

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

ADRIANA BEZERRA DOS SANTOS

**DIVERSIDADE RIZOBIANA EM SISTEMAS SILVIPASTORIS COM
LEGUMINOSAS ARBÓREAS E BRAQUIÁRIA**

**RECIFE
2017**

Adriana Bezerra dos Santos
Engenheira Agrônoma

**Diversidade rizobiana em sistemas silvipastoris com leguminosas arbóreas e
braquiária**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Ciências do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Ciências do Solo

Orientador: Prof. Dr. Mario de Andrade Lira Junior

Coorientadora: Prof.^a Dra. Giselle Gomes Monteiro Fracetto

Coorientador: Prof. Dr. Mario de Andrade Lira

**Recife
2017**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica

S237d Santos, Adriana Bezerra dos
Diversidade rizobiana em sistemas silvipastoris com
leguminosas arbóreas e braquiária / Adriana Bezerra dos
Santos. – 2017.
65 f.

Orientador: Mario de Andrade Lira Junior.
Coorientadora: Giselle Gomes Monteiro Fracetto.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Agronomia –
Ciências do Solo, Recife, BR-PE, 2017.
Inclui apêndice (s) e referências.

1. Fixação biológica de nitrogênio 2. Diazotrófica 3. Rizóbio
4. Nodulação 5. Densidade 6. *Bradyrhizobium* I. Lira Junior, Mario
de Andrade, orient. II. Fracetto, Giselle Gomes Monteiro,
coorient. III. Lira, Mario de Andrade coorient. IV. Título.

CDD 631.4

ADRIANA BEZERRA DOS SANTOS

Diversidade rizobiana em sistemas silvipastoris com leguminosas arbóreas e braquiária

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Ciências do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Ciências do Solo.

Aprovada em 07 de Agosto de 2017

Prof. Dr. Mario de Andrade Lira Junior

Orientador

Universidade Federal Rural de Pernambuco

BANCA EXAMINADORA

Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr. Eric Xavier de Carvalho

Pesquisador do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA)

Dedico esse trabalho a todas as pessoas que me fizeram chegar até aqui, em especial a meu pai José Bezerra (in memoriam) por todos ensinamentos e carinho, a minha querida mãe por todo apoio e amor, a minha irmã Maria Aparecida e ao meu namorado José Roberto.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer à Deus pela dádiva da vida, por me proporcionar saúde, sabedoria e força. Agradeço também pelas oportunidades que me tem concedido, por colocar tantas pessoas especiais na minha vida que tanto me ajudam e apoiam.

Ao meu orientador Prof. Dr. Mario de Andrade Lira Junior pela orientação, ética e confiança em transmitir seus conhecimentos.

Aos meus coorientadores Prof. Dr. Mario de Andrade Lira e a Prof.^a Dra. Giselle Gomes Monteiro Fracetto, por todo apoio, ensinamentos e confiança.

Ao Prof. Dr. Felipe José Cury Fracetto por todo o apoio para a realização deste trabalho.

Ao meu pai José Bezerra de Sá (*in memoriam*), pelos ensinamentos da vida, por me fazer ser o que sou. À minha mãe Maria Creuza dos Santos, fonte inigualável de amor e coragem. À Maria Aparecida em nome de todas as minhas irmãs, que é o meu exemplo de força, fé e vitória, e que soube compreender a minha ausência. Sou grata a toda minha família pelo imenso apoio e confiança.

Ao meu namorado e companheiro, José Roberto, que se fez presente em todos os momentos decisivos dessa etapa.

A Prof.^a Dra. Lindete Míria Vieira Martins por todo apoio, incentivo e ensinamentos.

À família que me acolheu tão bem aqui em Recife (Dona Ducarmo e Seu Eptácio).

Aos preciosos amigos, que sempre estiveram dispostos a me ajudar: Aleksandro Ferreira, Juscelia da Silva, Vinicius dos Santos, Mayame Brito, Emanuelle Maria, Juliet Emily, Aglair Alves, Leandro Reis, Thais Fernandes, Evaniely Costa, Rita de Cássia, Tiago de Oliveira, Felipe Martins, Petrônio, Abraão, Vanessa, Andressa, Pablo, Aline e Carina. Meu muito obrigada a todos. Sem o apoio de vocês não teria conseguido chegar até aqui!

A Socorro, por todo carinho.

A minha amiga Jane Fabrícia, por todo incentivo.

A Inês e Domênico por todo incentivo.

A todos os professores que contribuíram na construção do meu conhecimento.

Ao Dr. Jakson Leite e a Dra. Paula Rose de Almeida Ribeiro por serem sempre prestativos.

Aos membros da banca: Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas e Dr. Eric Xavier de Carvalho por aceitarem contribuir com este trabalho.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, pela oportunidade, acolhimento e condições concedidas para a realização do curso.

A todos, meu muito obrigado!

Diversidade rizobiana em sistemas silvipastoris com leguminosas arbóreas e braquiária

RESUMO

A presença de leguminosas pode influenciar na diversidade e no tamanho da comunidade rizobiana nativa do solo. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da leguminosa e sua distância em relação a diversidade rizobiana, em solo de pastagem de *Brachiaria decumbens* Stapf. sob sistema silvipastoril. O solo foi coletado em experimento instalado em Itambé-PE, com 3 tratamentos, constituídos por parcelas de 1 ha cada, sendo eles: Gliricídia + braquiária, Sabiá + braquiária e, braquiária em monocultivo, com 3 repetições. Nas parcelas com consórcio a amostragem foi feita dividindo-se a mesma em transectos no sentido do maior comprimento, ao longo do qual foram marcados pontos para obtenção da amostra composta de solo entre a fila dupla da leguminosa (0 m), e a partir desse ponto, a cada quatro metros (4m, 8m), coincidindo este último no centro da faixa de braquiária. Já nas parcelas com braquiária em monocultivo, a coleta foi realizada em três pontos aleatórios. A estimativa do número de rizóbios do solo, foi realizada pelo método de número mais provável em plantas, com três repetições, em casa-de-vegetação e utilizando o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) como planta isca. Sementes germinadas foram inoculadas com 1,0 ml das amostras de solo, após diluição serial (de 10^{-1} a 10^{-8}) e coletadas aos 35 dias. Foram utilizados 20 nódulos por tratamento para isolamento e caracterização fenotípica. Foi realizado agrupamento, com formação de grupos com 100% de similaridade, dos quais representantes aleatórios foram selecionados para avaliação da capacidade simbiótica conjuntamente com estirpes recomendadas para feijão-caupi, com um controle nitrogenado e outro absoluto. Foram analisadas as variáveis: massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), massa seca de nódulos secos (MSN), número de nódulo (NN), e eficiência relativa (ER). Para o sequenciamento foi utilizado o DNA amplificado dos isolados que apresentaram eficiência relativa, semelhante ou maior que as do controle referência. Foram encontradas populações rizobianas para caupi em todas as combinações de leguminosas e distâncias, bem como na pastagem de braquiária solteira. A diversidade morfológica das comunidades bacterianas diazotróficas mostrou-se alta. Foram encontradas diferenças significativas para número de nódulos, massa seca de raiz, massa seca de parte aérea e eficiência relativa. 51% dos isolados apresentaram eficiência relativa semelhantes, ou superiores aos controles positivos. A maioria dos isolados apresentou similaridade genética alcançando de 77% a 99% com linhagens de *Bradyrhizobium*. Portanto, conclui-se que a presença das leguminosas arbóreas Gliricídia e Sabiá sob sistema silvipastoril em pastagens de *B. decumbens* Stapf. não influenciam a densidade e diversidade de bactérias nodulíferas em feijão-caupi. E que as populações nativas de bactérias nodulíferas em feijão-caupi são eficientes em fixar nitrogênio e podem ser recomendadas para testes de eficiência agrônômica.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio. Diazotrófica. Rizóbio. Nodulação. Densidade. *Bradyrhizobium*.

Rizobian diversity in silvopastoral systems with tree legumes and brachiaria

ABSTRACT

The presence of legumes can influence the diversity and size of the native rhizobial community of the soil. In this context, the objective of this study was to evaluate the effect of the legume and its distance in relation to the rhizobia diversity, in pasture soil of *Brachiaria decumbens* Stapf. Under silvopastoral system. The soil was collected in an Itambé-PE experiment, with 3 treatments, consisting of 1 ha each, being: *Gliricidia* + braquiária, *Sabiá* + braquiária and, in monoculture, with 3 replicates. In the intercropped plots, sampling was done by dividing the same in transects in the direction of the longest length, along which points were scored to obtain the composite sample of soil between the double row of the legume (0 m), and from that plot Point, every four meters (4m, 8m), the latter coinciding in the center of the brachiaria. Already in the parcels with brachiaria in monoculture, the collection was carried out in three random points. The number of soil rhizobia was estimated using the most probable number method in plants, with three replications, in the greenhouse and using the cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) as bait plant. Germinated seeds were inoculated with 1.0 ml of soil samples after serial dilution (10^{-1} to 10^{-8}) and collected at 35 days. Twenty nodules per treatment were used for isolation and phenotypic characterization. Grouping with groups of 100% similarity was carried out. Random representatives were selected to evaluate the symbiotic capacity together with strains recommended for cowpea, with nitrogen and absolute control. The dry mass of dry nodules (MSN), number of nodules (NN), and relative efficiency (ER) were analyzed. For the sequencing, the amplified DNA of the isolates that showed relative efficiency, similar to or greater than the reference control, was used. Rhizobian populations were found for cowpea in all combinations of legumes and distances, as well as in single brachiaria pasture. The morphological diversity of diazotrophic bacterial communities was high. Significant differences were found for number of nodules, root dry mass, shoot dry mass and relative efficiency. 51% of the isolates showed similar or higher relative efficiency than the positive controls. Most of the isolates presented genetic similarity ranging from 77% to 99% with *Bradyrhizobium* strains. Therefore, it is concluded that the presence of the tree legumes *Gliricidia* and *Sabiá* under silvipastoral system in pastures of *B. decumbens* Stapf. Do not influence the density and diversity of noduliferous bacteria in cowpea. And that native populations of noduliferous bacteria in cowpea are efficient at fixing nitrogen and can be recommended for tests of agronomic efficiency.

Keywords: Biological nitrogen fixation. Diazotrophic. *Rhizobium*. Nodulation. Density. *Bradyrhizobium*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1**- Representação da parcela experimental e distribuição dos transectos para coleta de amostras de solo para avaliação da influência da leguminosa na diversidade rizobiana em sistemas silvipastoris na Zona da Mata de Pernambuco. (Imagem: FERREIRA, J.S., 2015).....30
- Figura 2** - Visão geral do experimento pelo método de Número Mais Provável em Plantas (NMPP) em casa de vegetação31
- Figura 3** - Caracterização morfológica de isolados obtidos de sistema silvipastoril, utilizando feijão-caupi como planta isca39
- Figura 4** - Hábito de crescimento, pH do meio e produção de muco de isolados bacterianos em meio de cultura YMA, em relação as espécies presentes no sistema silvipastoril.....41

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Características químicas do solo da área experimental.....31
- Tabela 2**- Comparação de médias pelo teste de Tukey e comparação entre grupos de médias por contrastes ortogonais para a característica de densidade rizobiana.38
- Tabela 3** - Comparação entre grupos de médias por contrastes ortogonais para as características de diversidade de bactérias rizobianas.....43
- Tabela 4** - Número de nódulos (NN) obtidos por feijão-caupi no ensaio de nodulação, massa seca de nódulos (MSN), massa seca de raiz (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA), eficiência relativa do controle nitrogenado (ERCN), eficiência relativa da testemunha absoluta (ERTA) e eficiência relativa do controle padrão (ERCP). Teste de Scott-Knott a 5% de significância.45
- Tabela 5** - Agrupamento das estirpes pela combinação leguminosa e distância. Número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), massa seca de raiz (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA), eficiência relativa do controle nitrogenado (ERCN), eficiência relativa do controle nitrogenado (ERCN), eficiência relativa da testemunha absoluta (ERTA) e eficiência relativa do controle padrão (ERCP). Teste de Tukey a 5% de significância.47
- Tabela 6** - Agrupamento das estirpes considerando só a distância. Número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), massa seca de raiz (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA), eficiência relativa do controle nitrogenado (ERCN), eficiência relativa da testemunha absoluta (ERTA) e eficiência relativa do controle padrão (ERCP). Teste de Tukey a 5% de significância.48
- Tabela 7** - Agrupamento das estirpes em função dos sistemas de pastagem. Número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), massa seca de raiz (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA), eficiência relativa do controle nitrogenado (ERCN), eficiência relativa da da testemunha absoluta (ERTA) e eficiência relativa do controle padrão (ERCP). Teste de Tukey a 5% de significância.....49
- Tabela 8** - Agrupamento das estirpes em função do tempo de crescimento, alteração de pH e produção de muco. Número de nódulos (NN), massa seca de

nódulos (MSN), massa seca de raiz (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA), eficiência relativa do controle nitrogenado (ERCN), eficiência relativa da testemunha absoluta (ERTA) e eficiência relativa do controle padrão (ERCP). Teste de Tukey a 5% de significância.50

Tabela 9 - Identidade e cobertura das sequências de rRNA 16S comparadas com outras sequências depositadas no GenBank (NCBI).52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Hipóteses	20
1.2 Objetivo Geral	20
1.3. Objetivos Específicos	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Sistema de Pastagens.....	21
2.2 Utilização de Leguminosas em Sistema Silvipastoril.....	22
2.3 Influência de leguminosas na comunidade microbiana do solo.....	23
2.4 Associação simbiótica rizóbio-leguminosa	23
2.5 Diversidade Rizobiana	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Localização e descrição das áreas	29
3.2 Amostragem e análise química do solo.....	29
3.3 Estimativa do número de rizóbios do solo por meio do Método de NMPP	31
(Número Mais Provável Em Plantas)	31
3.4 Isolamento, caracterização morfofisiológica e armazenamento dos isolados	33
3.5 Experimento de autenticação da nodulação.....	34
3.6 Diversidade genética dos isolados	35
3.6.1 Extração do DNA genômico total dos isolados.....	35
3.6.2 Amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA dos isolados	36
3.7 Análise estatística	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1 Ocorrência, caracterização morfofisiológica e diversidade das populações rizobianas.....	38
4.2 Autenticação e eficiência simbiótica relativa de isolados obtidos dos nódulos de feijão-caupi.....	44

4.3 Sequenciamento do gene 16S rRNA dos isolados bacterianos	50
5 CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
APÊNDICE A. Estimativa do número de células de bactérias que nodulam leguminosas por meio do método de número mais provável em plantas (NMPP)	63

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a maioria das terras agrícolas é ocupada por pastagens. No entanto, grande parte da área ocupada encontra-se em processo de degradação ou já degradadas devido ao manejo inadequado causado pelos sistemas extensivos de criação de gado, resultando em solos compactados, ácidos, de baixa fertilidade e disponibilidade de água. Diante da grande importância desse sistema para a criação bovina, faz-se necessário a adoção de práticas de manejo que visem a recuperação dessas áreas, mantendo a sustentabilidade tanto das pastagens quanto do solo.

Uma estratégia eficiente para a recuperação de áreas de pastagens degradadas é a adoção de sistema silvipastoril, caracterizado por integrar espécies florestais e criação de animais em uma mesma área simultaneamente ou escalonada no tempo. Se a espécie florestal utilizada for uma leguminosa, a vantagem é ainda maior pelo fato destas contribuírem com o aporte de N, um dos elementos mais requeridos pelas culturas.

A Leguminosae é uma família botânica constituída por diversas espécies capazes de se associar simbioticamente com bactérias fixadoras de nitrogênio (coletivamente chamadas de rizóbios). Esta característica torna o uso da maioria das espécies das famílias leguminosas altamente desejáveis, pois, em sistemas onde se utilizam espécies com comprovada capacidade de realizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN), a demanda por fertilizantes nitrogenados industrializados pode ser reduzida. A presença da nitrogenase (complexo enzimático constituinte das células dos diazotróficos) é que têm tornado possível a redução biológica do N_2 a NH_3 , desencadeando a FBN. A interação entre rizóbio-leguminosa é uma fonte importante de entrada de N no ecossistema terrestre.

As espécies de leguminosas influenciam na quantidade e qualidade dos exsudados, favorecendo ou não a presença de grupos de organismos na rizosfera. Os metabólitos lançados na rizosfera podem desencadear diferentes respostas nos micro-organismos do solo. Por exemplo, os flavonoides das plantas podem atrair simbiontes, como: *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Ensifer*, *Burkholderia*, *Microvirga*, dentre outros.

Dessa forma, a espécie vegetal pode influenciar na densidade e diversidade da comunidade microbiana do solo. Com isso, quanto maior for a diversidade vegetal,

maior será a diversidade dos compostos orgânicos excretados e, conseqüentemente, mais diversa será a comunidade microbiana quanto as exigências nutricionais.

1.1 Hipóteses

1. Leguminosas influenciam a diversidade da comunidade rizobiana do solo;
2. Quanto mais próximo da leguminosa, maior é a população rizobiana.

1.2 Objetivo Geral

Avaliar a influência de leguminosas arbóreas (Gliricídia e Sabiá) sobre a diversidade rizobiana em solo sob sistema silvipastoril.

1.3. Objetivos Específicos

1. Avaliar a população rizobiana em solo sob pastagem de *Brachiaria decumbens* Stapf. em sistema silvipastoril com leguminosas arbóreas;
2. Avaliar a diversidade fenotípica dos isolados obtidos de solo sob pastagem de *Brachiaria decumbens* Stapf. em sistema silvipastoril com leguminosas arbóreas;
3. Mensurar a eficiência relativa dos isolados autenticados;
4. Verificar a influência da leguminosa na comunidade rizobiana.
5. Identificar os isolados que apresentarem eficiência relativa semelhante, ou maior do que as estirpes recomendadas para a espécie de feijão-caupi.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sistema de Pastagens

A área total de pastagens (natural e plantada) no Brasil é de aproximadamente 172,3 milhões de hectares (DIAS-FILHO, 2014). Estima-se que, deste total, cerca de 30 milhões de hectares estão degradadas e precisam ser recuperados (ANUÁRIO BRASILEIRO DA PECUÁRIA, 2014). As pastagens desempenham papel fundamental na pecuária bovina brasileira, principalmente por garantir baixos custos de produção e, por ser a forma mais econômica e prática de produzir e oferecer alimentos para os bovinos (DIAS-FILHO, 2016).

No entanto, o manejo inadequado das áreas de pastagens e o uso sistemático de taxas de lotação que excedam a capacidade do pasto de se recuperar do pastejo e do pisoteio são uma das principais causas de degradação das pastagens (DIAS-FILHO, 2014). No Brasil, outras causas importantes da degradação são a ausência de adubações periódicas, falhas no estabelecimento da pastagem e problemas bióticos, como o ataque de insetos-praga (DIAS-FILHO, 2011).

Uma pastagem pode ser considerada degradada dentro de um universo relativamente amplo de condições. Os extremos dessas condições são conceitualmente denominados “degradação agrícola” (quando há um aumento na proporção de plantas daninhas na pastagem, diminuindo gradualmente a capacidade de suporte) e “degradação biológica” (o solo perde a capacidade de sustentar a produção vegetal de maneira significativa, levando à substituição da pastagem por plantas pouco exigentes em fertilidade do solo, ou simplesmente ao aparecimento de áreas desprovidas de vegetação) (DIAS-FILHO, 2011, 2014). A degradação de áreas de pastagem é um processo evolutivo de perda de vigor, rendimento e capacidade de recuperação natural, tornando a área incapaz de sustentar a produção de forragem e qualidade exigida pelos animais (ANDREOTTI et al., 2008).

Para retardar a degradação e recuperar pastagens já degradadas, têm-se buscado sistemas de manejo do solo, tais como aqueles que integram colheitas e gado para o propósito de recuperar ou manter a qualidade do solo (BONO et al., 2013). Uma alternativa é a utilização de sistemas silvipastoris (SSP), o qual é caracterizado pela combinação de cultivos florestais e criação de animais numa mesma área, de forma simultânea ou escalonada no tempo (AZAR, et al., 2013).

Os sistemas silvipastoris melhoram os atributos físicos e químicos do solo, reduzem os impactos ambientais inerentes aos sistemas de criação de gado convencionais, favorecem a restauração ecológica de pastagens degradadas, reduzem a dependência de insumos externos e melhoram o uso sustentável da terra (PEZARICO et al., 2013).

2.2 Utilização de Leguminosas em Sistema Silvipastoril

Leguminosae é a terceira maior família das angiospermas e abrange cerca de 770 gêneros e mais de 19.500 espécies (LEWIS et al., 2013; LPWG, 2013, 2017). O uso de leguminosas forrageiras em sistema silvipastoril têm contribuído com o aporte de elevadas quantidades de N aos sistemas de produção. Tal característica se deve a capacidade que as leguminosas têm de se associar simbioticamente com rizóbios (bactérias capazes de realizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN)).

Este tipo de simbiose tem proporcionado aumentos de produtividade tanto em culturas consorciadas quanto em sucessão (FÁVERO et al., 2008). O resultado é a redução nos custos de produção por haver menos demanda por fertilizantes nitrogenados industrializados e, conseqüentemente, redução dos impactos ambientais. Assim, o uso de leguminosas arbóreas (com comprovada capacidade de FBN), pode aumentar a sustentabilidade agrícola, por meio de restauração e manutenção da fertilidade do solo, combate à erosão e à desertificação, e fornecimento de energia (lenha) (MACHADO et al., 2012).

A inclusão de leguminosas arbóreas em sistemas silvipastoris pode ser considerada um dos caminhos para reduzir o problema de disponibilidade limitada de N na maioria dos solos brasileiros. Tal manejo diminuiria não apenas o processo de degradação de pastagens, mas também aumentaria o sequestro de carbono da atmosfera (BARCELLOS et al., 2008). Leguminosas como sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth.) e gliricídia [*Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud.] são exemplos de espécies forrageiras de reconhecido valor nutricional e de múltiplos usos (FREITAS, 2008; KREIBICH et al., 2006), e com reconhecida capacidade de se associarem simbioticamente com rizóbios.

O sabiá, assim como outras leguminosas, apresenta a característica de se associar simbioticamente a bactérias fixadoras de Nitrogênio. Sendo esta associação utilizada como ferramenta biológica capaz de minimizar o uso de fertilizantes químicos

e beneficiar o desenvolvimento da planta em ambientes com déficit nutricional (MENDES, et al., 2013). Já a Gliricídia, espécie resistente à seca, e vem sendo cultivada como fonte de forragem e lenha em propriedades rurais, têm grande capacidade de fixar nitrogênio atmosférico (BALA et al., 2003) e de produzir biomassa, em condições de baixa disponibilidade hídrica (PAULA et al., 2015). A incorporação da Gliricídia melhora a fertilidade do solo e aumenta a produtividade das culturas agrícolas associadas (BARRETO; FERNANDES, 2001).

2.3 Influência de leguminosas na comunidade microbiana do solo

As espécies de leguminosas podem influenciar na quantidade e qualidade dos exsudados radiculares, favorece ou não a presença de grupos de organismos na rizosfera. Estes exsudados são utilizados como fontes de carbono por micro-organismos do solo (PHILIPPOT et al., 2013).

A rizosfera é, desse modo, enriquecida seletivamente em alguns micro-organismos especiais que usam exsudatos de plantas específicos ou adaptados a ambientes altamente competitivos (YERGEAU et al. 2014). Assim, a diversidade da cobertura vegetal do solo poderá favorecer a diversidade microbiana, considerando que quanto maior a diversidade vegetal, maior será a diversidade dos compostos orgânicos excretados que, conseqüentemente, favorecerão o crescimento de organismos com exigências nutricionais mais diversas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Estudos mostram os efeitos específicos das espécies de plantas sobre a composição e a abundância relativa de populações microbianas na rizosfera (CHEN et al., 2008; ZAHRAN 2001; ZHOU et al., 2015; LI et al., 2016). No entanto, outros fatores que influenciam na presença e diversidade dos micro-organismos já foram comprovados.

2.4 Associação simbiótica rizóbio-leguminosa

A maioria das leguminosas são capazes de se associarem simbioticamente com rizóbios. A FBN é, por tanto, uma fonte importante de entrada de N nos ecossistemas terrestres (a principal em ecossistemas naturais).

O N é essencial para todos os organismos e, embora seja o mais abundante na atmosfera (na forma N₂) não é disponível para nenhum eucarioto, nem para a

maioria dos procariotos. Isso ocorre devido ao N₂ atmosférico possuir uma tripla ligação entre os dois átomos de N. Um passo fundamental para converter o N atmosférico relativamente inerte (N₂) em uma forma assimilável como a amônia (NH₃), é por meio do processo conhecido como FBN

A FBN é realizada por bactérias diazotróficas que possuem a enzima nitrogenase (complexo enzimático capaz de romper a tripla ligação existente entre os dois átomos de N₂) (TERPOLILLI, 2012). A ação da nitrogenase permite reduzir o N₂ a amônia (NH₃) (forma inorgânica disponível para plantas e outros organismos). Esse processo é semelhante ao realizado pela indústria na fabricação do N mineral. A diferença é que o N obtido através da FBN não polui o meio ambiente e é mais econômico para o produtor. Já o fornecimento de N mineral a uma cultura sob a forma de fertilizantes, como nitratos, representa um custo significativo tanto para o agricultor como para o ambiente.

Para que o estabelecimento da simbiose rizóbio-leguminosa seja eficaz, são necessárias várias etapas. A sinalização molecular entre o hospedeiro e bactérias no solo, por exemplo, é um dos fatores de grande importância para o sucesso da simbiose. Como exemplo dessa sinalização é possível citar a liberação de flavonoides e isoflavonoides pelas raízes das plantas, que induzem os genes de expressão da nodulação (NodABC). Estes genes, que codificam enzimas responsáveis pela biossíntese e secreção de fatores Nod (FN), são lipoquitoligossacarídeos (LCOs). Os genes de fixação de nitrogênio (*nif* e *fix*) incluem outros genes estruturais para a nitrogenase (*nifHDK*) (DIOUF et al., 2010, LARANJO et al., 2014).

Os rizóbios colonizam a rizosfera e multiplicam-se ao redor dos pelos radiculares. Esses microsimbiontes, por sua vez, colonizam o pelo radicular formando o cordão de infecção. Eles continuam multiplicando-se dando origem ao nódulo primário. O cordão de infecção libera bactérias nas células corticais do nódulo primário. Dentro de cada um deles, as bactérias liberadas diferenciam-se em bacteroides. Somente nesta forma, estes micro-organismos conseguem fazer a conversão do N₂ em NH₃ através da síntese da enzima nitrogenase e de outras proteínas. (SWAIN; ABHIJITA, 2013; HU; RIBBE, 2013; ECHAVARRI-ERASUN et al, 2014; GHOSH, 2016). A FBN é representada pela seguinte equação:



A enzima nitrogenase é um complexo enzimático composto por duas unidades básicas: uma de ferro-proteína (dinitrogenase redutase) que coleta a força redutora e

outra ferro-molibdênio (dinitrogenase) que coleta e reduz o substrato. Essa enzima é extremamente sensível ao oxigênio, o que leva os diazotróficos a desenvolverem mecanismos de proteção do sítio da nitrogenase, como: proteção respiratória, proteção conformacional, produção de polissacarídeos extracelulares, relação superfície/volume celular, formação de células especializadas, locomoção das células e (leg)-hemoglobina e nodulação. O mecanismo de proteção da (leg)-hemoglobina e nodulação é o mais evoluído dos mecanismos, ocorre nas simbioses de microsimbiontes fixadores de nitrogênio em algumas espécies de leguminosas. A (leg)-hemoglobina controla a concentração de oxigênio dentro do nódulo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A associação rizóbio-leguminosa é bem específica e é controlada principalmente pela planta hospedeira. Cada rizóbio tem sua gama definida de planta hospedeira (JANCZAREK et al., 2015). A capacidade dos rizóbios persistir na ausência de sua planta hospedeira é talvez mais dependente da sua capacidade de suportar um ambiente de fatores adversos. Sendo que, na simbiose o nódulo representa um ambiente protegido (WEAVER; HOLT 1990; WEAVER et al., 1985).

Os rizóbios estabelecem interações simbióticas com mais de 100 plantas leguminosas de importância agrícola, tais como: feijões (*Phaseolus* spp.), feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) e ervilhas (*Pisum* spp.) que são importantes para a nutrição humana, alfafa (*Medicago* spp.), trevo (*Trifolium* spp.), estilosantes (*Stylosanthes* spp.), amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*) e leucena (*Leucaena* spp.) como são fontes de alimentação animal, além da soja (*Glycine max*) que é importante para consumo humano e animal (JANCZAREK et al., 2015).

2.5 Diversidade Rizobiana

O estudo da diversidade rizobiana através das características fenotípicas representa o passo inicial para seleção de rizóbios eficientes. Essas características são influenciadas por condições edafo-climáticas específicas do local de origem (XAVIER, 2007).

De acordo com Martins et al. (2003), a população rizobiana do solo pode ser extremamente variável, tanto na composição quanto nas características simbióticas de uma espécie. Dentre as principais características morfológicas de uma espécie,

destacam-se o tempo de crescimento, o tamanho da colônia, a alteração do pH em meio de cultura e a produção de exopolissacarídeos (tipo, quantidade e composição).

A presença de uma determinada espécie de leguminosa no solo pode resultar no desenvolvimento de uma comunidade simbiótica específica (RODRIGUEZ-NAVARRO et al., 2000; CARELLI et al., 2000). Na ausência da planta hospedeira, os estresses ambientais e os efeitos tóxicos relacionados, podem diminuir significativamente a comunidade de rizóbios no solo (HUNGRIA; VARGAS, 2000; ANDRADE et al., 2002). Sendo assim, a interação entre estresses ambientais e a presença da leguminosa como hospedeiro pode influenciar a diversidade genética e a sobrevivência das comunidades de rizóbios no solo (GIONGO et al., 2008).

A diversidade rizobiana pode ser mensurada de diferentes formas, e são utilizados diversos índices de diversidade tais como: índice de dominância de Berger-Parker (ZAR, 1999); índice de riqueza de Margalef (1983); índice de riqueza de Shannon e Weaver (H) (SHANNON; WEAVER, 1949); índice de dominância de Simpson (1949), e de uniformidade (J') de Pielou (1977).

O índice de diversidade Berger-Parker tem sido utilizado para avaliar o domínio das espécies em uma comunidade. Compara as diferenças na abundância de espécies em comunidades dentro do mesmo ecossistema, onde a composição da comunidade pode ser relativamente constante, mas onde a abundância de indivíduos de cada espécie pode variar (INGRAM, 2008). A dominância é calculada pela seguinte equação:

$$d = \frac{N_{max}}{N_T}$$

Onde: N_{max} é o número de indivíduos da espécie mais abundante e N_T é o número total de indivíduos na amostra.

O índice de riqueza Margalef mede a riqueza de espécies e é altamente sensível ao tamanho da amostra, embora tente compensar efeitos de amostragem (MAGURRAN, 2004).

$$D = (S - 1) / \text{Log}N$$

Sendo: D = Diversidade; S = número de espécies presentes e N = número total de indivíduos encontrados (presente em todas as espécies).

O índice de diversidade mais popular é o de Shannon-Weaver H' , também conhecido como diversidade de Shannon-Weiner (TUOMISTO, 2012). Esse índice quantifica a variação entre os valores de abundância e é utilizado em diversos estudos

biológicos (STRONG, 2016). Pode ser considerado também como a interação entre riqueza (número de táxons ou espécies únicas) e uniformidade (distribuição de abundância) (SMITH; WILSON, 1996). A diversidade é calculada pela seguinte equação:

$$H' = \sum_{i=1}^n p_i \log_b p_i$$

Onde: H' = índice de diversidade de espécies de Shannon, p_i é a proporção da espécie em relação ao número total de espécies encontrados nos levantamentos realizados, $\log_b p_i$ = logaritmo na base 2 de p_i . Quanto menor o valor do índice de Shannon, menor o grau de incerteza e, portanto, a diversidade da amostra é baixa (URAMOTO; WALDER; ZUCCHI, 2005).

Outro índice conhecido é o de Simpson, que é igual a probabilidade de dois indivíduos selecionados ao acaso pertencerem a mesma espécie (TUOMISTO, 2012).

O índice de uniformidade (J') de Pielou quantifica quantas vezes a riqueza precisa ser multiplicado por si mesmo para a mesma diversidade (TUOMISTO, 2012). Pode ser calculada por meio da seguinte equação:

$$J = H' / \log(S),$$

Sendo: H' = Índice de Shannon e S = Riqueza

Diversos estudos tem avaliado a diversidade por meio dos índice de Shannon-Wiener (H); Índice de Simpson (D) e o índice de Pielou (J). Yan et al. (2016), avaliaram a diversidade de rizóbio, a riqueza e a uniformidade da espécie em diferentes locais de amostragem, por meio dos três índices, mostrando a dominância e a uniformidade de espécies, em uma comunidade. Cao et al. (2017), estimaram a diversidade da comunidade rizobiana pelo índice de Shannon-Weaver (H) e Índice de Simpson (D).

Vários gêneros de rizóbios já foram descritos: *Bradyrhizobium*, *Ochrobactrum*, *Devosia*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Phyllobacterium*, *Aminobacter*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Neorhizobium*, *Sinorhizobium/Ensifer*, *Shinella*, *Paraburkholderia* e *Cupriavidus* (HOWIESON; DILWORTH, 2016).

Com base na caracterização e diversidade genética novos estudos têm sido propostos (WOLDE-MESKEL et al., 2005; DIOUF et al., 2010; SHETTA et al., 2011). O isolamento e caracterização de novos rizóbios isolados de diferentes espécies de

leguminosas é um interessante campo de trabalho que ajuda a entender sua diversidade e evolução (RASUL ABDUL et al., 2012).

A diversidade genética pode ser determinada por técnicas moleculares, tais como sequência de DNA repetitivo (Elemento BOX) à base de reação em cadeia da polimerase PCR (BOX- PCR) e sequenciamento do gene 16S rRNA. Técnicas como estas são fortemente recomendadas pois os resultados são mais precisos em termos de identificação e avaliação da diversidade (GUIMARÃES, 2012). Estas técnicas permitem amplificar segmentos pequenos e específicos do DNA, pela qual se obtêm, “in vitro”, várias cópias de um segmento de DNA, previamente conhecido. Para a realização da amplificação da DNA, é necessário fazer, a extração do DNA, depois sua amplificação (PCR) com algum “primer” (oligonucleotídeo iniciador) em um termociclador (FUNGARO; VIEIRA, 1998). Comparações entre as sequências de nucleotídeos completas ou parciais do 16S rRNA têm sido amplamente utilizadas para avaliar relações filogenéticas entre muitas espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio (MOULIN et al., 2001; LIMA et al., 2009). Sendo assim, este trabalho poderá contribuir de maneira significativa para um melhor entendimento da influência que as leguminosas exercem sobre a diversidade rizobiana.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização e descrição das áreas

As amostras de solo foram coletadas em um experimento já estabelecido, em sistema silvipastoril pertencente a Estação Experimental do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), localizada no município de Itambé (7°25'S; 35°6'W, 190m). O experimento instalado foi conduzido em blocos ao acaso com três tratamentos e três repetições, em seis parcelas de 1 ha cada (43,5 x 230,0 m). O tratamento 1 é constituído de braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf.) + sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth), o tratamento 2 por braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf.) + gliricídia (*Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud.). Ambas implantadas em janeiro de 2011 em uma área experimental de 6 ha, com a escolha das áreas e a eliminação da vegetação existente por meio de roço manual, seguido de queima (GRACIANO, 2013; SILVA et al., 2013) e o tratamento 3 por braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf.), já estava estabelecido. As mudas das leguminosas foram produzidas em bandejas, e as sementes foram inoculadas com as estirpes recomendadas para as espécies (BRASIL, 2006): gliricídia SEMIA 6168 (BR8801), SEMIA 6435 (BR8802), ambas *Rhizobium* sp., e sabiá SEMIA 6382 (BR3405) e SEMIA 6410 (BR3451) *Burkholderia sabiae* e *Burkholderia* sp., respectivamente, obtidas junto ao Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE.

As leguminosas estão implantadas em 14 filas duplas, no espaçamento de 15,0 x 1,0 x 0,5 m, perfazendo, aproximadamente uma população de 2.500 plantas ha⁻¹, com plantio de *Brachiaria decumbens* nas faixas entre as fileiras duplas.

O clima, do tipo AS' na classificação de Köppen, é quente e úmido, com precipitação média de 1300 mm /ano, temperatura anual média de 24°C e umidade relativa média anual de 80% (CPRH, 2003). O solo predominante na estação experimental é classificado como ARGISSOLO VERMELHO-AMARELO segundo Jacomine et al. (1973) atualizado de acordo com EMBRAPA (2006).

3.2 Amostragem e análise química do solo

A coleta foi realizada em junho de 2016, dividindo-se cada parcela com os consórcios em três transectos no sentido do maior comprimento, ao longo dos quais

foram marcados pontos para obtenção de amostras simples nos seguintes pontos: entre a fila dupla da leguminosa (0 m), e a partir desse ponto, a cada quatro metros (4m e 8m), coincidindo este último, no centro da braquiária, formando amostras compostas dos três pontos dos transectos em cada parcela (0m; 4m; e 8m) (Figura 01). Já no monocultivo de braquiária foram selecionados três pontos para coleta de amostras simples que formaram amostras compostas da parcela. Em todos os tratamentos a profundidade de coleta foi de 20 cm, totalizando 21 amostras compostas. A caracterização química do solo foi realizada pelo Laboratório de Química ambiental de Solos da UFRPE (Tabela 01).

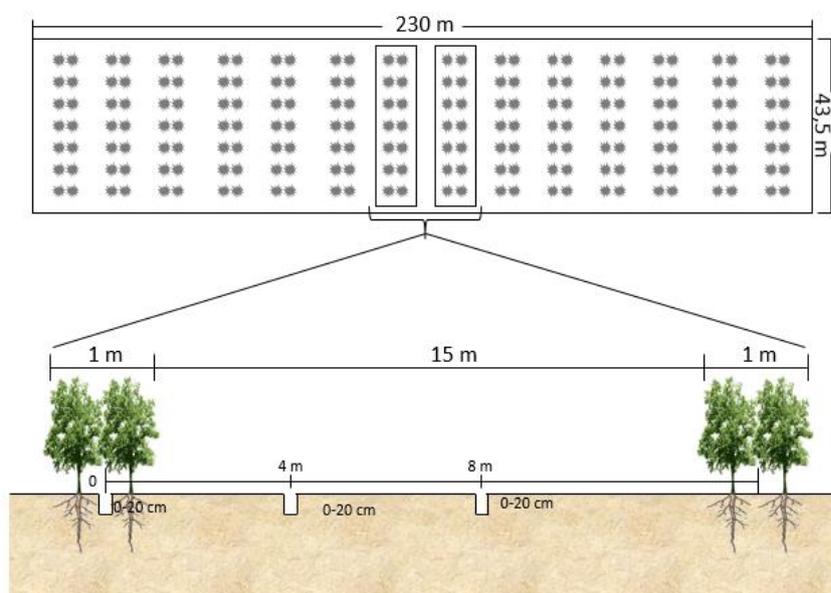


Figura 1- Representação da parcela experimental e distribuição dos transectos para coleta de amostras de solo para avaliação da influência da leguminosa na diversidade rizobiana em sistemas silvipastoris na Zona da Mata de Pernambuco. (Imagem: FERREIRA, J.S., 2015)

Tabela 1 - Características químicas do solo da área experimental

MONOCULTIVO BRAQUIÁRIA			pH (água)	Ca	Mg	Al	Na	K	P	H+Al
Tratamento	Distância/m	Profundidade/cm	1 : 2,5	cmol _c dm ⁻³					mg dm ⁻³	cmol _c dm ⁻³
Braquiária	=	0-20	5,6	3,70	2,00	0,17	0,04	0,19	9	6,48
BRAQUIÁRIA + GLIRÍCIDIA			pH (água)	Ca	Mg	Al	Na	K	P	H+Al
Tratamento	Distância/m	Profundidade/cm	1 : 2,5	cmol _c dm ⁻³					mg dm ⁻³	cmol _c dm ⁻³
B+G	0 m	0-20	5,2	4,43	1,17	0,41	0,06	0,23	9	7,60
B+G	4 m	0-20	5,5	4,68	1,90	0,15	0,08	0,30	7	6,75
B+G	8 m	0-20	5,6	4,60	2,43	0,20	0,05	0,24	6	6,48
BRAQUIÁRIA + SABIÁ			pH (água)	Ca	Mg	Al	Na	K	P	H+Al
Tratamento	Distância/m	Profundidade/cm	1 : 2,5	cmol _c dm ⁻³					mg dm ⁻³	cmol _c dm ⁻³
B+S	0 m	0-20	5,0	4,68	1,20	0,43	0,06	0,24	8	8,31
B+S	4 m	0-20	5,1	3,62	2,42	0,50	0,07	0,16	11	7,92
B+S	8 m	0-20	5,3	4,32	1,88	0,31	0,06	0,17	6	7,41

3.3 Estimativa do número de rizóbios do solo por meio do Método de NMPP (Número Mais Provável Em Plantas)

Para a estimativa do Número Mais Provável em Plantas (NMPP), o experimento foi conduzido em condições de casa de vegetação, nas dependências da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Figura 2).



Figura 2 - Visão geral do experimento pelo método de Número Mais Provável em Plantas (NMPP) em casa de vegetação

Utilizou-se como planta hospedeira o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) (cultivar IPA-206), o qual foi cultivado em garrafas recicláveis esterilizadas do tipo *long*

neck (350 mL). As garrafas foram preenchidas com uma solução de Hoagland e Arnon (1950), sem N e diluída 4 vezes. Colocou-se dentro de cada garrafa duas tiras de papel germitest de 1,8 cm de largura e comprimento correspondente à altura da mesma, servindo como suporte para o desenvolvimento das raízes das plantas e promovendo o contato entre a solução nutritiva e as sementes de feijão-caupi, que foi apoiada em uma pequena quantidade de algodão na boca da garrafa. Subsequentemente, todas as garrafas foram autoclavadas durante 40 min a 1,5 kg / cm² e 127 ° C. Sendo estas, revestidas com papel alumínio.

As sementes foram desinfestadas superficialmente com álcool a 70% durante 30 segundos, depois imersas em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% durante 3 minutos e lavadas oito vezes com água destilada esterilizada (ADE). Posteriormente foram colocadas para germinar em papel *germitest* esterilizado, humedecido e incubados a 28 ° C durante 2 dias.

O experimento foi constituído por 21 amostras compostas de solo, 8 diluições e 3 repetições, com delineamento em blocos inteiramente casualizados. Sendo, 168 inoculações com as diluições das amostras de solo, 2 controles positivos com as inoculações das estirpes de *Bradyrhizobium* spp. (BR 3267), (BR 3262) recomendadas para a espécie de feijão-caupi (BRASIL, 2011) e dois controles negativos não inoculados, um sem N e outro com N mineral (52,5 mg L⁻¹, respectivamente). O controle sem N mineral foi usado para testar a possibilidade de contaminação, enquanto que o controle com N mineral foi utilizado para determinar se as condições foram adequadas para o crescimento das plantas.

As amostras de solo foram submetidas a diluições em série. O procedimento foi realizado suspendendo 10 g de solo em 90 ml de solução fisiológica estéril (0,85% de NaCl) sob agitação durante 30 min a 125 rpm em agitador orbital, para a diluição 10⁻¹, e a realização de sete passos sucessivos de uma adição de 1,0 mL de alíquota de um tubo contendo 9,0 mL de solução fisiológica (diluições de 10⁻² a 10⁻⁸).

As plântulas foram transferidas para as garrafas contendo solução nutritiva e inoculadas com 1,0 mL de cada diluição (em série) da amostra de solo.

Após 35 dias de inoculação, as plantas foram coletadas e observou-se a presença ou ausência de nódulos, estimando-se o número de rizóbios no solo, por meio das tabelas apresentadas por Wooster et al. (1994). Cada planta é referida como positiva (sucesso) quando estão presentes um ou mais nódulos e negativa (insucesso) quando nenhum nódulo tinha sido formado.

3.4 Isolamento, caracterização morfofisiológica e armazenamento dos isolados

Após a retirada das plantas, foi realizada a lavagem das raízes com água corrente, os nódulos foram destacados, contados e armazenados em tubos com sílica gel. Para o isolamento, foram selecionados 20 nódulos aleatoriamente de cada tratamento (Gliricídia e Sabiá em cultivo consorciado de Braquiária e suas respectivas distâncias, e monocultivo de Braquiária). Inicialmente os nódulos foram desinfestados superficialmente em álcool etílico 70% por 30 segundos, e posteriormente em hipoclorito de sódio a 2,5% por 5 minutos, seguido de 10 lavagens em água destilada estéril (ADE) (VINCENT, 1970), para retirada do excesso de hipoclorito.

Após a desinfestação, os nódulos foram macerados com o auxílio de uma pinça devidamente esterilizada e riscados com alça de platina em placas de Petri com meio de cultura YMA (levedura-manitol-ágar) (VINCENT, 1970), com adição de vermelho congo (0,25% em 0,2N de KOH). As placas foram incubadas em câmara de crescimento tipo BOD e depois ocorreu sucessivas repicagens em placas contendo meio de cultura YMA, com indicador azul de bromotimol (0,5% em 0,2N de KOH), até a obtenção de colônias puras.

A caracterização dos isolados sucedeu-se a partir da obtenção dos isolados puros, com base no tempo de crescimento, para aparecimento de colônias isoladas (rápida: até 3 dias; intermediária: 4 a 5 dias; lenta: 6 a 10 dias e muito lenta: mais de 10 dias); alteração do pH (ácido, neutro e alcalino); quantidade de muco (pouco ou muito); tamanho (<1, 1 a 2 mm e > 2 mm) e cor das colônias (amarela, branca, rósea e creme).

Depois de caracterizados, iniciou-se o processo de estocagem dos isolados em tubos de polipropileno contendo meio YM com glicerina a 25% e armazenados em freezer. Os isolados que apresentarem as mesmas características morfofisiológicas foram unidos em grupos com 100% de similaridade em cada distância e espécie. Uma matriz binária (1 – positivo e 0 – negativo) foi construída a partir das características culturais e os isolados foram agrupados pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Analysis*), com base no Índice de Jaccard, utilizando o programa de software de estatística (PAST) (HAMMER et al., 2001). Foram construídos dendogramas de agrupamentos de todos os isolados encontrados, para as diferentes distâncias e para cada espécie com a finalidade de diagnosticar as semelhanças morfofisiológicas entre os isolados encontrados nesse experimento. Para a estimativa da diversidade foi

calculado o índice de diversidade de Shannon e Weaver (H) (SHANNON; WEAVER 1949), índice de dominância de Simpson, 1949 e índice de equitabilidade (J) de Pielou, 1977.

3.5 Experimento de autenticação da nodulação

Para avaliar a capacidade nodulífera e a eficiência simbiótica relativa de isolados obtidos dos nódulos de feijão-caupi, foi conduzido um experimento em casa de vegetação, nas dependências da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

O experimento foi composto por 73 tratamentos com três repetições, em delineamento em blocos casualizados. Sendo, 69 com inoculações dos isolados bacterianos selecionados aleatoriamente do agrupamento geral com 100% de similaridade, dois controles positivos com as inoculações das estirpes de *Bradyrhizobium spp.* recomendadas para a espécie feijão-caupi BR 3267 (SEMIA 6462) e BR 3262 (SEMIA 6464) (BRASIL, 2011), um controle nitrogenado (aplicação de 50 kg ha⁻¹ de N) e um controle absoluto (isento de N e sem inoculação).

O plantio foi em copos descartáveis com capacidade para 200 mL, preenchidos com areia e vermiculita autoclavada (pressão de 1,0 atm e temperatura de 120°C por 1 hora, durante dois dias consecutivos) na proporção de 2:1 (v:v). As sementes foram desinfestadas superficialmente em álcool (70%, por 30 segundos) e hipoclorito de sódio (2,5%, por 3 minutos), sendo em seguida lavadas 10 vezes em ADE. Foram semeadas três sementes por vaso. Após a emergência as plantas foram desbastadas, permanecendo apenas uma planta por vaso. Para o preparo do inoculante, as bactérias foram repicadas em placas de Petri em meio YMA, para garantir a viabilidade do inóculo. Após o crescimento das colônias, foi retirada uma pequena quantidade de muco utilizando-se uma alça de platina e inoculada em 2 mL de meio YM líquido em tubos de penicilina (VINCENT, 1970).

As bactérias foram cultivadas sob agitação orbital a 150 rotações por minuto (rpm) por três dias, para culturas de crescimento rápido, e cinco dias, para culturas de crescimento lento à temperatura ambiente. A inoculação foi realizada três dias após o plantio, utilizando-se 2 mL de meio YM líquido por semente, contendo as estirpes na fase *log* de seu crescimento. O fornecimento de nutrientes às plantas foi realizado a cada três dias com 30mL de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) sem N. Sempre que necessário, a irrigação foi realizada com água destilada estéril.

As plantas foram colhidas aos 35 dias após inoculação. A parte aérea das plantas e o sistema radicular foram cortados e acondicionados em sacos de papel, sendo posteriormente colocadas em estufa a 65°C por 72 horas para a avaliação da massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR). As raízes foram lavadas e os nódulos, contados e acondicionados em estufa para obtenção de sua massa seca.

A eficiência relativa (ER) foi calculada pela divisão da matéria seca da parte aérea dos tratamentos inoculados, pela massa seca da parte aérea do tratamento nitrogenado com 50 kg ha⁻¹ de N de acordo com a seguinte equação:

$$ER = \left(\frac{\text{MSPA de cada tratamento}}{\text{MSPA do tratamento nitrogenado}} \right) \times 100$$

Foram analisados os dados das variáveis: Massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), massa seca de nódulos (MNS), número de nódulo (NN) e eficiência relativa (ER). A análise estatística foi realizada com o programa SAS.

3.6 Diversidade genética dos isolados

3.6.1 Extração do DNA genômico total dos isolados

A partir do experimento de autenticação, foi selecionado 36 isolados, os quais apresentaram eficiência relativa semelhantes e maiores que as estirpes padrões.

O DNA genômico total bacteriano foi extraído por meio do método de quebra celular, “*bead beating*” que consiste em: lise da célula, extração e concentração dos ácidos nucleicos, precipitação de impurezas e purificação.

Sendo assim, suspendeu-se uma pequena quantidade de muco, utilizando uma alça de platina, em microtubos com 500 µL de tampão TE (10 mM tris HCl, mM EDTA, pH 8,0). A lise das células foi realizada em 10 µL solução dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% e 0,1 g (2 pérolas) de vidro. As células foram agitadas por 15 min. no vórtex, e após esse período foram adicionados 500 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico na proporção 25:24:1 e centrifugado a 12000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e pegou a primeira fase com a pipeta.

Foram adicionados 40 µL de acetato de sódio 5 M pH 5,0 e 400 µL de isopropanol gelado. Colocou novamente para centrifugar a 12000 rpm a 5 min. e descartou o sobrenadante. Foi adicionado 500 µL de etanol 70% gelado e centrifugou a 12000 rpm por 2 min. e o sobrenadante foi descartado com a pipeta e colocou para secar a temperatura ambiente. Após este procedimento, foi adicionado 50 µL de água esterilizada e armazenado a -20 °C.

A quantidade e qualidade de DNA de cada amostra foram verificados em eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão TAE 1X (400 mM Tris; 20 mM ácido acético glacial; 1 mM EDTA).

3.6.2 Amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA dos isolados

Para a amplificação parcial do gene 16S rRNA, foram utilizados os Iniciadores 27F (AGAGTTTGACCTGGCTCAG) e 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) (LANE, 1991). A reação de amplificação com um volume final de 50 µL constituiu na seguinte reação: 2 µL de DNA, 1,5 µL de MgCl₂, 5,0 µL tampão 10X para PCR, 1,0µL dNTP's, 2,0 µL de cada primer (27F e 1492R), 0,6 µL de Taq DNA Polimerase e água Mili-Q para completar a reação. A reação de amplificação foi realizada em termociclador, nas seguintes condições: desnaturação inicial de 94 °C, por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação (94 °C, por 40 segundos), anelamento (55 °C, por 40 segundos), extensão (72 °C, por 1 minuto e 30 segundos) e uma extensão final de 72 °C, por 7 minutos. Os produtos amplificados foram avaliados em gel de agarose 1% e visualizados sob luz UV.

Os produtos de PCR foram enviados para o Laboratório da Macrogen (Coreia), para purificação e sequenciamento. As sequências obtidas foram comparadas ao banco de dados do NCBI.

Para a realização do alinhamento pelo programa Clustal W (Thompson et al., 1994), foram obtidas sequências similares no GenBank (NCBI). As sequências alinhadas foram utilizadas para análise filogenética pelo método Neighbour-Joining, usando Kimura-2 parâmetros (KIMURA, 1980) pelo programa MEGA 6 (TAMURA et al., 2013), aplicando um bootstrap com um mínimo de 1.000 replicações.

3.7 Análise estatística

Os dados de densidade e diversidade rizobiana foram submetidos à análise de variância e foram realizados contrastes ortogonais pelo teste F a 10% de significância por meio do programa estatístico SAS. A utilização de contrastes ortogonais possibilita um maior grau de detalhamento na análise de dados, representando uma alternativa eficiente para se estimar os efeitos de interesse (CORRENTE et al., 2001).

Os contrastes utilizados neste estudo corresponderam às comparações: Leguminosas - (Gliricídia e Sabiá) vs Braquiária - (plantas de Braquiária em cultivo exclusivo); distância 0 (faixa da leguminosa) vs fora da faixa (distância em relação a leguminosa); distância 0 (faixa da leguminosa) vs distância 4 (distância próximo da leguminosa); fora da faixa (distância em relação a leguminosa) vs Braquiária - (plantas de Braquiária em cultivo exclusivo); distância 0 - (faixa da leguminosa) vs Braquiária - (plantas de Braquiária em cultivo exclusivo); Sabiá - (plantas de Sabiá em consórcio com Braquiária) vs Gliricídia - (plantas de Gliricídia em consórcio com Braquiária).

Para os dados de número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), massa seca de raiz (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA) e eficiência relativa (ER) foram aplicados o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade por meio do programa estatístico SISVAR.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ocorrência, caracterização morfofisiológica e diversidade das populações rizobianas

Foram encontradas populações rizobianas para caupi em todas as combinações de leguminosas e distâncias, bem como na pastagem de braquiária solteira, com 8 a 50 nódulos por diluição (Apendice A).

A densidade populacional variou de $5,7 \times 10^4$ a $1,5 \times 10^6$ células por grama de solo, sem efeito significativo da cobertura vegetal e suas distâncias (Tabela 2), o que pode estar relacionado ao sistema silvipastoril estar implantado desde 2011. Neste período, tem ocorrido o acúmulo de serrapilheira na área e decomposição do material depositado, como mostrado no trabalho de Silva (2015), o que pode ter beneficiado a microbiota do solo devido ao aporte considerável de nutrientes. As excretas do gado presente na área, que libera vários nutrientes durante sua decomposição, também tem efeito positivo na microbiota conforme relatado no trabalho de Lima et al. (2016).

Tabela 2- Comparação de médias pelo teste de Tukey e comparação entre grupos de médias por contrastes ortogonais para a característica de densidade rizobiana

Tratamentos	NMPP	Média	NMPP
	(Cel. g de solo ⁻¹)	Contraste	(Cel. g de solo ⁻¹)
Braquiária	$6,81 \times 10^4$	Leguminosas vs Braquiária	$2,89 \times 10^6$ ^{0,47}
Gliricídia 0	$5,74 \times 10^5$	Distância 0 vs Fora da faixa	$1,20 \times 10^5$ ^{0,92}
Gliricídia 4	$6,04 \times 10^5$	Distância 0 vs Distância 4	$-1,52 \times 10^6$ ^{0,23}
Gliricídia 8	$3,93 \times 10^5$	Fora da faixa vs Braquiária	$3,76 \times 10^5$ ^{0,80}
Sabiá 0	$5,79 \times 10^4$	Distância 0 vs Braquiária	$4,96 \times 10^5$ ^{0,74}
Sabiá 4	$1,55 \times 10^6$	Sabiá vs Gliricídia	$1,57 \times 10^5$ ^{0,91}
Sabiá 8	$1,19 \times 10^5$		

Braquiária - plantas de Braquiária em cultivo exclusivo, **Gliricídia 0**- plantas de Gliricidia na distância 0, **Gliricídia 4**- Gliricídia na distância 4, **Gliricídia 8**- Gliricídia na distância 8, **Sabiá 0**- plantas de Sabiá na distância 0, **Sabiá 4**- Sabiá na distância 4, **Sabiá 8**- Sabiá na distância 8. **Leguminosas** - (Gliricídia e Sabiá); **distância 0** - (faixa da leguminosa); **fora da faixa** (distância em relação a leguminosa); **distância 4** (distância próximo da leguminosa); **Sabiá** - (plantas de Sabiá em consórcio com Braquiária); **Gliricídia** - (plantas de Gliricídia em consórcio com Braquiária). A 10% de probabilidade

Foram obtidos 431 isolados dos quais 35% apresentaram crescimento rápido, 33% intermediário, 21% lento e 10% muito lento. Com relação a alteração de pH, 11%

dos isolados alcalinizaram o meio de cultura. Bactérias com capacidade de alcalinizar o meio de cultura e de crescimento lento estão associadas ao gênero *Bradyrhizobium*. As estirpes de *Bradyrhizobium* têm alta capacidade de superar o antagonismo de outros microorganismos do solo (GUIMARÃES et al., 2015). 53% dos isolados não alteraram o pH do meio e 36% alteraram para ácido. Isolados que geralmente acidificam o meio de cultura, apresentam características morfofisiológicas de *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Ensifer*. Com relação à cor da colônia, foram obtidas bactérias de coloração branca (14%), incolor (0,9%), amarela (24%), creme (60%) e rósea (1%). Quanto a produção de muco, houve um predomínio de bactérias com capacidade de produzir pouco à moderado (44 e 32%), respectivamente (Figura 3).

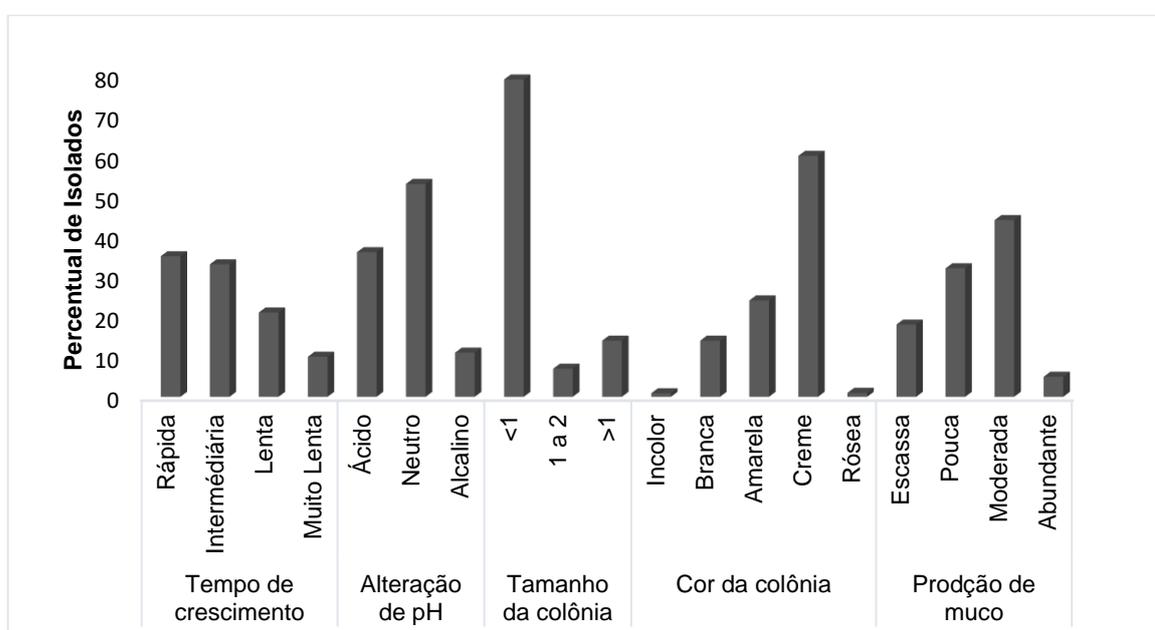


Figura 3 - Caracterização morfológica de isolados obtidos de sistema silvipastoril, utilizando feijão-caupi como planta isca

Para as espécies de sabiá e gliricídia e as suas respectivas distâncias em relação a linha de plantio cada uma delas, observou-se que em enquanto para Gliricídia + Braquiária (G+B), na distância zero, ocorreu um predomínio de isolados de crescimento intermediário que não alteraram o pH do meio, e com moderada produção de muco, na na distância 4 (D4), houve um maior predomínio de isolados de crescimento lento (33%), pH neutro e pouca produção de muco e na distância 8 (D8) verificou-se um predomínio de isolados de crescimento rápido, que não alteraram o pH do meio e com moderada produção de muco (Figura 4).

Com relação a Sabiá + Braquiária (S+B) em D0, ocorreu um maior percentual de isolados de crescimento rápido, que alteraram o pH do meio para ácido e com moderada produção de muco. A maioria dos isolados em (S+B) D4 foram de crescimento intermediário, não alteraram o pH e tiveram pouca produção de muco. Na D8 observou-se que a maioria dos isolados de crescimento rápido, neutros e de moderada produção de muco assemelharam-se aos resultados obtidos para (G+B) em D8 (Figura 4).

No cultivo exclusivo de braquiária, a maioria dos isolados foram de crescimento intermediário, não alteraram o pH do meio e a maioria apresentaram de pouco a moderada produção de muco (Figura 4).

O estudo das características morfofisiológicas tem sido utilizada para a seleção de estirpes para testes de autenticação, eficiência simbiótica e análises moleculares, uma vez que se torna limitante trabalhar com todos os isolados obtidos dos nódulos das leguminosas em ensaios (JARAMILLO et al., 2013).

O agrupamento com todos os isolados revelou a formação de 69 grupos distintos em um coeficiente de similaridade de 100% (Figura 5) e demonstrou alta diversidade das bactérias presentes no sistema silvipastoril.

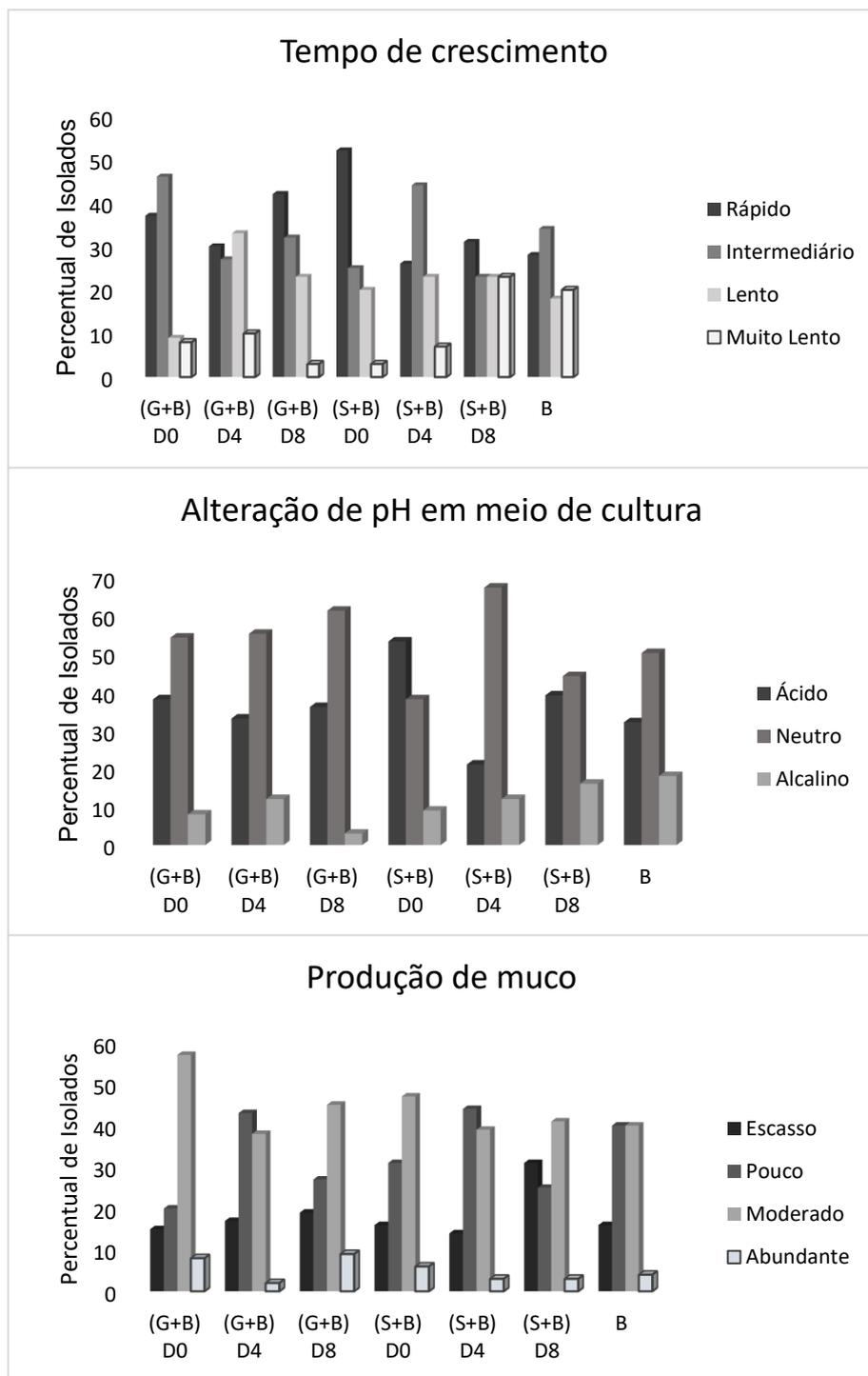


Figura 4 - Hábito de crescimento, pH do meio e produção de muco de isolados bacterianos em meio de cultura YMA, em relação as espécies presentes no sistema silvipastoril

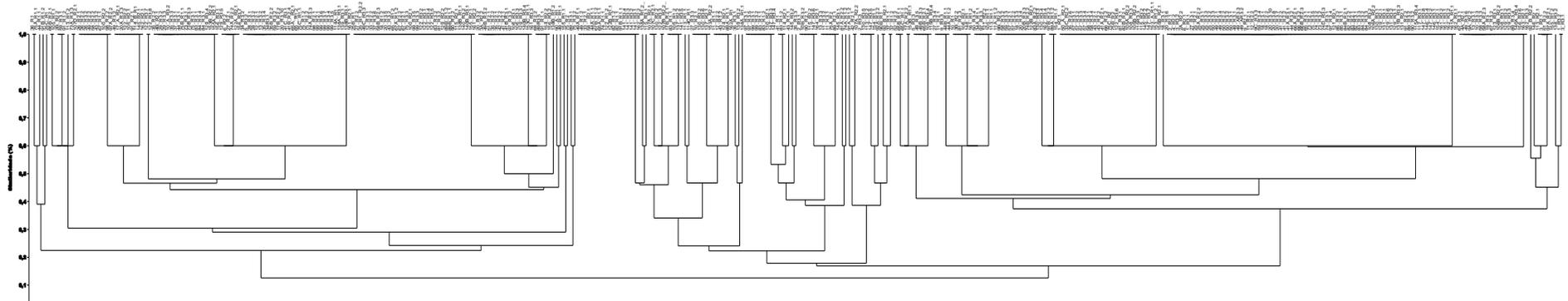


Figura 5 - Dendrograma de similaridade entre todas as bactérias isolados dos nódulos de feijão-caupi, com base em características morfofisiológicas

Com relação aos índices de diversidade, utilizando médias de contraste ortogonal, foi verificado efeito significativo da espécie leguminosa na diversidade de bactérias diazotróficas, já que o índice de Pielou mostrou diferença significativa do sabiá em relação a espécie de gliricídia, com esta apresentando maior dominância quando comparada aos isolados obtidos com cultivo de Sabiá. O índice de Pielou também mostrou influência da distância das leguminosas em relação a faixa (Tabela 3).

Um fator que pode ter influenciado a maior diversidade de bactérias de nódulos de feijão-caupi nativas de solo sob o consórcio de sabiá mais braquiária, pode ser a dispersão das sementes de sabiá que ocorre na área. Foi observado na área a presença de muitas mudas de sabiá em pontos fora da faixa sob a leguminosa, o que já foi constatado como favorável ao aumento da diversidade e a sobrevivência das comunidades de rizóbios no solo (GIONGO et al., 2008). Este resultado corrobora os resultados encontrados por Jaramillo et al. (2013).

Tabela 3 - Comparação entre grupos de médias por contrastes ortogonais para as características de diversidade de bactérias rizobianas

Média Contrastes	Isolados	Grupos	Shannon	Simpson	Margalef	Pielou
Leguminosas vs Braquiária	26,0 ^{0,01}	5,66 ^{0,54}	-0,01 ^{0,90}	0,01 ^{0,90}	0,07 ^{0,98}	-0,08 ^{0,49}
Distância 0 vs Fora da faixa	1,33 ^{0,65}	-1,33 ^{0,64}	-0,05 ^{0,17}	0,05 ^{0,17}	-0,51 ^{0,59}	-0,07 ^{0,06}
Distância 0 vs Distância 4	0,66 ^{0,82}	3,66 ^{0,21}	0,05 ^{0,20}	-0,05 ^{0,20}	1,27 ^{0,19}	0,03 ^{0,35}
Fora da faixa vs Braquiária	8,00 ^{0,04}	4,00 ^{0,27}	0,04 ^{0,31}	-0,04 ^{0,31}	0,79 ^{0,50}	0,03 ^{0,46}
Distância 0 vs Braquiária	9,33 ^{0,02}	2,66 ^{0,45}	-0,00 ^{0,89}	0,00 ^{0,89}	0,27 ^{0,81}	-0,04 ^{0,37}
Sabiá vs Gliricídia	-0,66 ^{0,85}	3,66 ^{0,31}	0,07 ^{0,14}	-0,07 ^{0,14}	1,21 ^{0,31}	0,09 ^{0,06}

Braquiária - plantas de Braquiária em cultivo exclusivo, **Gliricídia 0**- plantas de Gliricídia na distância 0, **Gliricídia 4**- Gliricídia na distância 4, **Gliricídia 8**- Gliricídia na distância 8, **Sabiá 0**- plantas de Sabiá na distância 0, **Sabiá 4**- Sabiá na distância 4, **Sabiá 8**- Sabiá na distância 8. **Leguminosas** - (Gliricídia e Sabiá); **distância 0** - (faixa da leguminosa); **fora da faixa** (distância em relação a leguminosa); **distância 4** (distância próximo da leguminosa); **Sabiá** - (plantas de Sabiá em consórcio com Braquiária); **Gliricídia** - (plantas de Gliricídia em consórcio com Braquiária). A 10% de probabilidade

4.2 Autenticação e eficiência simbiótica relativa de isolados obtidos dos nódulos de feijão-caupi

Entre os 69 isolados avaliados, 60 foram capazes de nodular e fixar nitrogênio para o feijão-caupi (Tabela 4). A planta inoculada com o isolado 43 R1.1 apresentou o maior número de nódulos (NN), 86 nódulos em média por planta, seguido por 65A R1.1 o qual apresentou em média 78 nódulos (Tabela 4) Ainda, quanto ao número de nódulo, 45 isolados não diferiram dos tratamentos inoculados com a BR 3267 e BR 3262.

Vários estudos têm mostrado a presença de endofíticos não simbióticos em nódulos de leguminosas como De Meyer et al. (2015), em estudo com endófitos de nódulos radiculares isolados de várias plantas de leguminosas indígenas e exóticas na Bélgica, observaram que a maioria dos nódulos investigados continha espécies de *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Pseudomonas*, juntamente com um pequeno número de outros gêneros bacterianos das classes Actinobacteria, Alpha e Betaproteobacteria. Aserse et al. (2013), confirmaram em seus estudos que bactérias endofíticas coexistem com simbióticas nos mesmos nódulos, o que pode explicar a não nodulação de alguns isolados. Endofíticos podem crescer mais rapidamente que os simbioss ocupando o meio de cultivo, não permitindo a observação de outros isolado, resultando assim no isolamento e re-inoculação de um não simbiote (ASERSE et al., 2013).

Para MSN não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos que nodularam (Tabela 4), ao passo que foram encontradas diferenças significativas para as variáveis massa seca de raiz, massa seca de parte aérea e eficiência relativa. Estes resultados corroboram os dados de Costa et al. 2014, que também observaram influência dos tratamentos no desempenho do feijão-caupi.

Para produção de massa seca da parte aérea, 43 isolados proporcionaram maiores produções de massa seca de parte aérea (Tabela 4), mas não foram significativamente diferentes das estirpes referência e do controle nitrogenado.

Com relação a eficiência relativa, 36 isolados foram semelhantes ou superiores aos controles positivos (BR 3262 e BR3267), sendo que os isolados 35 R3.3, 43 R1.1, 97A R2.1, 83 R1.1, 114C R1, 145 R3.1, 147 R3.3 apresentaram média superior a BR 3262, mostrando uma alta eficiência desses isolados. Os isolados autenticados apresentaram eficiência simbiótica variável, corroborando Jaramillo et al. (2013).

Tabela 4 - Número de nódulos (NN) obtidos por feijão-caupi no ensaio de nodulação, massa seca de nódulos (MSN), massa seca de raiz (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA), eficiência relativa do controle nitrogenado (ERCN), eficiência relativa da testemunha absoluta (ERTA) e eficiência relativa do controle padrão (ERCP). Teste de Scott-Knott a 5% de significância

Tratamentos	NN	MSN (mg)	MSR (g)	MSPA (g)	ERCN (%)	ERTA (%)	ERCP (%)
25C R1	0,00 c	00 a	0,30 a	0,46 b	128,97 c	209,09 c	51,22 c
2B R2.2	39,66 a	40 a	0,14 b	0,55 b	211,33 a	250,00 b	61,24 b
49 R2.2	0,00 c	00 a	0,22 b	0,19 c	55,13 c	89,39 c	21,90 c
51 R2.2	49,00 a	50 a	0,16 b	0,96 a	271,03 a	439,39 a	107,64 a
51 R2 1	16,00 b	20 a	0,33 a	0,41 c	113,08 c	189,39 c	46,40 c
49B R1.1	0,00 c	00 a	0,33 a	0,27 c	77,57 c	125,75 c	30,81 c
49 R3.6	17,00 b	30 a	0,18 b	0,42 c	119,62 c	193,94 c	47,51 c
1 R3.2	50,00 a	50 a	0,22 b	0,91 a	256,07 a	415,15 a	101,71 a
36 R1	54,00 a	80 a	0,25 b	0,81 a	227,10 a	368,18 a	90,20 a
12 R2.1	31,00 b	30 a	0,18 b	0,69 a	194,39 a	315,15 a	77,21 a
33 R2.2	25,00 b	40 a	0,30 a	0,63 b	178,50 b	289,39 b	70,90 b
10 R2.1	35,66 a	70 a	0,19 b	0,77 a	216,82 a	351,51 a	86,11 a
35 R3.1	52,66 a	50 a	0,27 a	0,86 a	241,12 a	390,91 a	95,77 a
35 R3.3	66,66 a	70 a	0,33 a	1,06 a	297,19 a	481,81 a	118,04 a
37 R1.1	53,33 a	50 a	0,35 a	0,70 a	197,19 a	319,69 a	78,32 a
11 R2.1	0,00 c	00 a	0,27 a	0,48 b	135,51 b	219,70 b	53,82 b
58 R3.2	62,66 a	90 a	0,26 a	0,82 a	230,84 a	374,24 a	91,68 a
57 R3.1	61,33 a	70 a	0,22 b	0,94 a	263,55 a	427,27 a	104,67 a
11 R3.2	56,33 a	70 a	0,28 a	0,86 a	242,05 a	392,42 a	96,14 a
44 R1.1	62,00 a	60 a	0,30 a	1,01 a	284,11 a	460,60 a	112,84 a
17A R2.1	0,00 c	00 a	0,19 b	0,44 b	125,23 c	203,03 c	49,74 c
44A R1.1	49,33 a	40 a	0,13 b	0,60 b	170,09 b	275,75 b	67,56 b
65A R1.1	78,33 a	70 a	0,42 a	0,91 a	257,01 a	416,66 a	102,08 a
43 R1.1	86,00 a	70 a	0,24 b	1,20 a	338,31 a	548,48 a	134,37 a
42 R2.1	64,66 a	280 a	0,37 a	1,04 a	291,59 a	472,72 a	115,81 a
65B R1.1	0,00 c	00 a	0,31 a	0,36 c	100,93 c	163,63 c	40,08 c
17A R2.2	66,00 a	50 a	0,23 b	0,86 a	242,99 a	393,93 a	96,51 a
18 R3.1	29,33 b	50 a	0,18 b	0,60 b	168,22 b	272,72 b	66,81 b
122 R3.7	11,66 b	60 a	0,24 b	0,51 b	143,92 b	233,33 b	57,16 b
75 R2.2	61,33 a	40 a	0,26 a	0,80 a	224,30 a	363,63 a	89,08 a
75 R3.2	0,00 c	00 a	0,34 a	0,34 c	96,26 c	156,06 c	38,23 c
124 R2.1	58,66 a	60 a	0,22 b	0,90 a	253,27 a	410,60 a	100,59 a
74A R1.2	0,00 c	00 a	0,16 b	0,37 c	104,67 c	169,69 c	41,57 c
97 R3.3	51,33 a	50 a	0,22 b	0,86 a	242,05 a	392,42 a	96,14 a
97A R2.1	57,33 a	70 a	0,30 a	1,15 a	323,36 a	524,24 a	128,43 a
105 R1.1	15,33 b	40 a	0,22 b	0,55 b	156,07 b	253,03 b	61,98 b
107D R2.1	46,00 a	50 a	0,21 b	0,64 b	180,37 b	292,42 b	71,64 b
130 R2.2	0,00 c	00 a	0,35 a	0,33 c	92,52 c	150,00 c	36,74 c

Tratamentos	NN	MSN (mg)	MSR (g)	MSPA (g)	ERCN (%)	Continuação Tabela 4	
						ERTA (%)	ERCP (%)
107B R2.2	21,66 b	50 a	0,19 b	0,60 b	169,16 b	274,24 b	67,18 b
83 R1.1	58,66 a	70 a	0,32 a	1,06 a	299,06 a	484,84 a	118,78 a
81A R2.2	63,00 a	80 a	0,29 a	0,95 a	267,29 a	433,33 a	106,16 a
130 R3.1	46,33 a	70 a	0,32 a	0,84 a	236,45 a	383,33 a	93,91 a
108 R3.4	41,66 a	40 a	0,28 a	0,64 b	180,37 b	292,42 b	71,63 b
91B R1.2	43,33 a	70 a	0,29 a	0,98 a	274,76 a	445,45 a	109,13 a
113 R1.2	20,33 b	20 a	0,32 a	0,26 c	72,89 c	118,18 c	28,95 c
138B R1.2	0,00 c	00 a	0,30 a	0,45 b	126,16 c	204,54 c	50,11 c
90A R1	63,66 a	60 a	0,19 b	1,00 a	280,37 a	454,54 a	111,36 a
90B R1	62,33 a	50 a	0,37 a	0,88 a	246,72 a	400,00 a	97,99 a
89 R3.1	55,33 a	60 a	0,27 a	0,89 a	251,40 a	407,57 a	99,85 a
138A R1.2	50,33 a	50 a	0,31 a	0,89 a	249,53 a	404,54 a	99,10 a
115 R3.1	57,33 a	60 a	0,18 b	0,89 a	251,40 a	407,57 a	99,85 a
114C R1	55,33 a	70 a	0,29 a	1,07 a	300,00 a	486,36 a	119,15 a
113 R1.1	62,66 a	80 a	0,34 a	1,01 a	283,18 a	459,09 a	112,47 a
138A R3.1	56,00 a	60 a	0,28 a	0,85 a	239,25 a	387,88 a	95,02 a
91A R1.2	12,50 b	40 a	0,26 a	0,46 b	86,91c	140,91 c	34,52 c
113 R2.2	45,66 a	70 a	0,22 b	0,89 a	251,40 a	407,57 a	99,85 a
92A R2.2	0,00 c	00 a	0,31 a	0,32 c	89,71 c	145,45 c	35,63 c
89A R1.2	30,33 b	03 a	0,15 b	0,53 b	149,53 b	242,42 b	59,39 b
141 R3.2	51,66 a	60 a	0,23 b	0,89 a	249,53 a	404,54 a	99,10 a
154 R2.2	66,00 a	70 a	0,30 a	0,90 a	253,27 a	410,60 a	100,59 a
155 R1.1	75,00 a	80 a	0,30 a	0,94 a	264,48 a	428,78 a	105,05 a
145 R3.1	48,00 a	50 a	0,33 a	1,08 a	303,73 a	492,42 a	120,64 a
147 R3.6	64,33 a	80 a	0,27 a	0,93 a	262,61 a	425,75 a	104,30 a
148 R1	61,66 a	60 a	0,24 b	0,81 a	228,03 a	369,69 a	90,57 a
146 R2	14,66 b	00 a	0,17 b	0,31 c	86,91 c	140,90 c	34,52 c
147 R3.3	54,00 a	50 a	0,29 a	1,06 a	199,06 a	322,72 a	79,06 a
155A R2.1	24,33 b	40 a	0,21 b	0,44 b	125,23 c	203,03 c	49,74 c
162 R3.2	64,66 a	60 a	0,31 a	0,97 a	271,96 a	440,91 a	108,01 a
BR3262	50,66 a	90 a	0,30 a	1,03 a	290,65 a	471,21 a	115,44 a
BR3267	42,33 a	60 a	0,20 b	0,79 a	221,49 a	359,09 a	87,97 a
TA	0,00 c	00 a	0,12 b	0,22 c	61,68 c	100,00 c	24,50 c
TN	0,00 c	00 a	0,34 a	0,35 c	100,00 c	162,12 c	39,72 c
Média a	56,45	47,6	0,30	0,92	255,96	417,36	102,24
Média b	20,72	-	0,19	0,53	163,17	263,22	64,48
Média c	0	-	-	0,32	91,74	159,17	38,99
CV%	39,70	90,88	35,91	24,34	24,50	24,34	

TA - testemunhas absoluta e TN – testemunha nitrogenada. Média a, b e c – Valores em uma mesma coluna seguidos por letras idênticas não diferem entre si ao nível de 5%

Observou-se que houve diferença significativa para massa seca da parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN), eficiência relativa do controle nitrogenado (ERCN), eficiência relativa da testemunha absoluta (ERTA) e eficiência relativa do controle padrão (ERCP) entre os grupos de isolados oriundos das combinações entre leguminosas e distâncias e as estirpes recomendadas para caupi (Tabela 5). Os isolados provenientes do cultivo exclusivo de braquiária apresentaram maior média de MSPA, NN e ER em relação aos outros sistemas de pastagens e suas respectivas distâncias e sendo menores que as médias encontradas no controle padrão (estirpes de *Bradyrhizobium* BR 3267 e BR 3262), as quais são recomendadas para a inoculação do caupi (*Vigna unguiculata*) no Brasil.

Nos sistemas que têm a presença da leguminosa pode ter havido um aumento de rizóbios que sejam mais específicos das leguminosas presentes na área, os quais pode não ser efetivos para o feijão-caupi. A área com monocultivo de braquiária pode abrigar rizóbios eficientes em caupi, podendo até ser endofíticos da braquiária. Jaramillo et al. (2013), relata em seu trabalho que o feijão-caupi nodula com uma grande diversidade de genótipos de bactérias fixadoras de nitrogênio isolados de solos sob sistemas agroflorestais. Mostrando a ampla faixa hospedeira do feijão-caupi.

Tabela 5 - Agrupamento das estirpes pela combinação leguminosa e distância. Número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), massa seca de raiz (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA), eficiência relativa do controle nitrogenado (ERCN), eficiência relativa do controle nitrogenado (ERCN), eficiência relativa da testemunha absoluta (ERTA) e eficiência relativa do controle padrão (ERCP). Teste de Tukey a 5% de significância

Tratamentos	MSPA (g)	MSR (g)	NN	MSN (mg)	ERCN (%)	ERTA (%)	ERCP (%)
Controle Padrão	0,91a	0,25	46ab	80	256,07a	415,15a	101,70a
Braquiária	0,83a	0,27	52a	58	221,70a	359,42b	88,05a
Glicíndia 0	0,50b	0,25	20cd	26	147,02b	229,09a	56,12b
Glicíndia 4	0,78a	0,26	45ab	61	220,39a	357,30a	87,53a
Glicíndia 8	0,78a	0,26	48ab	73	219,83a	356,39a	87,31a
Sabiá 0	0,70a	0,24	34bc	42	198,26a	321,42a	78,74a
Sabiá 4	0,69a	0,26	38b	52	195,95a	317,67a	77,82a
Sabiá 8	0,74a	0,27	39b	47	207,28a	336,06a	82,33a
Test. absoluta	0,22b	0,12	0d	0	61,68b	100,00b	24,49b
Test. nitrogenada	0,35b	0,34	0d	0	100,00b	162,12b	39,71b
CV	21,46	36,41	39,61	93,59	24,64	24,46	24,46

Braquiária- braquiária em cultivo exclusivo, Glicíndia 0- glicíndia na distância 0, Glicíndia 4- glicíndia na distância 4, Glicíndia 8- glicíndia na distância 8, Sabiá 0- sabiá na distância 0, Sabiá 4- sabiá na distância 4, Sabiá 8- sabiá na distância 8, TA- testemunha absoluta, TN - Testemunha nitrogenada

Levando em consideração só as distâncias (Tabela 6), observou-se que quanto maior a distância em relação as leguminosas maior é a eficiência relativa dos isolados, confirmando o resultado observado na comparação entre a braquiária solteira e os consórcios. Isso, pode estar relacionado ao fato da faixa da leguminosa (distância zero) ter uma população rizobiana específica das leguminosas estabelecidas na área. Portanto, a medida que se afasta da faixa das leguminosas, vai mudando a comunidade de bactérias ali presente.

Tabela 6 - Agrupamento das estirpes considerando só a distância. Número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), massa seca de raiz (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA), eficiência relativa do controle nitrogenado (ERCN), eficiência relativa da testemunha absoluta (ERTA) e eficiência relativa do controle padrão (ERCP). Teste de Tukey a 5% de significância

Tratamentos	MSPA (g)	MSR (g)	NN	MSN (mg)	ERCN (%)	ERTA (%)	ERCP (%)
Distância 0	0,67b	0,26	35b	41a	186,66b	299,06b	73,26b
Distância 4	0,74a	0,26	42a	57a	209,39a	339,46a	83,16a
Distância 8	0,75a	0,27	42a	55a	211,18a	342,37a	83,87a
CV	21,34	36,58	39,24	93,70	24,59	24,41	24,41

No agrupamento em função do sistema de pastagem (Tabela 7), também verificou-se que o sistema de cultivo só com braquiária apresentou média de MSPA, NN, MSR e ER maior do que a dos outros sistemas de cultivo que tinha a presença da leguminosa. O que também pode está relacionado com o tipo de cultura presente na área.

Tabela 7 - Agrupamento das estirpes em função dos sistemas de pastagem. Número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), massa seca de raiz (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA), eficiência relativa do controle nitrogenado (ERCN), eficiência relativa da da testemunha absoluta (ERTA) e eficiência relativa do controle padrão (ERCP). Teste de Tukey a 5% de significância

Tratamentos	MSPA (g)	MSR (g)	NN	MSN (mg)	ERCN (%)	ERTA (%)	ERCP (%)
Controle padrão	0,91a	0,25a	46ab	80	256,07a	415,15a	101,70a
Braquiária	0,83a	0,27a	52a	58	221,70ab	359,42a	88,05ab
Gliricídia	0,69b	0,26a	37b	53	195,76b	314,29b	76,99b
Sabiá	0,72b	0,26a	38b	47	202,69ab	328,61ab	80,50ab
Test. absoluta	0,22c	0,12b	0c	0	61,68c	100,00c	24,49c
Test. nitrogenada	0,35c	0,34a	0c	0	100,00c	162,12c	39,71c
CV%	21,46	36,41	39,61	93,59	24,64	24,46	24,46

Braquiária- braquiária em cultivo exclusivo, Gliricídia 0- gliricídia na distância 0, Gliricídia 4- gliricídia na distância 4, Gliricídia 8- gliricídia na distância 8, Sabiá 0- sabiá na distância 0, Sabiá 4- sabiá na distância 4, Sabiá 8- sabiá na distância 8, TA- testemunha absoluta, TN - Testemunha nitrogenada, Controle – BR3262 e BR3267

Os isolados que apresentaram características típicas de *Bradyrhizobium* (crescimento lento, pouca produção de muco e que tem a capacidade de alterar o pH do meio de cultura para alcalino) mostraram eficiência relativa semelhante as das estirpes recomendadas para cultura do feijão-caupi (Tabela 9). Corroborando Guimarães et al., 2012, que avaliando a diversidade genética e eficiência simbiótica de estirpes bacterianas de solos da Amazônia e utilizando o caupi como planta isca, também encontrou eficiência relativa semelhante as das estirpes recomendadas pelo MAPA. Diversos estudos como o de Gualter et al., 2011, Chagas Júnior et al., 2010 tem mostrado que estirpes de *Bradyrhizobium* são considerados importantes, pois contribuem para o rendimento das culturas. As quatro estirpes (UFLA 3-84, BR3267, INPA3-11B e BR 3262) recomendadas pelo MAPA pertencem ao gênero *Bradyrhizobium* (BRASIL, 2011).

Tabela 8 - Agrupamento das estirpes em função do tempo de crescimento, alteração de pH e produção de muco. Número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), massa seca de raiz (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA), eficiência relativa do controle nitrogenado (ERCN), eficiência relativa da testemunha absoluta (ERTA) e eficiência relativa do controle padrão (ERCP). Teste de Tukey a 5% de significância

Tempo de crescimento	MSPA (g)	MSR (g)	NN	MSN (mg)	ERCN (%)	ERTA (%)	ERCP (%)
Rápido	0,60b	0,28ab	29b	36b	168,80b	273,66b	67,04b
Intermediário	0,73a	0,23b	40a	63a	210,50a	335,82a	82,27a
Lento	0,78a	0,25ab	45a	52ab	212,59a	344,65a	84,43a
Muito lento	0,79a	0,28ab	29a	54ab	222,37a	360,52a	88,32a
CV	21,34	36,58	39,24	93,70	24,59	24,41	24,41
Produção de muco	MSPA (g)	MSR (g)	NN	MSN (mg)	ERCN (%)	ERTA (%)	ERCP (%)
Abundante	0,41b	0,20	9b	18	116,19b	188,38b	46,15b
Escasso	0,77a	0,27	43a	52	216,39a	350,82a	85,94a
Moderado	0,72a	0,26	40a	45	207,18a	331,68a	81,25a
Pouco	0,71a	0,26	30a	57	196,36a	318,34a	77,99a
CV	21,34	36,58	39,24	93,70	24,59	24,41	24,41
Alteração de pH	MSPA (g)	MSR (g)	NN	MSN (mg)	ERCN (%)	ERTA (%)	ERCP (%)
Alcalino	0,92a	0,26	52a	64a	251,26a	407,35a	99,79a
Neutro	0,73b	0,26	43b	58a	204,75b	331,95b	81,35b
Ácido	0,61c	0,26	30c	36b	174,67c	279,87c	68,56c
CV	21,34	36,58	39,24	93,70	24,59	24,41	24,41

4.3 Sequenciamento do gene 16S rRNA dos isolados bacterianos

Foi sequenciado 36 isolados, os quais apresentaram eficiência relativa semelhantes e maiores que as estirpes padrões.

As sequências obtidas variaram de 1.088 a 1.538 pares de bases, as quais foram submetidas ao GenBank (National Center for Biotechnology Information), para comparação dos dados com as estirpes tipo das espécies depositadas no mesmo.

De acordo com a análise da sequência do gene 16S rRNA, pode se verificar que dos 36 isolados sequenciados, 26 (72%) foram determinados como pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*, 3 (8%) como *Methylobacterium*, 2 (6%) como *Leifsonia*, seguido dos gêneros *Rhizobium*, *Mycobacterium*, *Cohnella*, *Burkholderia* e *Bacillus* com (14%) pertencentes a um destes gêneros (Tabela e Figura 6).

Vários trabalhos tem relatado a identificação de estirpes pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* provenientes de nódulos de feijão-caupi

(COSTA et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2012). Genêros de *Bacillus* e *Cohnella* geralmente são endofíticos de nódulos, mas não nodulíferos, embora nesse trabalho tenha sido observado nodulação por isolados que tiveram semelhança com *Bacillus* e *Cohnella* em feijão-caupi e eficiência relativa semelhante a estirpe padrão BR 3267, corroborando Marra et al. (2012) e Jamillo et al. (2013). Alguns autores têm sugerido que algumas bactérias endofíticas de nódulos poderão evoluir para bactérias simbióticas por meio de transferência horizontal de genes entre rizóbio e endofítico (XU et al., 2014; ASERSE et al., 2013).

Os isolados agrupados no filo *Firmicutes* foram identificados como *Bacillus* e *Cohnella*. Diferente do resultado encontrado por Xu et al. 2014, em que o gênero *Bacillus* predominou, neste estudo a maioria dos isolados se assemelharam ao gênero *Bradyrhizobium*.

Os isolados 147 R3.3, 35 R3.3, 113 R1.1, 162 R3.2, 57 R3.1, 83 R1.1, 124 R2.1, 11 R3.2, 138A R1.2, 115 R3.1, 1 R3.2, 65A R1.1, 147 R3.6 e 35 R3.1 assemelharam-se a espécie recomendada para cultura do feijão-caupi BR 3262 (*Bradyrhizobium elkanii*), a qual foi caracterizada por Zilli et al. (2006) (Figura 6).

No filo de Actinobactérias foram identificados os gêneros de *Mycobacterium* e *Leifsonia*, são Gram-positivos e endofíticos. Actinobactérias tem sido relatadas em nódulos de leguminosas (TRUJILLO et al., 2015).

Os gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Methylobacterium* e *Burkholderia* pertecem ao filo *Proteobacteria*.

Tabela 9 - Identidade e cobertura das sequências de rRNA 16S comparadas com outras sequências depositadas no GenBank (NCBI).

Isolados	Local de origem	Descrição	Sequências mais similares no banco de dados	Cobertura (%)	Identidade (%)	Score
rRNA 16S						
43 R1.1	(G+B)	KY246979.1	<i>Bradyrhizobium sp. strain SEMIA 5087</i>	96	97	2006
97A R2.1	(S+B)	FJ418701.1	<i>Bradyrhizobium elkanii strain CCBAU 61217</i>	95	96	2183
147 R3.3	(B)	FJ193504.1	<i>Uncultured Bradyrhizobium sp. clone G16-9-H06</i>	94	97	1977
145 R3.1	(B)	AY904743.1	<i>Bradyrhizobium japonicum strain SEMIA 6002</i>	96	97	2290
114C R1	(S+B)	NR_112235.1	<i>Methylobacterium radiotolerans strain DSM 1819</i>	85	98	1860
83 R1.1	(S+B)	KY246958.1	<i>Bradyrhizobium sp. strain SEMIA 5001</i>	96	95	2143
35 R3.3	(G+B)	LT630289.1	<i>Bradyrhizobium sp. VULI13</i>	95	97	1971
42 R2.1	(G+B)	KF114656.1	<i>Bradyrhizobium sp. CCBAU 51511</i>	89	93	1784
44 R1.1	(G+B)	KJ374714.1	<i>Rhizobium sp. MR-8</i>	96	95	2134
113 R1.1	(S+B)	AB513458.1	<i>Bradyrhizobium sp. C14-2660</i>	99	97	2281
90A R1	(S+B)	AB028940.1	<i>Mycobacterium str. DB102</i>	84	91	1482
91B R1.2	(S+B)	EU051340.1	<i>Bradyrhizobium erythrophlei</i>	96	78	75.0
162 R3.2	(B)	AY649430.1	<i>Bradyrhizobium elkanii strain BR3262</i>	95	96	2206
51 R2.2	(G+B)	AB601650.1	<i>Bradyrhizobium elkanii strain H11</i>	98	95	2108
81A R2.2	(G+B)	FR872485.1	<i>Methylobacterium sp. MG-2011-72-DF</i>	77	82	839
155 R1.1	(B)	EU867316.1	<i>Cohnella thermotolerans strain CCGE2315</i>	84	94	1788
57 R3.1	(G+B)	AB513461.1	<i>Bradyrhizobium sp. C17-2660</i>	93	95	1940
147 R3.6	(B)	JF266650.1	<i>Bradyrhizobium genosp. TUXTLAS-17</i>	93	96	2206
65A R1.1	(G+B)	KF113098.2	<i>Bradyrhizobium sp. AG14</i>	92	97	2010
1 R3.2	(G+B)	FJ193178.1	<i>Uncultured Bradyrhizobium sp. clone G16-10b-F12</i>	88	97	2241
124 R2.1	(S+B)	FJ193355.1	<i>Uncultured Bradyrhizobium sp. clone G16-6-H05</i>	97	97	1997
154 R2.2	(B)	HM587751.1	<i>Leifsonia sp. TSA71</i>	82	96	2063
113 R2.2	(S+B)	NR_145861.1	<i>Bradyrhizobium embrapense strain SEMIA 6208</i>	77	82	771
115 R3.1	(S+B)	FJ193386.1	<i>Uncultured Bradyrhizobium sp. clone G16-7-C07</i>	91	97	2241
89 R3.1	(S+B)	HE577956.1	<i>Methylobacterium sp. IMCd01</i>	76	90	1325
138A R1.2	(S+B)	KY246973.1	<i>Bradyrhizobium sp. strain SEMIA 5067</i>	94	95	2148
141 R3.2	(S+B)	GQ064282.1	<i>Bradyrhizobium erythrophlei</i>	24	81	209
17A R2.2	(G+B)	JN896363.1	<i>Burkholderia seminalis strain CC-IDD2w</i>	82	97	2119
11 R3.2	(G+B)	JF266664.1	<i>Bradyrhizobium genosp. TUXTLAS-17</i>	91	96	2213
35 R3.1	(G+B)	FJ193085.1	<i>Uncultured Bradyrhizobium sp. clone G16-8-D10</i>	92	95	2163
130 R3.1	(S+B)	KY246956.1	<i>Bradyrhizobium sp. strain SEMIA 591</i>	92	96	2239
90B R1.1	(S+B)	KY246962	<i>Bradyrhizobium sp. strain SEMIA 5015</i>	92	96	2207
58 R3.2	(G+B)	FJ193226.1	<i>Uncultured Bradyrhizobium sp. clone G16-1-D02</i>	95	97	2025
148 R1	(B)	FJ193319.1	<i>Uncultured Bradyrhizobium sp. clone G16-6-E01</i>	93	96	2228
36 R1	(G+B)	JX067673.1	<i>Leifsonia sp. SAP711.6</i>	86	96	1847
75 R2.2	(S+B)	HM566884.1	<i>Bacillus sp. DB170(2010)</i>	83	98	2152

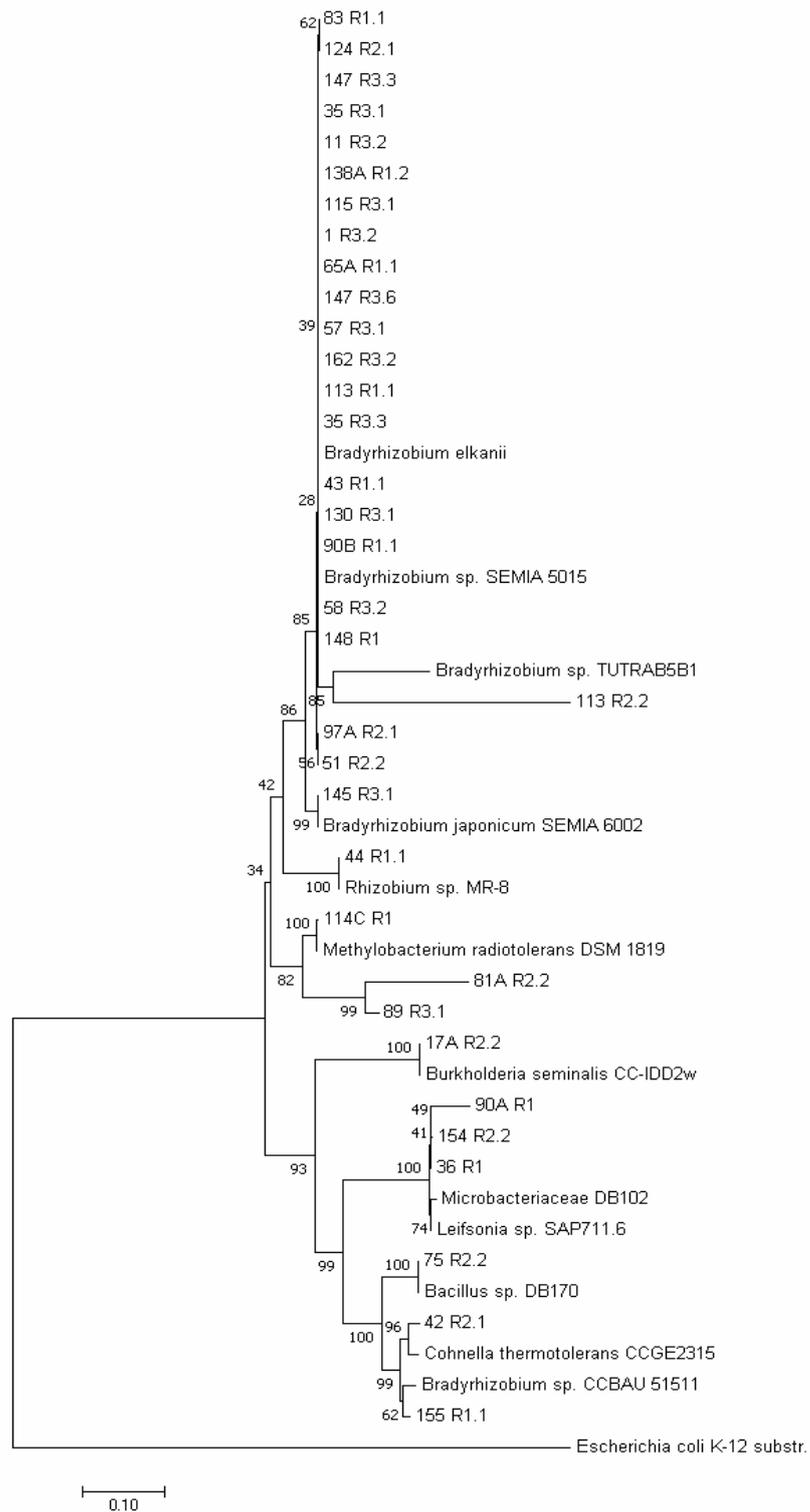


Figura 5 Árvore filogenética determinada pelo método neighbour-joining gerada a partir do parâmetro Kimura e teste de bootstrap com 1000 repetições. Sequências do gene 16S rRNA dos isolados rizobianos de nódulos de feijão-caupi

5 CONCLUSÕES

Sistemas silvipastoris com Gliricídia e Sabiá e *B. decumbens* Stapf. não influencia a densidade de bacterias nodulíferas em feijão-caupi.

A inclusão do sabiá no sistema silvipastoril influencia a diversidade de bacterias nodulíferas em feijão-caupi.

Solos de sistemas silvipastoril abrigam populações de rizóbios eficientes em realizar a fixação biológica de nitrogênio em feijão-caupi, que podem ser recomendadas para testes de eficiência agronômica.

Os isolados foram classificados como pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium*, *Methylobacterium*, *Rhizobium*, *Mycobacterium*, *Methylobacterium*, *Cohnella*, *Leifsonia*, *Burkholderia* e *Bacillus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASERSE, A.A.; RASANEN, L.A.; ASEFFA, F.; HAILEMARIAM, A.; LINDSTROM, K. Diversity of sporadic symbionts and nonsymbiotic endophytic bacteria isolated from nodules of woody, shrub, and food legumes in Ethiopia. **Appl Microbiol Biotechnol**, New York, v. 97, p. 10117 – 10134. 2013.
- ANDRADE, D.S.; MURPHY, P.J.; GILLER, K.E. The diversity of *Phaseolus*-nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 4025-4034. 2002.
- ANDREOTTI, M.; ARALDI, M.; GUIMARÃES, V.F.; FURLANI JUNIOR; BUZETTI, S. Produtividade do milho safrinha e modificações químicas de um Latossolo em sistema plantio direto em função de espécies de cobertura após calagem superficial. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 30 p.109-15. 2008.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DA PECUÁRIA. Santa Cruz do Sul : Editora Gazeta Santa Cruz, 64 p. : il. ISSN 1808-5172 1. **Pecuária – Brasil**. 2. Bovino - Brasil. 2014.
- AZAR, G. S.; ARAÚJO, A. S. F.; OLIVEIRA, M. E.; AZEVÊDO, D. M. M. R. Biomassa e atividade microbiana do solo sob pastagem em sistemas de monocultura e silvipastoril. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, p. 2727-2736. 2013.
- BALA, A. MURPHY, P. GILLER, K.E. Distribution and diversity of rhizobia nodulating agroforestry legumes in soil from three continents in the tropics. **Molecular Ecology**, Hoboken, v. 12, p. 917-930, 2003.
- BARCELLOS, A.O., RAMOS, A.K.B., VILELA, L., JUNIOR, G.B.M. Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, p. 51-67. 2008.
- BARRETO, A. C.; FERNANDES, M. F. Cultivo de *Gliricídia sepium* e *Leucaena leucocephala* em alamedas visando a melhoria dos solos dos tabuleiros costeiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 10, p. 1287-1293. 2001.
- BONO, J.A.M.; MACEDO, M.C.M.; TORMENA, C.A. Qualidade física do solo em um Latossolo Vermelho da região sudoeste dos cerrados sob diferentes sistemas de uso e manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 37, p. 743-53, 2013.
- BRASIL, S.D.D.A.-M.D.A.P.A. **Instrução Normativa Nº10**, de 21 de março de 2006, in Diário Oficial da União - Seção 1.Imprensa Nacional: Brasília. 2006.
- BRASIL, S. D. D. A.-M. D. A. P. E. A. **Instrução Normativa Nº13**, de 24 de março de 2011. Diário Oficial da União - Seção 1. Brasília: Imprensa Nacional. 58, 25 de março de 2011: p 3-7. 2011.

- CARELLI, M.; GNOCCHI, S.; FANCELLI, S.; MENGONI, A.; PAFFETTI, D.; SCOTTI, C.; BAZZICALUPO, M. Genetic diversity and dynamics of *Sinorhizobium meliloti* populations nodulating different alfalfa cultivars in Italian soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 4785-4789. 2000.
- CAO, Y.; WANG, E.; ZHAO, L.; CHEN, W.; WEI, G. Diversity and distribution of rhizobia nodulated with *Phaseolus vulgaris* in two ecoregions of China. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 78, p. 128-137. 2014.
- CHEN, M.; CHEN, B.; MARSCHNER, P. Plant growth and soil microbial community structure of legumes and grasses grown in monoculture or mixture. **Journal of Environmental Sciences**, Pequin, v. 20, n. 10, p. 1231-1237. 2008.
- CORRENTE, J. E.; NOGUEIRA, M. C. S.; COSTA, B. M. Contrastes ortogonais na análise do controle de volatilização de amônia em compostagem. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 58, n. 2, p. 407-412, 2001.
- COSTA, E. M., NÓBREGA, R. S. A., SILVA, A. F. T., FERREIRA, L. V. M., NÓBREGA, J. C. A.; MOREIRA, F. M. S. Resposta de duas cultivares de feijão-caupi à inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio em ambiente protegido. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.9, n.4, p.489-494, 2014.
- COSTA, E. M., NÓBREGA, R. S. A., CARVALHO, F., TROCHMANN, A., FERREIRA, L. V. M.; MOREIRA, F. M. S. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v 48, n. 9, p. 1275-1284, 2013.
- CPRH, Companhia Pernambucana do Meio Ambiente. **Diagnóstico sócio ambiental do litoral norte de Pernambuco**. Recife, 2003. 214p.
- DE MEYER, S. E., DE BEUF, K., VEKEMAN, B.; WILLEMS, A. A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 83, p.1-11. 2015.
- DIAS-FILHO, M. B. **Degradação de pastagens: processos, causas e estratégias de recuperação**, 4. ed. revista atualizada e ampliada. Belém, PA, 2011. 215 p.
- DIAS-FILHO, M. B. **Diagnóstico das pastagens no Brasil**. Belém, PA : Embrapa Amazônia Oriental. 36 p. (Documentos / Embrapa Amazônia Oriental, ISSN 1983-0513; 402). 1ª edição. Disponível em: www.cpatu.embrapa.br/publicacoes_online. 2014.
- DIAS-FILHO, M. B. **Uso de Pastagens para a Produção de Bovinos de Corte no Brasil: Passado, Presente e Futuro**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 42 f.: il. (Documentos /Embrapa Amazônia Oriental, ISSN 1983-0513; 418). Disponível em: <https://www.embrapa.br/amazonia-oriental/publicacoes>. 2016.

DIOUF, D., FALL, D., CHANTREUIL, C., BA, A.T., DREYFUS, B.; NEYRA, M., NDOYE, I.; MOULIN, L. Phylogenetic analyses of symbiotic genes and characterization of functional traits of *Mesorhizobium* spp. strains associated with the promiscuous species *Acacia seya*. **Journal of Applied Microbiology**, Hoboken v.108, p. 818–830, 2010.

ECHAVARRI-ERASUN, C., ARRAGAIN, S.; RUBIO, L.M. Purification of O₂-sensitive metalloproteins. In: Metalloproteins. New York, **Springer Science Business Media**, p. 5–18. 2014.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2.ed. Rio de Janeiro, Embrapa Solos, 2006. 306p.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred.II error probabilities, **Genome Research**, Huntington, v.8, p.186-194. 1998.

FÁVERO, C.; LOVO, I. C.; MENDONÇA, E. De S. Recuperação de área degradada com sistema agroflorestal no Vale do Rio Doce, Minas Gerais. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 32, n. 5, p. 861-868, 2008.

FERREIRA, J. S., SILVA, A.F. **Estoque de carbono e atividade microbiana em sistemas silvipastoris na Zona da Mata de Pernambuco**. Dissertação. 2015.

FREITAS, A.D.S.; AND E.V.S.B. Sampaio. Fixação biológica do N₂ em leguminosas arbóreas da Paraíba e de Pernambuco. In: MENEZES, R.S.C.; SAMPAIO, E.V.S.B.; SALCEDO, I.H. (Eds.) **Fertilidade do solo e produção de biomassa no semi-árido**. Recife: Editora UFPE, p.27-46, 2008.

FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. **Aplicações da PCR em ecologia molecular**. In: MELO, I. S.AZEVEDO, J. L. (Ed.). *Ecologia microbiana*. Jaguaríuna: Embrapa/CNPMA, p.205-225. 1998.

GIONGO, A.; AMBROSINI, A.; VARGAS, L.K.; FREIRE, J.R.J.; BODANESE-ZANETTINI, M. H.; PASSAGLIA, L.M.P. Evaluation of genetic diversity of bradyrhizobia strains nodulating soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) isolated from South Brazilian fields. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 38, p. 61-269, 2008.

GRACIANO, E. S.A. **Atividade microbiana e decomposição de serrapilheira em pastagens consorciadas na zona da mata seca de Pernambuco**. Recife, UFRPE, 145 p. (Tese de Doutorado). 2013.

GUALTER, R. M. R., BODDEY, R. M., RUMJANEK, N. G., FREITAS, A. C. R.; XAVIER, G. R. Eficiência agrônômica de estirpes de rizóbio em feijão-caupi cultivado na região da Pré-Amazônia maranhense. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, n.3, p.303-308, 2011.

GUIMARÃES, A.A.; JARAMILLO, P.M.D.; NÓBREGA, R.S.A.; FLORENTINO, L.A.; SILVA, K.B.; MOREIRA, F.M.S. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the western Amazon by using cowpea as the trap plant. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, p. 6726-6733, 2012.

GUIMARÃES, A. A., FLORENTINO, L. A., ALMEIDA, K. A., LEBBE, L., SILVA, K. B., WILLEMS, A., MOREIRA, F. M. S. High diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from several legume. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 38, n. 6, p. 433-441, 2015.

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, Amherst. 2001.

HOWIESON, J.G., DILWORTH, M.J. **Working with rhizobia**. Australian Centre for International Agricultural Research: Canberra. 2016. p. 312.

HU, Y., RIBBE, M.W., Biosynthesis of the iron–molybdenum cofactor of nitrogenase. **Journal Biological Chemistry**, Irvini, v. 288, p. 13173–13177. 2013.

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

INGRAM, J.C. Berger–Parker Index, **Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences**, O Earth Institute da Columbia University, Nova Iorque, EUA, p. 332-334. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4,00091-4>>.

JACOMINE, P. K. T.; CAVALCANTI, A. C.; BURGOS, N.; PESSOA, S. C. P.; SILVEIRA, C. O. **Levantamento exploratório – reconhecimento de solos do Estado de Pernambuco**. Boletim Técnico 26 Série Pedologia, 14: Recife, SUDENE, 1973. 359p.

JARAMILLO, P.M.D.; GUIMARAES, A.A.; FLORENTINO, L.A.; SILVA, K.B.; NOBREGA, R.S.A.; MOREIRA, F.M.S. Symbiotic nitrogen-fixing bacterial populationstrapped from soils underagroforestry systems in the Western Amazon. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 70, n. 6, p. 397-404, 2013.

JANCZAREK, M., RACHWAŁ, K., MARZEC, A., GRZĄDZIEL, J.; PALUSIŃSKA-SZYSZ, M. Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume–rhizobium interactions. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.85 p. 94-113, 2015.

KREIBICH, H.; KERN, J.; CAMARGO, P.B.; MOREIRA, M.Z.; VICTÓRIA, R.L.; WERNER, D. Estimation of symbiotic N₂ fixation in an Amazonian floodplain forest. **Oecologia**, New York, v. 147, p. 359-368, 2006.

LANE, D.J. **16S / 23S rRNA sequenciamento**. Em: Stackebrandt E, Goodfellow M, editores. Técnicas de ácido nucleico na sistemática bacteriana . New York, NY: John Wiley & Sons, p. 115-176. 1991.

LARANJO, M., ALEXANDRE, A.; OLIVEIRA, S. Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the *Mesorhizobium* genus. **Microbiological Research**, Jena, v.160, n.1, p.2-17, 2014.

LI, Q., WU, L., CHEN, J., KHAN, M. A., LUO, X.; LIN, W. Biochemical and microbial properties of rhizospheres under maize/peanut intercropping. **Journal of Integrative Agriculture**, Oxford, v. 15, n. 1, p. 101-110. 2016.

LIMA, A. S.; NÓBREGA, R. S. A.; BARBERI, A.; SILVA, K.; FERREIRA, D. F.; MOREIRA, F. M. S. Nitrogen fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 319, n. 1/2, p. 127-145, 2009.

LIMA, H. N. B.; DUBEUX JR, J. C.; SANTOS, M. V. F; MELLO, A. C. L.; LIRA, M. A.; CUNHA, M. V. Decomposition of cattle dung on grazed signalgrass (*Brachiaria decumbens* Stapf) pastures in monoculture or intercropped with tree legumes. **Journal African Journal of Range & Forage Science**, Pietermaritzburg, v.33, n. 2, p. 119-126, 2016.

LPWG, Legume Phylogeny Working Group. **A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny**, TAXON, v.66, n.1, p. 44–77. 2017.

LPWG, Legume Phylogeny Working Group. **Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades**, Taxon, v.62, n.2, p. 217–248. 2013.

MACHADO, F.A.; BEZERRA NETO, E.; NASCIMENTO. M. DO P.S.C.B.; SILVA. L.M.; BARRETO. L.P.; NASCIMENTO. H.T.S.; LEAL, J.A. Produção e qualidade da serrapilheira de três leguminosas arbóreas nativas do nordeste do Brasil. **Archivos Zootecnia**, Córdoba, v. 61 p.323-334. 2012.

MAGURRAN, A.E. Measuring Biological Diversity. **Blackwell Publishing**, London, v. 29, p. 264. 2004.

MARGALEF, R. **Limnologia**. Barcelona: Omega. 1983.

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**, New York, v. 38, p.333-339, 2003.

MENDES, M. M. C.; CHAVES, L. F. DE C.; NETO, T. P. P.; SILVA, J. A. A.; FIGUEIREDO, M. V. B. Crescimento e sobrevivência de mudas de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) inoculadas com micro-organismos simbiotes em condições de campo. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 23, n. 2, p. 309-320, 2013.

- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2006. 729p.
- MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the b-subclass of Proteobacteria. **Nature**, London, v. 411, p. 948-950, 2001.
- PAULA, P. D.; CAMPELLO, E. F. C.; GUERRA, J. G. M.; SANTOS, G. A.; RESENDE, A. S. Decomposição das podas das leguminosas arbóreas *Gliricidia sepium* e *Acacia angustissima* em um sistema agroflorestal. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 25, n. 3, p. 791-800, 2015.
- PEZARICO, C.R.; VITORINO, A.C.T.; MERCANTE, F.M.; DANIEL, O. Indicadores de qualidade do solo em sistemas agroflorestais. **Revista de Ciência Agrária**, Amazônia, v. 56, p. 40-47, 2013.
- PHILIPPOT, L.; RAAIJMAKERS, J. M.; LEMANCEAU, P.; VAN DER PUTTEN, W. H. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v.11, p.789-799, 2013.
- PIELOU, E.C. **Mathematical ecology**. Wiley, New York. 1977. 385p.
- RASUL A.; AMALRAJ, E.L.; PRAVEEN KUMAR, G.; GROVER, M.; VENKATESWARLU, B. Characterization of rhizobial isolates nodulating *Millettia pinnata* in India. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, Oxford, v. 336, p. 148–158, 2012.
- RODRIGUEZ-NAVARRO, D.N.; BUENDIA, A.M.; CAMACHO, M.; LUCAS, M.M.; SANTAMARIA, C. Characterization of *Rhizobium* spp. bean isolates from South West Spain. **Soil Biology Biochemistry**, Amsterdam, v. 32, p. 1601-1613, 2000.
- SHANNON, C. E.; WEAVER, W. The mathematical theory of communication. Urbana. University Illinois Press, Simpson, E.H. **Measurement of diversity**. **Nature**, Londres, v. 163, 1949.
- SHETTA, N.D.; A.L.-SHAHARANI, T.S.; ABDEL-A.A.L. M. Identification and characterization of rhizobium associated with woody legume trees grown under Saudi Arabia condition. **American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, Jordan, v. 10, p. 410–418, 2011.
- SILVA, I. A. G. **Deposição e decomposição de serrapilheira de leguminosas arbóreas consorciadas com *Brachiaria decumbens* Stapff**. 2015. 96 f. Dissertação (Zootecnia). Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife-PE, 2015.
- SILVA, A. B.; LIRA JUNIOR, M. A.; DUBEUX JUNIOR, J. C. B.; FIGUEIREDO, M. V. B.; VICENTIN, R. P. Estoque de serrapilheira e fertilidade do solo em pastagem degradada de *Brachiaria decumbens* após implantação de leguminosas arbustivas e arbóreas forrageiras. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 37, n. 2, p. 502-511, 2013.

SIMPSON, E. H. **Measurement of diversity**. Nature, Londres, v. 163, p. 688. 1949.
SMITH, B., WILSON, J.B., 1996. A consumer's guide to evenness indices, **Oikos**, v. 76, p.70–82. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2307/3545749>>.

SOARES, A. L. L.; PEREIRA, J. P. A. R.; FERREIRA, P. A. A.; VALE, H. M. M.; LIMA, A. S.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. S. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em perdões (MG): I, Caupi. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, n. 5, p. 795-802, 2006.

STRONG, W.L. Biased richness and evenness relationships within Shannon–Wiener index values. **Ecological Indicators**, v.67, p. 703–713, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.03.043>>.

SWAIN, H.; ABHIJITA, S. Nitrogen fixation and its improvement through genetic engineering. **Journal Global Biosciences**, Washim, v. 2, p. 98–112, 2013.

TERPOLILLI, J.J.; HOOD, G.A.; POOLE, P.S. What determines the efficiency of N₂-fixing *Rhizobium*-Legume symbioses? **Advances in Microbial Physiology and Physiology**, Londres, v. 60, p.325-389, 2012.

TRUJILLO, M. E.; RIESCO, R.; BENEDITO, P.; CARRO, LORENA. Endophytic Actinobacteria and the Interaction of *Micromonospora* and Nitrogen Fixing Plants. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 6, p 1341, 2015.

TUOMISTO, H. An updated consumer's guide to evenness and related indices, **Oikos**, Lund, v. 121, p. 1203–1218, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0706.2011.19897.x>>.

URAMOTO, K.; WALDER, J.M.M.; ZUCCHI, R.A. Análise quantitativa e distribuição de populações de espécies de *Anastrepha* (Diptera, Tephritidae) no Campus Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, **Neotropical Entomology**, Londrina, v.34, n.1, p. 33-39, 2005.

VINCENT, J.M. A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. Oxford, **Black well Scientific Publications**. (IBP Handbook, 15). 1970. 164p.

WANG, Q.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M.; COLE, J.R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.73, p. 5261–5267, 2007.

WEAVER, R. W.; HOLT, E. C. Short-term survival of rhizobia on arrow leaf clover seed at different depths. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 122, p. 147-150, 1990.

WEAVER, R.W.; MATERON, L.A.; KRAUTMANN, M.E.; ROUQUETTE, F.M. Survival of *Rhizobium trifolii* in soil following inoculation of arrow leaf clover. **MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 1, p. 311-318, 1985.

WOLDE-MESKEL, E.; TEREFWORK, Z.; FROSTEGA, R.D.A.; LINDSTROM, K. Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from agroforestry legume species in southern Ethiopia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Londres, v. 55 4, 1439–1452, 2005.

WOOMER, P.L. Most probable number counts. In: WEAVER, P.W.; ANGLE, J.S.; BOTTOMELY, P.S., ed. **Methods of soil analysis**. Wisconsin: Soil Science Society of American Book. p. 59-79. 1994.

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M.; RUMJANEK, N. V.; NEVES, N. C. P. Tolerância de rizóbio de feijão-caupi à salinidade e à temperatura em condição *in vitro*. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 20, n. 4, p. 01-09, 2007.

XU, L.; ZHANG, Y.; WANG, L.; CHEN, W.; WEI, GEHONG. Diversity of endophytic bacteria associated with nodules of two indigenous legumes at different altitudes of the Qilian Mountains in China. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 37, p. 457-465, 2014.

YERGEAU, E.; SANSCHAGRIN, S.; MAYNARD, C.; ST-ARNAUD, M.; GREER, C.W. Microbial expression profiles in the rhizosphere of willows depend on soil contamination. **International Society for Microbial Ecology**, Wageningen, v. 8, p. 344-358, 2014.

ZAHRAN, H. H. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 91, p. 143-153, 2001.

ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**. 4th edition. Prentice Hill. 1999.

ZHOU, X., GUAN, S. WU, F. Composition of soil microbial communities in the rhizosphere of cucumber cultivars with differing nitrogen acquisition efficiency.

ZILLI, A.J.E.; VALICHESKI, R.R.; RUMJANEK, N.G.; SIMÕES-ARAÚJO, J.L.; FREIRE FILHO, F.R.; NEVES, M.C.P. Eficiência simbiótica das cepas de caupi de bradyrhizobium em solos do Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 811- 818, 2006 .

APÊNDICE A. Estimativa do número de células de bactérias que nodulam leguminosas por meio do método de número mais provável em plantas (NMPP)

Identificação	Diluição								NMPP		NN por planta
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	Células por grama de solo	Log NMPP	
(G+B)1 D0	2	2	2	1	1	2	0	0	1,5x10 ⁶	6,176	30
(G+B)2 D0	3	3	2	1	1	0	0	0	2,04x10 ⁵	5,3096	17
(G+B)3 D0	3	2	1	1	0	0	0	0	2,04x10 ⁴	4,3096	22
(G+B)1 D4	2	3	3	2	1	0	0	0	1,5x10 ⁶	6,176	23
(G+B)2 D4	1	2	2	2	1	1	0	0	2,04x10 ⁵	5,3096	22
(G+B)3 D4	2	2	1	1	1	0	0	0	1,1x10 ⁵	5,0413	24
(G+B)1 D8	1	2	1	0	0	0	0	0	1,5x10 ³	3,176	8
(G+B)2 D8	3	1	3	3	0	0	0	0	2,8x10 ⁴	4,4471	22
(G+B)3 D8	3	2	3	1	2	0	0	0	1,15x10 ⁶	6,0606	39
(S+B)1 D0	3	3	3	0	0	0	0	0	4,8x10 ³	3,6812	28
(S+B)2 D0	2	1	2	2	0	0	0	0	1,9x10 ⁴	4,2787	36
(S+B)3 D0	1	3	2	1	0	0	0	0	1,5x10 ⁵	5,176	14
(S+B)1 D4	2	3	3	3	1	0	0	0	4,62x10 ⁶	6,6646	50
(S+B)2 D4	2	2	3	1	0	0	0	0	3,6x10 ⁴	4,5563	27
(S+B)3 D4	2	2	1	0	0	0	0	0	2,7x10 ³	3,4313	42
(S+B)1 D8	3	3	2	1	0	0	0	0	1,5x10 ⁵	5,176	36
(S+B)2 D8	2	3	2	0	0	0	0	0	4,4x10 ³	3,6434	21
(S+B)3 D8	1	3	2	1	1	0	0	0	2,04x10 ⁵	5,3096	18
(B)1	2	2	1	1	0	0	0	0	2,04x10 ⁴	4,3096	10
(B)2	2	2	2	2	0	0	0	0	3,4x10 ⁴	4,5314	18
(B)3	3	3	2	1	0	0	0	0	1,5x10 ⁵	5,176	20

(G+B)– cultivo de glicídia mais braquiária, (1, 2 e 3) repetição de campo, (0, 4 e 8) distância em relação a leguminosa