

Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Ecologia

Comparação da comunidade microbiana de solos sob vegetação  
nativa e sob diferentes sistemas agrícolas em áreas de plantio  
comercial na região central do Cerrado

Joana Dias Bresolin

Brasília

2006

Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Ecologia

Comparação da comunidade microbiana de solos sob vegetação  
nativa e sob diferentes sistemas agrícolas em áreas de plantio  
comercial na região central do Cerrado

Joana Dias Bresolin

Brasília

2006



UnB

de de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de pós-graduação em Ecologia

Comparação da comunidade microbiana de solos sob vegetação nativa e  
sob diferentes sistemas agrícolas em áreas de plantio comercial na região  
central do Cerrado

Joana Dias Bresolin

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ecologia.

Brasília – DF, março de 2006.

Joana Dias Bresolin

Dissertação aprovada junto ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ecologia.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Mercedes M. C. Bustamante  
Orientadora – Universidade de Brasília

Dr. Fábio Bueno Reis Júnior  
Embrapa Cerrados

Profa. Dra. Fátima  
Universidade de Lavras

Brasília, 10 de março de 2006

*“Nunca ande apenas pelos cominhos traçados, pois eles  
conduzem somente até onde os outros já foram.”*

*Alexander Graham Bel*

## **Agradecimentos**

A Deus pela oportunidade de crescer com mais uma experiência.

Aos meus pais, Francisco e Maria de Fátima, e a minha irmã, Marina, pela amizade e paciência durante estes dois anos!

Ao Luciano pelo apoio e carinho.

Aos meus avós e familiares por estarem sempre, de alguma maneira, dispostos a me ajudar.

À Professora Mercedes, minha orientadora, pela confiança e pelos ensinamentos. Obrigada!

Ao Professor Ricardo Krüger, meu co-orientador, pelo aprendizado diário e pela oportunidade gratificante de trabalhar em sua equipe.

Ao Sr. Sebastião Conrado que acolheu a mim e toda a nossa equipe em sua casa e em sua fazenda com muito carinho.

À Regina, minha amiga, às vezes minha segunda mãe, obrigada pela ajuda!!

As meninas Alinne e Dri pela amizade, incentivo e ajuda no laboratório!  
Paula, Isabella, José e Lucas, obrigada pelo apoio.

À Cris e Kátia pela ajuda no campo e laboratório!

A todos do Laboratório de Ecologia da UnB: Salomão, Vivi, Adriano, César, Dani e Zayra. Um agradecimento especial para Êrika e Alessandra!!

Ao professor Tatsuya Nagata pela disponibilização do equipamento do DGGE e por estar sempre disposto a ajudar.

Ao pessoal do Laboratório de Biotecnologia da UCB: Idacuí, André, Willian, Márcia e Alessandra. Obrigada pelo apoio!

À Arminda e ao Fábio pela ajuda na análise dos resultados.

Aos membros da banca examinadora pelo aprendizado.

Aos pesquisadores Richard Zepp e Marirosa Molina pela cooperação.

Aos professores e funcionários do Departamento de Ecologia da UnB pelos ensinamentos.

Ao Projeto LBA-Ecology/NASA, CNPq, CAPES, FAP-DF, UnB e UCB pelo financiamento.

# Índice

	página
Agradecimentos -----	i
Índice -----	iii
Lista de Figuras -----	iv
Lista de Tabelas -----	viii
Resumo -----	ix
Abstract -----	x
Introdução -----	1
Objetivos -----	6
Hipóteses -----	7
Material e Métodos -----	8
Áreas de estudo -----	8
Coleta de solos -----	14
Análise de solos -----	17
Análise dos resultados -----	25
Resultados -----	27
Teor gravimétrico de água, pH e Biomassa Microbiana -----	27
Extração de DNA, PCR, DGGE e Seqüenciamento -----	36
Discussão -----	65
Comparação de amostras de solo coletadas em linha e entrelinha de plantio -	65
Comparação entre áreas de cerrado nativo e áreas cultivadas -----	66
Estrutura das comunidades microbianas nas áreas cultivadas -----	68
Seqüenciamento -----	75
Considerações Finais -----	78
Referências Bibliográficas -----	80
Anexo -----	92



## Lista de Figuras

- Figura 1. Mapa da Fazenda Dom Bosco (Cristalina – GO) evidenciando as práticas de pecuária e lavoura bem como a extensão de áreas destinadas à preservação de áreas nativas ----- 9
- Figura 2. Distribuição da precipitação mensal durante os meses de junho de 2004 a março de 2005 na Fazenda Dom Bosco. Os números acima das barras correspondem aos valores de precipitação total do mês em mm ----- 10
- Figura 3. Fotos das áreas de estudo. Da esquerda para direita: A – Cerrado sentido restrito; B – Soja e C – Feijão preto ----- 11
- Figura 4. Representação esquemática da parcela de 10m x 15m. Os pontos pretos representam o local de coleta das amostras simples ----- 15
- Figura 5. Valores médios do teor de umidade no solo (%) obtidos em área de cerrado sentido restrito no intervalo de 0 a 5cm de profundidade do solo entre junho de 2004 a março de 2005. As barras verticais representam os desvios padrão e as letras diferentes acima das barras representam diferenças significativas entre os meses ----- 27
- Figura 6. Valores médios de pH em água obtidos na área de cerrado sentido restrito no intervalo de 0 a 5cm de profundidade durante o período de junho de 2004 a março de 2005. As barras verticais representam os desvios padrão e as letras diferentes acima das barras representam diferenças significativas entre os meses ----- 28
- Figura 7. Valores médios de carbono da biomassa microbiana do solo ( $\text{mg C.kg}^{-1}$  solo), obtidos na área de cerrado sentido restrito no intervalo de 0 a 5cm de profundidade do solo no período de junho de 2004 a março de 2005. As barras verticais representam os desvios padrão e as letras diferentes acima das barras representam diferenças significativas entre os meses ----- 29
- Figura 8. Valores médios do teor de umidade no solo (%) obtidos em área de plantação de soja no intervalo de 0 a 5cm de profundidade do solo entre setembro de 2004 a março de 2005. As barras verticais representam os desvios padrão. As letras diferentes acima das barras representam diferenças significativas entre os meses – minúsculas representam a linha de plantio e maiúsculas a entrelinha de plantio. Diferenças significativas entre a linha e entrelinha de plantio estão indicadas por asteriscos ( $P \leq 0,05$ ) ----- 30
- Figura 9. Valores médios de pH em água obtidos na área de soja no intervalo de 0 a 5cm e de profundidade durante o período de setembro de 2004 a março de 2005. As barras verticais representam os desvios padrão. As letras diferentes acima das barras representam diferenças significativas entre os meses – minúsculas representam a linha de plantio e maiúsculas a entrelinha de plantio. Diferenças significativas entre a linha e entrelinha de plantio estão indicadas por asteriscos ( $P \leq 0,05$ ) ----- 31

Figura 10. Valores médios de carbono da biomassa microbiana do solo ( $\text{mg C.kg}^{-1}$  solo), obtidos na área de soja no período de setembro de 2004 a março de 2005. As barras verticais representam os desvios padrão. As letras diferentes acima das barras representam diferenças significativas entre os meses – minúsculas representam a linha de plantio e maiúsculas a entrelinha de plantio. Diferenças significativas entre a linha e entrelinha de plantio estão indicadas por asteriscos ( $P \leq 0,05$ ) ----- 32

Figura 11. Valores médios do teor de umidade no solo (%) obtidos em área de feijão irrigado no intervalo de 0 a 5cm de profundidade do solo entre junho de 2004 a outubro de 2004. As barras verticais representam os desvios padrão e as letras diferentes acima das barras representam diferenças significativas entre os meses - minúsculas representam a linha de plantio e minúsculas a entrelinha de plantio. Diferenças significativas estão indicadas por asteriscos ( $P \leq 0,05$ ) ----- 34

Figura 12. Valores médios de pH em água obtidos na área de feijão no intervalo de 0 a 5cm e de profundidade durante o período de junho de 2004 a outubro de 2004. As barras verticais representam os desvios padrão e as letras diferentes acima das barras representam diferenças significativas entre os meses.– minúsculas representam a linha de plantio e minúsculas a entrelinha de plantio. Diferenças muito significativas estão indicadas por dois asteriscos ( $p \leq 0,01$ ) ----- 35

Figura 13. Valores médios de carbono da biomassa microbiana do solo ( $\text{mg C.kg}^{-1}$  solo), obtidos na área de feijão irrigado no intervalo de 0 a 5cm de profundidade do solo no período de junho a outubro de 2004. As barras verticais representam os desvios padrão ----- 36

Figura 14. Gel de TBE 0,8%. Da esquerda para direita: marcador 1kb ladder plus e nos quatro poços DNA de solo extraído de diferentes amostras da área de feijão irrigado-37

Figura 15. Gel de TBE 1%. Da esquerda para direita: marcador 1kb ladder plus e amostras coletadas na área de feijão irrigado amplificadas com primers 18S ----- 38

Figura 16. Gel de TBE 1% Da esquerda para direita: marcador 1kb ladder plus e amostras coletadas na área de soja amplificadas com primers 16S ----- 38

Figura 17. DGGE das amostras coletadas na área de soja amplificadas com primers universais 16S. Da direita para esquerda marcador 1kb ladder seguido das amostras: 1 – Cerrado out/04; 2 – 42 dias antes do plantio linha set/04; 3 – 42 dias antes do plantio entrelinha set/04; 4 – 7 dias após o plantio linha nov/04; 5 – 7 dias após o plantio entrelinha nov/04; 6 – floração linha dez/04; 7 – floração entrelinha dez/04; 8 – frutificação linha jan/05; 9 – frutificação entrelinha jan/05; 10 – 29 dias antes da colheita linha fev/05; 11 – 29 dias antes da colheita entrelinha fev/05; 12 – 7 dias após a colheita linha mar/05; 13 – 7 dias após a colheita entrelinha mar/05; 14 – Cerrado mar/05 ----- 39

Figura 18. Dendograma obtido a partir da análise de DGGE das amostras coletadas na linha de plantio na área de Soja e Cerrado amplificadas com primers universais 16S - 40

Figura 19. Dendograma obtido a partir da análise de DGGE das amostras coletadas na entrelinha de plantio na área de Soja e Cerrado amplificadas com primers universais 16S----- 41

Figura 20. DGGE das amostras coletadas na área de soja amplificadas com primers universais 18S. Da esquerda para direita marcador 1kb ladder seguido das amostras: 1 – Cerrado out/04; 2 – 42 dias antes do plantio linha set/04; 3 – 42 dias antes do plantio entrelinha set/04; 4 – 7 dias após o plantio linha nov/04; 5 – 7 dias após o plantio entrelinha nov/04; 6 – floração linha dez/04; 7 – floração entrelinha dez/04; 8 – frutificação linha jan/05; 9 – frutificação entrelinha jan/05; 10 – 29 dias antes da colheita linha fev/05; 11 – 29 dias antes da colheita entrelinha fev/05; 12 – 7 dias após a colheita linha mar/05; 13 – 7 dias após a colheita entrelinha mar/05; 14 – Cerrado mar/05 ----- 42

Figura 21. Dendograma obtido a partir da análise de DGGE das amostras coletadas na linha de plantio na área de Soja e Cerrado amplificadas com primers universais 18S - 44

Figura 22. Dendograma obtido a partir da análise de DGGE das amostras coletadas na entrelinha de plantio na área de Soja e Cerrado amplificadas com primers universais 18S ----- 45

Figura 23. DGGE das amostras coletadas na área de feijão irrigado amplificadas com primers universais 16S. Marcador 1kb ladder nas extremidades e amostras: 1 – Cerrado jun/04; 2 – 7 dias antes do plantio jun/04; 3 – 1 dia após plantio linha jun/04; 4 – 1 dia após plantio entrelinha jun/04; 5 – 2 dias após fertilização linha jul/04; 6 – 2 dias após fertilização entrelinha jul/04; 7 – 2 dias após fertilização linha ago/04; 8 – 4 dias antes da colheita linha out/04; 9 – 4 dias antes colheita entrelinha out/04; 10 – 10 dias após colheita linha out/04; 11 – 10 dias após colheita entrelinha out/04; 12 – Cerrado out/04 - ----- 46

Figura 24. Dendograma obtido a partir da análise de DGGE das amostras coletadas na linha de plantio na área de Feijão irrigado e Cerrado amplificadas com primers universais 16S ----- 48

Figura 25. Dendograma obtido a partir da análise de DGGE das amostras coletadas na entrelinha de plantio na área de Feijão irrigado e Cerrado amplificadas com primers universais 16S ----- 49

Figura 26. DGGE das amostras coletadas na área de feijão irrigado amplificadas com primers universais 18S. Marcador 1kb ladder nas extremidades e amostras: 1 – Cerrado jun/04; 2 – 7 dias antes do plantio jun/04; 3 – 1 dia após plantio linha jun/04; 4 – 1 dia após plantio entrelinha jun/04; 5 – 2 dias após fertilização linha jul/04; 6 – 2 dias após fertilização entrelinha jul/04; 7 – 2 dias após fertilização linha ago/04; 8 – 4 dias antes da colheita linha out/04; 9 – 4 dias antes colheita entrelinha out/04; 10 – 10 dias após colheita linha out/04; 11 – 10 dias após colheita entrelinha out/04; 12 – Cerrado out/04 - ----- 50

Figura 27. Dendograma obtido a partir da análise de DGGE das amostras coletadas na linha de plantio na área de Feijão irrigado e Cerrado amplificadas com primers universais 18S ----- 52

Figura 28. Dendograma obtido a partir da análise de DGGE das amostras coletadas na entrelinha de plantio na área de Feijão irrigado e Cerrado amplificadas com primers universais 18S ----- 53

Figura 29. Gel de DGGE para verificação de pureza da banda extraída e reamplificada -  
----- 55

Figura 30. DGGE das amostras coletadas na área de feijão irrigado amplificadas com primers universais 18S. As letras e números junto às setas indicam as bandas selecionadas para sequenciamento. Marcador 1kb ladder nas extremidades e amostras: 1 – Cerrado jun/04; 2 – 7 dias antes do plantio jun/04; 3 – 1 dia após plantio linha jun/04; 4 – 1 dia após plantio entrelinha jun/04; 5 – 2 dias após fertilização linha jul/04; 6 – 2 dias após fertilização entrelinha jul/04; 7 – 2 dias após fertilização linha ago/04; 8 – 4 dias antes da colheita linha out/04; 9 – 4 dias antes colheita entrelinha out/04; 10 – 10 dias após colheita linha out/04; 11 – 10 dias após colheita entrelinha out/04; 12 – Cerrado out/04 ----- 56

Figura 31. DGGE das amostras coletadas na área de feijão irrigado amplificadas com primers universais 16S. As letras e números junto às setas indicam as bandas selecionadas para sequenciamento. Marcador 1kb ladder nas extremidades e amostras: 1 – Cerrado jun/04; 2 – 7 dias antes do plantio jun/04; 3 – 1 dia após plantio linha jun/04; 4 – 1 dia após plantio entrelinha jun/04; 5 – 2 dias após fertilização linha jul/04; 6 – 2 dias após fertilização entrelinha jul/04; 7 – 2 dias após fertilização linha ago/04; 8 – 4 dias antes da colheita linha out/04; 9 – 4 dias antes colheita entrelinha out/04; 10 – 10 dias após colheita linha out/04; 11 – 10 dias após colheita entrelinha out/04; 12 – Cerrado out/04 ----- 58

Figura 32. DGGE das amostras coletadas na área de soja amplificadas com primers universais 18S. As letras e números junto às setas indicam as bandas selecionadas para sequenciamento. Da esquerda para direita marcador 1kb ladder seguido das amostras: 1 – Cerrado out/04; 2 – 42 dias antes do plantio linha set/04; 3 – 42 dias antes do plantio entrelinha set/04; 4 – 7 dias após o plantio linha nov/04; 5 – 7 dias após o plantio entrelinha nov/04; 6 – floração linha dez/04; 7 – floração entrelinha dez/04; 8 – frutificação linha jan/05; 9 – frutificação entrelinha jan/05; 10 – 29 dias antes da colheita linha fev/05; 11 – 29 dias antes da colheita entrelinha fev/05; 12 – 7 dias após a colheita linha mar/05; 13 – 7 dias após a colheita entrelinha mar/05; 14 – Cerrado mar/05 ----- 60

Figura 33. DGGE das amostras coletadas na área de soja amplificadas com primers universais 16S. As letras e números junto às setas indicam as bandas selecionadas para sequenciamento. Da direita para esquerda marcador 1kb ladder seguido das amostras: 1 – Cerrado out/04; 2 – 42 dias antes do plantio linha set/04; 3 – 42 dias antes do plantio entrelinha set/04; 4 – 7 dias após o plantio linha nov/04; 5 – 7 dias após o plantio entrelinha nov/04; 6 – floração linha dez/04; 7 – floração entrelinha dez/04; 8 – frutificação linha jan/05; 9 – frutificação entrelinha jan/05; 10 – 29 dias antes da colheita linha fev/05; 11 – 29 dias antes da colheita entrelinha fev/05; 12 – 7 dias após a colheita linha mar/05; 13 – 7 dias após a colheita entrelinha mar/05; 14 – Cerrado mar/05 ----- 62

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Áreas da Fazenda Dom Bosco selecionadas para estudo -----	11
Tabela 2. Análise de solos das parcelas das áreas de cerrado sentido restrito, feijão irrigado e soja inoculada -----	12
Tabela 3. Frequência de coleta e data de tratamento de cada área -----	16
Tabela 4. Diluição do produto de amplificação 18S EF3 / EF4 -----	22
Tabela 5. Índices de similaridade entre as amostras coletadas na linha e entrelinha de plantio obtidos dos dendrogramas para análise de DGGE das comunidades bacterianas e fúngicas nas áreas de cerrado sentido restrito, feijão irrigado e soja -----	50
Tabela 6. Justificativa da escolha da banda e resultado do seqüenciamento das bandas retiradas do gel de DGGE 18S da área de feijão após verificação de qualidade do eletroferograma e similaridade com banco de dados BLAST -----	57
Tabela 7. Justificativa da escolha da banda e resultado do seqüenciamento das bandas retiradas do gel de DGGE 16S da área de feijão após verificação de qualidade do eletroferograma e similaridade com banco de dados BLAST -----	59
Tabela 8. Justificativa da escolha da banda e resultado do seqüenciamento das bandas retiradas do gel de DGGE 18S da área de soja após verificação de qualidade do eletroferograma e similaridade com banco de dados BLAST -----	61
Tabela 9. Justificativa da escolha da banda e resultado do seqüenciamento das bandas retiradas do gel de DGGE 16S da área de soja após verificação de qualidade do eletroferograma e similaridade com banco de dados BLAST -----	63

## Resumo

O Cerrado vem sofrendo intensas mudanças no uso da terra em especial devido ao desenvolvimento agrário. O manejo inadequado dos solos tem resultado em sua degradação afetando propriedades físicas, químicas e biológicas. A diversidade da comunidade microbiana de solos e os processos que regulam esta comunidade são ainda pouco conhecidos. Com o objetivo de avaliar o impacto de diferentes usos do solo sobre a comunidade microbiana, amostras de Latossolo Vermelho (0-5 cm) foram coletadas na Fazenda Dom Bosco (Cristalina-GO) em áreas de cerrado sentido restrito e nas lavouras sob plantio direto de soja (*Glicine max*) e feijão (*Phaseolus vulgaris*) irrigado com pivô central, na linha e entrelinha de plantio. Determinou-se o teor gravimétrico de água do solo, pH e carbono da biomassa microbiana. A estrutura da comunidade microbiana foi avaliada através do uso de PCR-DGGE-Seqüenciamento de 16S e 18S rDNA. Em geral, o conteúdo gravimétrico de água, pH, carbono da biomassa microbiana e análises de PCR-DGGE 16S e 18S rDNA não diferiram nas amostras coletadas na linha e entrelinha de plantio nas áreas de cultivo de feijão e soja. Os valores médios de pH nas áreas agrícolas foram aproximadamente 14% maiores que na área nativa. Na área nativa e sob cultivo de soja foi possível observar um padrão sazonal nos valores de teor gravimétrico de água no solo e de biomassa microbiana. Entretanto, na área cultivada com soja, houve uma redução de 66% dos valores mínimos de biomassa em relação ao cerrado sentido restrito. Já na área de feijão irrigado, os valores de biomassa microbiana tenderam a não variar ao longo do ciclo de cultivo. Os dendrogramas das comunidades bacteriana e fúngica da área de soja e feijão irrigado obtidos a partir da análise do DGGE indicam primeiramente a influência do tipo de cobertura vegetal (áreas nativas x cultivadas), da presença ou ausência de cobertura (pré e pós-plantio e período de cultivo) e posteriormente do período de desenvolvimento da cultura e/ou da sazonalidade. A fertilização ocorrida na área de feijão irrigado parece ter influenciado mais a comunidade fúngica que bacteriana, pois os índices de similaridades entre as coletas foram menores. Com o seqüenciamento de bandas escolhidas nos géis de DGGE foi possível verificar a predominância das divisões actinobactéria, gammaproteobactéria, ascomicetos, basidiomicetos, chitridiomicetos e um membro do reino Protozoa.

## Abstract

The Cerrado is subjected to intense land use changes associated to agricultural development. The inadequate management of soils can lead to their degradation with impacts to physical, chemical and biological properties. The diversity of soil microbial community and the processes that regulate this community are still poorly understood. The objective of this study was to determine the effects of different land uses on the soil microbial structure. Soil samples (Red Latossol) (0-5 cm) were collected at the “Fazenda Dom Bosco” (Cristalina-GO) in a cerrado sentido restrito area, in an area cultivated with soybean (*Glicine max*) under no-tillage and another one cultivated with irrigated common bean (*Phaseolus vulgaris*) (central pivot), from row and inter-row. Soil gravimetric water content, pH, microbial biomass C were determined. The structure of soil microbial community were analysed by PCR-DGGE-Sequencing of 16S and 18S rDNA. In general, gravimetric water content, pH, microbial biomass C and PCR-DGGE 16S and 18S rDNA showed no difference between samples collected from row and inter-row in soybean and common bean areas. Mean soil pH values in soybean and common bean areas were approximately 14% higher than in the native area. In the native and soybean areas, a seasonal pattern was observed for gravimetric water content and microbial biomass C but in soybean area a reduction of 66% in microbial biomass was observed comparing minimum values in relation to cerrado sentido restrito. In the common bean area, microbial biomass tended to show no variation along the cultivation period. Cluster analysis from DGGE patterns of bacterial and fungal communities in soybean and common bean areas showed initially an influence of the type of vegetation (native areas x croplands), and then of the presence or absence of vegetation cover (fallow and growing period) and finally of plant development stage or seasonality. The soil fertilization on common bean area seems to produce more effect on fungal communities than on bacterial communities because similarity coefficients were lower when comparing different samples. Sequencing of selected bands showed a predominance of the following divisions: actinobacteria, gammaproteobacteria, ascomycetes, basidiomycetes, chitridiomycetes and a member of Protozoa Kingdom.

## **Introdução**

A estratégia utilizada para o desenvolvimento agropecuário na região central do Brasil durante as décadas de 80 e 90 priorizou fatores como a expansão da fronteira agrícola, investimento em mecanização, tecnologias baseadas em alto consumo energético (fertilizantes, defensivos e mecanização) e monoculturas. Estes fatores elevam os custos de produção e degradam o meio produtivo resultando na insustentabilidade de grande parte das explorações (Aidar e Kluthcouski, 2003, Girvan et al., 2004).

O Cerrado, por ser o bioma dominante da região central do Brasil, sofreu intensas reduções na sua extensão em consequência do desenvolvimento agrário adotado e está sendo desmatado a uma velocidade maior do que a Floresta Amazônica. Somente 5,5% do Cerrado está atualmente protegido em unidades de conservação (Mittermeier et al., 2005). Neste ritmo, o ecossistema poderá ser extinto por volta do ano 2030 de acordo com estimativas da Conservation International in Washington DC (Machado et al., 2004). Hoje, as principais causas da conversão de áreas nativas de Cerrado estão relacionadas a duas atividades econômicas: a pecuária extensiva na região central do Cerrado e a monocultura de grãos, principalmente a soja, com altos insumos e investimentos em infra-estrutura (Mittermeier et al., 2005).

A topografia da região dos Cerrados favorece a agricultura mecanizada e a irrigação. Os solos predominantes do Cerrado são os Latossolos, solos bem drenados, muito profundos, com seqüência de horizontes A, B e C pouco diferenciados. Mais de 95% dos Latossolos são distróficos, com baixos valores de capacidade de troca de cátions (CTC) e os valores predominantes de pH variam entre 4.0 e 5.5, o que caracteriza solos medianamente ácidos (Adámoli et al., 1986). O manejo inadequado dos solos dos Cerrados tem ocasionado sua degradação bem como a do ambiente que sustenta devido à erosão, compactação e desestruturação (Kluthcouski e Stone, 2003).

O Sistema de Plantio Direto (SPD), que é a aplicação de um conjunto de tecnologias baseadas na rotação de culturas, na ausência de preparo e na cobertura permanente do solo surgiu como alternativa mais sustentável, visto que melhora a qualidade do solo (aspectos físicos, químicos e biológicos), quando comparado ao sistema de plantio convencional. Na região do Cerrado, este é o tipo de manejo que vêm sendo conjuntamente empregado com a integração lavoura-pecuária em substituição ao



plantio convencional, pois proporcionam benefícios recíprocos como a reposição de matéria orgânica e a aração biológica pela abundância e agressividade do sistema radicular das forrageiras (Vilela et al., 2003).

Considerando que 80-90% dos processos que ocorrem no solo são reações mediadas por microrganismos (Nannipieri et al., 2003), a biomassa microbiana do solo torna-se um componente crítico de todos os ecossistemas naturais ou manipulados pelo homem. Sabe-se que os microrganismos como bactérias e fungos além de responsáveis por importantes transformações metabólicas, pelo controle biológico de doenças e pragas, pela fixação biológica do nitrogênio atmosférico, pela decomposição de resíduos vegetais e outros produtos, inclusive tóxicos, são um manancial de fármacos, corantes, enzimas e ácidos orgânicos, entre muitos outros produtos ainda inexplorados (Azevedo, 1998).

Algumas práticas agrícolas podem promover alterações críticas da comunidade microbiana do solo. Dentre estas práticas estão o uso de altas quantidades de fertilizantes inorgânicos e pesticidas que provocam mudanças na densidade de fungos e bactérias, supressão ou promoção de crescimento ou atividade microbiana e mudanças estruturais na comunidade microbiana. Estas mudanças podem contribuir para uma perda da diversidade e/ou função da comunidade microbiana (Heilmann et al., 1995, Girvan et al., 2004). Além do manejo da agricultura, o tipo de solo bem como tipo de planta estabelecido são fatores determinantes da estrutura da comunidade microbiana (Garbeva et al., 2004). Apesar de todas as mudanças ocorridas nas atividades de uso da terra em solos tropicais, poucos trabalhos abordam a contribuição da diversidade microbiana no funcionamento do ecossistema do solo e os efeitos das alterações antrópicas na estrutura e funcionamento destas comunidades (Nardoto, 2000; Oliveira, 2000; Garofalo, 2001; Viana, 2002; Silva, 2004; Bossio et al., 2005). Além disso, ainda são incipientes os estudos e o entendimento da comunidade microbiológica no Sistema de Plantio Direto, em especial em regiões tropicais e sistemas intensivos de uso da terra (Kluthcouski e Stone, 2003)

Como decompositores primários, as bactérias ocupam uma posição crítica na teia alimentar do solo e 90-95% de toda a ciclagem de nutrientes passa por este grupo de organismos (Kennedy, 1999). Assim, a função e possivelmente a diversidade de bactérias será um fator determinante da funcionalidade do sistema. Alguns fungos participam de um importante processo no ecossistema do solo por decompor resíduos,

promover o ciclo de nutrientes e estimular o crescimento das plantas (Bridge e Spooner, 2001). A composição, distribuição e diversidade da comunidade fúngica do solo pode ser um indicador eficiente da qualidade do solo (Doran e Zeiss, 2000).

Mudanças na diversidade fúngica associadas com práticas agrícolas podem ter importantes conseqüências para a fertilidade dos solos, estabilidade, estabelecimento de plantas e rendimento da cultura. Porém, apesar de sabermos que as comunidades fúngicas são afetadas por práticas agrícolas, os efeitos com a intensificação da agricultura permanecem incertos (Hunt et al., 2004). Outros fatores como a presença de herbicidas, temperatura e potencial hídrico, também influenciarão a colonização das espécies no substrato.

Com o advento da genética molecular na ecologia microbiana, tornou-se aparente que conhecemos somente parte pequena da diversidade microbiana (Schloter et al., 2003). O termo biodiversidade tem sido definido de várias formas. Em termos microbianos, descreve o número de diferentes espécies e sua relativa abundância em uma dada comunidade em um habitat. Em termos ecológicos-moleculares, ele pode ser definido como o número e forma de distribuição de diferentes tipos de seqüências presentes no DNA extraído da comunidade no habitat (Garbeva et al. 2004). Apesar de refletir o potencial genético total da comunidade microbiana, a diversidade genética também pode refletir mudanças nas condições ambientais quando relacionada com crescimento seletivo e processos de sucessão (Johnsen et al., 2001).

Baseado em estudos moleculares, foi estimado que 1g de solo pode conter mais do que  $10^9$  bactérias, pertencendo a aproximadamente 10000 espécies diferentes (Ovreas e Torsvik, 1998). Estimativas sugerem que existem 1,5 milhões de espécies de fungos na Terra; porém, somente 74000 espécies foram descritas, restando ainda 95% das espécies ainda não descritas. Apesar de considerável conhecimento sobre fungos já ter sido documentado, a maioria destes organismos permanece ainda não caracterizada. Muitos grupos de fungos como os basidiomicetos e glomeromicotas são difíceis ou impossíveis de cultivar (Borneman e Hartin, 2000, Kennedy e Clipson, 2003).

Técnicas de cultivo da microbiologia convencional detectam de 1 a 10% dos microrganismos presentes no solo pela alta seletividade dos meios de crescimento e pela interdependência de diferentes organismos entre si dentre outros fatores (Nannipieri et al., 2003). A contagem direta por microscopia de fluorescência pode dar de 100 a 1000 vezes mais números de microrganismos obtidos quando comparada com o

plaqueamento (Johnsen et al., 2001). Porém, estas técnicas não fornecem uma visão acurada da diversidade dos membros da comunidade microbiana (Hunt et al., 2004). Novas técnicas moleculares baseadas na caracterização de ácidos nucléicos extraídos do solo oferecem grande potencial para investigar a vasta porção da comunidade microbiana não cultivável (Crecchio et al., 2004). Elas são independentes de cultura e, de acordo com sua sensibilidade, podem detectar espécies, gêneros, famílias ou mesmo grupos taxonômicos maiores (Nannipieri et al., 2003).

Dentre as técnicas moleculares estão a análise do polimorfismo existente na região entre genes 16S e 23S rDNA ou Ribosomal Inter Space Analysis (RISA), o uso de cromossomos bacterianos artificiais (BAC) para estudo metagenômico e a amplificação por Polimerase Chain Reaction (PCR) de regiões conservadas do gene 16S e 18S rDNA, (Borneman e Triplett, 1997, Nannipieri et al., 2003, Kirk et al., 2004). Genes que codificam rRNA não variam muito no seu tamanho, contém em sua seqüência regiões conservadas e variáveis e são moléculas convenientes uma vez que a síntese de ribossomos tem sido fortemente conservada ao longo da evolução (Kennedy e Clipson, 2003). Outras técnicas, originalmente desenvolvidas na pesquisa médica para análise de mutações pontuais no DNA, também têm sido recentemente aplicadas no estudo de microrganismos em amostras ambientais. O DGGE - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ou TGGE - Temperature Gradient Gel Electrophoresis são provavelmente as técnicas mais utilizadas para o estudo de comunidades microbianas em amostras ambientais podendo detectar até 100% das variações seqüenciais em fragmentos de DNA com até 500pb (Myers et al., 1987; Garbeva et al., 2004). Um dos pontos mais fortes para se utilizar as técnicas de DGGE/TGGE em ecologia microbiana é a análise simultânea de várias amostras, o que permite monitorar a dinâmica complexa da comunidade microbiana e suas flutuações sazonais ou após perturbações ambientais (Muyzer, 1999). No entanto, apesar do DGGE/TGGE representar uma técnica rápida e adequada para estudar produtos de PCR de comunidades microbianas complexas, o maior limite da técnica é que no ecossistema do solo o número de diferentes genomas é tão alto que a complexidade de fragmentos do rDNA excede o poder de resolução de géis desnaturantes (Nakatsu et al., 2000, Ovreas e Torsvik, 1998, Crecchio et al., 2004).

Silva (2004) utilizando a técnica de DGGE em solos de áreas nativas de Cerrado observou uma diferenciação da comunidade bacteriana quando comparada a época de coleta, uma vez que este bioma apresenta duas estações climáticas distintas ao longo do

ano, uma seca e outra chuvosa. Neste mesmo trabalho, a técnica de DGGE foi aplicada para verificar o efeito de diferentes manejos de pastagens e tempo de conversão. Foi observada uma modificação na comunidade bacteriana após a fertilização das áreas, ressaltando o efeito do acréscimo de nutrientes na diferenciação da comunidade.

Como a comunidade microbiana é um complexo de inter-relações entre organismos de diferentes níveis tróficos duas implicações da diversidade microbiana se destacam: primeiro, uma queda na diversidade geralmente resulta em uma queda na habilidade do sistema biológico responder a perturbações e segundo, a diversidade reflete o estado e a história de influências do microambiente, indicando o nível de distúrbio ao qual sistema tem sido submetido (Johnsen et al., 2001). Desse modo, entender o efeito dos impactos de diferentes sistemas agrícolas na diversidade microbiana pode contribuir grandemente para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável, possibilitando métodos mais racionais para o diagnóstico de problemas, aumento da produtividade de culturas e desenvolvimento de estratégias de biorremediação (Thomas e Kevan, 1993, Silva e Nahas, 2002).

## **Objetivos**

Adequar a metodologia de PCR-DGGE-Seqüenciamento para análise das comunidades bacterianas e fúngicas em solos de Cerrado com o intuito de comparar o efeito de diferentes sistemas agrícolas em áreas de plantio comercial na comunidade microbiana do solo.

## **Hipóteses**

1) A comunidade microbiana apresenta variação na sua composição e densidade quando comparadas a linha e a entrelinha de plantio.

2) A comunidade microbiana do solo tem sua composição e estrutura alterada ao longo do ciclo de cada cultura, em especial após fertilizações.

3) O uso do solo em áreas agrícolas altera a composição e estrutura da comunidade microbiana de solo em relação a áreas nativas de Cerrado.

## **Metodologia**

### **1. Áreas de estudo**

As parcelas de estudo encontram-se na Fazenda Dom Bosco, propriedade particular, localizada no município de Cristalina (GO), distante 100km do centro de Brasília. A área destinada para implantação das lavouras e pastagens era originariamente constituída de vegetação característica de cerrado *stricto sensu*. A retirada desta cobertura original foi feita logo após a aquisição da fazenda, em 1974, utilizando técnicas de arrastão e queimada.

Hoje, a fazenda apresenta como principais atividades de lavoura e pecuária: lavouras de feijão irrigado e milho; pastagens rotacionadas, extensivas e de confinamento e a aplicação do Sistema Integração Lavoura-Pecuária. Além disso, possui áreas sob vegetação nativa de Cerrado (Figura 1).

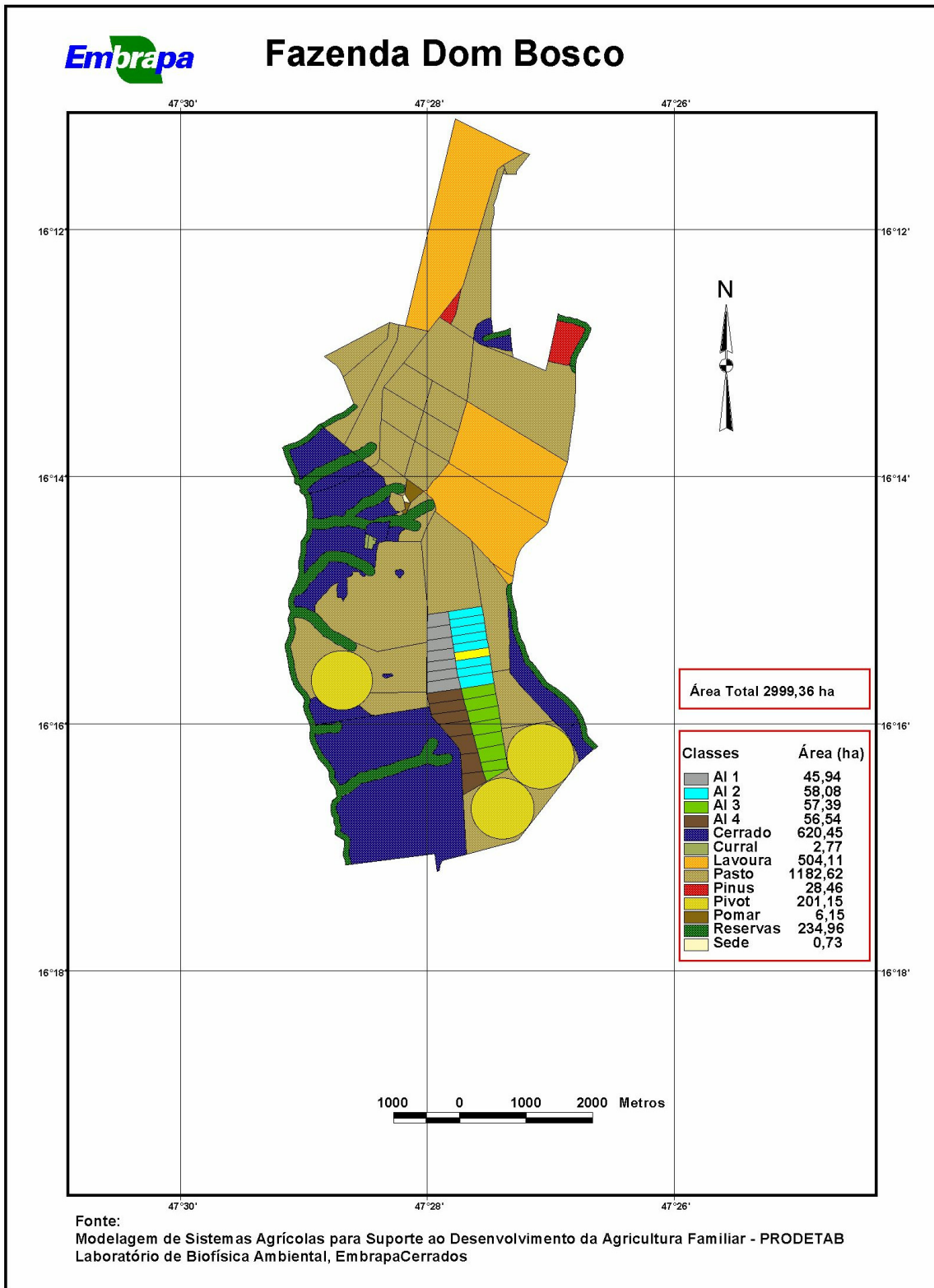


Figura 1. Mapa da Fazenda Dom Bosco (Cristalina – GO) evidenciando as práticas de pecuária e lavoura bem como a extensão de áreas destinadas à preservação de áreas nativas.



O clima na região é do tipo Aw (Köppen), tropical com sazonalidade bem definida (verões úmidos e invernos secos). A fazenda possui estação pluviométrica própria o que permite a determinação da precipitação pluviométrica diária na área. A precipitação na fazenda durante o período de estudo concentrou-se entre outubro de 2004 e março de 2005. Nos outros meses do ano houve um déficit hídrico, com 0mm de precipitação mensal (Figura 2).

As áreas escolhidas para o presente estudo estão listadas na tabela 1 e as características dos solos destas áreas estão descritas na tabela 2.

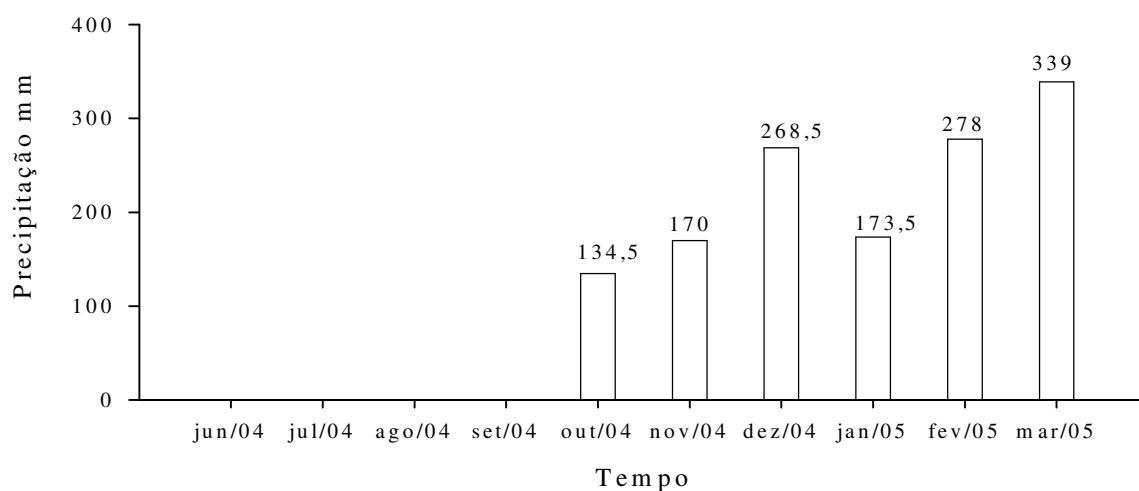


Figura 2. Distribuição da precipitação mensal durante os meses de junho de 2004 a março de 2005 na Fazenda Dom Bosco. Os números acima das barras correspondem aos valores de precipitação total do mês em mm.

Tabela 1. Áreas da Fazenda Dom Bosco selecionadas para estudo.

Área	Localização	Tamanho	Tratamento	Irrigação	Período
Cerrado <i>stricto sensu</i> (Figura 3A)	S 16°17'21.2" W 47°27'36.7"	620ha			jun/04 a mar/05
Rotação milho sequeiro ( <i>Zea mays</i> ) x feijão irrigado ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. Preto) (Figura 3C)	S 16°16'43.3" W 47°27'05"	75ha	Plantio Direto Herbicidas Inseticidas Fungicidas Controle biológico Tricodermil Adubação NPK	Pivô Central	jun/04 a out/04
Soja ( <i>Glycine max</i> cv. 70002 - Bayer) (Figura 3B)	S 16°13'14.4" W 47°27'59.8"	207ha	Plantio Direto Adubação NPK no plantio Herbicidas Inseticidas Fungicidas Inoculação com bactéria simbionte ( <i>Bradyrhizobium japonicum</i> )		set/04 a mar/05



Figura 3. Fotos das áreas de estudo. Da esquerda para direita: A – Cerrado sentido restrito; B – Soja e C – Feijão preto.

Tabela 2. Análise de solos das parcelas das áreas de cerrado sentido restrito, feijão irrigado e soja inoculada.

	<b>Cerrado sentido restrito</b>	<b>Feijão Irrigado</b>	<b>Soja Inoculada</b>
MO dag/kg	3,6	3,8	4,1
P mg/dm <sup>3</sup>	1,8	2,0	6,6
K mg/dm <sup>3</sup>	72,0	93,0	85,0
S mg/dm <sup>3</sup>	11,6	10,9	1,7
Ca <sup>2+</sup> cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>	0,4	2,7	2,9
Mg <sup>2+</sup> cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>	0,3	0,7	1,4
Al <sup>3+</sup> cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>	0,3	0,0	0,0
H+Al cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>	6,8	4,5	2,8
CTCt cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>	7,7	8,2	7,3
Argila %	65	45	74
Silt %	20	29	19
Areia %	15	26	7

Análises de Solos realizada pelo Laboratório de Fertilidade do Solo e Nutrição Vegetal – CAMPO. Extratores P e K: Mehlich I; Extrator S: Fosfato monobásico de cálcio; MO: método colorimétrico

### 1.1. Cerrado sentido restrito

A área de cerrado sentido restrito (Figura 3A) juntamente com as áreas de Mata de Galeria totalizam mais de 850ha de área protegida dentro da Fazenda Dom Bosco (Figura 1). É importante salientar que o cerrado permanecia sem queima e sem chuva desde junho de 2004 até a coleta feita em outubro de 2004. Doze dias antes desta coleta, a área sofreu queimada acidental e o período chuvoso teve início. A partir de então, a cerca que mantinha o gado afastado da área protegida foi destruída tornando freqüente o encontro de evidências da passagem do gado pela área.

## 1.2. Rotação milho sequeiro (*Zea mays*) x feijão irrigado (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Preto)

A área onde foi estabelecida a prática de rotação entre o milho sequeiro (*Zea mays*) e feijão irrigado (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Preto) foi estudada no período que compreende a cultura do feijão (Figura 3C). O milho é cultivado durante a estação chuvosa (novembro a abril) e o feijão é cultivado sob irrigação com pivô central durante a estação seca (junho a outubro). Após a remoção da cultura anterior (milho), a área permaneceu coberta com os restos culturais e com gramíneas mortas (*Brachiaria sp.*), produzidas anteriormente nesta área pelo sistema de Integração Lavoura–Pecuária, permanecendo estes como cobertura para o plantio direto. O plantio direto tem sido utilizado nesta área desde a retirada da cobertura original e a rotação de culturas teve início em 1986 sendo que somente a partir de 1996 o sistema de irrigação com pivô central foi instalado. Com exceção da colheita, todo o manejo da área foi feito via maquinário agrícola e a sua produção foi estimada em aproximadamente 50 sacas/ha.

Antes do plantio do feijão a área foi tratada com o herbicida Transorb (MonsantoS/A) para dessecação, com fungicida Tricodermil (Nutrimax LTDA) e foi aplicado 386,66 Kg.ha<sup>-1</sup> de adubo NPK (5-37-00) e 100 Kg.ha<sup>-1</sup> de KCl para o plantio, ambos fornecidos pela Bunge Fertilizantes. As sementes, produzidas na própria fazenda, também receberam tratamento com o inseticida Gaucho (Adubos Moema LTDA) e com os fungicidas Stablile Aid e o Tricodermil, ambos fornecidos pela Nutrimax LTDA. Logo após o plantio, feito via maquinário agrícola, nova dose de fungicida Tricodermil foi aplicada no solo.

A irrigação com pivô central provocava uma adição de água de aproximadamente 6 mm por dia e utilizava 40% da sua velocidade máxima gastando até 30 horas para irrigar toda área. Porém quando o adubo era adicionado à água, a fim de que ocorresse a fertilização, o pivô central funcionava a 100% da sua capacidade. A frequência de irrigação foi determinada pelo produtor e ocorria todos os dias na época de crescimento e fase juvenil do feijoeiro e após esta fase, de três em três dias.

Em julho/04 a área foi tratada com herbicidas de folha estreita, Fusilade (Agropaulista LTDA) e de folha larga, Flex (Agropaulista LTDA), Iharol (Vegetal LTDA) e Basagram (Charrua LTDA) e ao final do mês, 180 Kg.ha<sup>-1</sup> de uréia (Bunge Fertilizantes) foram aplicados sobre o feijão. Em agosto/04 a área recebeu doses diferenciadas de micronutrientes e logo após sofrer uma geada de vento, adicionou-se 5,33 Kg.ha<sup>-1</sup> de uréia (Bunge Fertilizantes). Em setembro/04, houve nova adição de inseticida, Acefato Cheminova (Brava LTDA) (contra percevejo) e do fungicida Tricodermil. Após este período as irrigações tornaram-se menos frequentes até a colheita, feita manualmente.

### 1.3. Soja (*Glycine max* cv. 70002 - Bayer)

A área destinada à soja (Figura 3B) não é submetida a rotação de culturas porém, o plantio direto tem sido utilizado desde a retirada da cobertura original, que ocorreu em 1991. Após a remoção da safra anterior, a área permaneceu coberta com os restos culturais até o início do período chuvoso (novembro de 2004), permanecendo estes restos como cobertura para o plantio direto. Todo o manejo desta área foi feito via maquinário agrícola e sua produção foi estimada em aproximadamente 51 sacas/ha.

Em novembro/04, antes do plantio da soja, a área foi tratada com o herbicida Transorb (Monsanto LTDA) e com o fungicida Derosal (Vegetal LTDA) e foi aplicado 423,43 Kg.ha<sup>-1</sup> de adubo (5-37-00), fornecidos pela Serrana S/A. As sementes, fornecidas pela Bayer, foram inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* (Carol LTDA) antes do plantio. Após o plantio, nova dose de herbicida Fusiflex (Agropaulista LTDA) folha larga e estreita foi aplicada no solo. Em dezembro/04 e janeiro/05 a área foi tratada com herbicidas Flex (Agropaulista LTDA), Pacto (Agrostemma LTDA) e Cobra (Moema LTDA) de folha larga e inseticidas Endosulfan (Agropaulista LTDA), Mentox e Dimilin, ambos fornecidos por Cultivar LTDA, contra a lagarta da soja. Em fevereiro/05 e início de março/05 a área recebeu doses diferenciadas de fungicidas como Score (Agropaulista LTDA), Stratego (Vegetal LTDA), Domark (Tec agro LTDA) e Folicur (Vilela e Cia LTDA) contra a ferrugem da soja.

## 2. Coleta de solos

Um quadrado de 05 m X 10 m (50 m<sup>2</sup>) foi estabelecido aleatoriamente em cada área de estudo e no seu interior cinco amostras simples foram coletadas em seis pontos distribuídos entre linha e entrelinha de plantio para a composição de seis amostras compostas (n=3 para linha e n=3 para entrelinha), como mostra a Figura 4. Na área de cerrado sentido restrito não houve diferenciação de linha e entrelinha sendo a amostra composta elaborada com 5g de cada amostras simples coletada (n=6). Para as análises moleculares, 5g de cada amostra simples foram separadas para a composição de duas amostras compostas representando a linha e entrelinha de plantio (n=1).

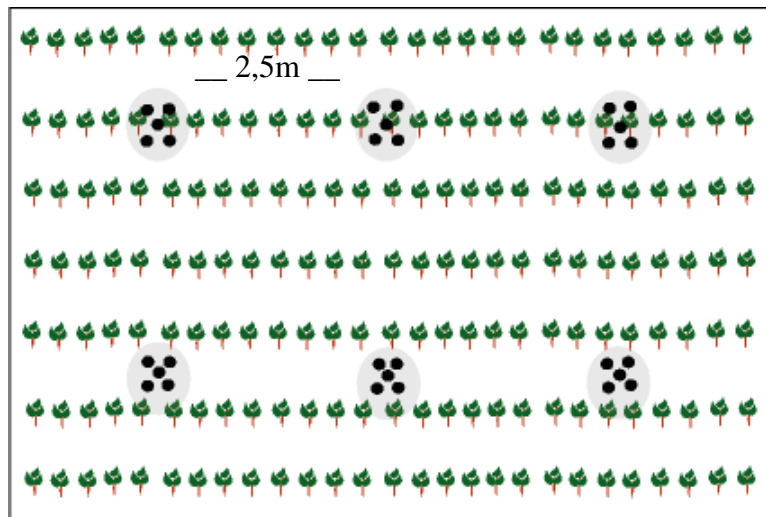


Figura 4. Representação esquemática da parcela de 05m x 10m. Os pontos pretos representam o local de coleta das amostras simples.

A coleta de solos foi feita com tubos de PVC de 10 cm de diâmetro, enterrados no solo a uma profundidade de 5 cm. As amostras destinadas à determinação do conteúdo gravimétrico de água foram acondicionadas em latas de alumínio vedadas, enquanto que as destinadas à determinação do carbono da biomassa microbiana, pH e análise de DNA foram acondicionadas em sacos plásticos e imediatamente refrigeradas até o laboratório, onde foram peneiradas em malha de 2 mm, congeladas (-20°C), para análise de DNA, e refrigeradas (4°C) para análise da biomassa microbiana.

As coletas de solo ocorreram em função das práticas aplicadas durante o ciclo de cada cultura, considerando-se o pré-plantio, plantio, fertilização, crescimento da cultura e pós-colheita (Tabela 3). Enquanto que na área de cerrado sentido restrito as coletas de solo foram realizadas mensalmente.

Tabela 3. Frequência de coleta e data de tratamento de cada área.

<b>Número</b>	<b>Área</b>	<b>Data de Coleta</b>	<b>Amostra *</b>	<b>Observação</b>
1	Feijão	11/6/2004	Pré-plantio (7 dias) - L	Plantio dia 18/6/2004
2	Feijão	19/6/2004	Pós-plantio (1 dia) – L e EL	
3	Feijão	23/6/2004	5 dias apos plantio – L e EL	
4	Feijão	23/7/2004	Pós-fertilização (2 dias) – L e EL	Fertilização dia 21/7/2004
5	Feijão	6/8/2004	Pós segunda fertilização (2 dias) - L	Fertilização dia 4/8/2004
6	Feijão	30/8/2004	Floração – L e EL	
7	Feijão	16/9/2004	Frutificação – L e EL	
8	Feijão	5/10/2004	Pré-colheita (4 dias) – L e EL	Colheita dia 9/10/2004
9	Feijão	19/10/2004	Pós-colheita (10 dias) – L e EL	
10	Soja	28/9/2004	Pré-plantio (42 dias) – L e EL	Plantio dia 9/11/2004
11	Soja	16/11/2004	Pós-plantio (7 dias) – L e EL	
12	Soja	17/12/2004	Floração – L e EL	
13	Soja	26/1/2005	Frutificação – L e EL	
14	Soja	1/3/2005	Pré-colheita (29 dias) – L e EL	Colheita dia 30/03/2005
15	Soja	6/4/2005	Pós-colheita (7 dias) – L e EL	
16	Cerrado	29/6/2004	Junho	
17	Cerrado	5/8/2004	Julho	
18	Cerrado	24/8/2004	Agosto	
19	Cerrado	16/9/2004	Setembro	
20	Cerrado	19/10/2004	Outubro	Início das chuvas 11/10/2004
21	Cerrado	16/11/2004	Novembro	
22	Cerrado	23/12/2004	Dezembro	
23	Cerrado	26/1/2005	Janeiro	
24	Cerrado	1/3/2005	Fevereiro	
25	Cerrado	6/4/2005	Março	

\* L – linha de plantio; EL – entrelinha de plantio

### **3. Análise de solos**

#### **3.1. Conteúdo gravimétrico de água**

O teor de umidade do solo foi obtido pelo método gravimétrico, que determina o percentual de água pela diferença entre o peso do solo fresco e seco (EMBRAPA, 1997). Em todas as coletas foram retiradas amostras simples de solo, na profundidade de 0-5cm, próximas aos seis pontos distribuídos dentro da parcela (Figura 4). No laboratório procedeu-se a pesagem do solo úmido (peso fresco), secagem em estufa a 105° C por 72 horas e pesagem do solo seco (peso seco).

#### **3.2. Carbono da biomassa microbiana do solo**

A biomassa microbiana foi estimada pela quantidade de C-CO<sub>2</sub> liberada das amostras de solo utilizando-se o método de fumigação - incubação estabelecido por Jenkinson e Powlson, 1976. Este método foi modificado por Oliveira (2000) e as alterações estão descritas abaixo.

Para cada coleta foram preparadas seis sub-amostras compostas onde a metade foi submetida a fumigação e a outra metade não. Estas foram acondicionadas por um período de sete dias a 100% da capacidade de campo. O acondicionamento das amostras não fumigadas foi realizado em frascos hermeticamente fechados, contendo em seu interior um frasco de vidro com 10 ml de KOH 0,3 N. No quinto dia de acondicionamento, as amostras destinadas à fumigação foram fumigadas por 48 horas com clorofórmio livre de álcool. Após este período foi determinada a taxa de respiração basal das amostras não fumigadas e procedeu-se a incubação de todas as amostras por dez dias da mesma forma em que foi realizado o acondicionamento das amostras não fumigadas.

A quantidade de C-CO<sub>2</sub> liberado foi quantificado através da titulação com HCl 0,1 N, usando fenolftaleína 1% como indicador. Uma constante  $K_c = 0,41$  (coeficiente de mineralização) foi utilizada para cálculo do C da biomassa microbiana, indicando



que 41% do C da biomassa microbiana foi mineralizado durante o período de incubação (Anderson e Domsch, 1978).

### 3.3. Determinação de pH

Dez gramas de solos previamente secos a temperatura ambiente foram utilizados na determinação do pH em H<sub>2</sub>O na proporção de 1:2,5. Após agitação com bastão de vidro e repouso por 30 minutos, procedeu-se a leitura com auxílio de um potenciômetro.

### 3.4. Extração de DNA microbiano do solo

De todas as amostras coletadas nas áreas sob cultivo foram selecionadas somente aquelas mais representativas de cada tratamento ou manejo feito no campo pelo produtor e na área de cerrado sentido restrito foram escolhidas somente amostras que representavam o início e o final de cada período de coleta feito nas lavouras. As amostras escolhidas são as de número 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 20 e 25 (Tabela 3). Esta escolha teve como objetivo a diminuição do número de amostras uma vez que as metodologias adotadas para análises moleculares envolvem grandes investimentos para a sua execução.

A extração de DNA do solo foi feita com base no método convencional de extração total direta retirado de van Elsas et al., 1997. Este método foi modificado por Silva (2004) e as alterações incluíram a modificação na seqüência dos passos utilizados ao longo do protocolo, a utilização de polietilenoglicol (PEG) e a retirada do passo que incluía precipitação com Cloreto de Césio (CsCl). A extração de DNA seguiu as seguintes etapas: lise física por agitação no aparelho Vórtex Genie 2 (Fischer Scientific) de células de 2 gramas de solo utilizando a mesma proporção de glass beads (150-212 microns, acid washed, marca Sigma<sup>®</sup>) e 5 ml de tampão (Tris HCl 0,01 M pH 8,0; Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,01 M pH 8,0; EDTA 0,5 M pH 8,0; NaCl e CTAB); lise química utilizando 200 µl de SDS 20% (sódio dodecil sulfato) e incubação a 65°C; centrifugação para separação do extrato com o DNA; separação do DNA de outros componentes celulares (como polissacarídeos e proteínas) e das partículas do solo utilizando 1 volume de polietilenoglicol (PEG) 8000 13%/NaCl 1,6 M; nova centrifugação e ressuspensão do pellet com 400 µl de TE 1X; precipitação do DNA utilizando acetato de potássio na

concentração final de 0.5 M; purificação do extrato utilizando 1 volume de phenol, seguido de 1 volume de clorofórmio:álcool-isoamílico (1:24) e 1 volume de isopropanol 80%; centrifugação para obtenção do DNA precipitado seguido de secagem à vácuo no Speed Vac (Eppendorf) e, por fim, ressuspensão em 200 µl de TE 1X.

A extração do DNA dos microrganismos do solo sempre resulta na coextração de substâncias húmicas que interferem na detecção e medida do DNA, podendo inibir a ação da *Taq* DNA polimerase no PCR (Zhou et al., 1996). Por este motivo outra etapa de purificação do extrato final é adotada após a extração do DNA. No presente estudo foi utilizado o kit de purificação Ultra Clean - Gel Spin DNA purification Kit - MoBio®, seguindo as recomendações do fabricante.

A comprovação da extração do DNA e sua integridade foi realizada em gel de agarose 0.8% corado com brometo de etídio (2 µg/ml) e o tamanho do DNA foi estimado por comparação com marcador 1kb plus ladder (USB-EUA).

A quantificação do material obtido foi determinada por meio da leitura de absorbância em espectrofotômetro (Gene Quant) utilizando comprimento de onda de 230 nm.

### 3.5 Amplificação por Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

#### 3.5.1 Comunidade bacteriana

As amostras purificadas foram submetidas à reação de polimerase em cadeia (PCR) e verificadas em gel de agarose a 1%. As reações para amplificação da comunidade bacteriana utilizaram primers universais 16S, U968f-GC (5' CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGACGCGAAGAA CCTTAC 3') e L1401r (5' GCGTGTGTACAAGACCC 3'), e seguiram o protocolo estabelecido por Nübel et al. (1996).

A reação de PCR que foi utilizada para amplificação da região 16S continha: 33,5 µl de H<sub>2</sub>O MilliQ, 5 µl de Tampão de *Taq* 10X (10 mM Tris-HCL pH 8,3; 5 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 4 µl de DNTP 2,5 µM, 2 µl de cada primer 16S a 5.10<sup>-12</sup> mol, 1,5 µl de *Taq* DNA polimerase 5 unidades e 2 µl de DNA purificado totalizando 50 µl de volume final da reação. O termociclador utilizado foi o Perkin Elmer seguindo o seguinte programa: Desnaturação inicial a 94°C por 4'; 25 etapas de desnaturação a

94°C 1', anelamento dos primers a 47°C 1'30'' e extensão da fita de DNA a 72°C 1'; Extensão final a 72°C por 15' e 10°C como temperatura de armazenamento.

### 3.5.2 Comunidade fúngica

Os protocolos inicialmente adotados a partir da literatura para as análises de PCR da comunidade fúngica não produziram os resultados esperados tornando necessárias algumas modificações.

Para amplificação da comunidade fúngica pretendia-se utilizar, em princípio, o conjunto de primers EF3 e EF4 para uma primeira amplificação seguido do conjunto EF4 e Fung5GC, específicos para a comunidade fúngica. Porém, apesar de resultar em produto de PCR de alta qualidade, não foi possível obter bandas nítidas no DGGE, resultado observado também por van Elsas et al. (2000). Por este motivo, optou-se pela utilização de dois conjuntos de primers para amplificação da comunidade fúngica em substituição ao conjunto EF4/Fung5GC, são eles: EF4/NS2GC e EF4/NS3GC. Os dois conjuntos de primers produziram bandas de tamanho esperado e alta intensidade. Porém, não foi possível obter bandas nítidas no DGGE com o conjunto EF4/NS2GC adotando-se para o presente estudo o conjunto EF4/NS3GC.

Smit et al. (1999) e Kowalchuk e Smit (2004) qualificaram o conjunto de primers escolhido neste trabalho (EF4/EF3 e EF4/NS3GC) como excelente em relação à especificidade de fungos; moderado em relação à abrangência de amplificação das divisões de fungos, bom em relação à qualidade do DGGE e moderado com relação ao poder de análise filogenética. Porém, os autores ressaltam que pode ocorrer amplificação preferencial com relação à divisão ascomicetos.

Borneman e Hartin (2000) testaram primers específicos para amplificação de comunidades fúngicas em ambientes complexos e compararam seus resultados com os primers descritos por Smit et al. (1999). Ao analisar o conjunto de primers EF3/EF4 é demonstrado que ele amplifica espécies de todas as divisões do reino Fungi e outras espécies que não são fungos. Com outro conjunto de primers EF4/NS3 não foi possível obter amplificações de todas as divisões do reino Fungi, fato contrário ao resultado obtido por Smit et al. (1999).

As amostras purificadas foram submetidas à reação de polimerase em cadeia (PCR) e verificadas em gel de agarose a 1%. Para a amplificação da comunidade fúngica as

reações seguiram o protocolo estabelecido por Smit et al. (1999) em que foram utilizados primers universais 18S EF4f (5' GGAAGGG[G/A]TGTATTTATTAG 3') e EF3r (5' TCCTCTAAATGACCAGTTTG 3') na primeira amplificação e o protocolo estabelecido por Brodie et al. (2003) em que foram utilizados os primers EF4f e NS3rGC(5'CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGGGCTGCTGGCACCAGACTTGC 3') para uma segunda amplificação (*nested PCR*).

A reação de PCR que foi utilizada para primeira amplificação da região 18S continha: 29,5 µl de H<sub>2</sub>O MilliQ, 5 µl de Tampão de *Taq* 10X (10 mM Tris-HCL pH 8,3; 5 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 4 µl de DNTP 2,5 µM, 4 µl de cada primer 18S a 5.10<sup>-12</sup> mol, 1,5 µl de *Taq* DNA polimerase 5 unidades e 2 µl de DNA purificado totalizando 50 µl de volume final da reação além de 10 µl de óleo mineral. O programa utilizado no termocilcador PTC-100 (Programmable Thermal Controler MJ Research INC) foi: Desnaturação inicial a 94°C por 3'; 25 etapas de desnaturação a 94°C 1', anelamento dos primers a 51°C 1' e extensão da fita de DNA a 72°C 1'; Extensão final a 72°C por 10' e 10°C como temperatura de armazenamento.

As amplificações que utilizavam produtos de PCR como template para uma segunda reação apresentavam no gel de agarose 1% bandas que representavam o DNA amplificado com o novo conjunto de primers EF4/NS3-GC e bandas que representavam o template não amplificado. Com o intuito de obter somente a banda do tamanho desejado foram feitas diluições do template obtido. As diluições estão apresentadas na tabela 4.

A reação de PCR que foi utilizada para a segunda amplificação da região 18S continha: 29,5 µl de H<sub>2</sub>O MilliQ, 5 µl Tampão de *Taq* 10X (10 mM Tris-HCL pH 8,3; 5 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 4 µl de DNTP 2,5 µM, 4 µl de cada primer 16S a 5.10<sup>-12</sup> mol, 1,5 µl de *Taq* DNA polimerase 5 unidades e 2 µl de DNA diluído da primeira amplificação (Tabela 4) totalizando 50 µl de volume final da reação além de 10 µl de óleo mineral. O programa utilizado no termocilcador PTC-100 (Programmable Thermal Controler MJ Research INC) foi: Desnaturação inicial a 94°C por 4'; 10 ciclos de desnaturação a 94°C 1', anelamento dos primers a 60°C 1' e extensão da fita de DNA a 72°C 1' sendo que a cada ciclo a temperatura de anelamento diminuía em 1°C; 15 ciclos de desnaturação a 94°C 1', anelamento a 50°C 1' e extensão a 72°C 1'; Extensão final a 72°C por 5' e 10°C como temperatura de armazenamento.

Tabela 4. Diluição do produto de amplificação 18S EF3 / EF4.

Área	Data Coleta	Amostra *	Diluição uDNA-ulH <sub>2</sub> O
Feijão	11/6/2004	Pré-plantio (7 dias) - L	1-1500
Feijão	19/6/2004	Pós-plantio (1 dia) – L	1-1500
Feijão	19/6/2004	Pós-plantio (1 dia) – EL	0,5-1000
Feijão	23/7/2004	Pós-fertilização (2 dias) – L	1-1500
Feijão	23/7/2004	Pós-fertilização (2 dias) – EL	0,5-1000
Feijão	6/8/2004	Pós segunda fertilização (2 dias) - L	1-1500
Feijão	5/10/2004	Pré-colheita (4 dias) – L	0,5-1000
Feijão	5/10/2004	Pré-colheita (4 dias) – EL	1-1500
Feijão	19/10/04	Pós-colheita (10 dias) – L	1-1500
Feijão	19/10/04	Pós-colheita (10 dias)–EL	0,5-1000
Soja	28/9/2004	Pré-plantio (42 dias) – L	1-1500
Soja	28/9/2004	Pré-plantio (42 dias) –EL	1-1500
Soja	16/11/04	Pós-plantio (7 dias) – L	1-1000
Soja	16/11/04	Pós-plantio (7 dias) –EL	1-1000
Soja	17/12/04	Floração – L	1-1000
Soja	17/12/04	Floração –EL	1-1500
Soja	26/1/2005	Frutificação - L	1-1500
Soja	26/1/2005	Frutificação - EL	1-1500
Soja	1/3/2005	Pré-colheita (29 dias) – L	0,5-1000
Soja	1/3/2005	Pré-colheita (29 dias) – EL	0,5-1000
Soja	6/4/2005	Pós-colheita (7 dias) – L	0,5-1000
Soja	6/4/2005	Pós-colheita (7 dias) – EL	0,5-1000
Cerrado	29/6/2004	Junho	1-1500
Cerrado	19/10/04	Outubro	1-1500
Cerrado	6/4/2005	Março	0,5-1000

\* L – linha de plantio; EL – entrelinha de plantio

Grampos de seqüências GC foram adicionados à extremidade 5' do primer NS3r (18S) e U968f (16S). O grampo quando introduzido ao fragmento amplificado após a reação age como um domínio de alta temperatura de desnaturação, impedindo a dissociação das duas fitas de DNA (Muyzer e Smalla, 1998). Este acréscimo permite a detecção nas variações de seqüências em fragmentos de DNA com até 500pb.

### 3.6 Eletroforese de gel com gradiente desnaturante (DGGE)

A técnica de DGGE baseia-se no decréscimo da mobilidade eletroforética de moléculas de DNA parcialmente desnaturadas em géis de poliacrilamida contendo um gradiente desnaturante (uma mistura de uréia e formamida). Moléculas de diferentes seqüências por ter comportamentos de desnaturação diferentes irão, portanto, parar a sua migração no gel em diferentes posições, formando bandas (Muyzer, 1999).

Para cada conjunto de amostras analisadas, três géis de DGGE foram feitos sob as mesmas condições de concentração de acrilamida, gradiente desnaturante, temperatura do tampão e tempo de corrida para verificação da reprodutibilidade da técnica.

#### 3.6.1 Comunidade bacteriana

O protocolo descrito por Peixoto et al. (2002) foi utilizado com modificações que incluíram: alteração do gradiente desnaturante de 40-70% para 45-75% e a alteração da temperatura do tampão de corrida de 60°C para 55°C. A mudança destes fatores tornou o gel de melhor qualidade, apresentando bandas mais nítidas e mais distribuídas ao longo do gradiente.

Os produtos de PCR foram aplicados na quantidade de 20 µl e adicionados 15 µl de corante (2% de azul de bromofenol, 2% de xileno cianol, glicerol 100% e água Milli-Q) em gel de poliacrilamida a 6% e gradiente desnaturante de 45 – 75% (uréia-formamida). A corrida do gel foi feita a voltagem constante de 70V e temperatura de 55° C por um período de 18 horas em tampão TAE 1X (20 mmol/l tris acetato, 10 mmol/l acetato de sódio e 5 mmol/l de EDTA).

### 3.6.2 Comunidade fúngica

O protocolo descrito por Brodie et al. (2003) foi utilizado com uma modificação que inclui a diminuição da temperatura do tampão de corrida de 60°C para 55°C.

Os produtos de PCR foram aplicados na quantidade de 15 µl e adicionados a 15 µl de corante em um gel de poliacrilamida a 10% e gradiente desnaturante de 35 – 50% (uréia-formamida). A corrida do gel foi feita a voltagem constante de 85V e temperatura de 55° C por um período de 17 horas em tampão TAE 1X.

Uma pré-corrída de 1 hora foi realizada com os mesmos parâmetros para limpeza inicial do gel e aquecimento do tampão de corrida. Após a corrida, os géis foram corados com SYBR green I seguindo as instruções do fabricante. A vantagem deste corante é a diminuição da observação de fragmentos de DNA menos dominantes que causam ruídos no gel e maior sensibilidade quando comparado ao brometo de etídio (Muyzer e Smalla , 1998, Muyzer et al. 2004). As bandas foram visualizadas em transiluminador UV (TFX 35M, Gibco BRI UV Transiluminador) com posterior fotografia do gel (KodaK digital Science Electrophoresis Documentation and Analysis System, modelo DC 120). O aparelho utilizado para as análises de DGGE (BioAgency) foi gentilmente cedido pelo professor Tatsuya Nagata da Universidade Católica de Brasília.

Para posterior seqüenciamento de bandas, os géis foram armazenados em papel celofane após a coloração com AgNO<sub>3</sub> segundo protocolo estabelecido por Creste et al. (2001): 10' sob leve agitação em solução fixadora (10% etanol e 1% de ácido acético glacial); 3' sob leve agitação em solução oxidante (1,5% de ácido nítrico); 15' sob leve agitação em solução contendo AgNO<sub>3</sub> a 0,2%; revelação utilizando CaCO<sub>3</sub> a 3% e formaldeído a 37% e solução *stop* com 5% de ácido acético. Entre cada etapa (com exceção do intervalo entre as etapas de revelação e *stop*) foi feita uma lavagem do gel com água destilada durante 2' para evitar manchas e melhorar a qualidade da revelação. Após a coloração os géis foram colocados entre duas camadas de papel celofane previamente umedecidas utilizando uma placa de vidro como suporte e secos a temperatura ambiente por 3 dias.

### 3.7. Seqüenciamento

Após a análise dos géis de DGGE, foram escolhidas bandas para a identificação da seqüência. A escolha das bandas foi feita utilizando-se como parâmetro a sua intensidade e presença/ausência em determinados perfis. O protocolo estabelecido por Marshall et al. (2003) foi utilizado com as seguintes modificações: Para a excisão da banda no gel, uma quantidade de água MilliQ suficiente para cobrir a banda escolhida foi adicionada e, após levemente amolecida, foi retirada do gel com o auxílio de uma lâmina de *gillete*. A banda permaneceu em 50 µl de água MilliQ por três dias a fim de liberar o DNA da acrilamida. Após este prazo, uma nova amplificação foi feita utilizando-se os mesmos parâmetros de PCR descritos anteriormente com a condição de substituir o valor equivalente de água MilliQ e DNA purificado pela água em que a banda está inserida.

Para as amostras representativas de populações fúngicas além da reamplificação se fez necessário melhorar a qualidade do DNA obtido eliminando primers, rastros e bandas inespecíficas. As amostras foram aplicadas em gel de TAE 1X 1% e as bandas de tamanho desejado foram removidas do gel e o DNA foi recuperado utilizando o kit Ultra Clean - Gel Spin DNA purification Kit - MoBio<sup>®</sup>, seguindo as recomendações do fabricante.

Após as reamplificações, as amostras foram submetidas a outro gel de DGGE com idênticas condições dos géis onde foram retiradas. Este procedimento visa verificar a qualidade da banda reamplificada bem como a presença de outras bandas inespecíficas que possam interferir na reação de seqüenciamento.

As reações de seqüenciamento foram feitas por PCR utilizando-se o kit de seqüenciamento DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing (Amersham Biosciences) para seqüenciador automático ABI Prism 377 (Applied Biosystems), nas seguintes concentrações 0,3 µM de primers (descritos acima nas reações de PCR); 100 ng de DNA; 2 µl de Sequencing reagent premix (marcação fluorescente do kit de seqüenciamento) totalizando 10 µl de volume final.



#### **4. Análise dos resultados**

A distribuição normal dos dados foi testada através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados de pH do solo, conteúdo gravimétrico de água e carbono da biomassa microbiana foram inicialmente analisados com procedimento para comparação de medidas ente a linha e entrelinha de plantio (Teste *t* de Student). Posteriormente procedeu-se análise de variância (ANOVA) e a análise univariada (teste Tukey) para testar diferenças através das médias ao longo do período de estudo. O nível de significância adotado foi de 5%. Utilizou-se o programa SPSS versão 10.0 para Windows.

Para análise dos perfis de bandas dos géis de DGGE foi feita uma matriz binária de acordo com a presença ou ausência de bandas. Os perfis das amostras foram convertidos manualmente em matrizes 1/0 e procedeu-se as análises no programa NTSYSpc - Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System versão 2.10t. Para avaliação da similaridade, utilizou-se o coeficiente Dice, que atribui pesos iguais à presença ou ausência de característica. O agrupamento das amostras foi feito utilizando-se o método UPGMA (Unweight pair-group method) (Sneath e Sokal, 1973 *apud* Johnson et al., 2003). O agrupamento das amostras através do método UPGMA deve ser aplicado quando se pretende identificar amostras que provavelmente venham a gerar padrões de bandas semelhantes (Fromin et al., 2002).

A análise da qualidade das seqüências foi feita através do site de Bioinformática da Universidade Católica de Brasília (<http://www.bioinformática.ucb.br/services.html>) utilizando o índice Phred 20. Após esta análise as seqüências foram submetidas à análise de quimeras através do programa Bellerophon no site (<http://foo.maths.uq.edu.au/~huber/bellerophon.pl>) utilizando o padrão de correção Huber-Hugenholtz (Huber et al., 2004) e a identificação com o organismo mais similar foi feita por meio do banco de dados NCBI-BLAST (National Center for Biotechnology Information - Basic Local Alignment Search Tool [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]).

## Resultados

### 1. Teor Gravimétrico de Água, pH e Carbono da Biomassa Microbiana

#### 1. Cerrado sentido restrito

O conteúdo gravimétrico de água no solo (0 a 5 cm) na área de cerrado sentido restrito respondeu às variações de precipitação durante o ano ocorridas na Fazenda Dom Bosco (Figura 2 e 5). Os valores médios de umidade no solo nos meses referentes ao período seco foram de 16,2% e no período chuvoso de 33,9%. A umidade do solo variou de forma significativa ( $P \leq 0,05$ ) de 12,6% (setembro de 2004) a 38,9% (dezembro de 2004) durante o período de coleta (Figura 5), ou seja, há uma diferença significativa entre os meses referentes à época seca com os meses referentes à época chuvosa.

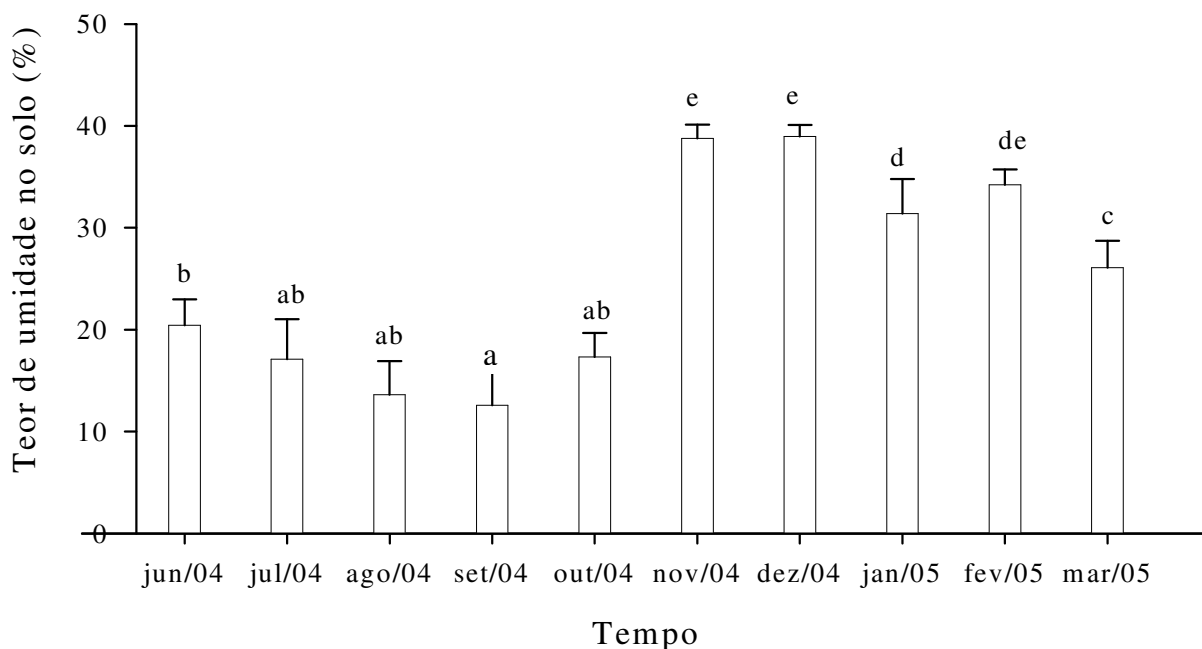


Figura 5. Valores médios do teor de umidade no solo (%) obtidos em área de cerrado sentido restrito no intervalo de 0 a 5cm de profundidade do solo entre junho de 2004 a março de 2005. As barras verticais representam os desvios padrão e as letras diferentes acima das barras representam diferenças significativas entre os meses.

Na figura 6 estão representados os valores de pH obtidos em água das amostras coletadas na área de cerrado sentido restrito. Os valores de pH do solo variaram de 4,48 (setembro de 2004) a 5,50 (novembro de 2005).

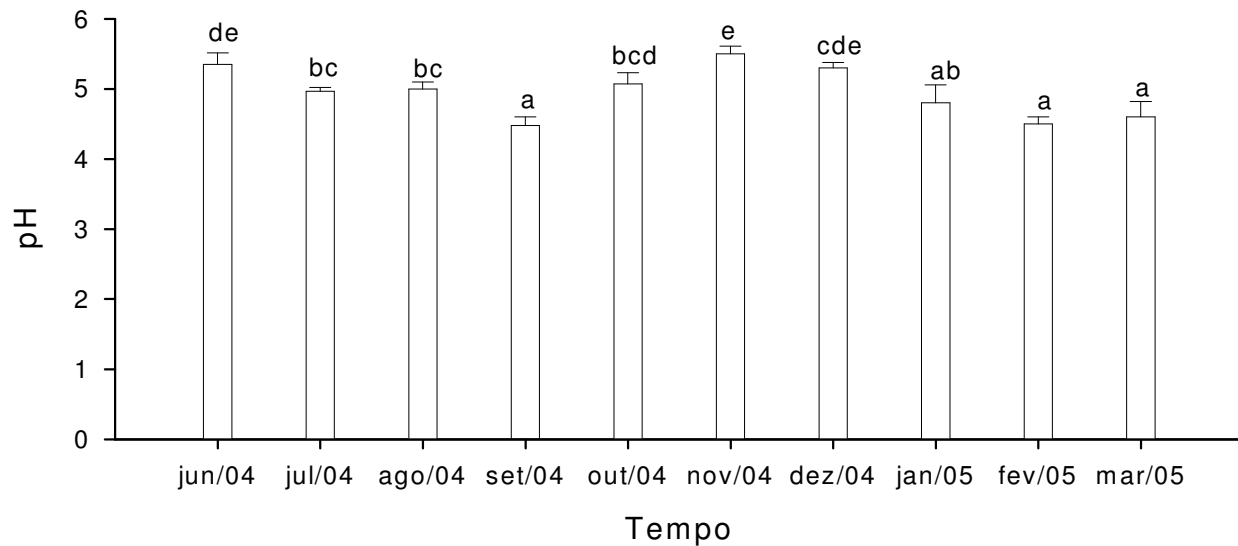


Figura 6. Valores médios de pH em água obtidos na área de cerrado sentido restrito no intervalo de 0 a 5cm de profundidade durante o período de junho de 2004 a março de 2005. As barras verticais representam os desvios padrão e as letras diferentes acima das barras representam diferenças significativas entre os meses.

Os valores de carbono da biomassa microbiana do solo na profundidade de 0 a 5cm na área de cerrado sentido restrito diferiram significativamente nos períodos de transição entre as estações e o auge da estação chuvosa, variando de 247,6 mg C.kg<sup>-1</sup> solo seco (dezembro de 2004) a 444,3 mg C.kg<sup>-1</sup> solo seco (setembro de 2004) (Figura 7).

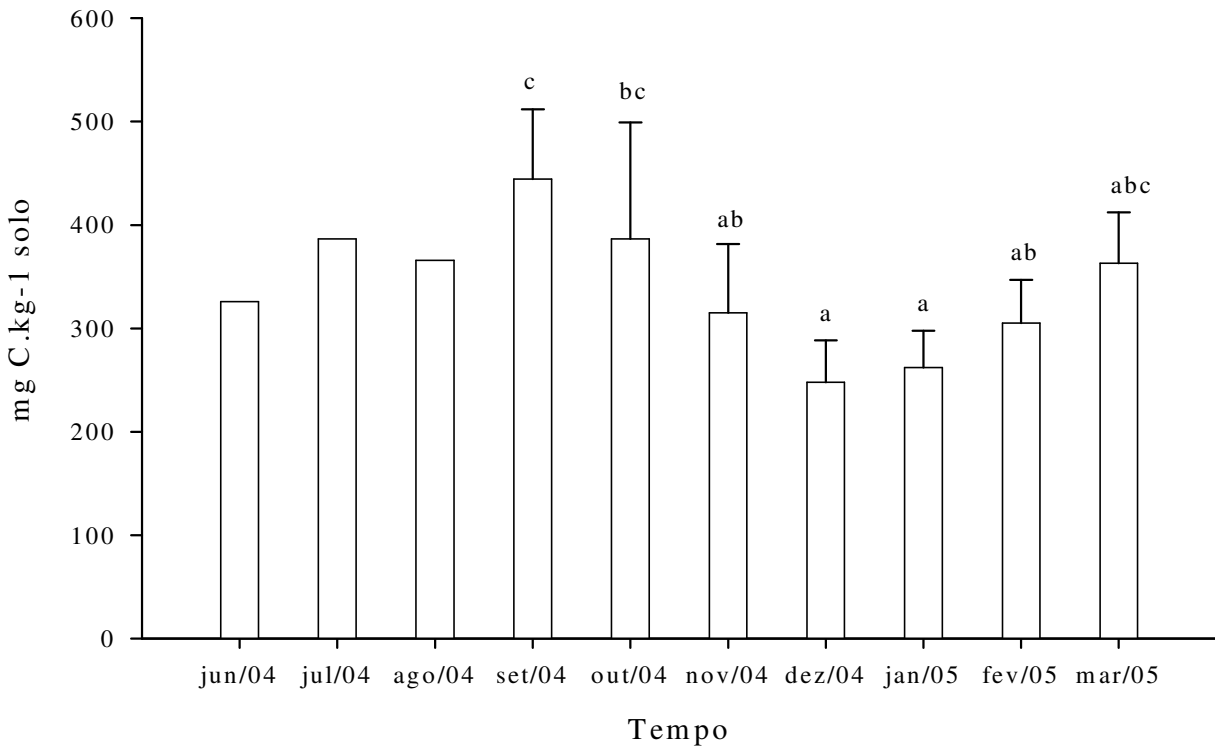


Figura 7. Valores médios de carbono da biomassa microbiana do solo (mg C.kg<sup>-1</sup> solo), obtidos na área de cerrado sentido restrito no intervalo de 0 a 5cm de profundidade do solo no período de junho de 2004 a março de 2005. As barras verticais representam os desvios padrão e as letras diferentes acima das barras representam diferenças significativas entre os meses.

### 1.2 Soja (*Glycine max* cv. 70002 - Bayer)

Como observado para a área nativa, o conteúdo gravimétrico de água na profundidade 0 a 5 cm na área de soja respondeu às variações de precipitação (Figura 8), entretanto os valores mínimos observados foram inferiores ao medido para o cerrado (12,6%). A umidade do solo variou de 5,7% (setembro de 2004 – pré-plantio) a 41,6% (fevereiro de 2005 – pré-colheita) e de 5,1% (setembro de 2004 – pré-plantio) a 41,1% (fevereiro de 2005 – pré-colheita) na linha e entrelinha de plantio, respectivamente. Os valores medidos nas amostras de setembro de 2004 (pré-plantio) foram significativamente ( $P \leq 0,05$ ) inferiores aos medidos nos meses referentes à época

chuvosa. Dentre os meses da época chuvosa, é possível observar diferença significativa entre os meses de dezembro de 2004 (floração) e março de 2005 (pós-colheita). Não houve diferença significativa entre os meses de novembro de 2004 (pós-plantio), janeiro (frutificação) e fevereiro (pré-colheita) de 2005.

Comparando-se os valores para linha e entrelinha de plantio, houve diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) dos valores de umidade do solo nos meses de novembro (pós-plantio) e dezembro (floração) de 2004, sendo maiores os valores encontrados na entrelinha de plantio.

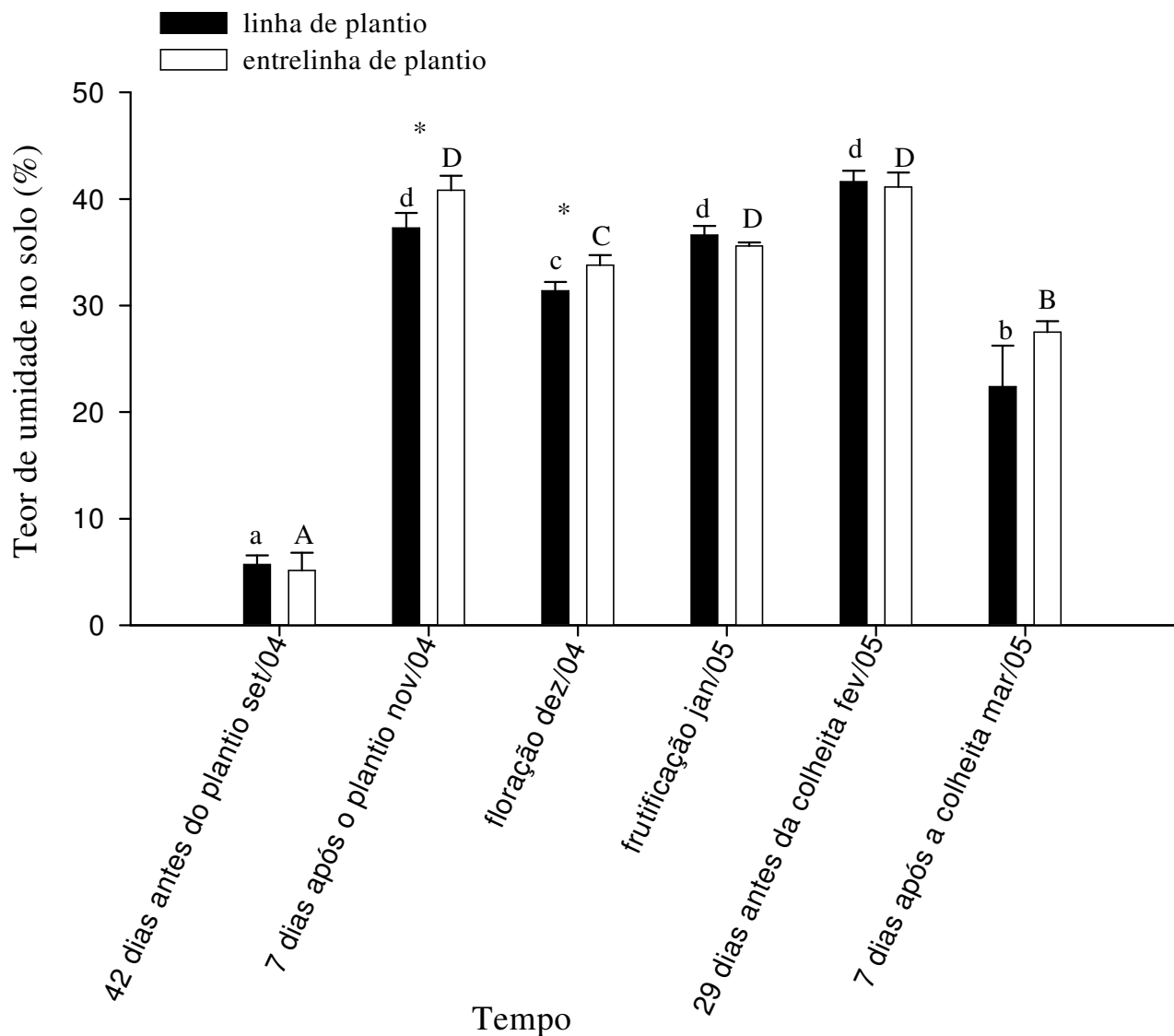


Figura 8. Valores médios do teor de umidade no solo (%) obtidos em área de plantação de soja no intervalo de 0 a 5cm de profundidade do solo entre setembro de 2004 a março de 2005. As barras verticais representam os desvios padrão. As letras diferentes acima das barras representam diferenças significativas entre os meses – minúsculas representam a linha de plantio e maiúsculas a entrelinha de plantio. Diferenças significativas entre a linha e entrelinha de plantio estão indicadas por asteriscos ( $P \leq 0,05$ ).

Os valores de pH do solo na área de soja foram mais altos que na área nativa e variaram de forma significativa de 5,20 (março de 2005 – pós-colheita) a 6,50 (dezembro de 2004 – floração) na linha de plantio e de 5,20 (março de 2005 – pós-colheita) a 6,40 (dezembro de 2004 – floração) na entrelinha de plantio (Figura 9). Comparando-se as coletas feitas na linha e entrelinha de plantio foi possível observar uma diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) no mês de janeiro de 2005, apresentando a entrelinha de plantio, menor valor.

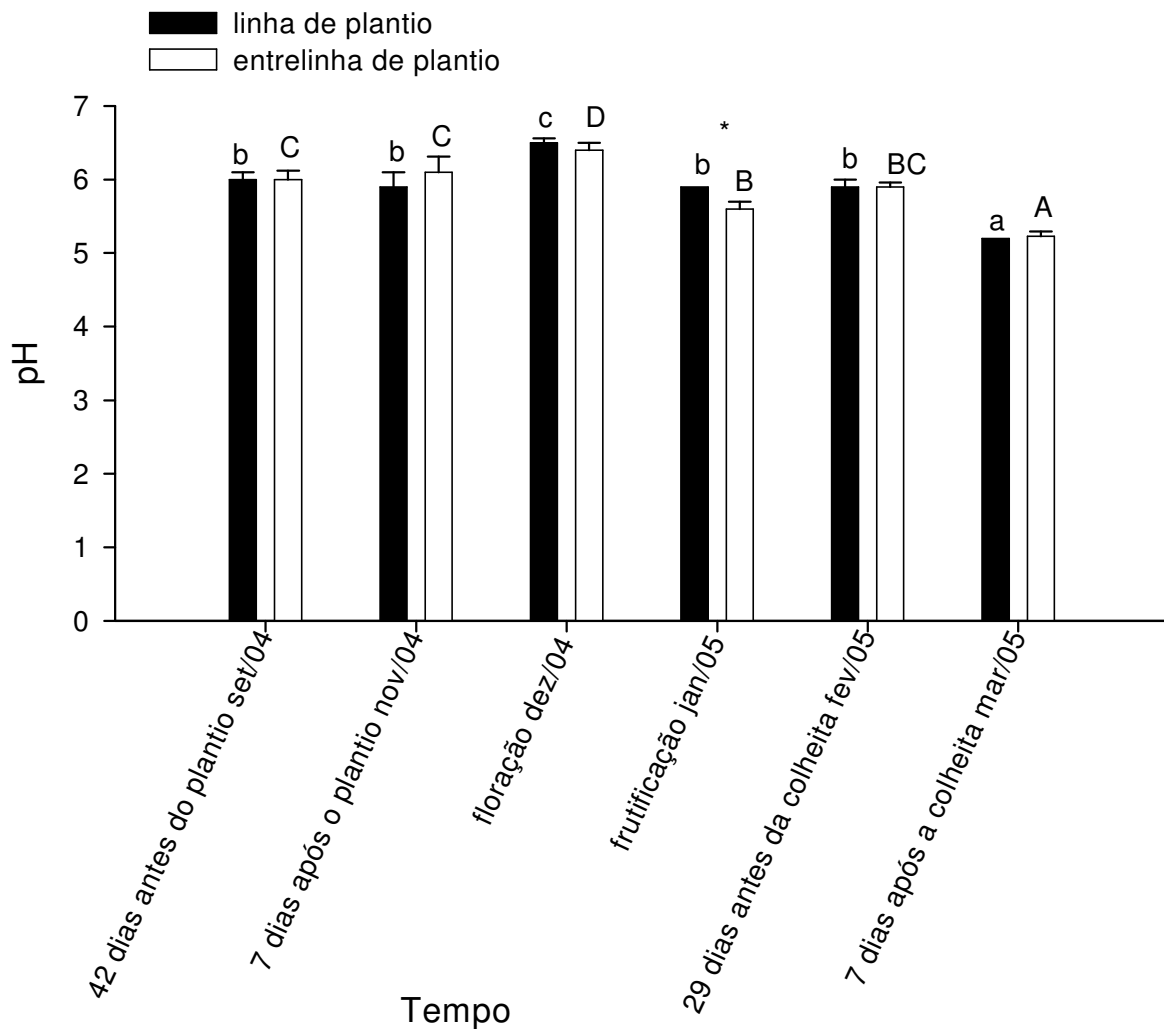


Figura 9. Valores médios de pH em água obtidos na área de soja no intervalo de 0 a 5cm e de profundidade durante o período de setembro de 2004 a março de 2005. As barras verticais representam os desvios padrão. As letras diferentes acima das barras representam diferenças significativas entre os meses – minúsculas representam a linha de plantio e maiúsculas a entrelinha de plantio. Diferenças significativas entre a linha e entrelinha de plantio estão indicadas por asteriscos ( $P \leq 0,05$ ).

Os valores de carbono da biomassa microbiana do solo na área de soja no intervalo de 0 a 5 cm de profundidade variaram de 130,4 mg C.kg<sup>-1</sup> (dezembro de 2004 – floração) a 220,8 mg C.kg<sup>-1</sup> (setembro de 2004 – pré-plantio) na linha e de 84,5 mg C.kg<sup>-1</sup> (setembro de 2004 – pré-plantio) a 367,6 mg C.kg<sup>-1</sup> (março de 2005 – pós-colheita) na entrelinha de plantio (Figura 10). Houve uma redução de até 66% do carbono da biomassa microbiana na área de soja em relação ao cerrado sentido restrito quando comparados os valores médios mínimos obtidos em cada área. Já a redução em relação à área nativa quando comparados os valores médios máximos foi de 17%.

Variação significativa entre os meses foi observada somente nas amostras coletadas na entrelinha de plantio (84,5 mg C.kg<sup>-1</sup> solo em setembro de 2004 – pré-plantio a 367,6 mg C.kg<sup>-1</sup> solo em março de 2005 – pós-colheita).

Observou-se diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) dos valores de carbono da biomassa microbiana do solo entre linha e entrelinha de plantio no mês de dezembro de 2004 e janeiro de 2005, sendo os valores maiores na entrelinha.

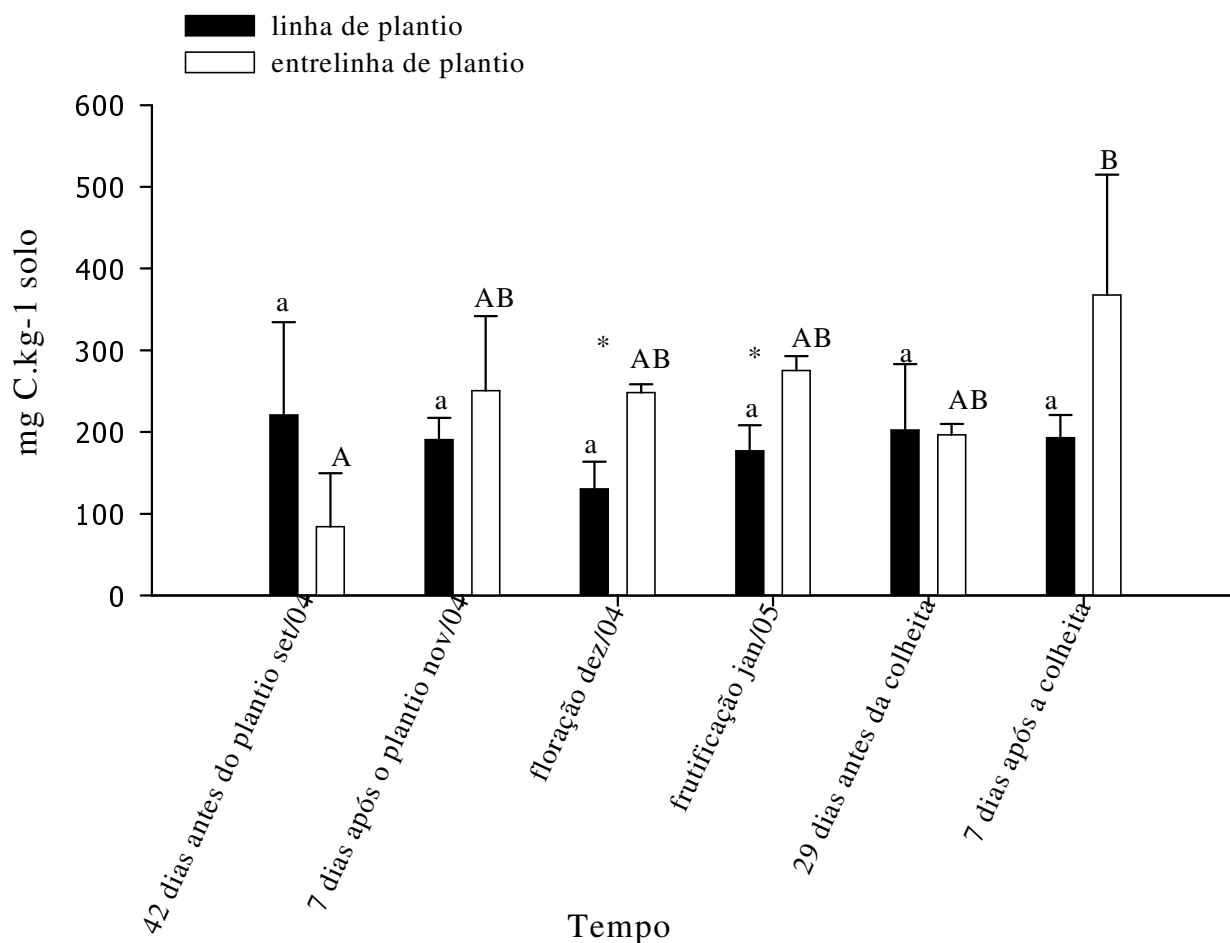


Figura 10. Valores médios de carbono da biomassa microbiana do solo (mg C.kg<sup>-1</sup> solo), obtidos na área de soja no período de setembro de 2004 a março de 2005. As barras verticais representam os desvios padrão. As letras diferentes acima das barras representam diferenças significativas entre os meses – minúsculas representam a linha de plantio e maiúsculas a entrelinha de plantio. Diferenças significativas entre a linha e entrelinha de plantio estão indicadas por asteriscos ( $P \leq 0,05$ ).

### 1.3 Feijão irrigado (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Preto)

O conteúdo gravimétrico de água no solo (0 a 5 cm) na área de feijão irrigado variou de 31% (outubro de 2004 – pré-colheita) a 42,7% (julho de 2004 – pós-fertilização) na linha e de 26,4% (outubro de 2004 – pós-colheita) a 41,7% (julho de 2004 – pós-fertilização) na entrelinha de plantio (Figura 11).

Os valores de umidade do solo diferiram significativamente ( $P \leq 0,05$ ) entre a linha e entrelinha de plantio no mês de junho de 2004 (5 dias pós plantio), sendo maior o valor encontrado na linha de plantio com 2,89% de diferença. Na linha de plantio, a umidade do solo no mês de outubro de 2004 (pré e pós-colheita) foi significativamente menor que nos demais meses avaliados (junho a setembro de 2004). Comparando-se somente as amostras da entrelinha de plantio, observa-se que a umidade é significativamente maior em julho de 2004 (pós-fertilização) que em outubro de 2004 (pós-colheita). Esta diferença pode ter sido ocasionada pela diminuição da frequência de irrigação pelo produtor na época da colheita.



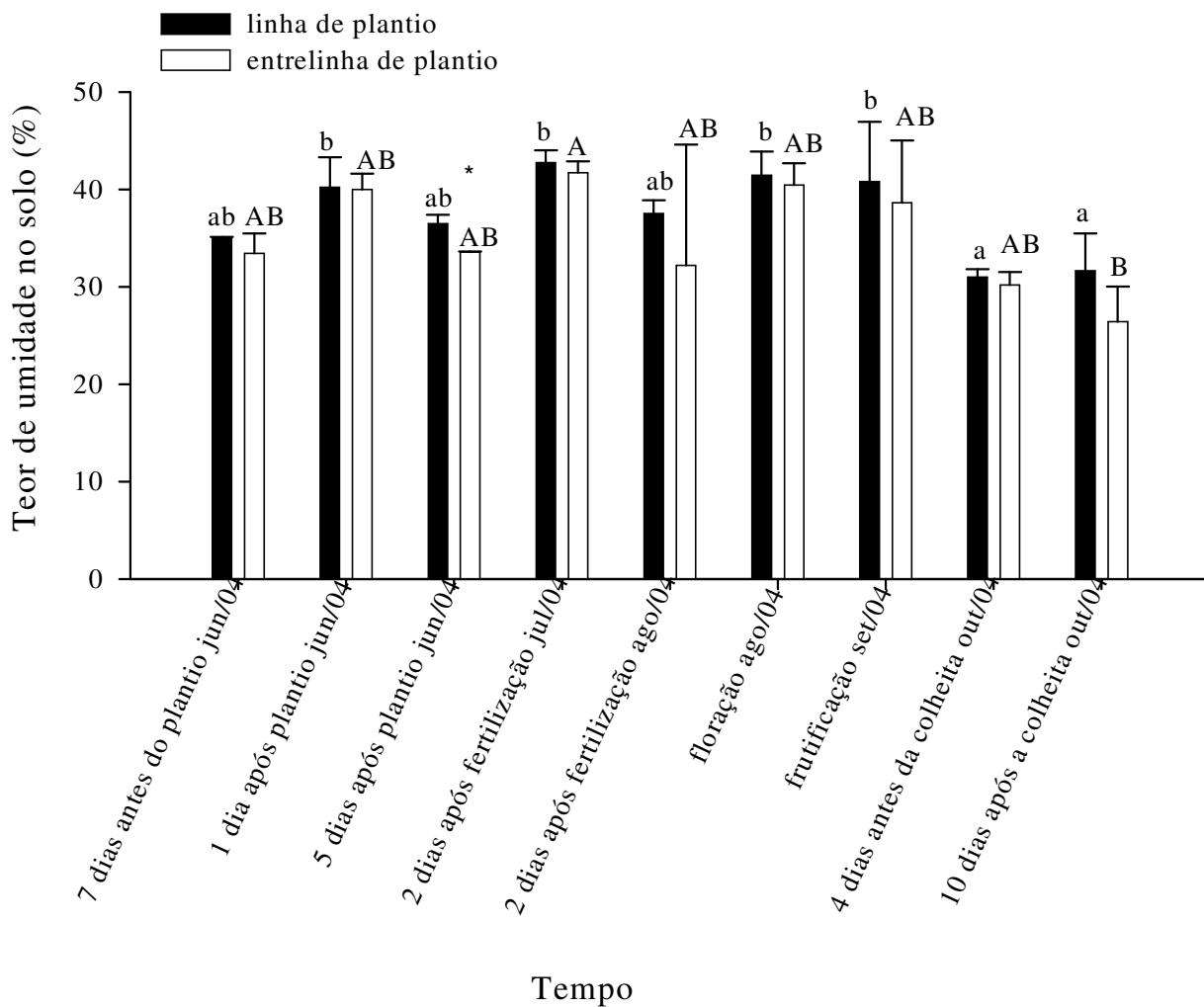


Figura 11. Valores médios do teor de umidade no solo (%) obtidos em área de feijão irrigado no intervalo de 0 a 5cm de profundidade do solo entre junho de 2004 a outubro de 2004. As barras verticais representam os desvios padrão e as letras diferentes acima das barras representam diferenças significativas entre os meses - minúsculas representam a linha de plantio e minúsculas a entrelinha de plantio. Diferenças significativas estão indicadas por asteriscos ( $P \leq 0,05$ ).

Os valores de pH variaram de 5,63 (setembro de 2004 – frutificação) a 6,71 (junho de 2004 – 5 dias pós plantio) na linha e de 5,87 (setembro de 2004 – frutificação) a 6,60 (agosto de 2004 – floração) na entrelinha de plantio (Figura 12).

Os valores de pH na entrelinha foram significativamente maiores que na linha de plantio ( $P \leq 0,01$ ) nos meses de setembro de 2004 (frutificação) e outubro de 2004 (pré-colheita).

Assim como observado para a área de soja, as variações significativas entre linha e entrelinha concentraram-se nos períodos referentes ao início do enchimento do legume (frutificação) até a colheita.

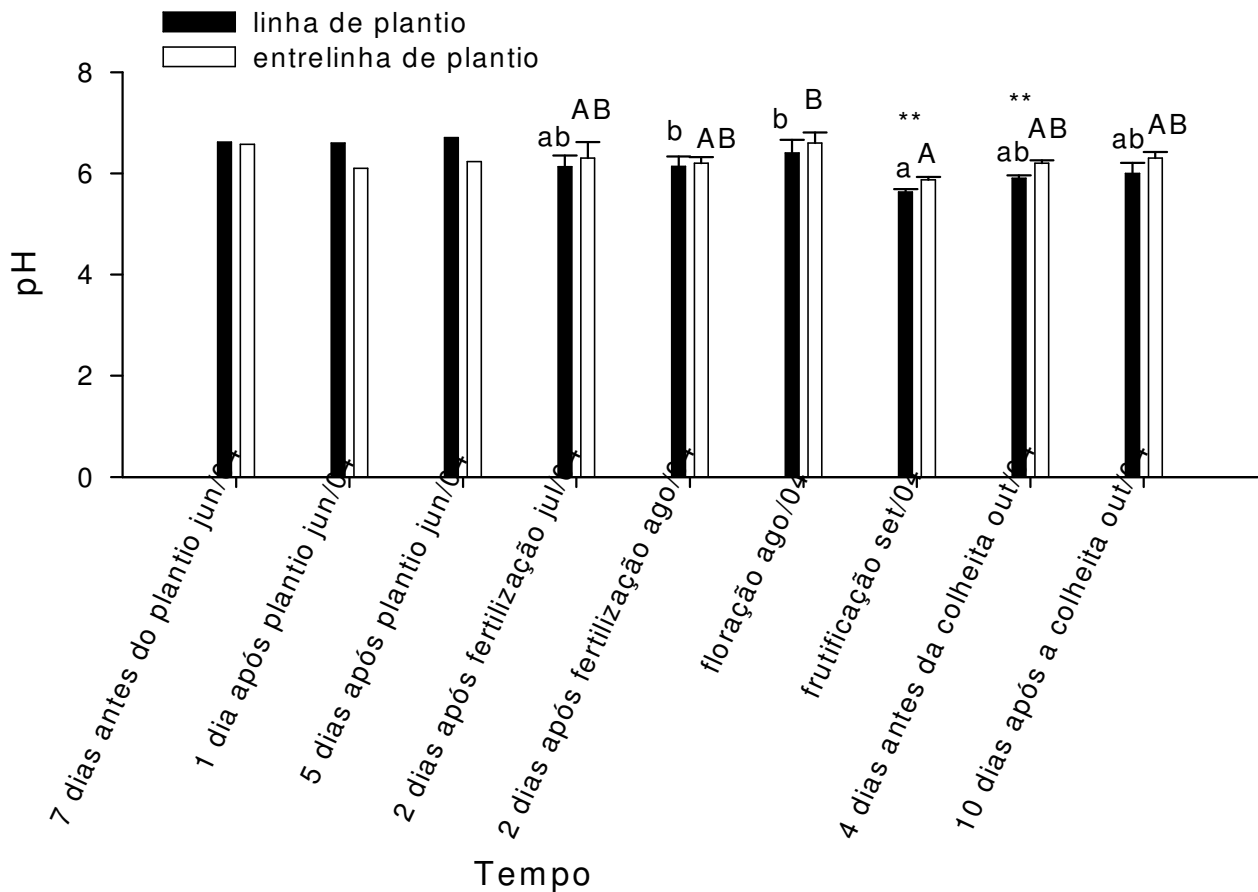


Figura 12. Valores médios de pH em água obtidos na área de feijão no intervalo de 0 a 5cm e de profundidade durante o período de junho de 2004 a outubro de 2004. As barras verticais representam os desvios padrão. As barras verticais representam os desvios padrão e as letras diferentes acima das barras representam diferenças significativas entre os meses.– minúsculas representam a linha de plantio e minúsculas a entrelinha de plantio. Diferenças muito significativas estão indicadas por dois asteriscos ( $p \leq 0,01$ ).

Os valores médios de pH nas áreas agrícolas (Figuras 9 e 12) foram aproximadamente 14% maiores que na área nativa (Figura 6), provavelmente pelas práticas de calagem e gessagem adotadas pelo produtor.

A variação de carbono da biomassa microbiana na área de feijão irrigado foi de 274,4 mg C.kg<sup>-1</sup> solo (agosto de 2004 – floração) a 738,1 mg C.kg<sup>-1</sup> solo (junho de 2004 – 1 dia pós plantio) na linha e de 279,4 mg C.kg<sup>-1</sup> solo (setembro de 2004 – frutificação) a 481,2 mg C.kg<sup>-1</sup> solo (junho de 2004 – 5 dias pós plantio) na entrelinha de plantio (Figura 13).

Não se observam diferenças nos valores de biomassa microbiana ao longo do ciclo de cultivo e entre as amostras de solo de linha e entrelinha embora se note uma tendência de maiores valores na linha de plantio no período pré-plantio e logo após o plantio.

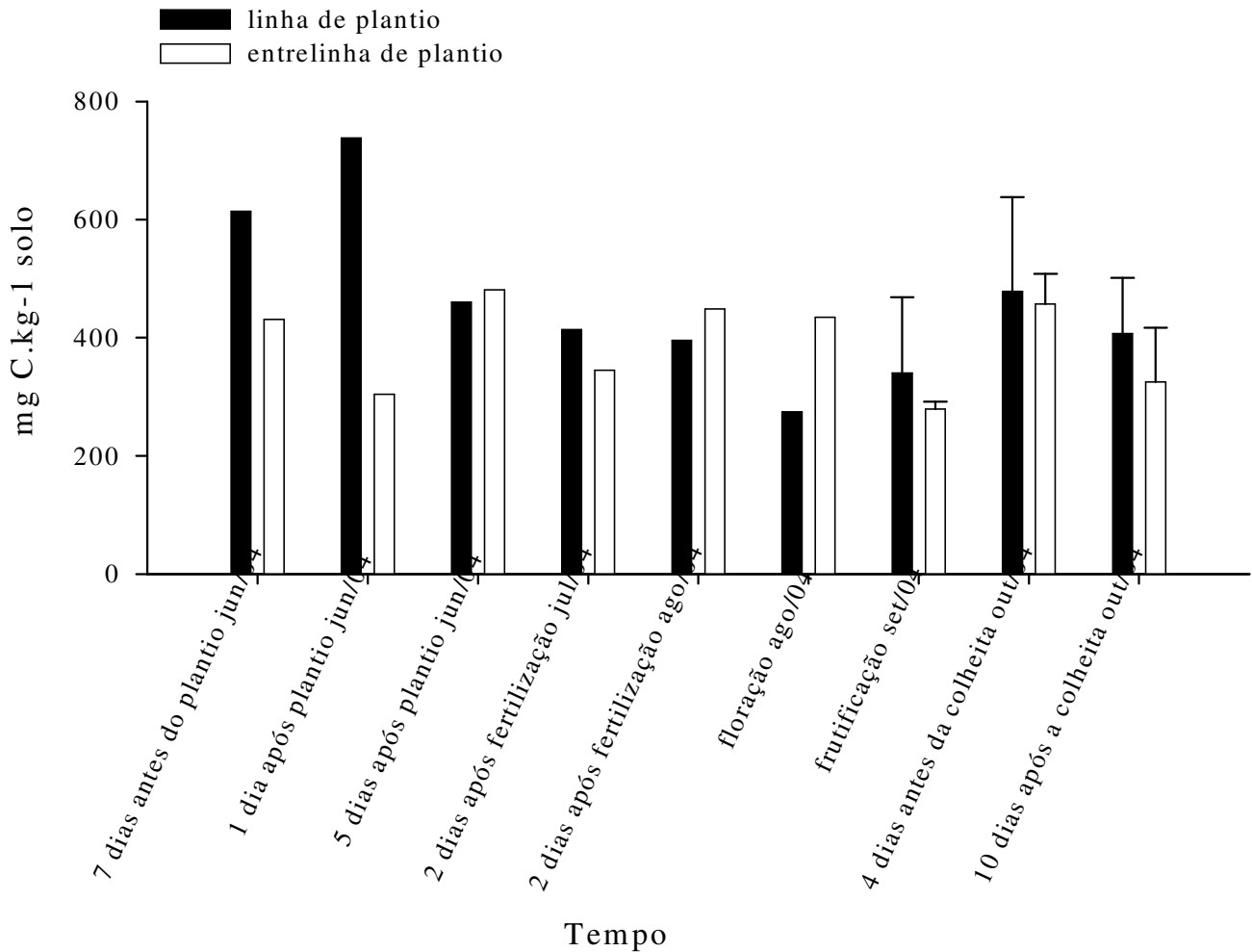


Figura 13. Valores médios de carbono da biomassa microbiana do solo (mg C.kg<sup>-1</sup> solo), obtidos na área de feijão irrigado no intervalo de 0 a 5cm de profundidade do solo no período de junho a outubro de 2004. As barras verticais representam os desvios padrão.

## 2. Extração de DNA, PCR, DGGE e Seqüenciamento

### 2.1 Extração de DNA e PCR

O DNA de solo obtido após extração e purificação para eliminação de compostos limitantes das reações de PCR apresentou qualidade e quantidade suficientes para a realização dos protocolos subseqüentes. Após a visualização em gel de agarose 0,8% foi verificado que o DNA extraído possuía peso maior que 12000 pb e ausência de rastro evidenciando a integridade do material extraído (Figura 14). A quantificação do produto através da espectrofotometria após a purificação confirmou a presença de grande quantidade de DNA atingindo em algumas amostras valores de até 5800 ng/ul. A intensidade de bandas não apresentou variação significativa entre as extrações de diferentes amostras.

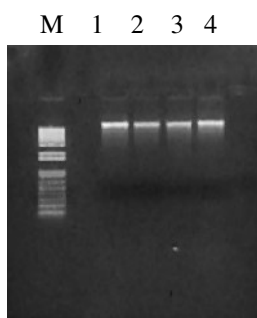


Figura 14. Gel de TBE 0,8%. Extração de DNA. Da esquerda para direita: M - marcador 1kb ladder plus e DNA de solo extraído das amostras de 1 – pré-plantio feijão; 2 – pós-plantio linha feijão; 3 – pós-plantio entrelinha feijão e 4 – pós-fertilização linha feijão.

Os primers escolhidos para análise em DGGE amplificaram regiões conservadas do genoma no tamanho esperado e com alta intensidade de banda, indicando grande concentração da região do DNA amplificado (Figura 15 e 16).

A primeira amplificação da região 18S (EF3/EF4) produziu bandas de baixa intensidade, mas de peso molecular esperado. Nova amplificação dentro da região já amplificada tornou possível obter bandas de maior intensidade e com peso molecular menor, ideal para separação no DGGE. Porém, apesar da pequena intensidade de bandas, para a amplificação do produto obtido com o primeiro conjunto de primers fez-se necessário a diluição das amostras em diferentes concentrações (Tabela 4). As diluições foram necessárias para diminuir a formação de bandas inespecíficas e o excesso de rastro nas amostras. O padrão de bandas obtido pode ser visualizado na figura 15.

M n 1 2 3 4 5 6 7

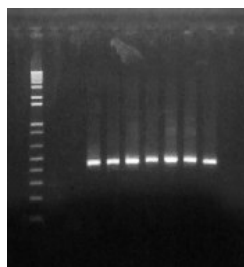


Figura 15. Gel de TBE 1%. Amplificação com primers 18S. Da esquerda para direita: M - marcador 1kb ladder plus; n - controle negativo e DNA amplificado com primers 18S das amostras 1 - pré-plantio; 2 - pós-plantio linha feijão; 3 - pós-plantio entrelinha feijão; 4 - pós-fertilização linha feijão; 5 - pós-fertilização entrelinha feijão; 6 - pós-fertilização linha feijão e 7 - antes da colheita linha.

Seguindo o protocolo estabelecido por Nübel et al. (1996), a amplificação da região 16S produziu bandas de intensidade adequadas para o DGGE e de tamanho esperado, aproximadamente 450pb. A ausência de rastro e de bandas inespecíficas evidencia a alta qualidade do DNA obtido (Figura 16).

M n 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

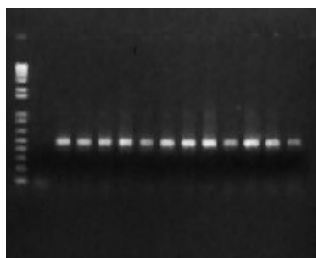


Figura 16. Gel de TBE 1%. Amplificação com primers 16S. Da esquerda para direita: M - marcador 1kb ladder plus; n - controle negativo e DNA amplificado com primers 16S das amostras 1 - pré-plantio linha soja; 2 - pré-plantio entrelinha soja; 3 - pós-plantio linha soja; 4 - pós-plantio entrelinha soja; 5 - floração linha soja; 6 - floração entrelinha soja; 7 - frutificação linha soja; 8 - frutificação entrelinha soja; 9 - pré-colheita linha soja; 10 - pré-colheita entrelinha soja; 11 - pós-colheita linha soja e 12 - pós-colheita entrelinha soja.

## 2.2 DGGE

### 2.2.1 Soja (*Glycine max* cv. 70002 - Bayer)

#### 2.2.1.1 Comunidade bacteriana

A análise do gel de DGGE da comunidade bacteriana contendo amostras da área de soja e da área nativa não indica uma diferenciação marcante entre os perfis correspondentes às diferentes datas de coleta (Figura 17) embora os perfis da área nativa (números 1 e 14 da figura 17) apresentem bandas mais intensas e exclusivas.

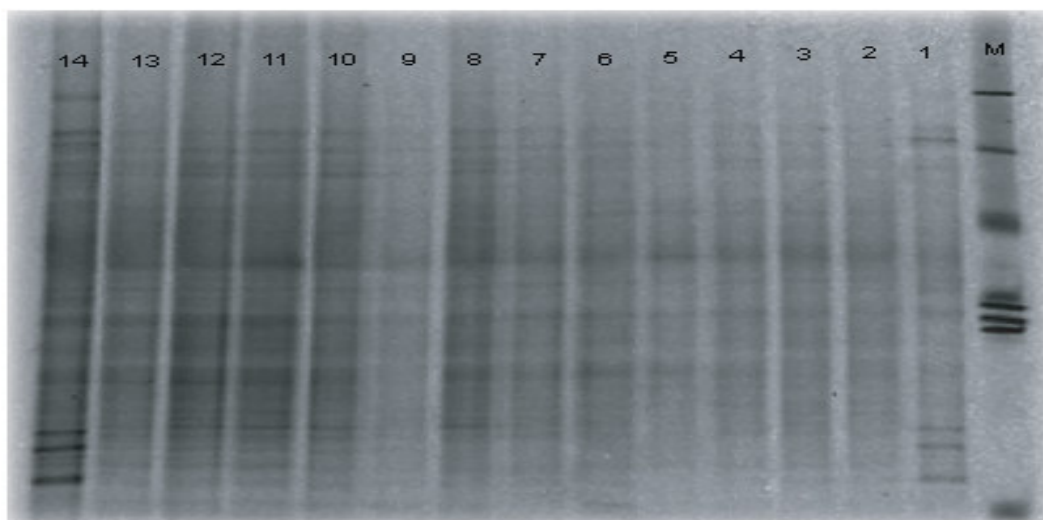


Figura 17. DGGE das amostras coletadas na área de soja amplificadas com primers universais 16S. Da direita para esquerda marcador 1kb ladder seguido das amostras: 1 – Cerrado out/04; 2 – 42 dias antes do plantio linha set/04; 3 – 42 dias antes do plantio entrelinha set/04; 4 – 7 dias após o plantio linha nov/04; 5 – 7 dias após o plantio entrelinha nov/04; 6 – floração linha dez/04; 7 – floração entrelinha dez/04; 8 – frutificação linha jan/05; 9 – frutificação entrelinha jan/05; 10 – 29 dias antes da colheita linha fev/05; 11 – 29 dias antes da colheita entrelinha fev/05; 12 – 7 dias após a colheita linha mar/05; 13 – 7 dias após a colheita entrelinha mar/05; 14 – Cerrado mar/05.

A análise dos dendrogramas mostra que as amostras coletadas na linha de cultivo da soja separaram-se inicialmente em dois grupos com 67% de similaridade sendo um grupo com as amostras do pré-plantio (setembro de 2004) e pós-plantio (novembro de 2004) e um segundo grupo com as amostras de áreas nativas e as demais do cultivo até a pós-colheita (março de 2005) (Figura 18). Essa primeira separação indica um provável efeito da cobertura do solo pois as amostras do primeiro grupo são as que apresentaram menor cobertura de vegetação.

Na primeira subdivisão do segundo grupo, com 72% de similaridade, houve a separação entre as amostras de áreas nativas e aquelas referentes à floração, frutificação, pré-colheita (fevereiro de 2005) e pós-colheita (março de 2005). A separação entre as amostras de área nativa e as da área cultivada indica o efeito da alteração da comunidade vegetal bem como das práticas agrícolas no solo na comunidade bacteriana apesar do nível alto de similaridade.

Por fim, a formação de dois grupos, sendo um com as amostras pré e pós-colheita e outro com as amostras dos períodos de floração e frutificação com

similaridades acima de 85% indicam que o procedimento de colheita não provocou mudanças significativas na comunidade bacteriana na linha de plantio após 7 dias e que a comunidade bacteriana estaria influenciada pelas diferenças estacionais e/ou pela fase de desenvolvimento da soja.

As amostras coletadas na entrelinha de cultivo da soja separaram-se inicialmente em dois grupos com 51% de similaridade sendo um grupo que inclui somente a amostra referente à frutificação de janeiro de 2005 e um segundo grupo que inclui o restante das amostras analisadas (Figura 19).

O segundo grupo subdivide-se em dois grupos com 64,2% de similaridade. A primeira subdivisão do segundo grupo inclui com 77,4% de similaridade as amostras referentes às áreas nativas e a amostra pré-colheita (fevereiro de 2005). A outra subdivisão do segundo grupo inclui as amostras referentes à condição pré e pós-plantio e ao período de floração agrupando-se com 71,8% de similaridade com a amostra correspondente à pós-colheita (março de 2005). As amostras referentes à condição pré e pós-plantio agruparam-se com 95% de similaridade indicando que esta prática não provocou maiores efeitos na comunidade bacteriana da entrelinha de plantio, pois o manejo do plantio ocorre somente na linha de plantio. Nesta segunda subdivisão as amostras também parecem responder mais às diferenças de sazonalidade e/ou período fisiológico da planta do que ao efeito do plantio em si.

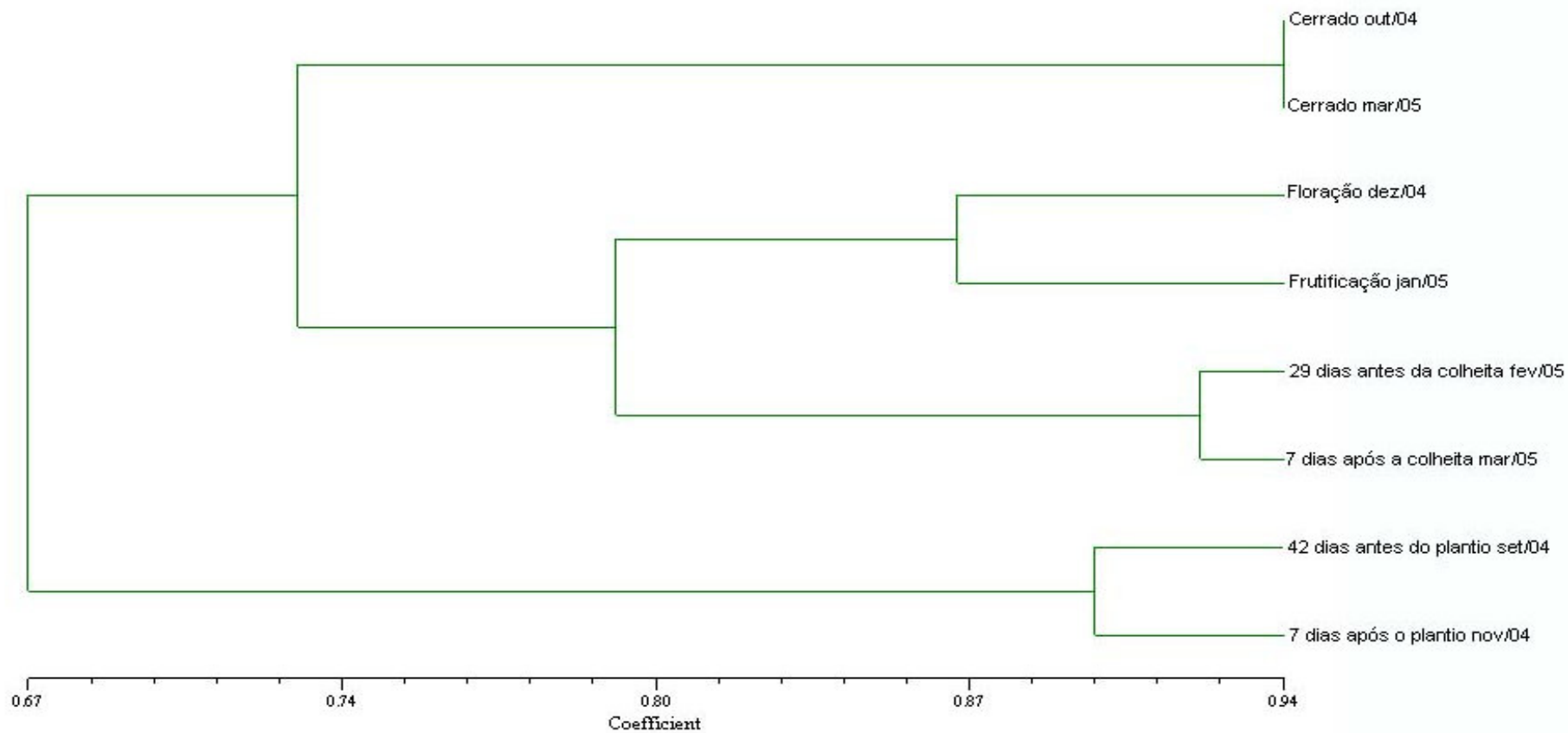


Figura 18. Dendograma obtido a partir da análise de DGGE das amostras coletadas na linha de plantio na área de Soja e Cerrado amplificadas com primers universais 16S.



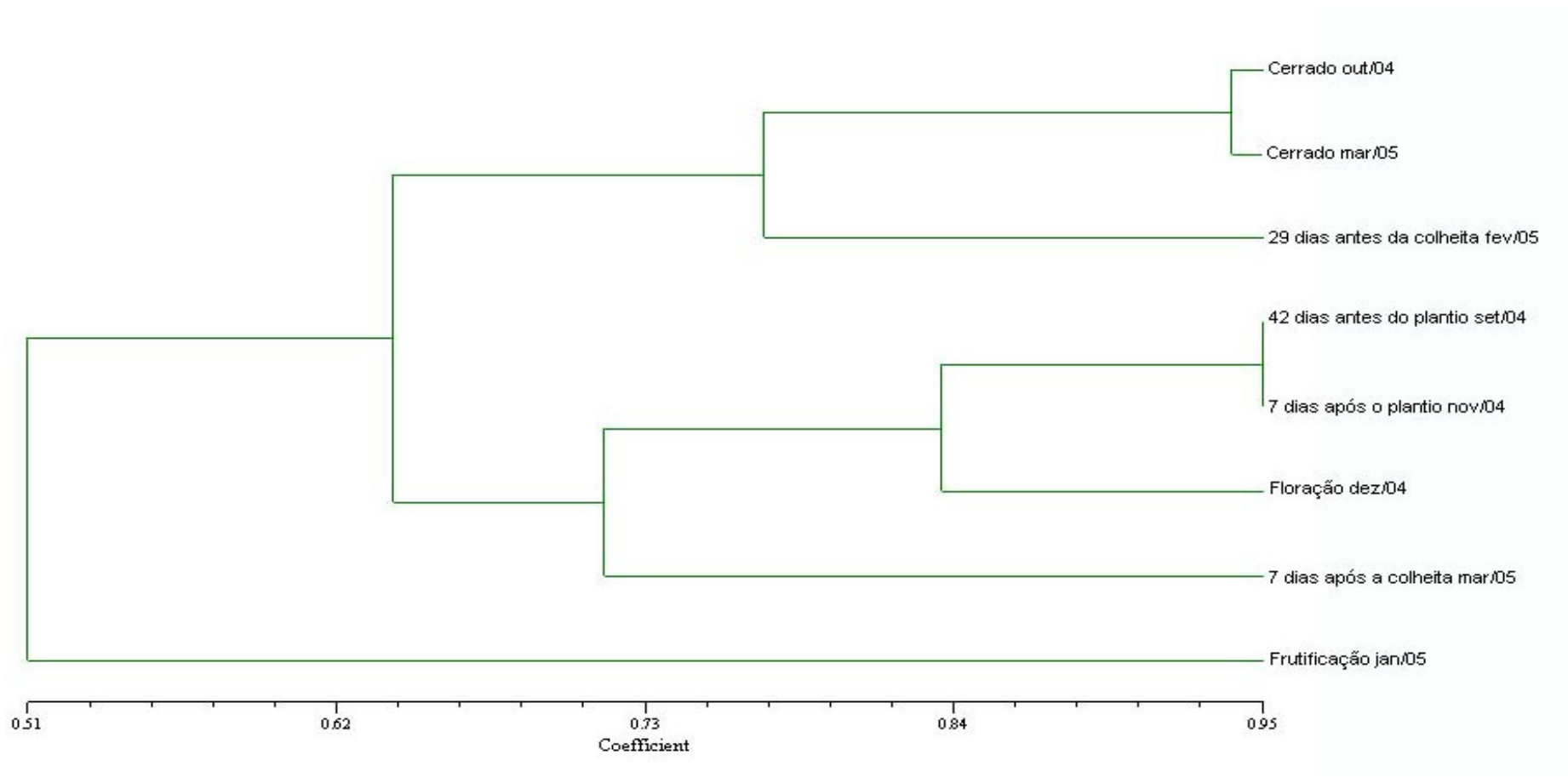


Figura 19. Dendrograma obtido a partir da análise de DGGE das amostras coletadas na entrelinha de plantio na área de Soja e Cerrado amplificadas com primers universais 16S.

### 2.2.1.2 Comunidade Fúngica

Os perfis obtidos para análise da comunidade fúngica na área de soja estão representados na figura 20. Ao contrário do ocorrido na comunidade bacteriana, o DGGE da comunidade fúngica apresentou perfis muito diferentes na intensidade e posição das bandas. Também foi mais nítida a diferença entre os perfis correspondentes à linha e entrelinha de plantio.

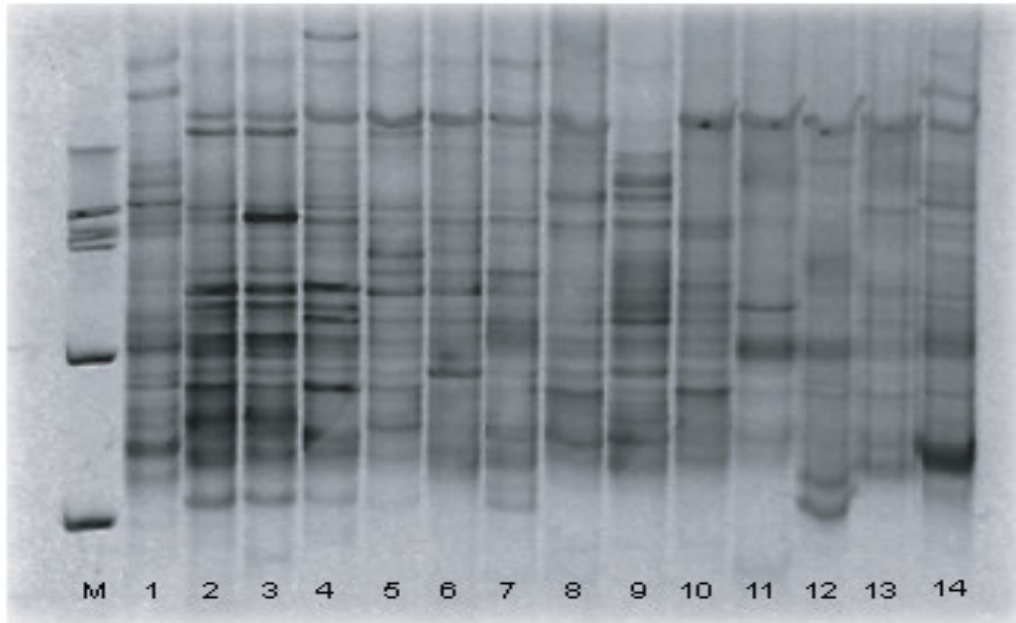


Figura 20. DGGE das amostras coletadas na área de soja amplificadas com primers universais 18S. Da esquerda para direita marcador 1kb ladder seguido das amostras: 1 – Cerrado out/04; 2 – 42 dias antes do plantio linha set/04; 3 – 42 dias antes do plantio entrelinha set/04; 4 – 7 dias após o plantio linha nov/04; 5 – 7 dias após o plantio entrelinha nov/04; 6 – floração linha dez/04; 7 – floração entrelinha dez/04; 8 – frutificação linha jan/05; 9 – frutificação entrelinha jan/05; 10 – 29 dias antes da colheita linha fev/05; 11 – 29 dias antes da colheita entrelinha fev/05; 12 – 7 dias após a colheita linha mar/05; 13 – 7 dias após a colheita entrelinha mar/05; 14 – Cerrado mar/05.

O dendrograma da comunidade fúngica elaborado com amostras coletadas na linha de plantio apresentou inicialmente a separação da amostra referente à pós-colheita (março de 2005) das outras amostras, incluindo as de área nativa e as outras amostras coletadas na área sob soja com 43% de similaridade (Figura 21). O manejo da colheita, que envolve o corte da planta, bem como o início da decomposição das raízes remanescente pode ter provocado esta separação.

No grande grupo ocorreu a subdivisão em mais dois grupos separando as amostras de áreas nativas daquelas coletadas na área de soja com similaridade de 56,6% (Figura 21). Esta separação também ocorreu para a comunidade bacteriana da linha de plantio, porém, com maior similaridade, indicando que as alterações da comunidade vegetal bem como a adoção de práticas agrícolas no solo alteram em maior grau a comunidade fúngica.

Na subdivisão maior ocorreu a separação com 68% de similaridade da amostra referente à frutificação das outras amostras correspondentes à condição pré e pós-plantio, à época de floração e à pré-colheita. Novamente os agrupamentos subseqüentes com similaridades acima de 80,5% parecem responder mais às diferenças de sazonalidade e/ou período fisiológico da planta do que ao efeito do plantio e colheita em si.

O dendrograma da comunidade fúngica elaborado com amostras coletadas na entrelinha de plantio apresentou inicialmente a separação com 57% de similaridade das amostras referentes às áreas nativas (cerrado de outubro de 2004 e março de 2005) das outras amostras coletadas na área sob soja (Figura 22). A separação das amostras de áreas nativas daquelas da área sob manejo indica que a alteração da comunidade vegetal bem como a adoção de práticas agrícolas (manejo do plantio e da colheita e a adição de herbicidas, fungicidas e inseticidas) no solo altera a comunidade fúngica.

No outro grande grupo ocorreu a subdivisão com 61,4% de similaridade em dois grupos sendo o primeiro com as amostras referentes à condição pré e pós-plantio e a amostra correspondente ao período da floração (dezembro de 2004) e o outro grupo com as amostras referentes ao período da frutificação e da colheita.

Apesar de ocorrerem pequenas variações entre as amostras correspondentes aos manejos realizados na área sob plantação de soja analisadas para a comunidade fúngica e bacteriana, claramente todos os dendrogramas elaborados com a análise dos perfis resultaram em maior efeito da sazonalidade e/ou período fisiológico da planta que à prática agrícola em si. Variações nas comunidades microbianas em resposta ao estado fisiológico das plantas têm sua estrutura modificada provavelmente pela diferenciação na liberação de exsudatos radiculares em quantidade e qualidade diferentes ao longo do desenvolvimento da planta.

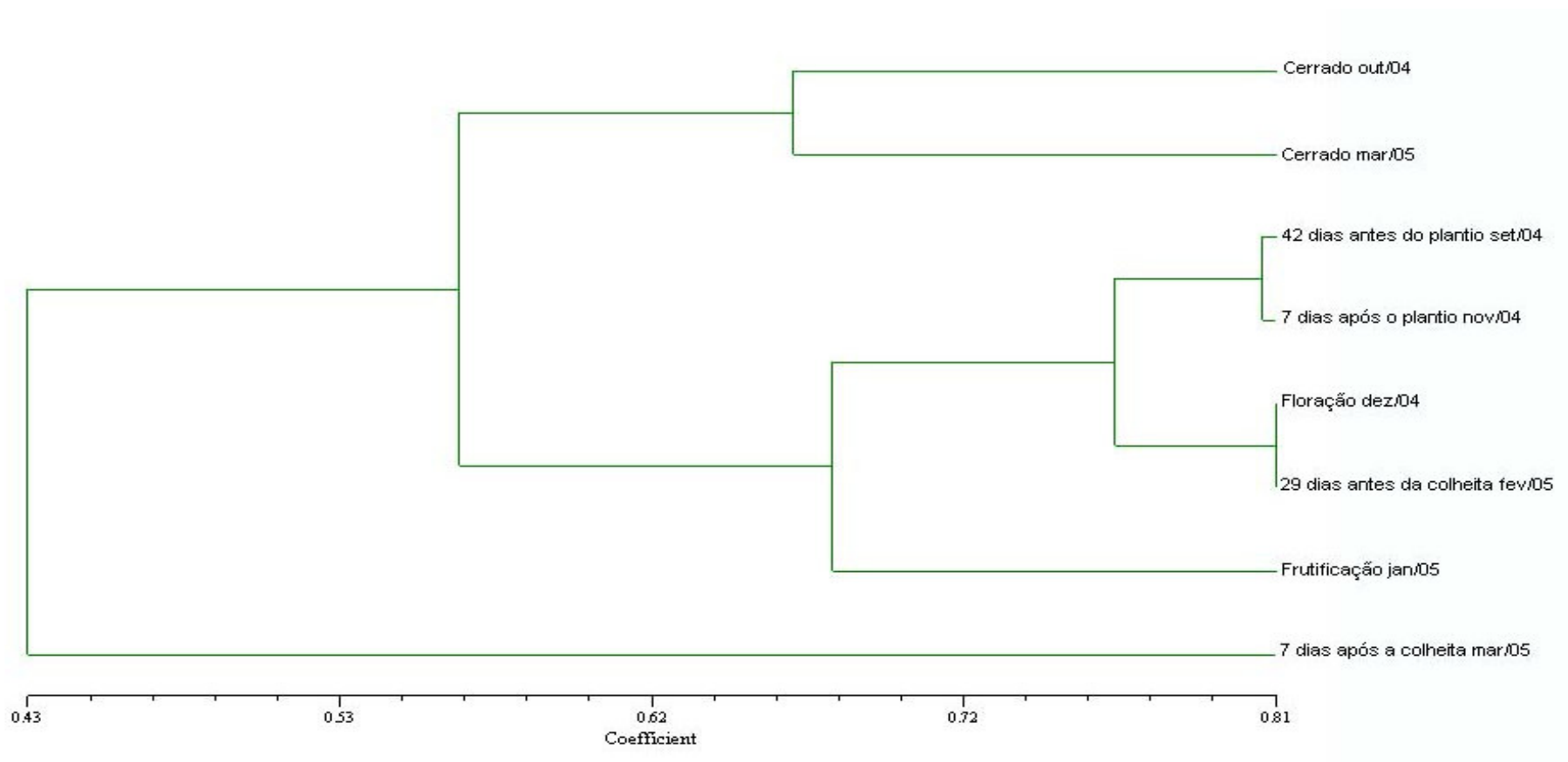


Figura 21. Dendrograma obtido a partir da análise de DGGE das amostras coletadas na linha de plantio na área de Soja e Cerrado amplificadas com primers universais 18S.

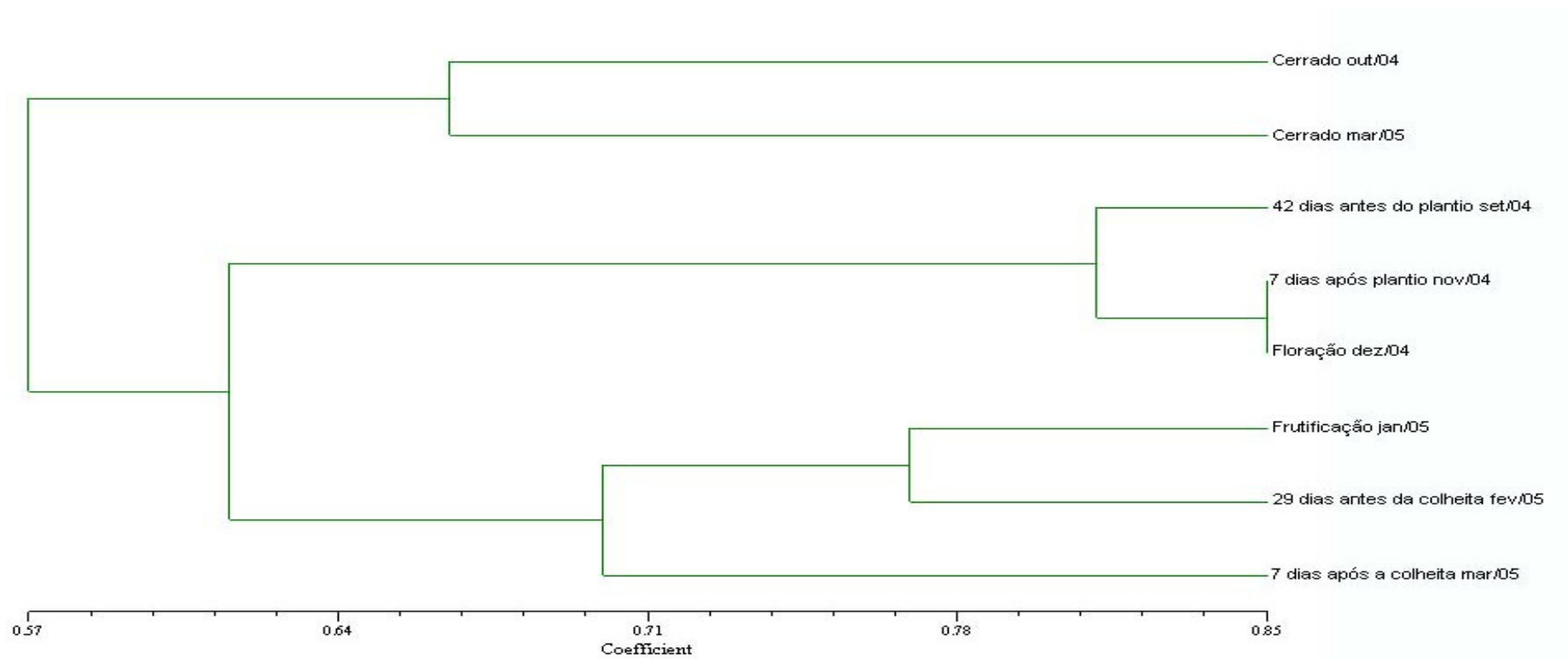


Figura 22. Dendrograma obtido a partir da análise de DGGE das amostras coletadas na entrelinha de plantio na área de Soja e Cerrado amplificadas com primers universais 18S.



## 2.2.2 Feijão irrigado (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Preto)

### 2.2.2.1 Comunidade bacteriana

A análise do gel correspondente à comunidade bacteriana (Figura 23) indica bandas de maior intensidade nos perfis de número 1, 7 e 12, correspondentes às amostras de cerrado sentido restrito de junho de 2004 e outubro de 2004 e a amostra 2 dias após fertilização em agosto de 2004. Também é possível visualizar uma maior intensidade de bandas na linha de plantio quando comparados os perfis 8 e 9 correspondentes às amostras 10 dias antes da colheita em outubro de 2004 da linha e entrelinha de plantio, respectivamente. O contrário ocorre com os perfis referentes às amostras 7 dias após a colheita, com a entrelinha apresentando maior intensidade de bandas (perfis 10 e 11).

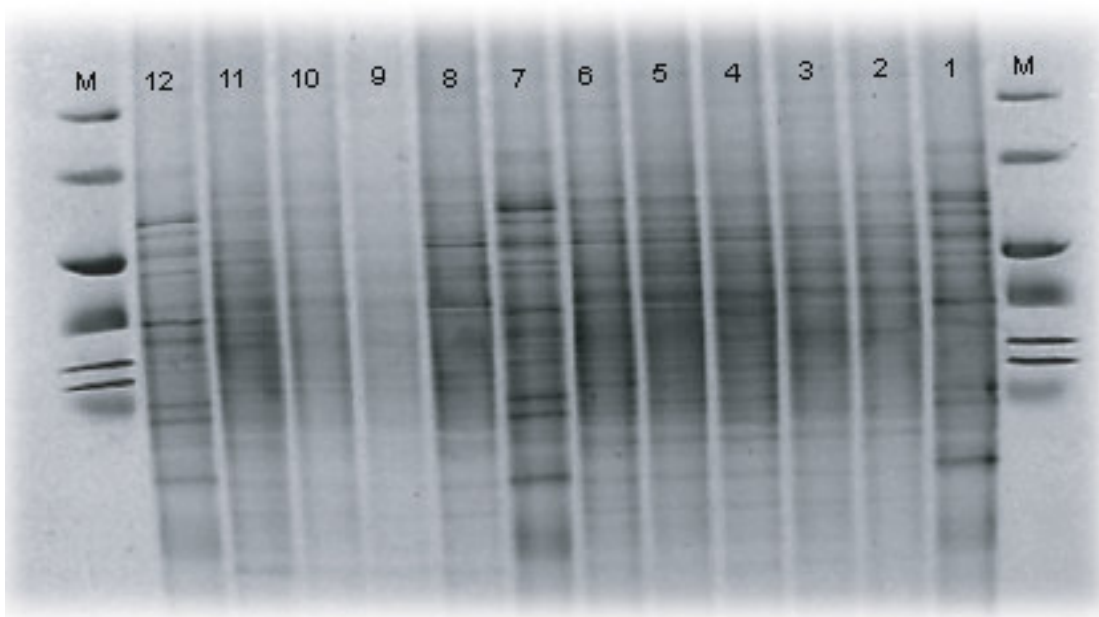


Figura 23. DGGE das amostras coletadas na área de feijão irrigado amplificadas com primers universais 16S. Marcador 1kb ladder nas extremidades e amostras: 1 – Cerrado jun/04; 2 – 7 dias antes do plantio jun/04; 3 – 1 dia após plantio linha jun/04; 4 – 1 dia após plantio entrelinha jun/04; 5 – 2 dias após fertilização linha jul/04; 6 – 2 dias após fertilização entrelinha jul/04; 7 – 2 dias após fertilização linha ago/04; 8 – 4 dias antes da colheita linha out/04; 9 – 4 dias antes colheita entrelinha out/04; 10 – 10 dias após colheita linha out/04; 11 – 10 dias após colheita entrelinha out/04; 12 – Cerrado out/04.

Com os dendrogramas construídos a partir da distribuição de bandas nos géis é possível observar com relação à comunidade bacteriana da linha de plantio (Figura 24) a formação de dois grandes grupos com similaridade de 64%. Em um grupo, encontram-se todas as amostras correspondentes à área de plantio enquanto o outro grupo é formado com as amostras de cerrado de junho e outubro de 2004. A separação das amostras de áreas nativas daquelas da área sob manejo indicam um efeito da alteração da comunidade vegetal bem como a adoção de práticas agrícolas no solo sobre a comunidade bacteriana.

No segundo grupo formado com as amostras coletadas na área sob plantio de feijão há a subdivisão com 79% de similaridade das amostras referentes ao período do plantio (pré e pós-plantio) das outras amostras coletadas na área.

No outro subgrupo formado há a separação da amostra coletada pós-colheita com 82% de similaridade das amostras referentes à fertilização e pré-colheita. O agrupamento das amostras referentes à fertilização com 95% de similaridade indica que a adição de nutrientes em momentos diferentes da cultura tornou a comunidade bacteriana mais semelhante. Como na segunda fertilização utilizou-se somente uréia, é provável que a comunidade apresente uma resposta, em especial, ao nitrogênio.

No dendrograma elaborado com as amostras referentes à comunidade bacteriana da entrelinha de plantio ocorre a formação de dois grandes grupos com similaridade de 69%, separando as amostras das áreas nativas (cerrado de junho e outubro de 2004) agrupadas com a amostra referente à pós-fertilização em julho de 2004 das outras amostras referentes à área sob manejo (Figura 25).

No outro grupo formado, a amostra pré-colheita separou-se com 76,1% de similaridade das amostras referentes ao período do plantio e pós-colheita. A formação deste segundo grupo inclui amostras de períodos onde houve manejo com trânsito na entrelinha de plantio (por exemplo, aplicação de herbicidas e colheita).

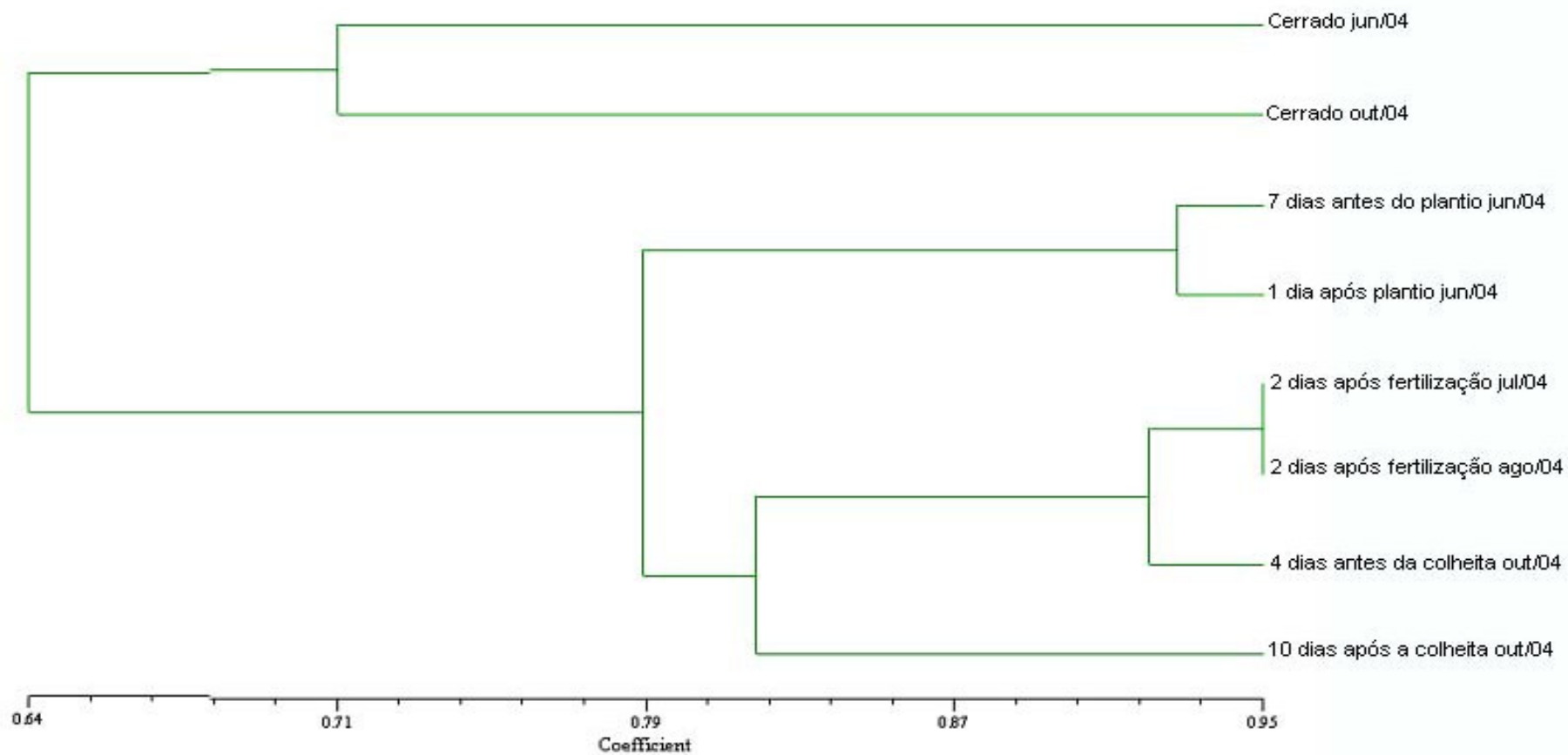


Figura 24. Dendograma obtido a partir da análise de DGGE das amostras coletadas na linha de plantio na área de Feijão irrigado e Cerrado amplificadas com primers universais 16S.



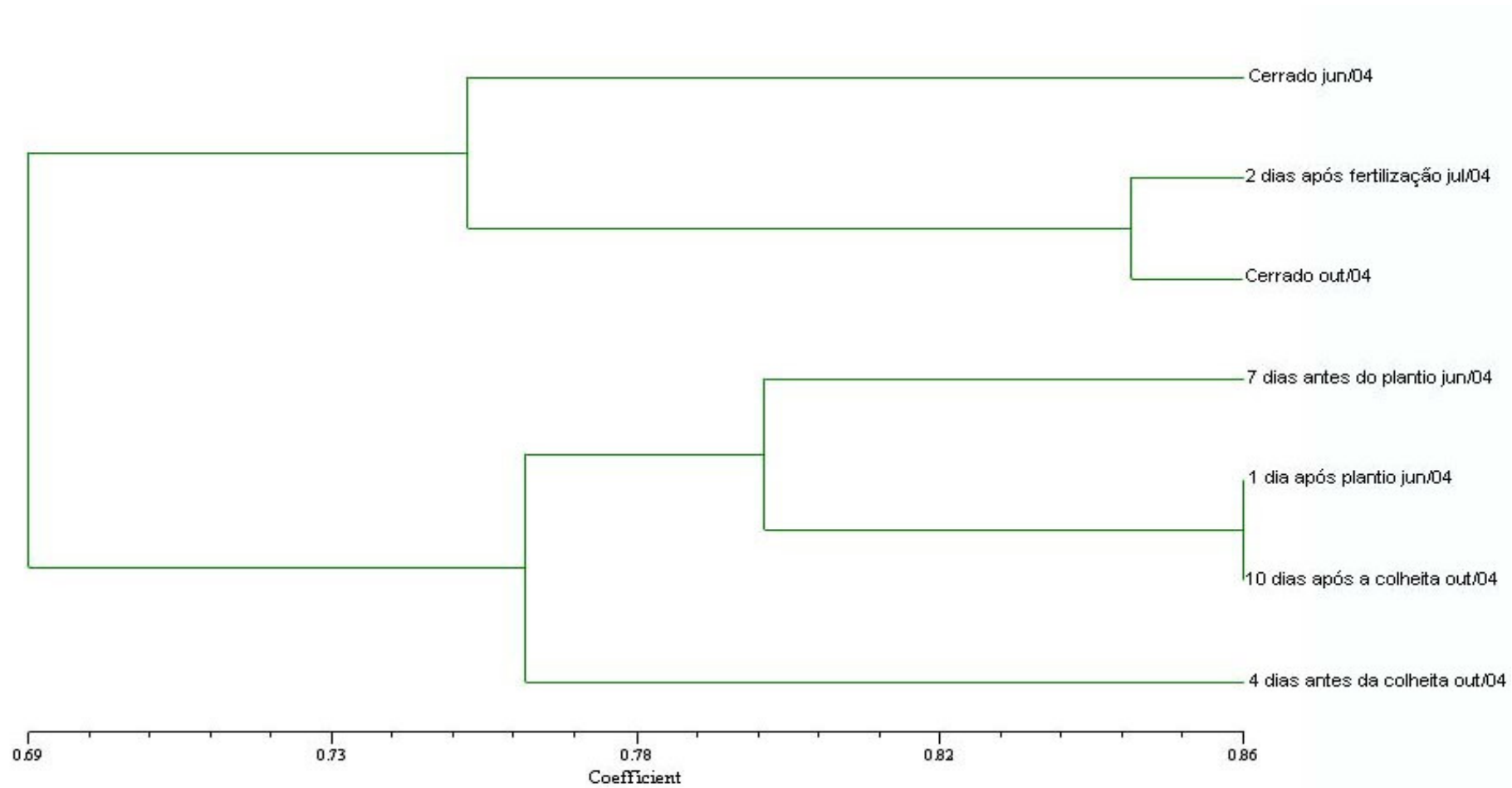


Figura 25. Dendograma obtido a partir da análise de DGGE das amostras coletadas na entrelinha de plantio na área de Feijão irrigado e Cerrado amplificadas com primers universais 16S.

### 2.2.2.2 Comunidade fúngica

O gel correspondente à comunidade fúngica (Figura 26), apresenta maior variação entre os perfis de amostras quando comparada com o gel da comunidade bacteriana (Figura 23). Há alterações mais nítidas no posicionamento das bandas e na intensidade destas. Também é possível visualizar diferença entre as coletas na linha e entrelinha de plantio nas comunidades fúngicas entre alguns perfis, como os perfis de número 3 e 4, correspondentes às amostras pós-plantio em junho de 2004.

É interessante salientar que assim como no gel correspondente à análise 16S, visualmente há uma maior semelhança nos perfis correspondentes às amostras coletadas após a fertilização (perfil de número 7) e nos cerrados (perfis de números 1 e 12). Esta semelhança pode ser evidenciada pela presença de bandas exclusivas nos perfis destas amostras.

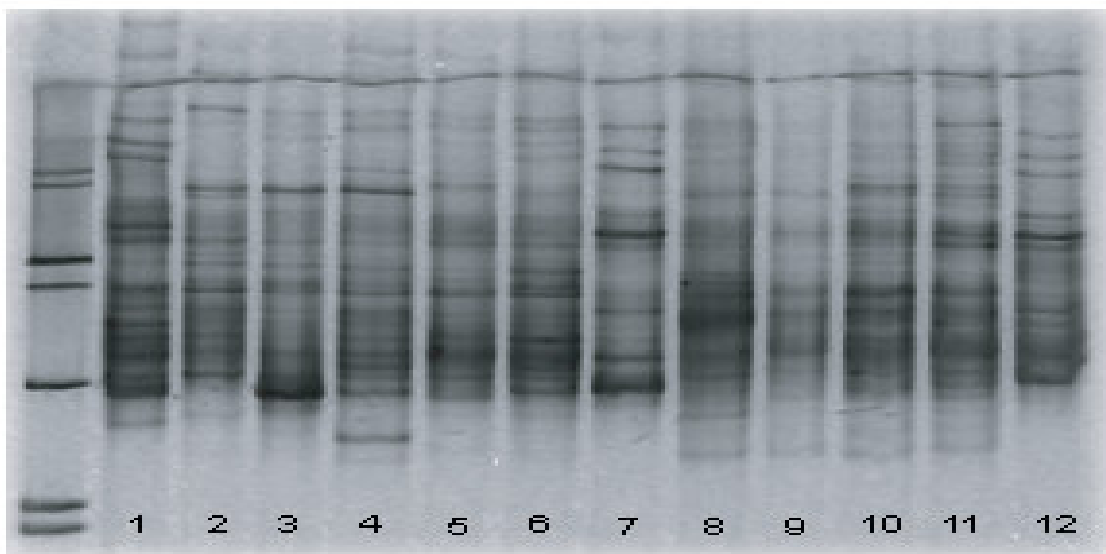


Figura 26. DGGE das amostras coletadas na área de feijão irrigado amplificadas com primers universais 18S. Marcador 1kb ladder nas extremidades e amostras: 1 – Cerrado jun/04; 2 – 7 dias antes do plantio jun/04; 3 – 1 dia após plantio linha jun/04; 4 – 1 dia após plantio entrelinha jun/04; 5 – 2 dias após fertilização linha jul/04; 6 – 2 dias após fertilização entrelinha jul/04; 7 – 2 dias após fertilização linha ago/04; 8 – 4 dias antes da colheita linha out/04; 9 – 4 dias antes colheita entrelinha out/04; 10 – 10 dias após colheita linha out/04; 11 – 10 dias após colheita entrelinha out/04; 12 – Cerrado out/04.

No dendrograma elaborado com as amostras referentes à comunidade fúngica da linha de plantio ocorre a formação de dois grandes grupos com similaridade de 58%, separando as amostras das áreas nativas agrupadas com a amostra referente à pós-fertilização em agosto de 2004 das outras amostras referentes à área sob manejo (Figura 27). Semelhante separação em um grupo com as amostras da área nativa e a amostra do período de fertilização também foi observado para a comunidade bacteriana.

No segundo grande grupo formado, há subdivisão em dois grupos com 62,4% de similaridade separando as amostras referentes ao plantio (pré e pós-plantio) e à pós-fertilização em julho de 2004 daquelas amostras referentes ao período da colheita (pré e pós-colheita). Apesar do manejo da colheita envolver a remoção da planta, este fator não provou mudanças significativas na comunidade bacteriana e fúngica na linha de plantio, pois as similaridades encontradas foram maiores que 70%. O padrão de agrupamento das amostras neste grupo indica, mais uma vez, que a comunidade fúngica parece ser mais afetada pela sazonalidade e/ou período fisiológico da planta do que à prática agrícola em si.

Na linha de plantio (Figura 27) as amostras referentes ao período da fertilização não se agruparam como ocorreu na comunidade bacteriana, para a qual além do agrupamento, encontrou-se também uma similaridade muito alta. Este fato evidencia que a mesma prática agrícola pode provocar efeitos diferentes nas comunidades bacterianas e fúngicas.

Nas amostras coletadas na entrelinha do feijão, observa-se inicialmente a formação de dois grupos com 49% de similaridade com um grupo reunindo as amostras de áreas nativas e outro grupo reunindo as amostras referentes à área do feijão (Figura 28). A separação das amostras de áreas nativas da área sob manejo indica que as alterações da comunidade vegetal bem como a adoção de práticas agrícolas no solo alteram a comunidade fúngica na entrelinha.

No grupo correspondente às amostras da área de feijão observa-se nova subdivisão a 53,8% de similaridade, com um grupo contendo as amostras referentes ao período da colheita (pré e pós-colheita) e outro grupo reunindo as amostras referentes ao período do plantio (pré e pós-plantio) e a amostra referente a pós-fertilização em julho de 2004. Semelhante divisão ocorreu nas amostras coletadas na linha de plantio.

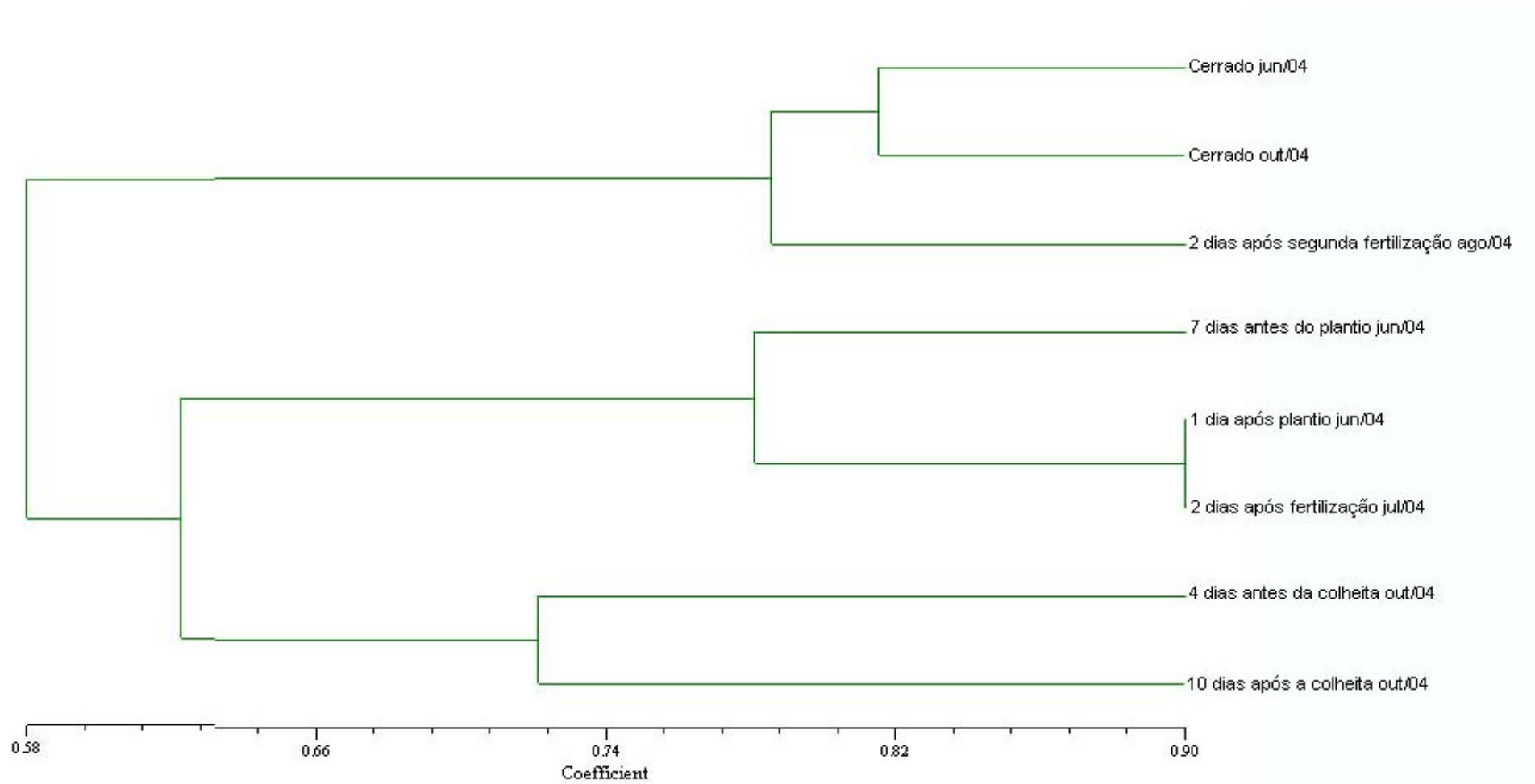


Figura 27. Dendrograma obtido a partir da análise de DGGE das amostras coletadas na linha de plantio na área de Feijão irrigado e Cerrado amplificadas com primers universais 18S.

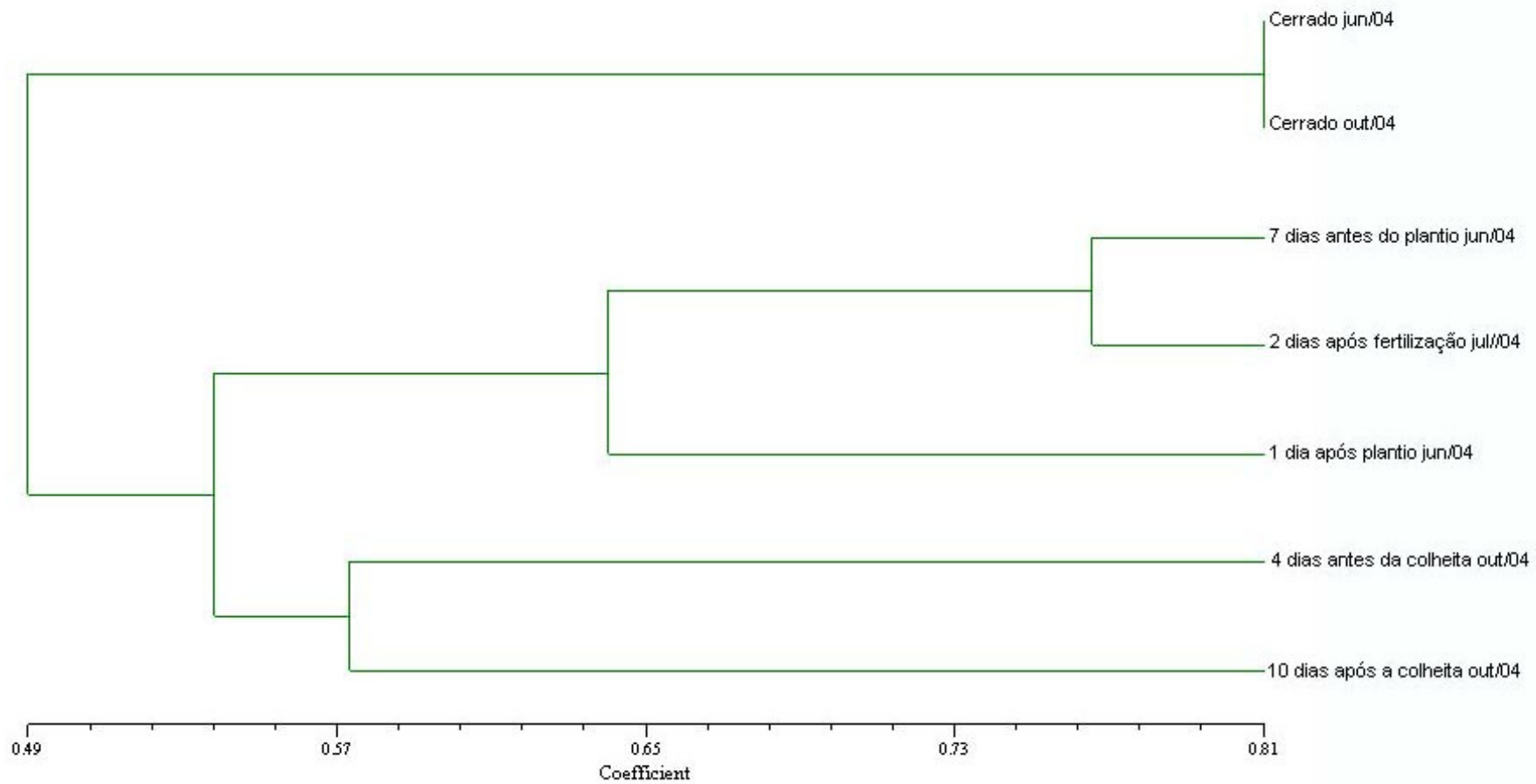


Figura 28. Dendrograma obtido a partir da análise de DGGE das amostras coletadas na entrelinha de plantio na área de Feijão irrigado e Cerrado amplificadas com primers universais 18S.

É possível observar nos dendrogramas das comunidades bacteriana e fúngica referentes à área de feijão irrigado e cerrado que as amostras referentes à área sob manejo apresentam-se na figura em ordem cronológica, agrupando-se as amostras com os meses próximos. Este fato pode indicar que o agrupamento é resultado de maior efeito da sazonalidade e/ou do período fisiológico da planta determinando a composição das comunidades microbianas.

### 2.2.3 Linha x Entrelinha de Plantio

Com o intuito de verificar a influência da coleta em linha ou entrelinha de plantio na análise da comunidade microbiana, foi elaborada uma tabela com os índices de similaridade das amostras nos dois pontos de coleta (Tabela 5). Considerando os altos valores de similaridade entre linha e entrelinha de plantio (maiores que 65%), não foi observada diferença entre os pontos de coleta com exceção de três amostras. As amostras incluem para a comunidade bacteriana a amostra frutificação da soja em janeiro de 2005 enquanto para a comunidade fúngica foram as amostras pós-colheita nas áreas de feijão e soja.

Tabela 5. Índices de similaridade entre as amostras coletadas na linha e entrelinha de plantio obtidos dos dendrogramas para análise de DGGE das comunidades bacterianas e fúngicas nas áreas de cerrado sentido restrito, feijão irrigado e soja.

Área	Amostra	Similaridade linha x entrelinha	
		16S	18S
Feijão	1 dia apos plantio jun/04	82,7 %	68,4 %
Feijão	2 dias apos fertilização jul/04	79,0 %	92,0 %
Feijão	4 dias antes colheita out/04	77,0 %	81,6 %
Feijão	10 dias após a colheita out/04	77,0 %	47,0 %
Soja	42 dias antes do plantio set/04	94,5 %	94,0 %
Soja	7 dias após o plantio nov/04	100,0 %	78,6 %
Soja	Floração dez/04	89,0 %	78,6 %
Soja	Frutificação jan/05	57,0 %	77,9 %
Soja	29 dias antes da colheita fev/05	96,2 %	77,9 %
Soja	7 dias após a colheita mar/05	70,5 %	46,0 %

### 2.3 Seqüenciamento

Com o intuito de conhecer as populações mais dominantes da comunidade e as que eram mais afetadas pelo manejo estabelecido, foram selecionadas algumas bandas dos géis

de DGGE para seqüenciamento (Figuras 30, 31, 32 e 33). O critério utilizado para a escolha das bandas foi a análise de presença/ausência em determinados perfis, especialmente com relação às áreas nativas, e a intensidade da banda, o que pode indicar maior abundância de organismos (Rosado e Duarte, 2002) (Tabela 6, 7, 8 e 9).

Todas as bandas cortadas foram amplificadas novamente com sucesso. Porém as bandas representantes das populações bacterianas necessitaram de duas ampliações com as mesmas condições para obtenção de produto com alta intensidade. Após as ampliações a maioria das amostras aplicadas no novo DGGE apresentou somente uma banda no gel, exemplificada na figura 29. As amostras que ainda apresentavam bandas inespecíficas foram cortadas deste novo gel e o todo o procedimento foi realizado novamente.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

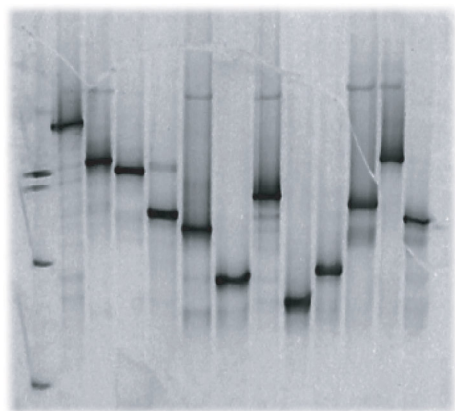


Figura 29. Gel de DGGE para verificação de pureza da banda extraída e reamplificada. M – marcador 1 kb ladder plus seguido das bandas cortadas 1 - S1, 2 - S2, 3 - S3, 4 - S4, 5 - S5, 6 - S6, 7 - S7, 8 - S8, 9 - S9, 10 - S10, 11 - S11 e 12 - S12 (figura 32).

Várias tentativas de seqüenciamento foram realizadas. Na primeira tentativa foram seqüenciadas todas as bandas escolhidas. Após a análise da qualidade das seqüências e o resultado obtido com a busca no BLAST foi verificado que algumas amostras não apresentaram seqüências confiáveis. Estas foram submetidas a purificação em gel de TAE 0,8% permitindo que primers e bandas inespecíficas, fatores que interferem na reação de seqüenciamento, fossem eliminadas do produto. Uma nova reação de seqüenciamento foi realizada após esta purificação e os resultados obtidos após busca no BLAST estão apresentados nas tabelas 5, 6, 7 e 8 junto com os primeiros resultados de qualidade. As

seqüências obtidas apresentaram tamanho esperado de aproximadamente 450pb e encontram-se em anexo.

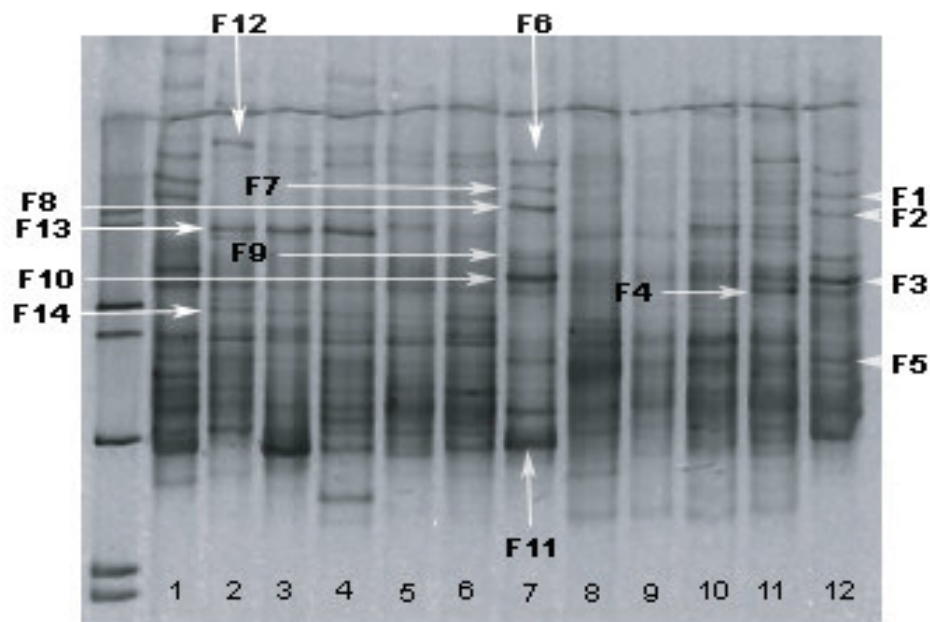


Figura 30. DGGE das amostras coletadas na área de feijão irrigado amplificadas com primers universais 18S. As letras e números junto às setas indicam as bandas selecionadas para seqüenciamento. Marcador 1kb ladder nas extremidades e amostras: 1 – Cerrado jun/04; 2 – 7 dias antes do plantio jun/04; 3 – 1 dia após plantio linha jun/04; 4 – 1 dia após plantio entrelinha jun/04; 5 – 2 dias após fertilização linha jul/04; 6 – 2 dias após fertilização entrelinha jul/04; 7 – 2 dias após fertilização linha ago/04; 8 – 4 dias antes da colheita linha out/04; 9 – 4 dias antes colheita entrelinha out/04; 10 – 10 dias após colheita linha out/04; 11 – 10 dias após colheita entrelinha out/04; 12 – Cerrado out/04.

Tabela 6. Justificativa da escolha da banda e resultado do seqüenciamento das bandas retiradas do gel de DGGE 18S da área de feijão após verificação de qualidade do eletroferograma e similaridade com banco de dados BLAST.

Justificativa de escolha	Identificação da seqüência mais		Número de acesso
	Banda	similar	



Alta intensidade nos cerrados e pós fertilização em agosto de 2004	F1	ascomiceto	97%	DQ248314
Exclusividade nos cerrados e pós fertilização em agosto de 2004	F2	ascomiceto	98%	AY251116
Alta intensidade nos cerrados e pós fertilização em agosto de 2004	F3	ascomiceto	98%	AY640993
Alta intensidade nos cerrados e pós a colheita na entrelinha	F4	ascomiceto	97%	AY843276
Presença em todos os perfis	F5	ascomiceto	99%	DQ248314
Ausência antes da colheita na linha e entrelinha	F6	ascomiceto	98%	AY640993
Alta intensidade nos cerrados e pós fertilização em agosto de 2004	F7	<i>Opegrapha varia</i> (ascomiceto)	99%	AF138853
Exclusividade nos cerrados e pós fertilização em agosto de 2004, nesta mais intensa.	F8	ascomiceto	98%	AY640993
Exclusividade no cerrado de outubro de 2004 e pós a fertilização em agosto de 2004	F9	ascomiceto	94%	AY251116
Alta intensidade nos cerrados e pós fertilização em agosto de 2004	F10	ascomiceto	97%	AY640993
Ausência antes do plantio linha e antes da colheita linha e entrelinha	F11	<i>Hygrocybe conica</i> (basidiomiceto)	99%	AY752965
Ausência nos cerrados e no período da colheita	F12	cercozoário flagelado (protozoário)	87%	AY965860
Ausência nos cerrados e maior intensidade no período do plantio	F13	ascomiceto	97%	AY916651
Ausência nos cerrados e pós a fertilização em agosto de 2004	F14	<i>Chytridium</i> sp. (chitridiomicota)	90%	AF164321

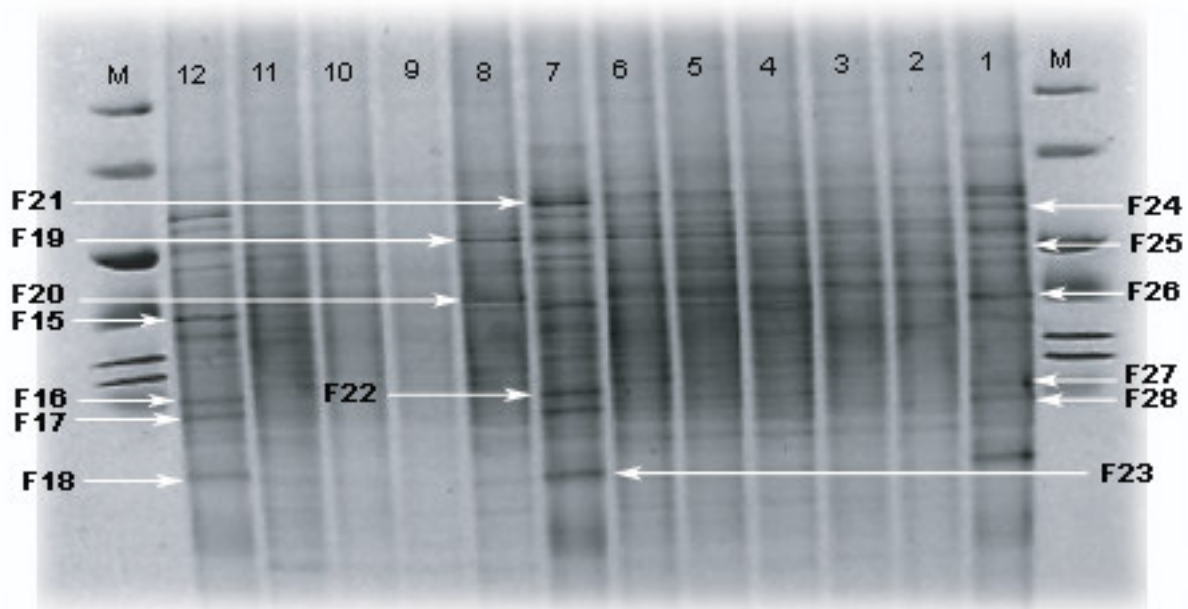


Figura 31. DGGE das amostras coletadas na área de feijão irrigado amplificadas com primers universais 16S. As letras e números junto às setas indicam as bandas selecionadas para seqüenciamento. Marcador 1kb ladder nas extremidades e amostras: 1 – Cerrado jun/04; 2 – 7 dias antes do plantio jun/04; 3 – 1 dia após plantio linha jun/04; 4 – 1 dia após plantio entrelinha jun/04; 5 – 2 dias após fertilização linha jul/04; 6 – 2 dias após fertilização entrelinha jul/04; 7 – 2 dias após fertilização linha ago/04; 8 – 4 dias antes da colheita linha out/04; 9 – 4 dias antes colheita entrelinha out/04; 10 – 10 dias após colheita linha out/04; 11 – 10 dias após colheita entrelinha out/04; 12 – Cerrado out/04.

Tabela 7. Justificativa da escolha da banda e resultado do seqüenciamento das bandas retiradas dos gel de DGGE 16S da área de feijão após verificação de qualidade do eletroferograma e similaridade com banco de dados BLAST.

<b>Justificativa de escolha</b>	<b>Banda</b>	<b>Identificação da seqüência mais similar*</b>	<b>Similaridade BLAST</b>	<b>Número de acesso</b>
Alta intensidade nos cerrados e pós a fertilização em agosto de 2004	F15	bactéria	80%	AY234675
Exclusividade nos cerrados e pós fertilização em agosto de 2004	F16	actinobactéria	96%	AY234442
Alta intensidade nos cerrados e pós a fertilização em agosto de 2004	F17	actinobactéria	98%	AY234442
Alta intensidade nos cerrados e pós a fertilização em agosto de 2004	F18	actinobactéria	97%	AY234442
Presença em todos os perfis	F19	bactéria não cultivável	84%	AF523963
Presença em todos os perfis	F20	–	–	
Alta intensidade nos cerrados e pós a fertilização em agosto de 2004	F21	bactéria de solo não cultivável	84%	AY326587
Exclusividade nos cerrados e pós fertilização em agosto de 2004	F22	–	–	
Alta intensidade nos cerrados e pós a fertilização em agosto de 2004	F23	–	–	
Ausência no período da colheita	F24	–	–	
Presença em todos os perfis	F25	–	–	
Alta intensidade nos cerrados e pós a fertilização em agosto de 2004	F26	–	–	
Exclusividade nos cerrados e pós fertilização em agosto de 2004	F27	–	–	
Alta intensidade nos cerrados e pós a fertilização em agosto de 2004	F28	–	–	

\* os traços indicam os seqüenciamentos que não funcionaram.

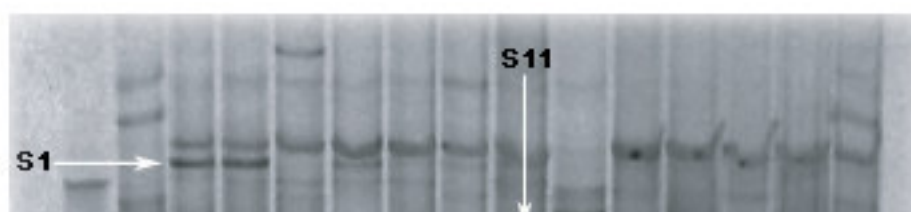


Figura 32. DGGE das amostras coletadas na área de soja amplificadas com primers universais 18S. As letras e números junto às setas indicam as bandas selecionadas para seqüenciamento. Da esquerda para direita marcador 1kb ladder seguido das amostras: 1 – Cerrado out/04; 2 – 42 dias antes do plantio linha set/04; 3 – 42 dias antes do plantio entrelinha set/04; 4 – 7 dias após o plantio linha nov/04; 5 – 7 dias após o plantio entrelinha nov/04; 6 – floração linha dez/04; 7 – floração entrelinha dez/04; 8 – frutificação linha jan/05; 9 – frutificação entrelinha jan/05; 10 – 29 dias antes da colheita linha fev/05; 11 – 29 dias antes da colheita entrelinha fev/05; 12 – 7 dias após a colheita linha mar/05; 13 – 7 dias após a colheita entrelinha mar/05; 14 – Cerrado mar/05.

Tabela 8. Justificativa da escolha da banda e resultado do seqüenciamento das bandas retiradas do gel de DGGE 18S da área de soja após verificação de qualidade do eletroferograma e similaridade com banco de dados BLAST.

Justificativa de escolha	Banda	Identificação da seqüência mais	Similaridade	Número de acesso
		similar*	BLAST	

Alta intensidade antes do plantio na linha e entrelinha	S1	basidiomiceto	99%	AJ515168
Maior intensidade nas amostras de áreas nativas	S2	ascomiceto	90%	AY640993
Alta intensidade na entrelinha antes do plantio	S3	ascomiceto	96%	AY843247
Ausência no cerrado de outubro de 2004 e alta intensidade no período do plantio	S4	<i>Ceramothyrium carniolicum</i> (ascomiceto)	98%	AF346418
Presente em todos os perfis e mais intensa na linha após o plantio	S5	–	–	
Alta intensidade na linha após o plantio e nos cerrados	S6	ascomiceto	97%	AY177295
Presença na entrelinha após o plantio e no cerrado em março de 2005	S7	ascomiceto	98%	AF346561
Presença em todos os perfis	S8	ascomiceto	100%	AY544725
Alta intensidade e ausência no período da colheita	S9	<i>Hydropisphaera erubescens</i> (ascomiceto)	96%	AY545722
Ausência nos cerrados	S10	ascomiceto	95%	AY282746
Alta intensidade no período da frutificação na linha e entrelinha	S11	fungo não cultivável	97%	AJ635526
Alta intensidade na entrelinha antes da colheita e no período do plantio	S12	ascomiceto	97%	SLU42478

\* o traço indica seqüenciamento que não funcionou.



Figura 33. DGGE das amostras coletadas na área de soja amplificadas com primers universais 16S. As letras e números junto às setas indicam as bandas selecionadas para seqüenciamento. Da direita para esquerda marcador 1kb ladder seguido das amostras: 1 – Cerrado out/04; 2 – 42 dias antes do plantio linha set/04; 3 – 42 dias antes do plantio entrelinha set/04; 4 – 7 dias após o plantio linha nov/04; 5 – 7 dias após o plantio entrelinha nov/04; 6 – floração linha dez/04; 7 – floração entrelinha dez/04; 8 – frutificação linha jan/05; 9 – frutificação entrelinha jan/05; 10 – 29 dias antes da colheita linha fev/05; 11 – 29 dias antes da colheita entrelinha fev/05; 12 – 7 dias após a colheita linha mar/05; 13 – 7 dias após a colheita entrelinha mar/05; 14 – Cerrado mar/05.

Tabela 9. Justificativa da escolha da banda e resultado do seqüenciamento das bandas retiradas do gel de DGGE 16S da área de soja após verificação de qualidade do eletroferograma e similaridade com banco de dados BLAST.

Justificativa de escolha	Banda	Identificação da seqüência mais similar*	Similaridade BLAST	Número de acesso
Presença em todos os perfis e maior intensidade	S13	<i>Shigella sonnei</i>	93%	X80726

nos cerrados		gammaproteobacteria		
Presença em todos os perfis e maior intensidade nos cerrados	S14	–	–	
Alta intensidade na linha e ausência na entrelinha na frutificação	S15	<i>Pseudomonas</i> sp. (gammaproteobacteria)	92%	AF312675
Presença exclusiva no cerrado de março de 2005	S16	–	–	
Presença em todos os perfis	S17	–	–	
Ausência até a floração e alta intensidade nos cerrados	S18	gammaproteobacteria	98%	AF351235
Alta intensidade nos cerrados	S19	actinobacteria	96%	AY234442
Alta intensidade nos cerrados	S20	actinobacteria	93%	AY234700

\* os traços indicam os seqüenciamentos que não funcionaram.

É possível verificar a predominância das divisões actinobactéria e proteobactéria (classe gamma) nos seqüenciamentos das bandas retiradas de DGGEs 16S e das divisões ascomicetos, basidiomicetos, chitridiomicetos e um membro do reino Protozoa das bandas retiradas de DGGEs 18S.

## Discussão

### 1. Comparação de amostras de solo coletadas em linha e entrelinha de plantio

Um aspecto importante ao analisar comunidades microbianas em áreas cultivadas é determinar possíveis diferenças nas condições edáficas entre linha e entrelinha de plantio. Esta comparação pode evidenciar o efeito rizosférico nas comunidades microbianas e

verificar os efeitos da adoção de um sistema envolve o revolvimento mínimo do solo e a sua cobertura ao longo de todo o cultivo. Em geral, o conteúdo gravimétrico de água, pH do solo e carbono da biomassa microbiana não diferiram nas amostras coletadas na linha e entrelinha de plantio nas áreas de cultivo de feijão e soja (Figuras 8, 9, 10, 11, 12 e 13).

Diferenças significativas entre linha e entrelinha foram observadas com relação ao teor gravimétrico de água somente nas amostras coletadas após o plantio e no período da floração, o que coincide com o início do período chuvoso no cultivo de soja (Figura 8), e após o plantio justificado pelas irrigações mais frequentes no cultivo do feijão (Figura 11). Com relação ao pH do solo, diferenças entre linha e entrelinha foram observadas somente do período da frutificação na soja e a partir deste período até a colheita no feijão. Este fato pode estar relacionado com a diferenciação na quantidade e qualidade dos ácidos orgânicos e outros produtos liberados pelas raízes na forma de exsudatos ou lisados que podem reduzir o pH nas amostras de solo coletadas na linha (Figuras 9 e 12).

Maiores valores de carbono da biomassa microbiana na área cultivada com soja foram encontrados na entrelinha em comparação com a linha de plantio somente nas amostras referentes ao período da floração e frutificação (Figura 10). Na área cultivada com feijão irrigado não se observaram diferenças nos valores de biomassa microbiana entre amostras de solo de linha e entrelinha embora se note uma tendência de maiores valores na linha no período pré-plantio e logo após o plantio (Figura 13). Isto pode estar relacionado à decomposição de resíduos da cultura anterior e também à adição de fertilizantes diretamente na linha no momento do plantio. As demais fertilizações na área foram realizadas com o uso do pivô central, afetando tanto linha como entrelinha. Diferenças entre valores de biomassa microbiana não necessariamente refletem diferenças semelhantes na atividade microbiana como observado por Matsuoka et al. (2003). Esses autores compararam o comportamento da comunidade microbiana em cultura de videira na linha e entrelinha de plantio e encontraram maiores valores de carbono da biomassa microbiana na profundidade de 0 a 5 cm na linha de plantio porém níveis de C prontamente mineralizável e de atividades enzimáticas mais elevados na entrelinha de plantio sugerindo uma relação com o uso de restos culturais como cobertura morta e com o efeito rizosférico de gramíneas utilizadas como cobertura viva.



A análise dos dendrogramas elaborados a partir dos perfis de bandas obtidos com DGGE relacionados à linha e entrelinha não indicou muitas diferenças quando comparadas as coletas nas áreas de cultivo de feijão e soja exceto pelas amostras referentes a comunidade bacteriana no período da frutificação da soja em janeiro de 2005 (similaridade entre linha e entrelinha de 57%) e nas amostras pós-colheita da comunidade fúngica nas áreas de feijão e soja (similaridade entre linha e entrelinha de 47% e 46%, respectivamente) (Tabela 5). Nas demais datas de coletas, as similaridades entre linha e entrelinha ficaram acima de 68%. A variação no período da frutificação pode estar relacionada com a diferenciação na quantidade e qualidade dos ácidos orgânicos e outros produtos liberados pelas raízes como já indicado anteriormente para o pH do solo. Já as diferenças observadas nas amostras coletadas após a colheita podem estar relacionadas com o trânsito na entrelinha em virtude da colheita.

## **2. Comparação entre áreas de cerrado nativo e áreas cultivadas**

Como as diferenças entre linha e entrelinha de plantio nas áreas cultivadas não foram contundentes, diferenças entre as áreas e ao longo do tempo para conteúdo gravimétrico de água, pH e biomassa microbiana foram discutidas sem discriminação de linha e entrelinha.

Os valores de teor gravimétrico de água no solo na área de cerrado sentido restrito responderam às variações de precipitação ocorridas durante o ano apresentando uma diferença significativa entre os meses referentes à época seca e chuvosa (Figura 5). Como observado para a área nativa, o conteúdo gravimétrico de água na área de soja respondeu às variações de precipitação (Figura 8), entretanto os valores mínimos observados foram inferiores ao medido para o cerrado (12,6%) provavelmente pela pequena quantidade de cobertura morta sob o solo. Já na área de feijão, em virtude da irrigação e da presença de camada espessa de cobertura morta, os valores de umidade do solo mantiveram-se acima de 25%, com uma queda no período da colheita em virtude da diminuição da frequência de irrigação (Figura 11).

Diferenças significativas de pH na área nativa foram observadas ao longo do tempo embora os valores tenham variado somente entre 4,48 e 5,50 (Figura 6). Os valores médios

de pH nas áreas agrícolas foram aproximadamente 14% maiores que na área nativa provavelmente pelas práticas de calagem e gessagem adotadas. Na área sob cultivo de soja, também foram observadas diferenças significativas de pH do solo ao longo do tempo com maiores valores no período da floração apresentando pequena queda até a colheita (Figura 9). Padrão semelhante pode ser observado na área de feijão irrigado com variações ao longo do tempo ocorrendo entre o período de floração e frutificação (Figura 12). Uma variação no padrão de exsudatos liberados pela planta ao longo do seu desenvolvimento, em especial nos períodos mencionados acima, pode ter afetado os valores de pH do solo.

Na área nativa é possível observar um padrão sazonal nos valores de biomassa microbiana, com menores valores na estação chuvosa (Figura 7). O maior valor de biomassa microbiana (444,3 mg C.kg<sup>-1</sup> solo) no mês de setembro de 2004, ainda com ausência de precipitação, pode ser justificado pelo método de determinação utilizado que envolve a adição de água ao solo até atingir 100% da capacidade de campo e pelo acúmulo de C mineralizável ao longo da estação seca como observado por Silva (2004) com amostras de outra área de cerrado nativo.

Na área de soja, os resultados de biomassa microbiana não diferiram ao longo do período de cultivo (Figura 10). Houve uma redução do carbono da biomassa microbiana na área de soja em relação ao cerrado sentido restrito sendo o valor médio mínimo na área de soja 66% inferior ao do cerrado. Resultados semelhantes foram encontrados por Perez et al. (2004) com maior valor de C da biomassa microbiana no solo sob vegetação de cerrado sentido restrito quando comparado a um solo sob cultivo convencional de soja. Reduções na biomassa microbiana comparando outros sistemas de cultivo com áreas sob vegetação nativa de cerrado também foram observadas por Mendes et al. (1999) e Oliveira (2000). Bossio et al. (2005) ao estudar a conversão de áreas de floresta e de áreas reflorestadas em áreas sob manejo agrícola de solos tropicais também observou uma redução nos valores de biomassa microbiana e atividade enzimática total. Dentre os fatores responsáveis por favorecer a biomassa microbiana nas áreas nativas são destacados a ausência de preparo do solo, maior diversidade florística e produção de serapilheira. Embora a área de soja avaliada no presente estudo tenha sido cultivada em sistema de plantio direto desde sua conversão em lavoura a decomposição de resíduos é expressiva impedindo um grande acúmulo de necromassa sobre o solo. Apesar das reduções

encontradas para os valores de carbono de biomassa microbiana com relação à área nativa, o plantio direto ainda é considerado mais apropriado que o sistema convencional como observado por Vasconcellos et al. (1998). Os autores compararam os dois sistemas em cultivo de milho e demonstraram que a massa residual no plantio direto ao permanecer na superfície favorece o desenvolvimento da biomassa microbiana principalmente nas camadas superiores (0-5cm).

Como observado para a soja, os valores de carbono da biomassa na área de feijão irrigado tendem a não variar ao longo do ciclo de cultivo com exceção de valores mais altos medidos na etapa de plantio quando houve fertilização em linha (Figura 13). Entretanto, ao contrário do observado para a área cultivada unicamente com soja, o valor médio mínimo de biomassa microbiana é semelhante ao do cerrado nativo. Deve-se considerar que, além do efeito da irrigação, a área estudada vem sendo submetida à rotação de culturas tendo sido anteriormente cultivada com milho e braquiária. Essa entrada de material orgânico de diferentes origens pode estar relacionada também às diferenças observadas entre as duas áreas cultivadas quando comparadas ao cerrado nativo.

### **3. Estrutura das comunidades microbianas nas áreas cultivadas**

Os perfis obtidos nos géis de DGGE refletem a composição dominante da comunidade microbiana, pois são utilizados primers de regiões conservadas do genoma (Muyzer e Smalla, 1998). A forma de interpretação deste gel pode ocorrer pela análise da intensidade de suas bandas, o que estaria refletindo grosseiramente na abundância das populações na comunidade e/ou pela presença ou ausência de bandas, indicando a flutuação das populações de espécies mais dominantes na comunidade (Rosado e Duarte, 2002).

A análise de DGGE forneceu uma medida da composição e estrutura das espécies dominantes da comunidade microbiana do solo e produziu padrões de bandas reproduzíveis. Estes padrões de bandas, através da análise dos dendrogramas das comunidades bacteriana e fúngica da área de soja e feijão irrigado, indicam primeiramente influência do tipo de cobertura vegetal (áreas nativas X cultivadas), da presença ou ausência de cobertura [pré e pós-plantio e período de cultivo] e posteriormente do período de desenvolvimento da cultura e/ou da sazonalidade.

O tipo de planta é um fator determinante da estrutura da comunidade microbiana do solo, pois as plantas são os maiores fornecedores de formas específicas de carbono e fontes de energia (Garbeva et al., 2004). Desse modo, o tipo de vegetação bem como as condições ambientais torna-se fatores que determinam a quantidade e qualidade do material depositado no solo, influenciando a heterogeneidade e taxa de decomposição (Moreira e Siqueira 2002) atuando diretamente sobre a comunidade microbiana do solo. A diversidade estrutural e de atividade do sistema radicular podem estar igualmente envolvidas na deposição diferencial de compostos orgânicos no solo.

Em ecossistemas naturais é mantida uma estreita integração da cobertura vegetal com o sistema físico, químico e biológico do solo, por meio de processos essenciais como a ciclagem de nutrientes. A influência da cobertura vegetal na comunidade microbiana de solos tropicais descrita no presente estudo também foi documentada em outros trabalhos. Viana et al. (submetido) ao comparar áreas de cerrado nativo com áreas convertidas a pastagens pela técnica de PLFA observou maior predominância de bactérias gram-negativas em áreas nativas e bactérias gram-positivas e microrganismos eucarióticos em áreas de pastagem, evidenciando o efeito da cobertura vegetal na composição da comunidade microbiana. Silva (2004), usando a técnica de PCR-DGGE 16S rDNA, relatou que a comunidade bacteriana de uma área de pastagem convertida há dois anos diferiu de uma área de pastagem adjacente convertida há dez anos indicando um efeito do tempo de conversão de vegetação nativa de Cerrado em pastagem nas mudanças estruturais na comunidade bacteriana. Quirino et al. (submetido) em estudo metagenômico realizado nas mesmas áreas que Silva (2004), encontrou maiores raízes filogenéticas na área de cerrado nativo quando comparada com a área convertida a pastagem. Este resultado sugere que bactérias encontradas em solos de cerrado convertidos a pastagem são mais próximas filogeneticamente que as encontradas em áreas nativas. Bossio et al. (2005) também observou o efeito do tipo de vegetação na determinação da comunidade bacteriana de solos tropicais quando comparadas áreas reflorestadas com áreas agrícolas pela técnica de PCR-DGGE 16S rDNA, apresentando estas áreas 16% de similaridade (UPGMA-Coefficiente Dice).

Outros trabalhos evidenciando o efeito da cobertura vegetal na comunidade microbiana em solos de clima temperado também devem ser ressaltados. Carlile et al.

(2001) discutem que populações de fungos do solo são alteradas em virtude do cultivo agrícola. Áreas não cultivadas tendem a apresentar hifas fúngicas de maior tamanho que em áreas sob cultivo. Kowalchuck et al. (2002) pela técnica de PCR-DGGE e Waldrop e Firestone (2004) pela técnica de PLFA demonstraram que os maiores efeitos na estrutura e composição da comunidade microbiana foram induzidos pelo tipo de planta quando comparadas áreas de semelhantes condições edáficas e climáticas. Wieland et al. (2001) ao comparar variáveis como o tipo de solo, tipo de planta e a idade da planta demonstraram pela técnica de PCR-TGGE que o tipo de planta (espécie) apresentou maior efeito na determinação da estrutura da comunidade microbiana em comparação com as outras variáveis. No trabalho de Garbeva et al. (2006) a diversidade da comunidade microbiana foi analisada pelas técnicas tradicionais de cultivo e PCR-DGGE em diferentes tratamentos. O tratamento com maior biodiversidade sob o solo manteve maiores níveis de diversidade microbiana. Pastagens permanentes e convertidas a cultivo de milho estimularam a diversidade microbiana quando comparada a área sob intenso manejo convencional.

No presente trabalho, a presença ou ausência de cobertura vegetal, quando comparadas as coletas pré e pós-plantio e as realizadas durante todo o cultivo da soja e feijão, também foi um fator determinante na determinação da estrutura de comunidades bacterianas e fúngicas. O efeito da presença da planta na estrutura da comunidade microbiana também foi documentado por Smalla et al. (2001) em análises de solos sem cobertura vegetal e sob culturas de morango, batata e uva. Os fragmentos de 16S rDNA analisados por PCR-DGGE indicaram que no solo sem cobertura havia dominância de duas bandas fortes e a presença de inúmeras bandas mais difusas, indicando que a maioria das populações eram igualmente abundantes. Já nos solos sob cultivo, o padrão obtido indicou a presença de várias bandas de alta intensidade e poucas bandas difusas, evidenciado o efeito da presença da planta na estrutura da comunidade bacteriana.

A variação sazonal é tida como um dos principais fatores determinantes da comunidade microbiana do solo. Silva (2004) utilizando a técnica de PCR-DGGE em solos de áreas nativas de Cerrado observou uma diferenciação da comunidade bacteriana quando comparada a época de coleta, uma vez que este bioma apresenta duas estações climáticas distintas ao longo do ano, uma seca e outra chuvosa.

Nos períodos da cultura do feijão analisados por PCR-DGGE não foram encontradas variações significativas ao longo do tempo no teor gravimétrico de água no solo (Figura 11). A irrigação durante todo o período de cultivo na área de feijão impede que o efeito da sazonalidade atue de forma significativa na estrutura da comunidade microbiana. Desse modo, mudanças nas comunidades bacterianas e fúngicas do solo podem ter sido provocadas pela distribuição diferenciada de assimilados para as raízes ao longo do desenvolvimento da planta o que contribuiu para uma modificação no padrão de liberação de exsudatos radiculares.

Exsudatos radiculares são conhecidos como um dos mais importantes fatores que afetam a comunidade microbiológica. As raízes saudáveis liberam no solo compostos orgânicos solúveis, como açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos, os quais atraem populações microbianas, beneficiando a decomposição da liteira e a conservação de nutrientes no ecossistema (Moreira e Siqueira, 2002).

É sabido que o fluxo de carboidratos nas diversas partes da planta do feijão varia conforme o seu estágio de desenvolvimento. Antes do florescimento, a maioria dos assimilados são direcionados para o suprimento das raízes enquanto no florescimento este suprimento cai para 20%. Durante a fase de enchimento de vagens somente 1% do que é produzido por folha é direcionado para as raízes, permanecendo 75% dos assimilados nos grãos. No estágio de maturação das vagens a distribuição de assimilados para os ramos inferiores e raízes é restabelecida, ao passo que para as vagens é reduzida (Portes, 1988). Um estudo conduzido por Hungria et al. (1996) demonstrou que os exsudatos de feijoeiro (cv. Negro Argel) estimularam a biomassa microbiana, o potencial nitrificante e as populações de rizóbio e fungos micorrízicos.

Na área de cultivo de soja, as variações de umidade ao longo do tempo foram mais acentuadas no período pré-plantio (pousio), durante a floração e após a colheita apresentando estes menores valores (Figura 8). A diferença dos valores de umidade do solo no período pré-plantio (pousio) e pós-plantio não foram suficientes para provocar uma variação na estrutura das comunidades bacterianas e fúngicas, pois ocorreu o agrupamento com alta similaridade destes dois períodos de coleta em todos os dendrogramas (Figura 18, 19, 21 e 22). Apesar de menores valores de umidade terem sido encontrados no período de floração e após a colheita, a análise dos dendrogramas não justifica a mudança na estrutura

da comunidade bacteriana e fúngica pela variação de umidade do solo nestes períodos. Novamente, a variação no padrão de liberação de exsudatos radiculares ao longo do desenvolvimento da planta pode ter provocado mudanças nas comunidades bacterianas e fúngicas do solo.

No presente estudo, a fase de frutificação da soja, ou enchimento de vagens, exerceu grande efeito na composição da comunidade fúngica. Como toda cultura de ciclo anual, a soja apresenta no início uma taxa de acúmulo de matéria seca bastante reduzida, que é acompanhada de pequena absorção de nutrientes. No estágio seguinte (30 a 60 dias após a semeadura), o desenvolvimento e a absorção de elementos ocorrem em taxa elevada. Nessa fase, a taxa fotossintética é mais intensa e há alta absorção de nutrientes e água. No final do estágio seguinte, que compreende a fase de enchimento das vagens, há uma queda na elaboração de compostos fotossintetizantes que se acentua até total senescência (Tanaka et al., 1993). Esta diminuição pode ter contribuído para uma modificação no padrão de exsudatos radiculares liberados pela planta provocando uma modificação na comunidade fúngica da linha de plantio.

Vários trabalhos também demonstraram o efeito da variação na liberação de exsudatos na composição da comunidade microbiana do solo. Grayston et al. (1996) afirmam que a quantidade e composição dos exsudatos são dependentes do genótipo da planta, do estágio de crescimento da planta e das condições ambientais como CO<sub>2</sub>, luz, pH, temperatura, umidade e nutrientes. Outros estudos revelaram que espécies de microrganismos classificadas como r-estrategistas eram dominantes quando a planta encontrava-se jovem, com raízes imaturas e espécies k-estrategistas tornavam-se dominantes em raízes mais maduras (Chiarini et al., 1998 e Garbeva, 2004) Portanto, a comunidade não só se adapta ao tipo de planta, mas também muda ao longo do tempo sob o efeito de uma mesma planta. Kozdrój e van Elsas (2000) ao estudar o efeito da rizodeposição em solos poluídos com metais pesados demonstraram que a quantidade de DNA extraído do solo não foi alterada quando nutrientes em concentrações similares às dos exsudatos foram adicionadas. Porém o número de bactérias cultiváveis, incluindo *Pseudomonas sp.*, aumentou significativamente. A análise por PCR-DGGE 16S mostrou que esta adição não só afetou o número de bactérias dominantes como também provocou mudança na diversidade estrutural da comunidade microbiana. Wardle et al. (1999),

Garbeva et al. (2004), Smalla et al. (2001) e Yang et al. (2000) mostraram pela análise 16S que comunidades bacterianas pareceram sofrer maior influência do genótipo da planta, zona radicular e idade da planta, pois as plantas liberam uma variedade de componentes no solo criando ambientes únicos para o desenvolvimento de microrganismos. Chiarini et al. (1998) ao estudar a estrutura da comunidade microbiana pela técnica de plaqueamento demonstrou que nos estágios iniciais do crescimento do milho (*Zea mays*) (0 a 38 dias) a estrutura da comunidade microbiana da rizosfera mudou de forma significativa. Em uma primeira amostragem, 25 dias após o plantio, ocorreu a formação de colônias no primeiro dia após o plaqueamento. Na segunda amostragem, 38 dias após o plantio, a proporção de bactérias diminuiu e a maioria das colônias formou-se no segundo dia após o plaqueamento. Após este período de crescimento inicial do milho não foi observada nenhuma mudança significativa na estrutura da comunidade microbiana da rizosfera.

A fertilização ocorrida na área de feijão irrigado apesar de visualmente provocar mudanças no padrão de bandas, tornando-as mais intensas (Figura 23), não parece exercer efeito pronunciado na composição da comunidade bacteriana (Figura 24), pois além de se agruparem (95%) apresentaram alta similaridade (> 78%) com as outras amostras da área sob cultivo. Quando a comunidade fúngica é analisada, as fertilizações além de provocar mudanças na intensidade de bandas exerceram efeitos diferenciados na composição da comunidade fúngica, pois além de não se agruparem, as similaridades com as outras amostras da área sob cultivo foram menores (> 58%) do que na comunidade bacteriana. Nem todo adubo aplicado no solo é aproveitado pela planta; parte do nitrogênio é perdido por lixiviação, denitrificação ou volatilização; parte do potássio perde-se por lixiviação e fixação e grande parte do fósforo aplicado perde-se por fixação no solo. Considerando estas implicações, a quantidade a ser aplicada deve ultrapassar a quantidade exigida pela planta (Oliveira e Thung 1988). Girvan et al. (2004) destaca que dentre as práticas agrícolas que mais provocam alterações na comunidade microbiana estão o uso de altas quantidades de fertilizantes inorgânicos e pesticidas, pois provocam mudanças na densidade de fungos e bactérias, supressão ou promoção de crescimento e mudanças estruturais na comunidade microbiana, podendo contribuir para uma perda da diversidade e/ou função. Girvan et al. (2003) relataram que o intervalo de tempo em relação à aplicação do fertilizante foi mais importante que a concentração adicionada ao solo quando em menores intervalos após a



aplicação ocorreu um aumento no número de espécies bacterianas incluindo as cultivadas. Este resultado sugere que a comunidade bacteriana responde rapidamente a adição de nutrientes mas que a resposta decresce com o tempo. De acordo com Sarathchandra et al. (2001) o nitrogênio é quase sempre um fator limitante para os organismos do solo e a adição de nitrogênio pode mudar a biomassa microbiana, sua atividade e a composição de espécies. Silva e Nahas (2002) observaram maiores números de bactérias em parcelas não fertilizadas (controle) quando comparadas com parcelas tratadas com fertilizantes fosfatados. Por meio da técnica de plaqueamento, foram encontradas 22 espécies de bactérias nas parcelas controle, o que corresponde a um aumento de 15 a 21% em relação às parcelas tratadas com fertilizantes, sugerindo que a fertilização com fosfatos tem um efeito negativo na diversidade bacteriana. Silva e Nahas (2002) também observaram pela técnica de plaqueamento que em Latossolo Vermelho quando fertilizado com superfosfatos há uma alta proporção de bacilos gram-positivos já no mesmo solo não fertilizado há predominância de cocos gram-positivos e bacilos gram-negativos. Nos solos não fertilizados foram encontrados de 9 a 22 espécies o que corresponde a um aumento de 15 a 21% em relação às parcelas fertilizadas sugerindo que este tipo de fertilização tem um efeito negativo na diversidade bacteriana. Apesar da pouca informação disponível na literatura sobre o efeito da fertilização em fungos, Donnison et al. 2000 e Sarathchandra et al. 2001 discutem que em relação às bactérias, os fungos do solo diferem na sua resposta a fertilizantes NPK, tendo a abundância de espécies da comunidade reduzida em função da adição de N.

#### **4. Seqüenciamento**

Com o seqüenciamento das bandas escolhidas foi possível verificar a predominância das divisões actinobactéria e proteobactéria (classe gamma) nos seqüenciamentos das bandas retiradas de DGGEs 16S.

As actinobactérias são gram-positivas e com alto conteúdo de G+C. Uma característica marcante é a produção de enzimas extracelulares que degradam moléculas complexas comumente encontradas no solo (ex. húmus, quitina e celulose), além da síntese

e excreção de milhares de metabólitos como antibióticos, inseticidas e controladores de ervas daninhas. Neste grupo também são encontrados representantes que realizam o processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico e patógenos de plantas (Moreira e Siqueira, 2002).

A divisão proteobactérias, ou bactérias púrpuras, inclui a maioria das bactérias gram negativas, organismos fotossintéticos e não fotossintéticos, anaeróbios, aeróbios, heterótrofos e quimiotróficos. Esta divisão é subdividida em classes alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gamma ( $\gamma$ ), delta ( $\delta$ ) e epsilon ( $\psi$ ). As  $\gamma$ -proteobactérias incluem bactérias entéricas, pseudomonas fluorescentes, bactérias púrpuras e outras metabolizantes de enxofre (Woese 1987 *apud* Moreira e Siqueira, 2002).

O seqüenciamento da região 18S mostrou uma predominância das divisões ascomicetos, basidiomicetos, chitridiomicetos e um membro do reino Protozoa . Porém, a maioria das seqüências identificadas pertence à divisão ascomicetos. Esta dominância pode ter ocorrido, pois os primers adotados para a análise 18S tendem a gerar uma amplificação preferencial desta divisão, como descrito nos trabalhos de Smit et al. (1999) e Kowalchuk e Smit (2004).

Os fungos são reconhecidos como um dos cinco reinos eucarióticos e a diversidade de espécies deste reino é maior que a de bactérias e Archea (Kowalchuk e Smit 2004). O Reino Fungi é classificado em quatro divisões de acordo com a forma adotada na fase sexual do ciclo de vida: Chitridiomicetos, Zigomicetos, Ascomicetos e Basidiomicetos (Carlile et al., 2001).

Os ascomicetos são fungos septados (com parede celular de celulose), com exceção das leveduras unicelulares. Apresentam reprodução assexuada e sexuada, que envolve a produção de esporos a partir de células dos ascos. Formam ectomicorrizas e micorrizas ericóides. Os basidiomicetos são fungos septados com reprodução assexuada e sexuada, formam cogumelos e englobam a maioria das ectomicorrizas. Os quitridiomicetos são fungos septados com reprodução sexuada. Não são simbioses mutualistas e sim parasitas, tanto em ambiente terrestre quanto aquático. Os zigomicetos são fungos não septados (sem parede celular) com reprodução assexuada e sexuada englobando a maioria das micorrizas arbusculares e alguns parasitas obrigatórios de insetos (Carlile et al., 2001, Moreira e Siqueira 2002).

Dentre as espécies de fungos que foram identificadas, *Opegrapha varia* foi reconhecida por Wetmore (1987) como líquen e está associado a estudos de qualidade do ar pela sensibilidade intermediária à dióxido de enxofre (50 a 100ug/l) refletindo as condições ecológicas pela sua distribuição. O gênero *Chitridium sp.* analisado em um estudo sobre a decomposição de folhas de *Ficus microcarpa* mostrou ser sensível a concentrações maiores que 0.003M de fosfatos (Schoenlein-Crusius et al., 1999). *Hydropisphaera erubescens* descrito por Kohlmeyer e Kohlmeyer em 1979 (*apud* Kohlmeyer, 2002) foi identificado no estado da Carolina do Norte (EUA) como um fungo marinho que cresce sobre plantas em decomposição.

Outros trabalhos realizados em solos de região tropical merecem ser destacados. Quirino et al. (submetido) em estudo de solos de Cerrado nativo e sob pastagens encontrou maior predominância do grupo  $\alpha$ -proteobactéria seguido de acidobactérias e actinobactérias em solo de área nativa. A conversão para pastagens alterou a dominância dos grupos mais abundantes no solo sendo a predominância das seqüências pertencentes ao grupo actinobactérias seguido de acidobactérias e  $\alpha$ -proteobactérias. Bossio et al. (2005) pela técnica de PLFA identificou maior abundância de fungos e de bactérias gram-negativas em solos de floresta e de áreas reflorestadas de regiões de clima tropical. A conversão deste tipo de solo em uma área agrícola indicou altos níveis de actinomicetos e bactérias gram-positivas.

Muitas bandas retiradas do gel de DGGE não apresentaram seqüência com qualidade suficiente para identificação de homologias (F22 a F28, S5, S14, S16 e S17). Resultado semelhante foi observado por Sekiguchi et al. (2001) que ao seqüenciar bandas extraídas de géis de DGGE 16S tiveram dificuldades para realizar a leitura das seqüências. Ao construir uma biblioteca com clones gerados destas bandas não seqüenciadas, detectou-se a presença de várias seqüências filogeneticamente diferentes sugerindo que apesar de aparecer no DGGE como uma única banda ela pode incluir pequenas quantidades de DNA heterogêneo geradas pela co-migração de bandas (Sekiguchi et al., 2001).

Nikolausz et al. (2005) ao estudar a re-amplificação de DNA isolado da região inter-bandas de géis desnaturantes encontrou que o padrão de bandas no gel de DGGE pode não ser simplesmente o resultado da separação de diferentes amplicons de acordo com o comportamento de desnaturação, mas uma conseqüência de interações complexas entre

diferentes estruturas do DNA como a formação de estruturas de fita simples e a sua migração no gel, a formação de heteroduplex e a possibilidade da formação de um tipo de amplicon muito abundante que estaria presente não somente em uma banda mas no gel como um todo, causando interferências na região inter-bandas.

## **Considerações Finais**

No início do trabalho foram propostas três hipóteses: 1) A comunidade microbiana apresenta variação na sua composição e densidade quando comparadas a linha e a entrelinha de plantio; 2) A comunidade microbiana do solo tem sua composição e estrutura alterada ao longo do ciclo de cada cultura, em especial após fertilizações e 3) O uso do solo em áreas agrícolas altera a composição e estrutura da comunidade microbiana de solo em relação a áreas nativas de Cerrado.

A primeira hipótese proposta não foi comprovada. Apesar de ocorrerem algumas variações quando comparadas as coletas realizadas na linha e entrelinha de plantio, estas não foram contundentes.

Dois fatores importantes na diferenciação das comunidades microbianas foram identificados. A presença de cobertura vegetal quando comparado com o período de pousio e o estágio de desenvolvimento da cultura, o que está de acordo com o proposto na segunda hipótese do presente trabalho. No entanto, as fertilizações ocorridas na área de feijão parecem ter provocado efeito mais pronunciado na comunidade fúngica quando comparada à comunidade bacteriana tendo em vista menores índices de similaridade encontrados nas análises 18S. Os resultados encontrados na literatura para a comunidade fúngica ainda são incipientes em comparação com os dados já existentes para a comunidade bacteriana. Os resultados aqui apresentados indicam a necessidade de um melhor entendimento dos processos que controlam as duas comunidades quando submetidas às mesmas condições ambientais.

A terceira hipótese foi corroborada quanto à diferenças na estrutura da comunidade pois as análises de DGGE para as comunidades fúngicas e bacterianas mostraram inicialmente um maior efeito do tipo da cobertura vegetal (nativa x feijão/soja) na determinação da estrutura destas comunidades. Quanto à diferenças na composição da comunidade os resultados obtidos com o seqüenciamento mostraram alguns grupos mais dominantes como actinobactéria, gammaproteobactéria, ascomicetos, basidiomicetos, chitridiomicetos e um membro do reino Protozoa. No entanto, a análise de alterações da composição foi restrita em função de algumas limitações da técnica de DGGE. Em um ambiente como o solo, o número máximo de diferentes fragmentos de DNA separados por DGGE é vastamente subestimado (Ibekwe et al., 2001). Especialmente em comunidades complexas como as de solo, o padrão de bandas gerado é considerado como uma imagem da comunidade microbiana e refletem as seqüências de DNA mais abundantes. Para reduzir a complexidade dos padrões obtidos com DGGE as análises podem ser limitadas a grupos particulares de microrganismos (Muyzet et al., 2004). Além desta limitação, seqüências diferentes podem co-migrar em posições idênticas e, em alguns grupos de microrganismos, a análise de seqüências 16S e 18S rDNA não permite a discriminação de espécies. Portanto, é discutido que o número e a intensidade de bandas podem não corresponder ao número e à

abundância de espécies que pertencem à comunidade microbiana pelas limitações das análises de 16S e 18S rDNA para filogenia e pela possibilidade de amplificação preferencial por PCR em amostras complexas (Kowalchuk e Smit, 2004; He et al., 2005).

Apesar de algumas limitações, a técnica de PCR-DGGE adotada no presente estudo permitiu diferenciar populações de fungos e bactérias sendo ainda a mais utilizada para estudos de comunidades ambientais pelo baixo custo e possibilidade de análise simultânea de várias amostras. Esta técnica têm sido largamente utilizada para estudo de ecologia bacteriana porém, recentemente foi adotada para estudos de fungos (Anderson e Cairney, 2004). Apesar do êxito obtido neste trabalho em relação à adequação da metodologia para análise da comunidade fúngica em solos de Cerrado, adaptações na metodologia para melhorar a resolução dos géis e o uso de novos primers para análise de comunidades complexas ainda são necessárias. Em um futuro recente, o uso de produtos de PCR fluorescentes poderão ser utilizados para visualizar os perfis de bandas sem a necessidade de corar o gel, facilitando a análise de imagens (Muyzer et al., 2004). Outro aspecto importante é a tendência de combinar métodos (como no presente estudo - DGGE com seqüenciamento) para facilitar o entendimento do que está ocorrendo em amostras ambientais.

Estudos de comunidades microbianas têm destacado o papel crítico da composição destas comunidades em sistemas naturais. Considerando a rápida taxa de transformação e a intensificação do uso do solo do Cerrado, estudos visando melhor entendimento dos processos que regulam as comunidades microbianas em ambientes naturais e em função de alterações no uso do solo são fundamentais para melhor entendimento da ecologia deste bioma.

## **Referências Bibliográficas**

**Aidar, H e Kluthcouski, J.** 2003. Evolução das Atividades Lavoureira e Pecuária nos Cerrados. In: Kluthcouski, J; Stone, L.F. e Aidar, H (ed). *Integração Lavoura-Pecuária*. EMBRAPA Arroz e Feijão. Santo Antônio de Goiás – GO;

**Adámoli, J., Macêdo, J., Azevedo, L.G. de e madeira Netto, J.** 1986. Caracterização da Região dos Cerrados. In: Goedert, W.J. (ed.). *Solos dos Cerrados: tecnologias e estratégias de manejo*. EMBRAPA Cerrados. Planaltina DF. P 33-74;

**Anderson, I. C. e Cairney, J. W. G.** 2004. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology*. 6(8): 769-779;

**Anderson, J.P. e Domsch, K.H.** 1978. A physiological method for quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 10: 215-221;

**Azevedo, J.L.** 1998. Biodiversidade Microbiana e Potencial Biotecnológico. In: Melo, I.S.de e Azevedo, J.L.(ed.). *Ecologia Microbiana*. EMBRAPA CNPMA, Jaguariúna. 488p;

**Borneman, J. e Hartin, R. J.** 2000. PCR primers that amplify fungal rRNA Genes from Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(10):4356-4360;

**Borneman, J e Triplett, E.W.** 1997. Molecular microbial diversity in soils from earstern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial populations shifts associated with deforestation. *Applied Environmental Microbiology*. 63: 2647-2653;

**Bossio, D.A., Girvan, M.S., Verchot, L., Bullimore, J., Borelli, T., Albrecht, A., Scow, K.M., Ball, A.S., Pretty, J.N. e Osborn, A.M.** 2005. Soil Microbial Community Response to Land Use Change in na Agricultural Landscape of Western Kenya. *Microbial Ecology*. 49: 50-62;

**Bridge, P. e Spooner, B.** 2001. Soil fungi: diversity and detection. *Plant and Soil*. 232: 147-154;

**Brodie, E., Edwards, S. e Clipson, N.** 2003. Soil fungal community structure in a temperate upland grassland soil. *FEMS Microbiology Ecology*. 45: 105-114;

**Carlile, M.J., Watkinson, S.C. e Gooday, G.W.** 2001. *The Fungi*. Elsevier Academic Press. 2<sup>a</sup> Ed.

**Chiarini, L., Bevivino, A., Dalmastri, C., Nacamulli, C. e Tabacchioni, S.** 1998. Influence of plant development, cultivar and soil type on microbial colonization of maize roots. *Applied Soil Ecology*. 8:11-18.

**Crecchio, C., Gelsomino, A., Ambrosoli, R. Minati, J. L. E Ruggiero, P.** 2004. Functional and molecular responses of soil microbial communities under differing soil management practices. *Soil Biology Biochemistry*. 36: 1873-1883;

**Creste, S., Tulmann Neto, A e Figueira, A.** 2001. Detection of Single Sequence Repeat Polymorphisms in Denaturing Polyacrilamide Sequencing Gels by Silver Staining. *Plant Molecular Biology Reporter*. 19:299-306;

**Donnison, L.M., Griffith, G.S. e Bardgett, R.D.** 2000. Determinants of fungal growth and activity in botanically diverse hay meadows: effects of litter type and fertilizer additions. *Soil Biology and Biochemistry*. 32: 289-294;

**Doran, J. W. e Zeiss, M. R.** 2000. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*. 15: 3-11;

**EMBRAPA.** Centro Nacional de Pesquisa de Solos. 1997. *Manual de métodos de análises de solo*. 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, RJ. 212p.

**Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Forestier, N., Teyssier-Cuvelle, S., Gillet, F., Aragno, M. e Rossi, P.** 2002. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology*. 4(11): 634-643;



**Garbeva, P., Postma, J. Van Veen, A. e van Elsas, J.D.** 2006. Effect of above-ground plant species on soil microbial community structure and its impact on suppression of *Rhizoctonia solani* AG3. *Environmental Microbiology*. 8(2): 233-246;

**Garbeva, P., veen, J. A. van e Elsas, J. D. van.** 2004. Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*. 42: 243-270;

**Garofalo, C.R.** 2001. Efeitos do aumento da disponibilidade de nutrientes na dinâmica de nutrientes em plantas lenhosas e solo em uma área de cerrado *stricto sensu*. Departamento de Ecologia, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil. Dissertação de Mestrado. 89p;

**Girvan, M.S., Bullimore, J., Pretty, J.N., Osborn, A.M. e Ball, A.S.** 2003. Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 1800-1809;

**Girvan, M.S., Bullimore, J., Ball, A.S., Pretty, J.N. e Osborn, A.M.** 2004. Responses of Active Bacterial and Fungal Communities in Soils Under Winter Wheat to Different Fertilizer and Pesticide Regimens. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(5):2692-2701;

**Grayston, S.J., Vaughan, D., Jones, D.** 1996. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Applied Soil Ecology*. 5:29-56;

**He, J., Xu, Z. E Hughes, J.** 2005. Analyses of soil fungal communities in adjacent natural forest and hoop pine plantation ecosystems of subtropical Australia using molecular approaches based on 18S rRNA genes. *FEMS Microbiology Letters*. 247:91-100;

**Heilmann, B. Lebuhn, M. e Beese, F.** 1995. Methods for investigation of metabolic activity and shifts in the microbial community in soil treated with a fungicide. *Biology and Fertility of Soils*. 19: 186-192;

**Huber, T., Faulkner, G e Hugenholtz, P.** 2004. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics. Applications Note*. 20: 2317-2319;

**Hungria, M., Andrade, D.S.de., Colozzi-Filho, A. E Balota, E.L.** 1996. Interação entre microrganismos do solo, feijoeiro e milho em monocultura ou consórcio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira-On line*. 31(11);

**Hunt, J., Boddy, L., Randerson, P. F. e Rogers, H. J.** 2004. An evaluation of 18S rDNA Approaches for the studyof fungal diversity in grassland soils. *Microbial Ecology*. 47: 385-395;

**Ibekwe, A. M., Papiernik, S. K., Gan, J.; Yates, S. R.; Yang, C. E Crowley, D.** 2001. Impact of fumigants on soil microbial communities. *Applied and environmental microbiology*. 67(7): 3245-3257;

**Jenkinson, D.S. e Powlson, D.S.** 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. V. A method for measuring soil biomass. *Soil Biology Biochemistry*. 8(3): 209- 213;

**Johnsen, K., Jacobsen, C. S., Torsvik, V. e Sorensen, J.** 2001. Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils – a review. *Biology and Fertility of Soils*. 33: 443-453;

**Johnson, M.J., Lee, K.I. e Scow, K.M.** 2003. DNA fingerprinting reveals links among agricultural crops, soil properties and the composition of soil microbial communities. *Geoderma*. 114:279-303;

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

**Kennedy, N e Clipson, N.** 2003. Fingerprinting the fungal community. *Mycologist*. 17(4):158 – 164;

**Kirk, J.L., Beaudette, L.A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J.N., Lee, H e Trevors, J.T.** 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*. 58: 169-188;

**Kluthcouski, J e Stone, L.F.** 2003. Manejo Sustentável dos Solos dos Cerrados. In: *Integração Lavoura-Pecuária*. Kluthcouski, J; Stone, L.F. e Aidar, H ed. EMBRAPA Arroz e Feijão. Santo Antônio de Goiás – GO

**Kohlmeyer, J. e Volkmann- Kohlmeyer, B.** 2002. Fungi on *Juncus* and *Spartina*: New marine species of *Anthostomella*, with a list of marine fungi know on *Spartina*. *Mycology Research*. 106(3): 365-374;

**Kohlmeyer, J e Kohlmeyer, E.** 1979. Marine Mycology: The Higher Fungi. Academic Press, New York;

**Kozdrój, J. e Van Elsas, J.D.** 2000. Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. *Soil Biology and Biochemistry*. 32:1405-1417;

**Kowalchuk, G.A., Souza, F.A. de e van Veen, J.A.** 2002. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* en Dutch coastal sand dunes. *Molecular Ecology*. 11: 571-581;

**Kowalchuk, G.A. e Smit, E.** 2004. Fungal community analysis using PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). *Molecular Microbial Ecology Manual*. 3.14: 771-788. 2ª edição. Kluwer Academic publishers. Netherlands;

**Machado, R.B., Ramos Neto, M.B., Pereira, P.G.P., Caldas, E.F., Gonçalves, D.A., Santos, N.S. e Tabork Steininger M.** 2004. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Relatório Técnico. Conservação Internacional, Brasília, DF;

**Marshall, M. N.; Cocolin, L.; Mills, D. A. e Vanderghenst, J. S.** 2003. Evaluation of PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities in compost. *Journal of Applied Microbiology*. 95: 934-948;

**Matsuoka, M.; Mendes, I.C. e Loureiro M.F.** 2003. Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos sob vegetação nativa e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de Primavera do Leste (MT). *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 27:425-433;

**Mendes, I.C.; Carneiro R.G.; Carvalho, A.M.; Vivaldi, L. E Vargas, M.A.T.** 1999. Biomassa C e atividade microbiana em solos de cerrado sob plantio direto e plantio convencional. Pesquisa em andamento. Planaltina, EMBRAPA Cerrados. 5p;

**Mihermeier, R.A., Gil, P.R., Hoffmann, M., Pilgrim, J., Brooks, T., Mihermeier, C.R., Lamourex, J. E Fonseca G.A.B.da.** 2005. Hotspots Revisited – Earth’s Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions. Conservation International. CEMEX. 16p;

**Moreira, F.M.S e Siqueira, J.O.** 2002. Microbiologia e Bioquímica do Solo. Lavras: Editora UFLA. 626p;

**Muyzer, G.** 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*. 2:317-322;

**Muyzer, G.; Brinkhoff, T.; Nübel, U.; Santegoeds, C.; Schäfer, H. e Wawer, C.** 2004. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. *Molecular Microbial Ecology Manual*. 3.13:743-770. 2<sup>a</sup> edição. Kluwer Academic publishers. Netherlands;

**Muyzer, G. e Smalla, K.** 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*. 73:127-141;

**Myers, R.M., Maniatis, T. e Lerman, L.S.** 1987. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods in Enzimology*. 155: 501-527;

**Nannipieri, P.; Ascher, J.; Ceccherini, M.T.; Landi, L.; Pietramellara, G. E Renella, G.** 2003. Microbial Diversity and Soil Functions. *European Journal of Soil Science*. 54:655-670;

**Nardoto, G.B.** 2000. Efeito de queimadas na mineralização de nitrogênio e em processos de ciclagem de nutrientes em uma área de cerrado *stricto sensu*. Departamento de Ecologia, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil. Dissertação de Mestrado. 90p.

**Nakatsu, C.H., Torsvik, V e Øvreas, L.** 2000. Soil Community Analysis using DGGE of 16S rDNA Polymerase Chain Reaction Products. *Soil Science Society American Journal*. 64: 1382-1388

**Nikolausz, M., Sipos, R., Révész, S., Székely, A. E Márialigeti, K.** 2005. Observation of bias associated with re-amplification of DNA isolated from denaturing gradient gels. *FEMS Microbiology Letters*. 244:385-390;

**Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwig, W. E Backhaus, H.** 1996. Sequence Heterogeneities of Genes Encoding 16S rRNAs in

*Paenibacillus polymyxa* Detected by Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Journal of Bacteriology*. 178(19): 5636-5643;

**Oliveira, I.P.de. e Thung, M.D.T.** 1988. Nutrição mineral. In: Zimmermann, M.J.O.de; Rocha, M e Yamada, T. *Cultura do Feijoeiro – fatores que afetam a produtividade*. Associação Brasileira para pesquisa da Potassa e do Fosfato. Piracicaba, SP. 589p;

**Oliveira, J.** 2000. O impacto de sistemas integrados de lavouras e pastagens na biomassa-c e na atividade biológica de um Latossolo vermelho escuro de Cerrado. Dissertação de Mestrado em Agronomia. Universidade de Brasília;

**Øvreas, L. e Torsvik, V.** 1998. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microbial Ecology*. 36: 303-315;

**Peixoto, R.S., Coutinho, H.L.C., Rumjanek, A.M. e Rosado, A.S.** 2002. Use of *rpoB* and 16S rRNA genes to analyse bacteria diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. *Letters in Applied Microbiology*. 35:316-32;

**Perez, K.S.S.; Ramos, M.L.G e McManus, C.** 2004. Carbono da biomassa microbiana em solo cultivado com soja sob diferentes sistemas de manejo nos Cerrados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 39(6): 567-573;

**Portes, T.A. de.** 1988. Ecofisiologia. In: Zimmermann, M.J.O.de; Rocha, M e Yamada, T. *Cultura do Feijoeiro – fatores que afetam a produtividade*. Associação Brasileira para pesquisa da Potassa e do Fosfato. Piracicaba, SP. 589p;

**Quirino, B.F., Pappas, G.P., Tagliaferro, A.C., Collevatti, R.G., Leonardecz-Neto, E., Silva, M.R.S.S., Bustamante, M.M.C. da. e Krüger, R.H.** Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. Submetido;

**Rosado, A. S. e Duarte, G. F.** 2002. Utilização de eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura (TGGE) para estudar diversidade microbiana. In: Melo, I.S., Valadares-Inglis, M.C., Nass, L.L. e Valois, A.C.C. *Recursos Genéticos e Melhoramento – Microrganismos*. Embrapa;

**Sarathchandra, S.U., Ghani, A., Yeates, G.W., Burch, G. e Cox, N.R.** 2001. Effect of nitrogen and phosphate fertilizers on microbial and nematode diversity in pasture soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 33: 953- 964;

**Sneath, P.H.A. e Sokal, R.R.** 1973. Numerical Taxonomy; The Principles and Practice of Numerical Classification. Freeman, San Francisco. 573p;

**Schlöter, M., Dilly, O. e Munch, J.C.** 2003. Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 98:255-262;

**Schoenlein-Crusius, I.H., Pires-Zottarelli, C.L.A., Milanez, A.I. e Humphreys, R.D.** 1999. Interaction between the mineral content and the occurrence number of aquatic fungi in leaves submerged in a stream in the Atlantic rainforest, São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Botânica*. 22(2): 133-139;

**Sekiguchi, H.; Tomioka, N.; Nakahara, T. E Uchiyama, H.** 2001. A single band does not always represent a single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotechnology Letters*. 23:1205-1208;

**Silva, M.R.S.S da.** 2004. Produção de serapilheira, biomassa e diversidade de comunidades bacterianas do solo em áreas de Cerrado sob diferentes usos e manejos. Departamento de Ecologia, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil. Dissertação de Mestrado. 77p;

**Silva, P. e Nahas, E.** 2002. Bacterial diversity in soil in response to different plants, phosphate fertilizers and liming. *Brazilian Journal of Microbiology*. 33: 304-310;

**Smalla K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Kaiser, S. Roskot, N., Heuer, H. E Berg, G.** 2001. Bulk and Rhizosphere Soil Bacterial Communities Studied by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: Plant-Dependent Enrichment and Seasonal Shifts Revealed. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(10): 4742-4751;

**Smit, E.; Leeflang, P.; Glandorf, B.; Elsas, J. D. van e Wernass, K.** 1999. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-Amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *American Society for Microbiology*. 65(6): 2614-2621;

**Tanaka, R.T., Mascarenhas H.A.A. e Borkert, C.M.** 1993. Nutrição mineral da soja. In: Arantes, N.E. e Souza, P.I.M de. (ed). *Cultura da soja nos Cerrados*. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. Piracicaba, SP. 535p.

**Thomas, V.G. e Keavan, P.G.** 1993. Basic principle of agroecology and sustainable agriculture. *Journal of Agriculture Environment Eth*. 5:1-18;

**Van Elsas, J. D., Duarte, G. F., Keijzer-Wolters, A. e Smit, E.** 2000. Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*. 43: 133-151;

**Van Elsas, J.D., Mäntynen, V. E Wolters, A.C.** 1997. Soil DNA extraction and assessment of the fate of *Mycobacterium chlorophenicum* strain PCP-1 in different soil by 16S ribosomal RNA gene sequence based most-probable-number PCR and immunofluorescence. *Biology and Fertility of Soils*. 24:188-195;

**Vasconcellos, C.A., Figueiredo, A.P.H.D., França, G.E.de, Coelho, A.M. e Bressan, W.** 1998. Manejo do Solo e a Atividade Microbiana em Latossolo-Vermelho Escuro da Região de Sete Lagoas, MG. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 33(07).



**Viana, L.T.** 2002. Comparação das dinâmicas de mineralização de nitrogênio, biomassa e estrutura das comunidades microbianas do solo em áreas de cerrado nativo e pastagem. Departamento de Ecologia, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil. Dissertação de Mestrado. 85p;

**Viana, L.T., Bustamante, M.M.C.da., Molina, M., Pinto, A.S., Kisselle, K., Zepp, R. e Burke, R.** Soil Microbial Communities by PLFA Patterns: Effects of Vegetation Cover, Sazonality and Prescribed Fires. *Global Change Biology*. Submetido.

**Vilela, L., Macedo, M.C.M., Martha Júnior, G.B. e Kluthcouski, J.** 2003. Benefícios da Integração Lavoura-Pecuária. In: *Integração Lavoura-Pecuária*. Kluthcouski, J; Stone, L.F. e Aidar, H ed. EMBRAPA Arroz e Feijão. Santo Antônio de Goiás – GO

**Yang, C.H. e Crowley, D.E.** 2000. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied and Environmental Microbiology*. 63:345-351;

**Waldrop, M.P e Firestone, M.K.** 2004. Microbial community utilization on recalcitrant and simple carbon compounds: impact of oak-woodland plant communities. *Oecologia*. 138: 275-284;

**Wardle, D.A., Yeates, G.W., Nicholson, K.S., Bonner, K.I., Watson, R.N.** 1999. Response of soil biomass dynamics, activity and plant litter decomposition to agricultural intensification over a seven-year period. *Soil Biology Biochemistry*. 31:1701-1720;

**Wetmore, C.M.** 1987. Lichens and air quality in boundary waters canoe area of superior national forest – Final Report. National Forest Service, Minnesota. 28p;

**Wieland, G. Neumann, R. e Backhaus, H.** 2001. Variation of microbial communities in soil, rhizosphere and rhizoplane in response to crop species, soil type and crop development. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:5849-5854;

**Woese, C.R.** 1987. Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews*. 51(2): 221-271;

**Zhou, J., Bruns, M.A. e Tiedje, J.M.** 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(2):316-322;

## **Anexo**

S1

tgattcataataacttctcgaatcgcattggccttgccggcgatgcttcattcaaatatctgccctatcaactttcgatggtcgagtagt  
gttctaccatggtatcaacgggtaacggggaattagggttcgattccggagagggagcctgagaaacggctatcacatccaagga

aggcagcaggcgcgcaaattaccaatcccacacggggaggtagtacaataaataacaatacagggtctaatgggtcttgta  
attggaatgagtacaatttaaatccctaacgaggaaca

S2

accaatccccatgggcttgagccggcgaaggtcattcaaacttgcctatcaacttgcattgtaagataaaaggctacacaggtt  
caacgggtaacgggagaattaagggtcgggtcccgaagggaacctgaaaaacggctaacacattcaaagaaagcagcaggcgc  
caaattaccaatcccacacggggaggtagtacaataaataactgatacagggtctttgggtcttgtaattggaatgagtacaatt  
taaatccctaacgaagaacaattggagggaagctg

S3

cataataactaaacgaatcgcattgggcttgcgccggcgatgggtcattcaaatttgcctatcaacttgcattgtgagatagaggct  
tacaatggcttaacgggttacggggaattagggtctattccggagaggagcctgagaaacggctaccacatcccaggaaggc  
agcaggcgcgtaattaccatgctgatacagcagggtagtacaattaatactgatacggggtctttgggtctcgttaattggaa  
tgagtacaatctaaatccctaacgaggaacaattgg

S4

taacgaatcgcattggccttgcgccggcgatgggtcattcaaatttgcctatcaacttgcattgtaaggcttggcctaccatggtt  
caacgggtaacggggaattagggtctatcccggagaggagcctgagaaacggctaccacatccaaggaaggcagcaggcgc  
gcaaattaccaatcccacacggggaggtagtacaataaatactgatacagggtctttgggtctcgttaattggaatgagtaca  
tctaaatccctaacgaggaacaattggagggaagctggtgccatcanc

S6

Agcacaaccgctgccttataaactcaatgcccttgcggctccttgggtattcataataactaccgaatcgcattggccttgcgccg  
gcgattgggtcattcaaatatctgcctatcaacttgcattgtagggattggcctaccatgggtgtaacgggtaacggggaattagg  
ttcgattccggagaggagcctgagaaacggctaccacatccaaggaaggcagcaggcggcgaattaccaatcccacacgg  
ggaggtagtacaataaatactgatacagggtctttgggtctcgttaattggaatgagtacaatttaaatccctaacgaggaaca  
ttggagggaagctggtgccatca

S7

Ttccgaatcgcattggccttgcgccggcgatgggtcattcaaacttgcctatcaacttgcattgtaggggtcttggcctgacatgg  
tacaacgggtaacggggttagggctcgaacccggaaaaggagcctgaaaaacggctactacatccaaggaaggcagcagg  
cgcccaattaccaatcccacacggggaggtagtacaataaatactgatacagggtctttgggtcttgtaattggaatgagtac  
aatttaaatccctaacgaggaacaattggagggaagctggtgccagcaacc

S8

ttacggatcgcattggccttgcgccggcgacgggtcattcaaatttgcctatcaacttgcattgtaggggtattggctaccatggt  
tcaacgggtaacggggaattagggtcattccggagaggagcctgagaaacggctaccacatccaaggaaggcagcaggc  
cgcaattaccaatcccacacggggaggtagtacaataaatactgatacagggtctttgggtcttgtaattggaatgagtaca  
atataaccttaacgaggaacaattggagggaagct

S9

cacggatcgcacgggcttgcgccgggactgtcattcaaatttccctatcaacttgcattgtaggggtatggcgaacatgg  
ggcaacgggtaacggggttagggctcgaacccggagaaggagcctgagaaacggctactacatccaaggaaggcagcagg  
cgcgcaattaccaatcccacacggggaggtagtacaataaatactgatacagggtctttgggtcttgtaattggaatgagta  
caatttaaatccctaacgaggaacaattggagggaagct

S10

cgaatctcacgggctcgcgccggcgatgggtcatacaaatatctccctatcaaatcgcattgtaggggtatagggaacatggctc  
caacgggtaacggggttagggctcgaacccgcagaaagagcctgagaaacggctactacatccaaggaaggcagcaggc  
cgcaattaccaatcccacacggggaggtagtacaataaatactgatacagggtctttgggtcttgtaattggaatgagtaca  
ttaaatcttaacgaggaacaattggagggaagctg

S11

ttctgaatcgtatgacctgagtcgacgattgggtcattcaaatttgcctatcaacttgcattgtaggggtataggcctaccatgg  
gtaacgggtaacggggaattagggtcattccggagaggagcctgagaaacggctaccactccaaggaaggcagcaggcgc

cgcaaattaccaatcctgacacaggaggtagtacaataaataacaatacagggccttctgggtcttgaattggaatgagtaca  
atttaaatcccttaacgaggaacaattggagggcaagt

S12

gcgtgataaaaacaatgccttcgaggctccttgggtgattcatcataacttaacggatcgcattgggcttgcgccggggacgggtcattc  
aaatttctgcctatcaacttctgatggtaaggatggcctaccatggtttcaacgggtaacggggaattaggggttcgattccggaga  
gggagcctgagaaacggctatcacatccaaggaaggcagcaggcgcgcaaattaccaatcccacacgggggaggtggtgac  
aataaatactgatacagggctctttgggtcttgaatcggaatgagtacaattaaacccttaacgaggaacaattggagggcaagt

F1

Taacgaatcgtatggccttgcggcggatggttcattcaatttctgcctatcaacttctgatgtaagatagggcctaccatggt  
ttcaacgggtaacggggaattaggggttcgattccggagagggagcctgaaaaacggctaccatccaaggaaggcagggagcgc  
cgcaaattaccaatcccacacgggggaggtagtacaataaatactgatacagggctctttgggtcctgtaattggaatgagtaca  
atttaaatcccttaacgaggaacaattggagggcaagt

F2

taaacgaatcgcattggccttgcggcggatggttcattcaatttctgcctatcaacttctgatgtaggatagaggcctacaatgg  
ttcaacgggtaacggggaattaggggttcggttccggagagggagcctgagaaacggctaccatccaaggaaggcagcagggc  
gcgcaaattaccaatcccacacgggggaggtagtacaataaatactgatacagggctctttgggtcctgtaattggaatgagtac  
aatttaaatcccttaacgaggaacaattggagggcaagt

F3

aaacgaatcgcattggccttgcggcggatggttcattcaatttctgcctatcaacttctgattgtaggatagaggcctacaatggt  
tcaacgggtaacggggaattaggggttcggttccggagagggagcctgagaaacggctaccatccaaggaaggcagcagggc  
cgcaaattaccaatcccacacgggggaggtagtacaataaatactgatacagggctctttgggtcctgtaattggaatgagtaca  
atttaaatcccttaacgaggaacaattggagggcaagt

F4

gaatcgcattggccttgcggcggatggttcattcaatttctgcctatcaatttctgattgtaggatagaggcctacaatggttcaa  
cgggtaacggggaattaggggttcggttccggagagggagcctgagaaacggctaccatccaaggaaggcagcagggcgcg  
aaattaccaatcccacacgggggaggtattgacaataaatactgatacagggctctttgggtcctgtaattggaat

F5

taacgaatcgcattggccttgcggcggatggttcattcaatttctgcctatcaacttctgatgtaggataatggcctaccatggt  
tcaacgggtaacggggaattaggggttcgattccggagagggagcctgagaaacggctaccatccaaggaaggcagcagggc  
cgcaaattaccaatcccacacgggggaggtagtacaataaatactgatacagggctctttgggtcctgtaattggaatgagtaca  
atttaaatcccttaacgaggaacaattggagggcaattc

F6

aaacgaatcgcattggccttgcggcggatggttcattcaatttctgcctatcaacttctgattgtaggatagaggcctacaatggt  
tcaacgggtaacggggaattaggggttcggttccggagagggagcctgagaaacggctaccatccaaggaaggcagcagggc  
cgcaaattaccaatcccacacgggggaggtagtacaataaatactgatacagggctctttgggtcctgtaattggaatgagtaca  
atttaaatcccttaacgaggaacaattggagggcaagt

F7

Taacgaatcgcattggccttgcggcggatggttcattcaatttctgcctatcaacttctgatgtaggatagggcctaccatggt  
ttcaacgggtaacggggaattaggggttcgactccggagagggagcctgagaaacggctaccatccaaggaaggcagcagggc  
gcgcaaattaccaatcccacacgggggaggtagtacaataaatactgatacagggctcttgggttctctacggg

F8

taaacgaatcgcattggccttgcggcggatggttcattcaatttctgcctatcaacttctgattgtaggatagaggcctacaatggt  
ttcaacgggtaacggggaattaggggttcggttccggagagggagcctgagaaacggctaccatccaaggaaggcagcagggc  
gcgcaaattaccaatcccacacgggggaggtagtacaataaatactgatacagggctctttgggtcctgtaattggaatgagta  
caatttaaatcccttaacgaggaacaattggagggcaagt

F9

aacgaatcgcattggccttgagccggcgatggttcattcaaatctgcctatcaacttcgattgtaagataaaggcctaccatggtt  
caacgggttacggagaattaggggttcgggtcccgagaaggagccttagaaacggctaacacatccaagaaggcagcagggcgcg  
caaattaccaatcccacacggggaggtagtacaataaatactgatacagggtcttttgggtcttgaattggaatgagtacaatt  
taaatcccttaacgaggaacaattggagggcaaatct

F10

taaacgaatcgcattggccttgagccggcgatggttcattcaaatctgcctatcaacttcgattgtaggataaaggcctacaatggt  
ttcaacgggtaacggagaattaggggttcgggtccggaaaggagcctgagaaacggctaccacatccaaggaaggcagcagggc  
gcgcaaattaccaatcccacacggggaggtagtacaataaatactgatacagggtcttttgggtcttgaattggaatgagtac  
aatttaaatcccttaacgaggaacaattggagggcaagt

F11

ttgtcgaatcgcattggccttgagccggcgatggttcattcaaatctgcctatcaacttcgattgtaggataaaggcctaccatggt  
ttcaacgggtaacggggaataagggttcgattccggagagggagcctgagaaacggctaccacatccaaggaaggcagcaggg  
cgcgcaaattaccaatcccacacggggaggtagtacaataaatacaatataggggccccctttgggtcatataattgcaatgag  
tacaatttaaatcccttaacgaggatcaattggagggcaag

F12

gcatggacttcgctcgtcgtacagtcattccaattctgcctatcaggctcccacggtagttagtgtagggactatcaggcactag  
cgggtgacggcgaataagggtacgattccggacacggaccagagaaacgggtaccacatccaaggtatcgagaaggcgcgc  
aaatgaccaatcctgacacagggaggtagggagaagtaataacaataatcgggccttaacgggtctgtagttggaatgagtaca  
ttgaaatcccttaacgacgatccatgggaaggcaagtctggtg

F13

cgaatcgcattggccttgagccggcgatggttcattcaaatctgcctatcaacttcgattgtaggataaaggcctaccatggttca  
acgggtaacggggaattaggggttcgattccggagagggagcctgagaaacggctaccacatccaacgaaggcagcagggcgcg  
caaattatccaaatcccacacggggaggtagtacaataaataatgatacagggtcttttgggtcttgaattggaatgagtaca  
ttaaatcccttaacgaggaacaattggagggcaagtctgg

F14

tcgaatcgtacgagtttacgtcaggaagggtcattcaaatctgcctatcaacttcgattgtaggataaaggcctaccacgggttt  
aacgggtaacggggaataagggttcgattccggagagggagcctgagaaacgggtaccacatccaacgaaggcagcagggcgcg  
caaattaccaatcctgattcagggaggtagtacaataaataacaatccgaggtcttttgggtcttgaattggaatgaacacaattaa  
atccctcccagggcacaatggatggcaagtctggtg

S13

ccagctcttgacatccacggaagttctagagataaaaagggtgccttcgggaaccgtgagacaggtgctgcatggctgctcagct  
cgtgctgtaaatgttgggttaagtcccgaacgagcgaacccttatccttagttgccagcgggtccgggcgggaaatcaaaagag  
aaaggcagtgataaaatggaggaaggggggaftaactcagtcctcaaggcccctaacagcaggggtaaaaaagtgtgaaaa  
ggcgcataaaaaaagaagggcactcccagagggcggcgacc

S15

caggtgntgcatggntgctcagctcgtgctganatgttgggttaagtcccgtaacgagcgaaccctgtcctnngttaccagc  
acgtaatggtggcnccttaagnagactccgggtgacaaaccggannaagggtgggatgacntcaantcatnatggccttacg  
gcctggntacacangtgnanaagggtcggaaacagngggtgccaaaccgcgaggtggagctaanccanaaaaccgntc  
tantccgnatcgantctgcaactcgactcgtgaagtcggaatcg

S18

gaaccttgagacaggtgctgcatggctgctcagctcgtgtgtgaaatgtagggtaagtcccgtaacgagcgaacccttatect  
tagttgccagcgggtcgtgggggaaatgaaggaaaatggccgggaaaaatggaggaaggggggaftaactcaaatgctcctg  
ggcctacgagccggggtaaaaaacgggtaaacgggcgatacaaatagatggcccctctgacagcgggagcactc

S19

ggcaggatcaaaagtgggtcatgggtgtcgtcaactcctgtcgtgaaatgtgggtaagtcccgcaaagagcgccaaccccgctg  
catgttgccagcatttacttggggactcatgcgagaccgccggtgacaaaaccggaggaaggtgggatgacgtccactcatcatg  
ccccttatgtccaggggtacacacgtgttacattggggcgtacagagggtgggtataccgtcaggtggagcgaattcct

S20

cgctgagatatacgcggcattgcggatccgcgataataaccaattccgccttcaggcaggcagttgtcagccggcaatccgaatc  
gaaacgcgcttgaagggattcgtccacctcgcggatcgcgaacctctgtacgcgccaatgtagcatgtgtgtagccctggacata  
aggggcatgatgacttgacgtcatccccaccttctccggttgtcaccggcgggtctcgcagtagtccccactaaatgctggcaac  
atgcgacgggggttgcgctcgttgcgggacttaaccaac

F15

gggaagtataccngtctgtcgnnccnggnataataannaattcnnatttannaggtntnttggaaaatccnanncgnaat  
gnnnacnggttttggantngntcncctcanggtntngnanccttngnaccgncnatngnagnantntnnnccctaga  
antaagggnntgangattngagntnttccnacnttctcngntnnancnggangtntcctatnannccccnccataacn  
ngnnggnaanatggaaagngggtngcncncgtngnggnttaccnaanntntnanganaggnngnacaacnacatg  
caccantgtgcacggcccttaaggancccgattctcnaatttncnngcatgtaancctnngtaaggttttngngtcccc

F16

acggtntccctcggggcaggatcacaggtgggtcatggntgtcgtcagctcgtcgtgagatgttgggtaagtcccgcaanga  
gcgcaacccccgtcgnatgttgccagcatttagttggggactcatgcganacngccggtgacaaaccggaggaaggtggggatg  
acgtcaagtcacatgcccccttatgtccagggctacacacgtgctacattggcgcgtacanaggggtgnataaccngaggtggag  
cgaatcccttaaagcgcgtctcggttcggattgcaggtgaaactgcctgcatgaaggcggagttgctagtaatcgcggatcagn  
attgccgcggtgaatac

F17

gtgnannnnnannnggnanngtgatcgcgattactagcaactccgccttcacgaggcagntcagcctgcaatccgaacc  
ganacgcgcttnaagggattcgtccacctcncggatcgcgaacctctgtacgcgccaatgtagcacgtgtgtagccctggacat  
aaggggcatgatgacttgacgtcatccccaccttctccggttgtcaccggcagctcgcagtagtccccactaaatgctggca  
catgcgacgggggttgcgctcgttgcgggacttaaccaacatctcacgacacgagctgacgacagccatgcaccacctgtgatc  
ctgccccgaaggganacc

F18

ncgtgaaatatacaccggcagngngatccgcgattactagcaactccgccttcacgaggcgggtntcagcctgcaatccga  
accganacgcgcttnaagggattcgtccacctcgcggatcgcgaacctctgtacgcgccaatgtagcacgtgtgtagccctgga  
cataaggggcatgatgacttgacgtcatccccaccttctccggttgtcaccggcgggtcgcagtagtccccactaaatgctggc  
aacatgcgacgggggttgcgctcgttgcgggacttaaccaacatctcacgacacgagctgacgacagccatgcaccacctgtga  
tctgccccgaaggganaccgtttccacggtgtcaggaacatgtcaagcccaggttaaggttctcgcgttccc

F19

ccngaaatatacaggntccccngncncgattactancgattccancttcacggagtcgagttgcagactccaatccgaactg  
agacngnttttggnttggntccccctcngngtngnanccnttgnaccngccattgtannangntngtngccnngncat  
aaaggccatgaggantgaggtcatccccaccttctccggttntcancggnagtctcnnagantnccccnncnaancggng  
ggaaannnggaaaagggnngcnccttnggggggtttaaaccaaaattcaaganangggnggnnaaanncannnaanc  
ctnnacnngccccggnanaaaan

F21

cgtgaaatatacaggttcncctgggnccngcgatnacaaccaatccgatttannagnancnantgnannctcnaatnga  
gagnanggggtttnggnattggctccnctcgcgggttggnnacctntgtancnaccattgtagcangtgtgngccctggnc  
ataangccatgatgacttgangtcatccccaccttctccggttgnnacnggagncnccntnngtccccactnaatgctgg  
naantaaggacaagggtngcgtccttgcgggattnaancaaaaatntcacnancgagntgannacagccatgcnngcctn  
tctccaggtccttgcggnacc