

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRICULTURA NO TRÓPICO ÚMIDO - ATU**

**RIQUEZA DE COMUNIDADES BACTERIANAS EM DOIS SOLOS SOB O
CULTIVO DE TRÊS FRUTÍFERAS NA AMAZÔNIA CENTRAL, BRASIL**

BIANCA GALÚCIO PEREIRA

Manaus, Amazonas

Fevereiro, 2012

BIANCA GALÚCIO PEREIRA

**RIQUEZA DE COMUNIDADES BACTERIANAS EM DOIS SOLOS SOB O
CULTIVO DE TRÊS FRUTÍFERAS NA AMAZÔNIA CENTRAL, BRASIL**

Orientador: Dr. Luiz Antonio de Oliveira

Co-orientadora: Dra. Siu Mui Tsai

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Agrárias. Área de concentração: Uso e Manejo dos Recursos Naturais.

Manaus, Amazonas

Fevereiro, 2012

P436r

Pereira, Bianca Galúcio

Riqueza de comunidades bacterianas em dois solos sob o cultivo de três frutíferas na Amazônia Central, Brasil/ Bianca Galúcio Pereira. --- Manaus: [s.n.], 2012.

90 f.: il. color.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2012

Orientador: Luiz Antonio de Oliveira

Co-orientadora: Siu Mui Tsai

Área de concentração: Agricultura no Trópico Úmido.

1. Latossolo amarelo. 2. DGGE. 3. Terra Preta de Índio.

I.Título

CDD 631.417

Dedico

A meus pais Maria Fátima Galúcio Alegre e Janilson Luis Mendes Pereira que com amor, dedicação e esforço, a cada dia proporcionaram a realização deste sonho. Agradeço e devo tudo a vocês.

A meus irmãos Marcelo, Glauce, Hugo, Raul e Davi por todo apoio e incentivo em todos os dias de minha vida

Agradecimentos

Ao finalizar mais esta etapa de minha vida, expresso a enorme satisfação de poder compartilhar com todos aqueles que estiveram do meu lado ao longo desta jornada, incentivando, apoiando e acreditando neste jubiloso momento.

Agradeço a Deus, pela saúde, inspiração e fé que me sustenta e ilumina as trilhas desta caminhada.

À Cooperação Acadêmico-Científica entre os Programas de PG do CENA-USP, UFMT-MT e INPA-AM, ao Programa CAPES - PROCAD que me deram suporte financeiro e estrutural para desenvolver este trabalho e ao programa de Pós-Graduação em Agricultura no Trópico Úmido, e ao PPG-ATU do INPA, que oferece o Curso, esse que possibilitou desenvolver esta pesquisa.

À toda equipe técnica do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA-USP e da Coordenação de Pesquisas em Ciências Agronômicas do INPA, por todo apoio e disposição que sempre dispensaram nas oportunidades necessárias.

Ao Professor, Dr. Luiz Antonio de Oliveira pelos bons conselhos, solitudes e sempre prontidão na minha orientação que foram essenciais para o meu crescimento.

À Professora, Dra. Siu Mui Tsai, pela amizade e principalmente pela disponibilidade para atender minhas dificuldades, sempre com extrema gentileza.

A todos aqueles que estiveram envolvidos nos trabalhos de campo, agradeço pela solidariedade.

Agradeço a todos, pois este trabalho tem um pouco de cada um de vocês.

Todo conhecimento humano
começou com intuições,
passou daí aos conceitos e
terminou em idéias.

Immanuel Kant

RESUMO

RIQUEZA DE COMUNIDADES BACTERIANAS EM DOIS SOLOS SOB O CULTIVO DE TRÊS FRUTÍFERAS NA AMAZÔNIA CENTRAL, BRASIL

A diversidade genética presente nos microrganismos proporciona o desempenho de funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas, sendo eles, portanto, componentes fundamentais de cadeias tróficas e ciclos biogeoquímicos. Técnicas modernas e mais eficientes no estudo da microbiota do solo, como o uso de ferramentas moleculares, vêm sendo aplicadas para maximizar a caracterização da diversidade microbiana. Amostras de solos foram coletadas em duas propriedades rurais localizadas na RESEX Uatumã, Estrada de Balbina no Ramal da Morena, no Município de Presidente Figueiredo, AM, em solos de Terra Preta de Índio e Latossolo Amarelo sob o cultivo de três espécies botânicas nativas da Amazônia, açaí – *Euterpe precatoria* Mart., pupunha – *Bactris gasipaes* Kunth e cupuaçu – *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum. As amostras foram analisadas pela técnica de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) a fim de obter uma caracterização das estruturas de comunidades do filo Proteobacterias nas classes Alfa, Beta e Gammaproteobacteria. Os resultados mostraram que as culturas de açaí, pupunha e cupuaçu cultivadas em solos de Latossolo Amarelo e Terra Preta contemporânea são capazes de influenciar diferencialmente as estruturas de comunidades de Alfaproteobacterias. Para esse estudo, o ambiente de Terra Preta contemporânea parece favorecer a maior riqueza para os grupos de Beta-proteobacterias, quando comparado aos solos de Latossolo Amarelo. Fato contrário foi observado para o grupo de Gammaproteobacterias levando a um indicativo de maior riqueza para os solos de Latossolo Amarelo. Fe, Al e porcentagem de saturação por alumínio (m) foram os principais fatores abióticos que influenciaram na estrutura das comunidades bacterianas estudadas.

Palavras-chave: Terra Preta; Latossolo Amarelo; Diversidade Genética; Ecologia microbiana; Técnicas moleculares; DGGE.

ABSTRACT

BACTERIAL COMMUNITIES RICHENESS IN TWO SOILS BEING USED TO GROW THREE FRUIT TREE SPECIES IN CENTRAL AMAZONIA, BRAZIL

Microorganisms genetic diversity provides unique and crucial ecosystem, maintaining performances, thus being a fundamental trophic food chain and biogeochemical cycle components. Modern and more efficient techniques for studying soil microbiota, such as the use of molecular tools, are being employed so as to maximize microbial diversity characterization. Soil samples were collected in two rural properties located at RESEX Uatumã, Balbina road in the ramal Da Morena, in the municipality of Presidente Figueiredo, AM, in dark earth and yellow latosol being used to cultivate three native, Amazonian botanical species, açai – *Euterpe precatoria* Mart., peach palm – *Bactris gasipaes* Kunth and cupuassu – *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum. Samples were analyzed through Denaturing Gradient Gel Electrophoresis technique (DGGE) in order to attain Proteobacteria phylum, communities structure characterization, in Alfa, Beta and Gammaproteobacteria classes. Results showed that cultures of açai, cupuassu and peach palm grown in yellow latosol and Dark Earth contemporary are able to differentiate influence the structures of Alphaproteobacteria communities. The contemporary dark earth environment seems to favor the rich for Beta-proteobacteria groups, when compared to the yellow latosol. Indeed, opposite was observed for the Gammaproteobacteria group leading to an indication of greater wealth for the yellow latosol. Fe, Al and percentage of aluminum saturation (m) were the main abiotic factors that influenced the structure of the studied bacterial communities. Keywords: Amazonian Dark Earth; Yellow Latosol; Genetic Diversity; microbial Ecology; Molecular techniques; DGGE.

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

16S rRNA – Acido ribonucleico ribossomal 16S

18S rRNA – Acido ribonucleico ribossomal 18S

Al – Alumínio

ANOSIM – Análise de Similaridade

B – Boro

Ca²⁺ – íon de cálcio

Cu – Cobre

DGGE – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ou Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante

DNA – Ácido desoxirribonucléico

Dntp – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados (dNTP's), são nucleotídeos do DNA

EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid ou ácido etilenodiamino tetra-acético

Fe – Ferro

K⁺ – Íon de fósforo

Mg²⁺ – Íon de magnésio

Mn – Manganês

MO – Matéria orgânica

N – Nitrogênio

NMDS – *Non-Metric Multidimensional Scaling* ou Escalonamento Multidimensional Não-Métrico

P – Fósforo disponível

PCR – Polymerase Chain Reaction ou Reação em Cadeia da Polimerase

S – Enxofre

SB - Soma de bases

T – Índice de saturação por bases

Tampão TSB –

UPGMA – *Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages* ou Método não ponderado de agrupamento aos pares por médias aritméticas

V – Saturação por bases

Zn – Zinco

SUMÁRIO

1	Introdução	15
2	Objetivos	20
	Objetivo Geral	20
	Objetivos Específicos	20
3	Revisão da Literatura	21
	3.1 Solos de Terra Firme da Amazônia	21
	3.2 Diversidade Microbiana dos Solos	23
	3.3 Diversidade Botânica na Amazônia	25
	3.3.1 Açazeiro (<i>Euterpe precatoria</i> Mart.)	26
	3.3.2 Pupunheira (<i>Bactris gasipaes</i> Kunth)	28
	3.3.3 Cupuaçu [<i>Theobroma grandiflorum</i> (Willd. ex Spreng.) Shum. ..	30
	3.4 Os três domínios Bacteria, Archaea e Eucarya	32
	3.5 Técnicas moleculares para estudo de comunidades microbianas em amostras ambientais	37
	3.5.1 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)	41
4	Material e Métodos	48
	4.1 Área de Estudo	43
	4.2 Coleta de Dados	44
	4.2.1 Análise química de solos	46
	4.2.2 Extração do DNA total do solo	46
	4.2.3 PCR-DGGE	47
	4.2.3.1 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)	47
5	Resultados e Discussão.....	51
	Análises de solos	51
	5.1 Análises dos padrões de bandas gerados por DGGE e estatísticas	51

5.2 Estimativas de riqueza para Alfa, Beta e Gammaproteobacteria – Índices Chao 2 e Jackknife2	55
5.3. Análises de similaridade (ANOSIM)	58
5.4 Análises de NMDS dos perfis de DGGE	60
6 Conclusão	66
7 Referências Bibliográficas	84

ANEXOS

Anexo A - Análise e caracterização química dos solos. Atributos químicos analisados: pH, matéria orgânica (MO), P disponível, N total, S, K ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ trocáveis, Al, soma de bases (SB), T, índice de saturação por bases (V), saturação por alumínio	85
Anexo B - Análise e caracterização química dos micronutrientes dos solos (B, Cu, Fe, Mn e Zn)	86
Anexo C – Concentração de nitrogênio (N) nas amostras de solo	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências iniciadoras utilizadas nas reações de PCR-DGGE, programas no termociclador e variações no preparo das reações	49
Tabela 2 - Condições de eletroforese em gel com gradiente desnaturante que serão utilizadas para análise de fragmentos parciais SSU rDNA de diferentes tamanhos	50
Tabela 3 - Estimativas de riqueza de estruturas de comunidades bacterianas, em solos na Amazônia Central, por meio de dois estimadores não paramétricos Chao 2 e Jackknife2	56
Tabela 4 - Descrição das análises de similaridade (ANOSIM) e NMDS	59
Tabela 5 - Efeito da condicional NMDS segundo as variáveis ambientais sob a distribuição da estrutura das comunidades de bactérias observadas	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Árvore filogenética universal inferida com base em análise comparativa de sequências de rRNA	33
Figura 2 - Vista do “pomar caseiro” em área de Latossolo Amarelo	44
Figura 3 - Coleta de solos sob cultivo de pupunheira, em área de Terra Preta	45
Figura 4 - Agrupamentos hierárquicos definidos a partir de fingerprints DGGE de comunidades de Alfabroteobacteria presentes em solos de Terra Preta e Latossolo Amarelo, amostrados em maio de 2009, nas áreas de estudo localizadas na Amazônia Central brasileira	52
Figura 5 - Agrupamentos hierárquicos definidos a partir de fingerprints DGGE de comunidades de Betaproteobacteria presentes em solos de Terra Preta e Latossolo Amarelo, amostrados em maio de 2009, nas áreas de estudo localizadas na Amazônia Central brasileira.....	53
Figura 6 - Agrupamentos hierárquicos definidos a partir de fingerprints DGGE de comunidades de Gammaproteobacteria presentes em solos de Terra Preta e Latossolo Amarelo, amostrados em maio de 2009, nas áreas de estudo localizadas na Amazônia Central brasileira	54
Figura 7 - Riqueza das comunidades bacterianas Alfabroteobacteria, revelada nos padrões de bandas DGGE obtidos a partir de 6 amostras (pontos amostrais) de solos de Terra Preta e Latossolo Amarelo sob três diferentes cultivos (açai, cupuaçu, pupunha)	57
Figura 8 - Riqueza das comunidades bacterianas Betaproteobacteria, revelada nos padrões de bandas DGGE obtidos a partir de 6 amostras (pontos amostrais) de solos de Terra Preta e Latossolo Amarelo sob três diferentes cultivos (açai, cupuaçu, pupunha)	57

Figura 9 - Riqueza das comunidades bacterianas Gammaproteobacteria revelada nos padrões de bandas DGGE obtidos a partir de 6 amostras (pontos amostrais) de solos de Terra Preta e Latossolo Amarelo sob três diferentes cultivos (açai, cupuaçu, pupunha)	58
Figura 10 - Análises de NMDS (<i>Non-Metric Multidimensional Scaling</i>) baseadas nas estruturas de comunidades de Alfaproteobacteria, em solos sob o cultivo de açai, pupunha e cupuaçu, conforme discriminadas pela técnica de DGGE, e nos atributos químicos dos solos	62
Figura 11 - Análises de NMDS (<i>Non-Metric Multidimensional Scaling</i>) baseadas nas estruturas de comunidades de Betaproteobacteria, em solos sob o cultivo de açai, pupunha e cupuaçu, conforme discriminadas pela técnica de DGGE, e nos atributos químicos dos solos	63
Figura 12 - Análises de NMDS (<i>Non-Metric Multidimensional Scaling</i>) baseadas nas estruturas de comunidades de Gammaproteobacteria, em solos sob o cultivo de açai, pupunha e cupuaçu, conforme discriminadas pela técnica de DGGE, e nos atributos químicos dos solos	64

1 INTRODUÇÃO

A Amazônia é detentora da maior sócio-biodiversidade do planeta, representando o habitat de 200 grupos étnicos, expressando-se em 170 línguas diferenciadas. Acumula, portanto, um valioso e cobiçado patrimônio cultural a respeito do conhecimento ancestral e atual dos produtos regionais sobre: plantas medicinais e comestíveis, flores, frutos, sementes, cascas de árvores, extração de resinas, seivas, raízes e agricultura de subsistência (Goodland & Irwin, 1975; Benchimol, 1997).

Em sua grandeza tropical, a Amazônia contém uma mega biodiversidade que não encontra paralelos no planeta. Segundo a Convenção sobre a Diversidade Biológica (CDB e sua transformação em lei brasileira - MP 2186), a biodiversidade deveria ser considerada em três níveis: os ecossistemas, as espécies que os ocupam, e os genes que determinam as características das espécies.

Grande parte da Amazônia é constituída por solos de baixa fertilidade e de elevada acidez. Dentre as principais classes de solos encontradas na Amazônia Legal, a grande dominância é dos Latossolos e Argissolos distróficos que juntos representam cerca de 70% da região (Rodrigues, 1996). Entretanto, apesar da fragilidade desses solos, a floresta é particularmente mantida em equilíbrio por meio de uma ciclagem eficiente dos nutrientes medida por uma complexa rede de interações entre as plantas, os animais e os microrganismos (Alfaia *et al.*, 2005). Há ainda uma pequena parcela 0,1 a 0,3% (15.500-20.700 Km²) da floresta Amazônica onde são encontradas manchas de um dos solos mais ricos do mundo, os solos de Terra Preta Antropogênica ou Terra Preta de Índio (Sombroek *et al.*, 2003).

Os solos de Terra Preta Antropogênica apresentam evidências arqueológicas de que atividades humanas antigas transformaram significativamente as paisagens da vizinhança dos seus assentamentos, especialmente no período pré-histórico colombiano entre 500 e 8700 anos atrás (Kern; Costa 1997). Sociedades indígenas formaram extensos depósitos de resíduos que contribuíram para a alteração das propriedades do solo. De origem vegetal houve deposição de folhas, cascas de mandioca e sementes;

de origem animal houve deposição de ossos, sangue e carapaças de quelônios; também apresentam resíduos de fogueiras que também contribuíram na formação do carvão vegetal (Lehmann et al, 2003)

Concernente a produtividade e sustentabilidade dos sistemas de produção agrícola na Amazônia, estessão limitados, principalmente pelos diferentes níveis de fertilidade natural dos solos, de modo que grande parte da população local cultiva em seus quintais frutíferas regionais. Na maioria desses quintais a agricultura é familiar e, a diversidade de espécies frutíferas, os tratos culturais e ação de microrganismos, são fatores que parecem influenciar mais fortemente na sustentabilidade desses sistemas. A diversificação desse sistema produtivo, tem como função, garantir a manutenção da família e fornecer alimentos ricos em proteínas, vitaminas e sais minerais (VIANA et al., 1996). Além do consumo familiar, as plantas condimentares e aromáticas contribuem para a diversificação e geração de renda, pela comercialização da produção excedente. Dessa forma, tornam-se um fator de complementação da renda dos pequenos agricultores rurais da região Amazônica.

Os microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas, sendo eles, portanto, componentes fundamentais de cadeias tróficas e ciclos biogeoquímicos. No entanto, apesar de sua importância na manutenção da biosfera, estimativas recentes indicam que os microrganismos constituem quase que 90% das espécies da Terra, enquanto que somente 5% dessa totalidade foram caracterizados e descritos até o momento. Em relação às bactérias e fungos, o número decai ainda mais, pois apenas 1% são conhecidos (Canhos e Vazoller, 1999).

Apenas uma pequena fração dos organismos na natureza, menos de 1%, podem ser cultivados usando técnicas microbiológicas de rotina (MALIK *et al.*, 2008). O pouco conhecimento da diversidade de microrganismos em amostras ambientais deve-se em grande parte aos métodos tradicionalmente utilizados de isolamento e cultivo em laboratório (RANJARD et al, 2000). Estas evidências influenciaram estudos de diversidade de microrganismos não-cultiváveis de amostras ambientais e estimularam particularmente o desenvolvimento de técnicas que permitissem o estudo das comunidades

microbianas independentes de cultivo. De fato, esses avanços aumentaram o interesse em conhecer a diversidade microbiana ambiental, assim como o papel que desempenham na qualidade do solo, com o grande aumento do número de estudos voltados a esta área, juntamente com os avanços no desenvolvimento de novas técnicas biomoleculares para a análise de ácidos nucléicos.

A análise do DNA permite analisar complexas comunidades microbianas a nível genético fornece informação sobre a composição de espécies ou estruturas de comunidades. Embora, a princípio, qualquer gene possa ser usado nas análises, o gene 16S rRNA em procariotos e o 18S rRNA em eucariotos são os mais utilizados como moléculas marcadoras para este propósito, uma vez que estão presentes em todos os organismos; apresentam regiões conservadas e regiões variadas, o que torna possível o desenho de primers e sondas com diferentes níveis de especificidade; têm informação de sequência suficiente para inferência filogenética; e estão presentes em grande número de células, o que facilita sua detecção. Além disso, cerca de 800.000 sequências estão disponíveis atualmente em bases de dados de livre acesso, tais como Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/html>) e Greengenes (<http://greengenes.lbl.gov>).

Neste sentido, técnicas de fingerprinting são utilizadas a fim de se obter uma visão global da estrutura genética da comunidade microbiana. A aplicação destas técnicas em estudos de ecologia microbiana vem sendo amplamente disseminada nos últimos anos, uma vez que constituem metodologias rápidas e relativamente fáceis de operacionalizar, permitindo a análise simultânea de múltiplas amostras ambientais (Navarrete,2009). Dentre estas técnicas estão ARDRA (“Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis”), DGGE (“Denaturing Gradient Gel Electrophoresis”), RISA (“Ribosomal Intergenic Spacer Analysis”), ARISA (“Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis”) e T-RFLP (“Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism”). Estas técnicas para análise de ácidos nucléicos têm sido desenvolvidas mediante variações no método básico de PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizado com acuidade no diagnóstico, quantificação, caracterização e identificação de microrganismos e atividade dos mesmos. Em genética de populações e ecologia microbiana, a

PCR gera dados para estudos da distribuição natural de membros dos Domínios Bacteria, Archaea e Eucarya.

O uso das técnicas moleculares vem oferecendo uma oportunidade única e inovadora para se estudar comunidades microbianas *in situ*, sem a necessidade de isolamento e cultivo. Entretanto, nenhuma destas técnicas isoladamente é capaz de gerar dados abrangentes ou conclusivos sobre uma comunidade microbiana em particular. Além das limitações técnicas, o uso do rRNA como marcador molecular pode limitar a tarefa de descrever a diversidade microbiana. Esta molécula pode ser, em alguns casos, muito conservada para revelar diferenças entre microrganismos evolutivamente relacionados, mas ecologicamente diferentes. Apenas uma aplicação combinada de diferentes métodos de biologia molecular, aliada ao uso de técnicas clássicas de isolamento e cultivo de microrganismos em cultura pura, será capaz de revelar de maneira mais precisa a dimensão da diversidade microbiana na natureza.

O manejo do solo e de sua cobertura vegetal reflete-se em suas características físicas, químicas e biológicas. Uma vez que os microrganismos respondem rapidamente às alterações impostas ao ambiente (Bunemann *et al.*, 2006), o monitoramento de mudanças microbiológicas e a correlação dessas com as características bióticas, abióticas e com as práticas de manejo das culturas, têm potencial para o estabelecimento de indicadores da qualidade do solo. A análise da estrutura de comunidades microbianas por meio de técnicas moleculares, como a PCR-DGGE, pode ser uma ferramenta útil no monitoramento de mudanças ambientais em função dos diferentes usos da terra (Kirk *et al.*, 2004).

O objetivo de muitas técnicas moleculares é descrever as populações biológicas por meio da riqueza de táxons. O mais antigo e mais simples conceito de diversidade de espécies é a riqueza de espécies: o número de espécies na comunidade, mas o problema básico desta medida é que frequentemente não é possível enumerar todas as espécies em uma comunidade natural.

A avaliação da abundância de diferentes taxas por meio dessas técnicas é dificultada por implicações decorrentes das etapas de extração de ácidos

nucléicos e ampliações por PCR. Além do mais, esses métodos ainda não são refinados ao ponto de considerar que a função pode não ser ambigualmente nomeada por diferentes taxás. Portanto, métodos moleculares devem ser usados em concordância com outras técnicas para alcançar uma compreensão mais holística da estrutura e função das comunidades microbianas do solo (Thies, 2004).

Considerando a necessidade de estudos relacionados à diversidade de bactérias dos solos da Amazônia Central, o presente trabalho tem como objetivo comparar e estimar a riqueza de comunidades bacterianas de solo de Terra Preta e Latossolo Amarelo, sob o cultivo de três espécies botânicas cultivadas em duas propriedades localizadas na região de Balbina no município de Presidente Figueiredo no Amazonas. Portanto, esse estudo se torna importante por ilustrar o impacto das comunidades bacterianas presentes nesses dois solos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar a riqueza de comunidades bacterianas, usando métodos moleculares independentes de cultivo, em solos de Terra Preta e Latossolo Amarelo sob o cultivo de três espécies botânicas nativas da Amazônia, açaí – *Euterpe precatoria* Mart., pupunha – *Bactris gasipaes* Kunth e cupuaçu – *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum., em dois sítios localizados na região de Balbina, município de Presidente Figueiredo, Amazônia Central.

2.2 Objetivos Específicos

1. Através do isolamento do gene 16S rRNA, identificar a estrutura de comunidades bacterianas (cultiváveis e não cultiváveis) presentes em solos de Terra Preta e Latossolo Amarelo, sob o cultivo de três espécies botânicas (açaí, pupunha e cupuaçu) cultivadas em duas propriedades na zona rural do município de Presidente Figueiredo, AM.
2. Avaliar a similaridade das estruturas de comunidades do Domínio Bacteria nas classes Alfareobacteria, Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria presentes em solos de Terra Preta e Latossolo Amarelo sob cultivo de açaí, pupunha e cupuaçu, utilizando técnicas moleculares de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE).
3. Analisar quais fatores químicos influenciam nas estruturas de comunidades bacterianas, por meio da determinação dos teores de macro e micronutrientes nos solos de Terra Preta e Latossolo Amarelo sob o cultivo das três espécies estudadas, relacionadas com as variáveis bióticas obtidas com dados do DGGE.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Solos de Terra Firme da Amazônia

Grande parte da Amazônia é constituída por solos de baixa fertilidade e acidez elevada. Apesar da fragilidade desses solos, a floresta é mantida em equilíbrio por meio de uma ciclagem eficiente dos nutrientes medida por uma complexa rede de interações entre as plantas, os animais e os microrganismos (Alfaia *et al.*, 2005).

Os solos amazônicos são resultados do intenso processo de lixiviação que vem ocorrendo há milhões de anos. O clima da região, quente e úmido, favorece os processos de intemperização das rochas e a lixiviação dos metais alcalinos e alcalinos terrosos; a exposição do solo por longo tempo à ação das chuvas abundantes e de temperaturas elevadas, aliada às grossas texturas do substrato geológico, permite fácil drenagem da água de percolação, tornando o intemperismo mais intenso (Schubart *et al.*, 1984).

Dentre as principais classes de solos encontradas na Amazônia Legal, a grande dominância é dos Latossolos e Podzólicos distróficos que juntos representam cerca de 70% da região (Rodrigues, 1996).

Analisando os fatores limitantes ao uso agrícola dos solos como um todo para a Amazônia, diversos autores se referem à fertilidade natural e não às propriedades físicas. Problemas como a elevada acidez, deficiência de fósforo (P), baixa capacidade de troca catiônica, alto teor de alumínio trocável (Al^{+3}) e uma representativa deficiência de nitrogênio (N), potássio (K), Cálcio (Ca), magnésio (Mg), boro (B), cobre (Cu), zinco (Zn), podem ser tomados como os principais entraves edáficos para o cultivo na região (Hecht, 1985; Chauvel *et al.*, 1987; Sanchez *et al.*, 1987; Luizão *et al.* 2009).

Aproximadamente 90% dos solos amazônicos são deficientes em nitrogênio e fósforo. Essa deficiência natural é ainda mais elevada devido às práticas agrícolas neles cultivadas (Nicholaides *et al.*, 1983; EMBRAPA, 1990).

Apesar de todos os aspectos negativos conhecidos, a exuberância da floresta de terra firme é garantida por um mecanismo particular de

disponibilidade e retenção de nutrientes essenciais à sua manutenção, ao lado da existência das condições básicas de calor e umidade (Franken *et al.*, 1985). A elevada eficiência na reciclagem de nutrientes observada nas florestas tropicais tem sido correlacionada com a sua alta diversidade biológica; e a reciclagem de nutrientes se contrapõe à lixiviação dos solos, pois representa um mecanismo de conservação de nutrientes no ecossistema, promovendo, ao mesmo tempo, a produtividade biológica e o bom estado nutricional das plantas (Schubart *et al.*, 1984).

No sistema Amazônico, a dinâmica do aproveitamento dos nutrientes é mais intensa no período chuvoso, quando o aumento da umidade favorece as atividades da biota do solo no processo de mineralização da matéria orgânica acumulada durante o período de baixa precipitação. A estrutura macroscópica da floresta de terra firme está caracterizada por um fluxo lento de entrada - saída, e um fluxo rápido de reciclagem (Walker e Franken, 1983).

Considerando que a ciclagem de nutrientes assegura a manutenção da floresta de terra firme, a remoção das árvores e a substituição de floresta por pastagens ou outras atividades agrícolas leva à diminuição de nutrientes do compartimento biomassa, transferindo-os temporariamente ao solo (Ferreira *et al.*, 2006).

A fertilidade natural da maioria dos solos amazônicos diminui de forma acentuada quando é retirada sua cobertura vegetal e, portanto, torna-se necessário desenvolver sistemas agrícolas adequados que permitam melhorar sua recuperação, assim como desenvolver e utilizar tecnologias direcionadas aos fatores de produção (Pereira *et al.*, 2000).

A solução para a atividade agrícola nos solos de terra firme da Amazônia seria, então, a implantação de técnicas específicas, como o manejo adequado do solo, o cultivo de espécies pioneiras, a utilização de plantas fixadoras de nitrogênio, o uso de fertilizantes artificiais, incluindo os macro e micronutrientes Salati *et al.* (1998), além de associações simbióticas mutualísticas entre plantas e microrganismos benéficos do solo. A comunidade microbiana dos solos é a principal responsável pela decomposição dos resíduos orgânicos, pela ciclagem de nutrientes e pelo fluxo de energia dentro do solo, exercendo

influência tanto na transformação da matéria orgânica, quanto na estocagem do carbono e nutrientes minerais (Oliveira e Oliveira, 2003).

Para que os sistemas produtivos dos agricultores regionais sejam bem sucedidos, faz-se necessário mesclar técnicas de cultivos tradicionais aliadas a técnicas de baixo uso de insumos agrícolas. Dentro desse contexto, a utilização de microrganismos benéficos do solo voltada para o melhor aproveitamento dos nutrientes minerais pelas plantas é uma alternativa desejável. Entre esses organismos, alguns que se associam às raízes das plantas, como os fungos micorrízicos arbusculares, bactérias do gênero *Rhizobium*, entre outros, tornando as plantas menos dependentes de adubos químicos acarretando assim, uma economia destes insumos e ao mesmo tempo proporcionando uma maior produtividade dos solos (Oliveira e Oliveira, 2003).

3.2 Diversidade Microbiana dos Solos

Em microbiologia, o termo biodiversidade tem sido definido como o número de diferentes espécies em uma comunidade, para um ambiente específico. Do ponto de vista da ecologia molecular, biodiversidade pode ser definida como o número de seqüências de DNA divergentes presentes no DNA total extraído de uma comunidade, para um ambiente específico (Garbeva *et al.*, 2004).

No solo, a diversidade microbiota é extremamente elevada. Poucos ambientes fornecem tão grande variedade de microrganismos, como o solo. Bactérias, fungos, algas, protozoários e vírus formam a coleção microscópica que pode alcançar um total de bilhões de organismos por grama de solo. A diversidade de microrganismos é tão vasta quanto desconhecida. Um grama de solo pode conter 10 bilhões de microrganismos (Rosseló-Mora e Amann, 2001). Em estudo da análise da cinética de reassociação de DNA, foi estimado que em um grama de solo possa conter mais de 10.000 genomas diferentes (Torsvik *et al.*, 1998). Em estudo posterior a estimativa varia entre 2.000 a 18.000 genomas distintos.

O número de espécies microbianas identificadas cresce a cada ano, sendo descritos mais de 69.000 fungos, 30.000 protozoários, 40.000 algas, 4.700 bactérias e 5.000 vírus. Esses números são, no entanto, pequenos diante do total de espécies, estimado em cerca de treze milhões (Azevedo, 1998; Rosselló-Mora e Amman, 2001). Isso significa que foram descobertas e nomeadas até o presente momento, menos de 0,1% e no máximo 10% das espécies microbianas (Trüper, 1992; Rosselló-Mora e Amman, 2001). Alguns autores, como Pace *et.al.* (1986); Torsvik e Ovreas (2002) associam esta realidade a razão de que, até pouco tempo atrás, os microrganismos tinham que ser cultivados para serem identificados, além deste fator limitante, o tamanho microscópico dos microrganismos, a freqüência de ocorrência das populações, a sazonalidade, e em muitos casos, a dependência de hospedeiros e/ou substratos específicos para sua sobrevivência e multiplicação também podem ser consideradas relevantes limitações.

Esses organismos solo representam o repertório mais rico em diversidade química e molecular da natureza, constituindo a base de processos ecológicos, como os ciclos biogeoquímicos e a cadeia trófica, além de manter relações vitais com organismos superiores (Hunter-Cevera, 1998). De forma que, o estudo da diversidade microbiana nos solos é essencial para definir estratégias para preservação da biomassa e proporcionar parâmetros para desenvolver sistemas que indicam alterações ambientais, associadas geralmente, pela utilização não sustentável de solos agrícolas. Além destas aplicabilidades, a diversidade microbiana benéfica dos solos pode ser tomada como um suposto indicador da qualidade do solo.

O entendimento atual do conceito de qualidade do solo compreende o equilíbrio entre os condicionantes geológicos, hidrológicos, químicos, físicos e biológicos do solo (Bruggen e Semenov, 2000; Sposito e Zabel, 2003).

O conceito de qualidade do solo surgiu no final da década de 70, e durante os 10 anos seguintes esteve muito associado ao conceito de fertilidade. Acreditava-se, que um solo quimicamente rico era um solo com alta qualidade, isto porque tinha a capacidade de promover a produção agrícola. Entretanto, a percepção de qualidade do solo evoluiu, principalmente nos últimos 10 anos. E em um entendimento mais amplo, percebe-se que não

basta apenas o solo apresentar alta fertilidade, mas, também possuir boa estruturação e abrigar uma alta diversidade de microrganismos (Karlem *et al.*, 2003; Zilli *et al.*, 2003). Portanto, a diversidade microbiana tem figurado como importante indicador da qualidade do solo por estarem na base da cadeia trófica e intrinsecamente ligados aos diversos processos ecológicos do solo (Zilli *et al.*, 2003).

Devido à importância dos microrganismos do solo, muitos estudos têm sido realizados com o propósito de determinar os fatores que regulam as estruturas das comunidades microbianas ao longo de escalas temporais e espaciais, e ainda conhecer o impacto de diferentes espécies de plantas sobre a diversidade microbiana (Chiarini *et al.*, 1998; Smalla *et al.*, 2001; Ibekwe *et al.*, 2002; Kowalchuk *et al.*, 2002; Glayston *et al.*, 2004). Esta preocupação tem levado a um aumento no número de publicações de 1974 a 1999 (Morris *et al.*, 2002) que avaliaram principalmente os efeitos de diferentes propriedades dos solos sobre as comunidades microbianas. No entanto, nos últimos cinco anos o impacto das atividades humanas sobre a diversidade microbiana do solo e o impacto da biodiversidade nos processos do solo têm recebido atenção especial (Steenwerth *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2003; Buckley e Schmidt, 2003; Clegg *et al.*, 2003; Glayston, *et al.*, 2004; Jesus *et al.*, 2009; Navarrete *et al.*, 2010). Como resultado, o número de estudos abordando o impacto das práticas agrícolas e outros sistemas de uso da terra sobre a diversidade microbiana têm aumentado.

3.3 Diversidade Botânica na Amazônia

As plantas atingem uma extraordinária biodiversidade na Amazônia. Estima-se que a região abrigue cerca de quarenta mil espécies vasculares de plantas, das quais trinta mil são endêmicas à região (Mittermeier *et al.*, 2003). Considera-se que há na Amazônia um dos maiores estoques de espécies frutíferas tropicais mundiais, a maioria delas com frutos comestíveis (Calzavara, 1978; Clement *et al.*, 1982).

Dos grupos de espécies botânicas utilizadas por populações sedentárias na forma de quintais caseiros na Amazônia, o de maior expressão, ou pelo menos o de maior visibilidade, é o da categoria "perene" (Clement, 1999). Neste grupo se encaixam as árvores frutíferas comestíveis que incorporam à alimentação diferentes fontes de vitaminas, de suma importância ao metabolismo fisiológico humano, podendo também oferecer sombra e lazer, além de se enquadrarem no grupo das medicinais alternativas (MS, 2002; Madaleno, 2000).

Na região amazônica, as adaptações das populações humanas (tradicionais ou externas à região) em ambientes urbanos podem acarretar diferenças no uso destes recursos (Martins, 1998). Fatores como migração, por exemplo, incorporam uma bagagem cultural externa no uso dos recursos regionais, fazendo com que variedades não-existentes na localidade (exóticas) sejam incorporadas e/ou maximizadas aos hábitos locais. (Semedo e Barbosa, 2007).

Desta forma, para proporcionar o aproveitamento do potencial econômico destas espécies e incorporá-las definitivamente à lista de produtos comerciais, torna-se necessário ampliar os estudos aplicados para melhor produção e aproveitamento, com tecnologias ecológicas, econômicas e sociais. A aplicação de tecnologia com baixo uso de insumos agrícolas como a utilização de microrganismos benéficos do solo voltados para o melhor aproveitamento dos nutrientes pelas plantas é uma alternativa desejável.

3.3.1 Açaizeiro (*Euterpe precatoria* Mart.)

A família das palmeiras (Arecaceae), conhecida anteriormente como Palmae, é uma das maiores famílias vegetais do mundo e, pela forma e aspecto, é a mais característica da flora tropical (Hewood, 1993). As palmeiras dividem-se em 6 subfamílias, que apresentam 200 gêneros e 1500 espécies (Uhl e Dransfield, 1987; Kanh e Granville, 1992).

O gênero *Euterpe*, que congrega cerca de 28 espécies e ocorre nas Américas Central e do Sul, está distribuído por toda bacia Amazônica. As três

espécies que ocorrem com maior frequência são *oleraceae*, *edulis* e *precatória* (MMA, 1998).

Euterpe precatoria, de ocorrência natural apenas no estado do Amazonas, é conhecida popularmente como açaí, açaí de terra firme, açaí solitário (Bovi e Castro, 1993; Henderson, 1995). Está distribuída por toda a região Amazônica (Kahn e Granville, 1992), sendo uma das espécies mais difundidas e comuns da família e do gênero, nos Neotrópicos (Henderson, 1995).

O açaí é um produto muito consumido na região do estuário amazônico (Estados do Pará e Amapá). O Pará é o maior produtor nacional com colheita de 92 mil toneladas de frutos em 2005, o que representa 88% da produção brasileira. O único estado fora da região Norte que figura nas estatísticas oficiais é o Maranhão (IBGE, 2003). A maior parte da produção de açaí do Pará provém do extrativismo, porém um aumento da demanda tem provocado a passagem progressiva do extrativismo para a produção manejada em áreas enriquecidas com açaizeiros (Rogez, 2000).

O consumo de açaí (*E. precatoria*, *E. oleracea*, Mart.) faz parte da cultura alimentar das populações do Norte do Brasil. Com produção 90.512 t ano⁻¹ e consumo médio 2000 mil L dia⁻¹ o estado do Pará é reconhecido como o maior produtor e consumidor do açaí. O Amazonas é o quarto maior produtor com 1.134 t anos⁻¹, que corresponde aproximadamente 1% da produção nacional da polpa do fruto. Os principais municípios produtores são Itacoatiara, Manacapuru, Anamá, Anori, Codajás, Coari, Rio Preto da Eva e Presidente Figueiredo. O município de Codajás - AM é conhecido como a "A Terra do Açaí" devido aos grandes açaizais nativos e ao ótimo potencial produtivo. O município já foi o maior produtor, porém na safra de 2002 ele ocupou apenas o quarto lugar, com produção de 284 t do suco do fruto. Várias famílias dependem da coleta e beneficiamento do fruto durante o período da safra. Apenas a cooperativa mista de produtores de açaí e frutas tropicais agrega mais de 100 cooperados (Rogez, 2000; SUFRAMA, 2003; IBGE, 2003; Amazonas, 2006, SUFRAM, 2007).

Esta espécie tem alto potencial econômico, principalmente pelo seu fruto que é utilizado na preparação de sorvetes e sucos, e pelo palmito extraído de seus caules. As folhas são empregadas na cobertura de barracas provisórias e

fechamento de paredes. Na etnomedicina, a raiz e o talo da folha são usados contra dores musculares e picadas de cobra e a folha, para aliviar dores no peito (Henderson, 1995; Brian, 1988). A raiz também é utilizada no tratamento da malária e contra infecções hepáticas e renais (Kahn e Granville, 1992; Prance, 1975). A semente fornece um óleo verde escuro, usado popularmente como antidiarréico (Prance, 1975).

Estudos fitoquímicos e farmacológicos são bastante limitados neste gênero, sendo que dos frutos de *E. oleraceae* e *E. edulis* já foram isolados ácidos graxos, esteróides e antocianinas (Bobbio *et al.*, 2000; Harborne *et al.*, 1994). Da raiz de *E. precatória* foi descrito recentemente o isolamento do ácido *p*-hidroxibenzóico e da lignana, diidroiconiferil dibenzoato, tendo esta última, apresentado uma acentuada atividade anti-malária (Jensen *et al.*, 2002).

3.3.2 Pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth)

A pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth), da família Arecaceae (Palmae), pertence ao grupo das Bactrióideas, as quais tendem a formar touceiras com vários troncos ou estipes (planta principal e perfilhos). As plantas são eretas, podendo alcançar entre 15 até 25 metros de altura e mais de 20 a 30 cm de diâmetro. O tronco apresenta anéis ou nós que são as cicatrizes deixadas pela inserção da base da bainha das folhas e os entrenós apresentam espinhos pretos ou marrons pontiagudos de diferentes tamanhos, forma e densidade. Mora Urpí e Clement (1985); Chávez Flores (1987); Chávez Flores *et al.* (1990); Villachica (1996) informam que em Yurimaguas (Peru) existem populações de ecótipos que se caracterizam por serem inermes (desprovidos de espinhos).

A domesticação da pupunheira começou, provavelmente, devido ao interesse dos primeiros povos americanos na sua madeira (Patiño, 1989), sempre preferida para a fabricação de instrumentos de pesca, caça e guerra por sua flexibilidade e dureza. Os frutos das populações silvestres, ricos em óleos, oferecem uma importante fonte de energia, e poderia ter incentivado sua domesticação como fruteira (Clement *et al.*, 1989). Porém, não há dúvida de

que o resultado final do processo de domesticação da pupunha é a produção de frutos amiláceos (Mora Urpí *et al.*, 1997).

A pupunheira produz frutos comestíveis de sabor agradável e alto valor nutritivo, destacando-se elevados teores de caroteno, de proteína e de gordura. Essa espécie de palmeira produz, além dos frutos, palmito comestível de ótima qualidade. O potencial da pupunheira para a produção de palmito cultivado é considerado maior que o das palmáceas utilizadas para tal finalidade (Araújo, 1996).

A pupunheira apresenta cinco utilizações básicas: fruto cozido, óleo, farinha, ração animal e palmito (Bonaccini, 1997).

Quando cultivada em condições adequadas, apresenta rápido crescimento, produzindo palmito de boa qualidade e plantas com bom perfilhamento, o que confere caráter permanente de exploração à cultura (Ramos *et al.*, 2004).

De acordo com Mora Urpí *et al.* (1999), para a produção de palmito de pupunheira, a população de Yurimaguas (raça Pampa Hermosa), é a que se apresenta mais adequada pela inexistência de espinho no estipe e bainha, o que facilita o manejo da planta e a extração do palmito. Esta população possui, ainda, material promissor para programa de melhoramento, pois alguns atingem mais de 45 cm de comprimento do palmito (Yuyama *et al.*, 2002), que possibilita maior rendimento por estipe.

Yuyama *et al.* (2005) compararam a produção de palmito de pupunha e observaram maior massa média do estipe tenro e maior diâmetro de palmito em plantio com densidade de 3333 plantas ha⁻¹, comparativamente às densidades de 5000 e 10000 plantas ha⁻¹.

Comentando sobre potencial econômico, Araújo (2008), destaca que o mercado potencial da pupunheira como fruteira é grande, pois o fruto possui qualidades nutritivas, organolépticas e químicas que podem ser exploradas para criar novos produtos e mercados Clement, (2000); Clement e Mora Urpí, (1987), no entanto o mercado do fruto da pupunha está essencialmente limitado ao uso mais tradicional (consumo humano direto) (Yuyama *et al.*, 2003), pois até o momento nenhum empreendedor brasileiro tem-se esforçado para ampliar o mercado. Além do fruto, existe a demanda de mercado para

farinha seca, porém a taxa de custo/benefício é geralmente negativa (Clement, 2000).

Entretanto, Clement *et al.* (2001), reconhecem que atualmente, a exploração do palmito está captando o entusiasmo de produtores e empresários em muitas partes do Brasil e do exterior.

Utilizando Marcadores de RAPD, Rodriguez *et al.* (2004), confirmaram a hipótese de uma única origem para a pupunha no sudoeste da Amazônia, com duas rotas de migração: uma ao nordeste, chegando à raça Pará, e a outra ao noroeste ao longo dos Andes, espalhando-se na Amazônia ocidental (raças Pampa Hermosa e Putumayo) e atravessando os Andes, alcançando a América Central (raça *Utilis*).

3.3.3 Cupuaçu [*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.]

O cupuaçu é uma fruteira arbórea nativa da Amazônia Brasileira, sua distribuição geográfica originalmente restringia-se às áreas de floresta nativa ao sul do rio Amazonas, Oeste do rio Tapajós, incluindo o Sul e Sudeste do Estado do Pará e a região “pré-amazônica” do Estado do Maranhão. Trata-se de uma espécie pré-colombiana que, possivelmente, foi disseminada, de seu centro de origem, para todos os estados da região Norte, através da intensa movimentação das nações indígenas no interior da Amazônia (Clement, 1999).

Atualmente, o cupuaçu esta sendo cultivado, em pequena escala, em vários estados brasileiros, como Bahia, São Paulo e Paraná, mas também em outros países como Guiana, Martinica, Equador, São Tomé, Trindad, Gana e Costa Rica estão dando início a seu cultivo (Venturieri e Aguiar, 1998).

O cupuaçuzeiro é uma árvore que, em condições naturais, é retilínea, podendo atingir mais de 30 m de altura e perímetro de tronco superior a 100 cm. Nas áreas cultivadas sua altura varia de 6 a 10 m, porém, parte dos agricultores efetua a poda após o segundo fluxo de lançamentos, para forçar a emissão de ramos secundários e, com isso reduzir a altura da planta. O tronco possui coloração acinzentada com manchas brancas, o sistema radicular

apresenta grande proporção de raízes finas que se encontram próximas à superfície (Prance e Silva, 1975; Calzavara *et al.*, 1984; Cavalcante, 1991).

Os frutos são do tipo baga drupácea oblonga, elipsóide ou oboval, com as extremidades obtusas ou arredondadas (Prance e Silva, 1975; Calzavara *et al.*, 1984; Cavalcante, 1991). O endocarpo, parte comestível do fruto, tem coloração branco-amarelada, recobre as sementes e de sabor ácido e odor agradável (Calzavara *et al.*, 1984; Venturieri, 1993; Souza *et al.*, 1996).

O consumo dos frutos dificilmente é *in natura*, em virtude da sua alta acidez. Grande parte dos frutos é beneficiado em forma de bombons, balas, biscoitos, sorvetes, doces, compotas, sucos e polpas congeladas. As sementes, que representam cerca de 15% do peso do fruto, possuem aproximadamente 60% do seu peso seco, constituídas de uma fina gordura, de fácil digestibilidade composta principalmente, por ácidos oléicos e esteárico Vasconcelos *et al.* (1975), das quais pode ser obtido um produto muito similar ao chocolate oriundo do cacauzeiro (Souza *et al.*, 1996).

A utilização de sementes de cupuaçu como sucedâneo para o cacau, ainda não se tornou realidade, em virtude dos baixos preços para aquisição do cacau e a carência de tecnologias apropriadas para disponibilizar ao mercado um produto de melhor qualidade. Essa utilização parece ter mais chances, em curto prazo, na indústria de cosméticos, onde alguns produtos estão sendo ofertados ao mercado (Alves, 2002).

A produção do cupuaçu tem início no terceiro ano de cultivo, contudo é bastante irregular, com grande variação entre plantas e sendo ainda bastante sensível a variações das condições climáticas (Locatelli *et al.*, 2001; Reisdorff *et al.*, 2002). Em média, a produção de cupuaçuzeiros nativos é de 25 frutos/pé. Em condições de cultivo a variação de produção entre as plantas é muito mais pronunciada, estima-se em média 12 frutos/pé, esta variação é acentuada devido à desuniformidade do material genético e as diversas formas de manejo (Calzavara *et al.*, 1984).

Diversas pesquisas já foram realizadas sobre as características físicas e químicas do fruto do cupuaçu. O que se pode comprovar é que estas características são bastante variáveis. Venturieri (1993) e Carvalho *et al.* (1999) relatam estudos comparativos entre diferentes autores que realçam a

diversidade dos resultados disponíveis, decorrentes de características intrínsecas dos materiais e da falta de padronização das metodologias de avaliação e análise.

Rodrigues *et al.* (2009) obtiveram a biblioteca genômica (495 clones, 208 OTUs) de Latossolo sob o cultivo de cupuaçu na Região Amazônica, onde apresentaram predominância de microrganismos pertencentes ao Filo Acidobacteria (217 seqüências - 43,8% da biblioteca), seguido pelo Filo Proteobacteria (136 seqüências - 27,4%). Setenta e seis clones não se encaixaram em nenhum perfil depositado no GenBank ou no RDP II, o que pode implicar a possibilidade da existência de novos grupos bacterianos nos solos amazônicos.

3.4 Os três domínios Bacteria, Archaea e Eucarya

Em 1977, Carl Woese propôs que a classificação dos seres vivos fosse substituída por um esquema baseado em três Domínios: *Bacteria*, *Archaea* e *Eucarya*, sendo os dois primeiros exclusivamente microbianos e compostos por células procarióticas. O terceiro Domínio, o *Eucarya*, englobaria todos os organismos eucariotos, incluindo os microrganismos do grupo dos fungos e protozoários. Os genes que codificam para a formação do rRNA foram usados como base para estes estudos por serem essenciais para a sobrevivência de todos os organismos e altamente conservados em procariotos e eucariotos.

A árvore filogenética universal evidencia que o Domínio *Eucarya* não apresenta origem recente e que é tão antigo quanto às linhagens procarióticas (Figura 1). A árvore mostra também que a evolução inicial a partir do ancestral comum se deu inicialmente em duas direções, *Bacteria* versus *Archaea-Eucarya*. Mais tarde, *Archaea* e *Eucarya* divergiram e produziram duas linhagens principais. Portanto, *Archaea* e *Eucarya* são filogeneticamente mais relacionados entre si do que qualquer um destes Domínios com *Bacteria*.

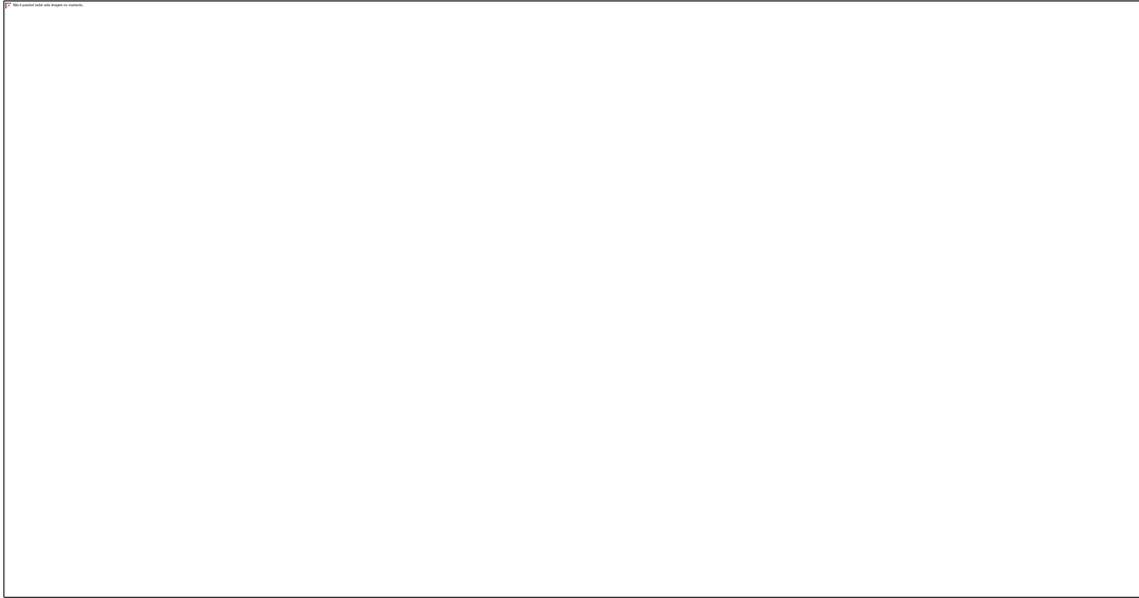


Figura 1 - Árvore filogenética universal inferida com base em análise comparativa de sequências de rRNA (adaptado de Woese, 1977 por Pommerville, 2004).

Segundo Pace (2006), os resultados de análises comparativas do enorme acúmulo de sequências gênicas testemunhado nas últimas décadas (primeiro de genes ribossomais e depois de muitos outros genes) indicam que é necessário rever o paradigma da diversidade e evolução biológica, e abandonar o modelo procarioto eucarioto. O argumento de Pace se baseia em filogenias estabelecidas usando os genes RNAr, assim como os genes responsáveis pelo funcionamento do genoma (que codificam a maquinaria necessária para expressar sequências gênicas), as quais são suportadas por evidências bioquímicas. A estrutura básica de 3 domínios nos mostra que ao invés de dois tipos de organismos, procariotos e eucariotos, há três: bactéria, eukarya (eucariotos) e archaea, sendo os dois últimos mais proximamente relacionados entre si do que qualquer um deles com bactéria. Não há um grupo filogenético único (monofilético) que se possa chamar de procarioto, e, portanto, o modelo procarioto eucarioto para diversidade e evolução biológica se tornou obsoleto.

Outro grande impacto do uso de sequências de DNAr como ferramenta na classificação microbiana se deu em estudos de diversidade de microrganismos a partir de amostras ambientais. A utilização de metodologias que independem do isolamento e cultivo de microrganismos levou a uma drástica mudança na

perspectiva da diversidade microbiana existente no ambiente. Diversos grupos de microrganismos nunca antes cultivados puderam ser detectados no ambiente por meio das seqüências de DNAr 16S e, através da comparação com seqüências depositadas em base de dados, observou-se que muitas delas pertenciam a organismos filogeneticamente não relacionados às divisões bacterianas existentes. Este impacto na visão da diversidade microbiana pode ser exemplificado pelo número de divisões existentes no Domínio Bactéria: em 1987 eram 12 divisões, todas elas descritas com base em organismos cultivados; já em 1998 o número de divisões publicado havia subido para 36 Hugenholtz *et al.* (1998), sendo 13 delas divisões candidatas, ou seja, sem representante cultivado e descrição formal. Um levantamento mais recente, realizado por Rappé e Giovannoni (2003) apontou como 53 o número de divisões dentro do Domínio Bactéria, sendo que aproximadamente 50% destas não possuem representantes cultivados (Keller e Zengler, 2004). Atualmente, o cultivo de representantes destas divisões é um dos grandes desafios para os taxonomistas.

Membros do Domínio Bactéria desempenham um importante papel nas atividades de decomposição, transformação de nutrientes e outros processos biogeoquímicos relacionados à manutenção da capacidade produtiva dos solos em diversos ambientes (Cury, 2006). Estima-se que é conhecido apenas 1% das bactérias presentes no solo, no entanto, esta porcentagem vem aumentando nos últimos anos em virtude do desenvolvimento de técnicas moleculares. Estudos empregando tais técnicas têm revelado que alguns grupos de Bactéria apresentam distribuição cosmopolita, ao passo que outros parecem estar restritos a ambientes particulares (Schlegel e Jannasch, 1992).

Recentemente têm sido constatadas mudanças significativas nas estruturas de comunidades bacterianas em solos da Amazônia Ocidental sob efeito antropogênico de desmatamento e uso da terra com cultivo agrícola tradicional e pastagem, revelando a sensibilidade de diferentes grupos bacterianos às mudanças nos sistemas de uso da terra (Jesus *et al.*, 2009, Navarrete *et al.*, 2010).

Filo Proteobacteria

"Proteobacteria" (do grego: Proteus, deus do oceano capaz de mudar de forma; + bakterion, pequeno bastão) é um filo composto por bactérias de coloração gram-negativas. Considerando a etimologia da palavra Proteobactéria este filo tem esse nome pela variedade de formas estruturais que assume de acordo com a espécie. E considerando o sequenciamento do rRNA 16S, as proteobactérias são classificadas em 5 grupos. Popularmente seus representantes são designados de proteobactérias (Madigan e Martinko, 2006) distribuídos em cinco classes: Alfaproteobacteria, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Epsilonproteobacteria e Gammaproteobacteria.

A primeira descrição do termo Proteobacteria por Stackebrandt, Murray e Truper, em 1988, referia o grupo como uma classe. Entretanto, na segunda edição do Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, o termo foi classificado como um filo. O filo "Proteobacteria" é um dos maiores filios do domínio Bacteria, incluindo mais de duzentos gêneros. Incluem uma grande variedade de agentes patogênicos, tais como Escherichia, Salmonella, Vibrio e Helicobacter outras são de vida livre, e incluem muitas das bactérias responsáveis pela fixação do nitrogênio. (Madigan e Martinko, 2006). Os microrganismos que fazem parte desse Filo possuem um metabolismo muito diversificado Margulis *et al.*, (1998), incluindo os autotróficos e os heterotróficos, aeróbios e anaeróbios. Pela elevada diversidade fisiológica, é o Filo predominante em ecossistemas que possuem uma grande variedade de condições ambientais para o estabelecimento de populações de procariotos.

No Amazonas, em estudo realizado em solos de Latossolo Amarelo, Rodrigues (2008) constituiu três bibliotecas genômicas, onde foram analisadas comunidades bacterianas sob o cultivo de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e camu-camu - (*Myrciaria dubia*), observando uma prevalência de bactérias das classes Acidobacteria, Betaproteobacteria e Alfaproteobacteria.

Alfaproteobactérias

As proteobactérias alfa incluem a maioria dos gêneros fototróficos, mas também vários gêneros que metabolizam componentes C1, simbioses de plantas (por exemplo, os rizóbios) e de animais e também um grupo de agentes patogênicos (Rickettsiaceae). Pensa-se que os precursores das mitocôndrias das células eucariotas originaram-se a partir deste grupo bacteriano (Madigan e Martinko, 2006).

Os microrganismos encontrados nessa classe são descritos principalmente no solo e em água doce, com poucos representantes marinhos (Cho e Giovannoni, 2003). Essa ordem possui 11 famílias Garrity *et al.* (2004) sendo o gênero *Bradyrhizobium* o mais conhecido e estudado, por ser uma bactéria fixadora de nitrogênio atmosférico quando associada a leguminosas. Algumas características do solo podem afetar a nodulação e a fixação do N₂ de leguminosas junto à vasta variedade de *Rizobium* tais como condições de baixa fertilidade do solo e elevadas doses de nitrogênio combinado, o efeito da rizosfera, tensão da água, pH, salinidade, temperatura, toxinas e predadores.

Na Amazônia, Chagas Junior *et al.* (2009), encontraram grande variabilidade genética de rizóbios isolados de nódulos de caupí, com a formação de oito grupos.

Betaproteobactérias

As proteobactérias beta incluem vários grupos de bactérias aeróbias ou facultativas que são versáteis nas suas capacidades de degradação, mas também contém gêneros quimiolitotróficos (por exemplo, o gênero *Nitrosomonas* que oxida o amoníaco) e alguns fototróficos (gêneros *Rhodocyclus* e *Rubrivivax*). As proteobactérias beta desempenham um papel importante na fixação de azoto em vários tipos de plantas, oxidando a amônia para produzir nitrito, um produto químico importante para a função das plantas. Muitas delas encontram-se em amostras ambientais, tais como águas residuais ou no solo. Espécies patogênicas dentro desta classe são as Neisseriaceae (que causam a gonorreia e a meningoencefalite) e as espécies do gênero *Burkholderia*, com amplo potencial agrícola e biotecnológico, promotoras de crescimento em plantas com fixação biológica de nitrogênio, além de

produtoras de biopolímeros (Yabuuchi, 1997), possui também um papel importante na biodegradação de compostos naturais, sendo capaz de utilizar uma grande variedade de substratos (Freitag e Prosser, 2004). Outra bactéria que se destaca neste grupo é a *Ralstonia*, agente causal da murcha bacteriana em solanáceas e Moko em bananeiras, sendo um fator limitante dessas culturas no Amazonas (Coelho Netto *et al.*, 2004).

Gammaproteobactérias

São encontradas em grande frequência em solos, e estão distribuídas em 13 Ordens (Garrity e Holt, 2001). As proteobactérias gama incluem vários grupos de bactérias importantes para a ciência e para a medicina, tais como as Enterobacteriaceae, Vibrionaceae e Pseudomonadaceae. Este grupo inclui vários agentes patogênicos importantes, como por exemplo, *Salmonella* (enterite e febre tifóide), *Yersinia* (peste), *Vibrio* (cólera), *Pseudomonas aeruginosa* (infecções pulmonares em pacientes hospitalizados ou com fibrose cística).

3.5 Técnicas moleculares para estudo de comunidades microbianas em amostras ambientais

Pela complexidade da população de microrganismos, métodos convencionais que usam meios de culturas seletivos são limitados, pois uma pequena fração dos organismos pode ser isolada e assim estudada. Além disso, os microrganismos que conseguem crescer em meios artificiais não são necessariamente metabólica ou numericamente dominantes no meio natural de onde foram retirados (Muyzer e Ramsing, 1995).

A necessidade de métodos mais eficientes, capazes de caracterizar a diversidade de microrganismos é, portanto, imperativa para melhor compreender os processos de decomposição da matéria orgânica e reciclagem de nutrientes. A partir do início da década de 90, com o desenvolvimento dos métodos moleculares para a análise de microrganismos a partir de amostras de

DNA ambiental Ward *et al.* (1992), abriram-se novas perspectivas de pesquisa. A utilização de tais métodos tem resultado num melhor conhecimento da sucessão microbiana, dos diferentes níveis tróficos relacionados com a decomposição da matéria orgânica e a importância relativa de componentes nas suas múltiplas funções e nos seus *habitats* naturais (Peters *et al.*, 2000).

Um grande avanço nos estudos de ecologia microbiana foi dado com o advento de técnicas moleculares, baseadas na análise do DNA de microrganismos retirado diretamente dos ambientes naturais, sem a necessidade de multiplicação prévia das células (Benlloch *et al.*, 1995). O uso de ferramentas moleculares tem sido cada vez mais aplicado na área de agronomia/Ciência do solo. Somando aos métodos tradicionais, essas ferramentas têm permitido uma nova abordagem científica nos estudos de microbiologia do solo, possibilitando assim um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos (Xavier *et al.*, 2004).

As técnicas moleculares mais bem sucedidas e amplamente utilizadas tem sido baseadas no uso do gene 16S do RNA ribossômico ou o gene 16S rRNA , no caso de procariontes e o 18S rRNA para o caso de eucariotes. A importância da utilização deste gene para a Ecologia Molecular foi revista por Macrae (2000) mostrando o histórico do desenvolvimento e a aplicação dos métodos baseados no 16S rRNA, que possibilitem a identificação do relacionamento filogenético entre todos os seres vivos por sua distribuição universal, conservação de sua estrutura e função, seu tamanho e a presença de seqüências divergentes. Os dados gerados possibilitam a caracterização da estrutura fundamental da microbiota presente em uma determinada amostra, permitindo a identificação de espécies predominantes, que podem ser utilizadas como indicadores de funcionalidade e equilíbrio. Segundo Schwieger e Tebbe (2000), métodos baseados na caracterização do DNA total extraído de uma comunidade microbiana são bastante confiáveis na identificação de bactérias isoladas, além de apresentarem resultados mais rapidamente do que os métodos fenotípicos convencionais.

O primeiro estudo a ser publicado sobre a diversidade bacteriana utilizando apenas ferramentas moleculares em solos da Amazônia foi realizado por (Bornemann e Triplett, 1997). Nesse estudo, foram obtidos 100 clones por

meio da amplificação do gene 16S rRNA. O conceito de clonagem de DNA extraído diretamente do ambiente natural, independentemente do cultivo prévio, foi sugerido inicialmente por Pace *et al.* (1986), porém somente após cinco anos foi executado por (Schmidt *et al.*, 1991). Em seu trabalho, foi realizado a partir da extração do DNA total da comunidade bacteriana, a construção de uma biblioteca de DNA em bacteriófago lambda, seleção por hibridação com uma seqüência específica de 16S rRNA, determinação das seqüências dos clones contendo o gene e análise comparativa das seqüências encontradas.

Os métodos avançados de biologia molecular para seqüenciamento quando comparados com os tradicionais de cultivo de isolados em meios de cultura, mostram-se com larga vantagem, uma vez que grande parte das bactérias presentes em amostras ambientais não são cultiváveis ou são difíceis de cultivar (Rondon *et al.*, 2000). Em seus estudos sobre a diversidade genética de organismos não cultiváveis de fontes termais, ambientes marinhos e ambientes terrestres, Hugenholtz *et al.* (1998) observaram que a maior parte das seqüências obtidas e analisadas pertencia a microrganismos que não apresentavam relação com microrganismos cultiváveis já seqüenciados e pertencentes a banco de dados públicos. Um outro exemplo é o trabalho publicado por Venter *et al.* (2004), onde foi constatado que das 1400 espécies de bactérias, reveladas a partir de amostras de DNA extraídas de Mar de Sargasso, aproximadamente 150 destas eram desconhecidas. Um estudo com grande impacto, quando analisado à ocorrência de seqüências desconhecidas, foi o realizado por Lambais *et al.* (2006) sobre a diversidade bacteriana na filosfera de árvores da Floresta Atlântica onde 97% do total de 428 genes 16S rRNA seqüenciados pertenciam às espécies desconhecidas.

A avaliação dos impactos antrópicos sobre as comunidades microbianas tem tradicionalmente dependido das técnicas de isolamento e cultivo. No entanto, uma pequena fração dos organismos na natureza, menos de 1%, podem ser cultivados usando técnicas microbiológicas de rotina (Malik *et al.*, 2008).

O estudo de complexas comunidades microbianas tem sido ampliado por meio do desenvolvimento de técnicas de análises de ácidos nucleicos,

permitindo análises a nível genético. A análise do DNA fornece informação sobre a composição de espécies ou estruturas de comunidades. Embora, a princípio, qualquer gene possa ser usado nas análises, o gene 16S rRNA em procariotos e o 18S rRNA em eucariotos são os mais utilizados como moléculas marcadoras para este propósito, uma vez que estão presentes em todos os organismos; apresentam regiões conservadas e regiões variadas, o que torna possível o desenho de *primers* e sondas com diferentes níveis de especificidade; têm informação de sequência suficiente para inferência filogenética; e estão presentes em grande número de células, o que facilita sua detecção. Além disso, cerca de 800.000 sequências estão disponíveis atualmente em bases de dados de livre acesso, tais como *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), *RDP* (<http://rdp.cme.msu.edu/html>) e *Greengenes* (<http://greengenes.lbl.gov>).

Neste sentido, técnicas de *fingerprinting* são utilizadas a fim de se obter uma visão global da estrutura genética da comunidade microbiana. A aplicação destas técnicas em estudos de ecologia microbiana vem sendo amplamente disseminada nos últimos anos, uma vez que constituem metodologias rápidas e relativamente fáceis de operacionalizar, permitindo a análise simultânea de múltiplas amostras ambientais. Dentre estas técnicas estão ARDRA (“*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*”), DGGE (“*Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis*”), RISA (“*Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*”), ARISA (“*Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*”) e T-RFLP (“*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*”). Estas técnicas para análise de ácidos nucleicos têm sido desenvolvidas mediante variações no método básico de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizado com acuidade no diagnóstico, quantificação, caracterização e identificação de microrganismos e atividade dos mesmos. Em genética de populações e ecologia microbiana, a PCR gera dados para estudos da distribuição natural de membros dos Domínios *Bacteria*, *Archaea* e *Eucarya*.

O uso das técnicas moleculares vem oferecendo uma oportunidade única e inovadora para se estudar comunidade microbianas *in situ*, sem a necessidade de isolamento e cultivo. Entretanto, nenhuma destas técnicas isoladamente é capaz de gerar dados abrangentes ou conclusivos sobre uma

comunidade microbiana em particular. Além das limitações técnicas, o uso do rRNA como marcador molecular pode limitar a tarefa de descrever a diversidade microbiana. Esta molécula pode ser, em alguns casos, muito conservada para revelar diferenças entre microrganismos evolutivamente relacionados, mas ecologicamente diferentes. Apenas uma aplicação combinada de diferentes métodos de biologia molecular, aliada ao uso de técnicas clássicas de isolamento e cultivo de microrganismos em cultura pura, será capaz de revelar de maneira mais precisa a dimensão da diversidade microbiana na natureza.

3.5.1 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

A técnica de DGGE é uma metodologia que permite a separação de fragmentos de DNA com o mesmo tamanho, porém com seqüência de nucleotídeos diferentes, baseada na mobilidade eletroforética de uma molécula de DNA parcialmente desnaturada em géis de poliacrilamida com gradiente crescente de agente desnaturante. À medida que fragmentos de DNA se movem através do gel de poliacrilamida, contendo um gradiente crescente de desnaturantes, uréia e formamida, pequenas regiões denominadas domínios de desnaturação sofrem uma dissociação das fitas que compõem a dupla hélice, gerando moléculas parcialmente desnaturadas com mobilidade eletroforética retardada. Estas moléculas de DNA continuam a se mover vagarosamente através das concentrações mais altas de desnaturantes e, desse modo, domínios de desnaturação adicionais sofrem dissociação das fitas. Variações na composição de bases dentro destes domínios alteram o seu comportamento de desnaturação, caracterizando diferenciações no padrão de eletroforese no gel gradiente desnaturante. Entretanto, quando o último domínio, ou o mais estável, sofre desnaturação, o fragmento tem suas fitas completamente dissociadas e o poder de resolução do gel é perdido. Para contornar este problema, uma seqüência de DNA rica em GC (cerca de 40-45 bases) é acoplada à extremidade 5' do *forward primer*, no caso de fragmento amplificado por PCR. Desta maneira, o fragmento inteiro desnatura como um

domínio único e pára de migrar quando encontra seu T_m (*melting temperature*) no gel, enquanto a seqüência rica em GC permanece na configuração duplex, impedindo a completa separação das duas fitas da molécula (Myers *et al.*, 1985).

Na década de 90, a técnica de DGGE foi introduzida no campo da ecologia molecular microbiana, aliada à extração direta de DNA da comunidade. Os produtos de PCR obtidos com vários conjuntos de *primers* que se anelam às regiões conservadas do gene 16S rRNA em procariotos e 18S rRNA em eucariotos, e abrangem uma ou até três regiões variáveis, têm sido separados por DGGE, revelando a complexidade de comunidades microbianas.

Entretanto, muitas vezes, a molécula de rRNA não oferece variação suficiente para diferenciar linhagens dentro de espécies. A análise de seqüências intergênicas espaçadoras (IGS) entre a menor e a maior subunidade do gene rRNA pode gerar maior variabilidade a fim de investigar organismos em nível intra-específico (Gürtler e Stanisich, 1996). O uso de *primers* específicos para a região espaçadora oferece uma vantagem sobre o uso de *primers* para a região 16S do gene rRNA no caso de espécies de rizóbios, uma vez que esta molécula não apresenta muita variação dentro deste táxon (Vallaeyes *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2006).

O uso de DGGE vem sendo disseminado nos últimos anos, demonstrando seu valor não apenas na caracterização de comunidades microbianas, como também para inferir afiliação filogenética dos membros da comunidade, testar a pureza de linhagens bacterianas, monitorar o isolamento de bactérias a partir de amostras ambientais, ou estudar a dinâmica de populações específicas em função de variações ambientais ou das condições operacionais de um sistema (Muyzer *et al.*, 1993; Heuer *et al.*, 1997; Nogueira *et al.*, 2006; Peixoto *et al.*, 2006).

Dentro desse contexto, vale ressaltar a importância do conhecimento da comunidade bacteriana presente em solos tropicais da Amazônia Central. O levantamento ecológico por meio de técnicas moleculares e a aplicação dessas comunidades são desconhecidos até o presente momento. Estudos com os solos sob o cultivo de espécies frutíferas da Amazônia começam a ser realizados (Rodrigues, 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA-USP, Piracicaba/SP, por meio do Programa CAPES – PROCAD 143/2007 intitulado Manejo Sustentável, Conservação da Biodiversidade e Produção Agrícola em Solos Tropicais Degradados: Uma Cooperação Acadêmico-Científica entre os Programas de PG do CENA-USP, UFMT-MT e INPA-AM.

4.1 Área de Estudo

Foram escolhidas duas propriedades rurais no Ramal da Morena, Estrada de Balbina, no Município de Presidente Figueiredo, AM. A primeira em solo de Terra Preta situada no Km 18 Sítio Felix (proprietário Felix Costa Borges), coordenada geográfica S 020213.9 W 592451.8, a segunda em solo de Latossolo Amarelo no Km 22, Sítio Dona Maria (proprietária Maria Ferreira de Oliveira), coordenada geográfica S 020356.1 W 592252.6.

Nas duas propriedades o sistema agrícola é o de pomar caseiro, que são sistemas agrícolas nos quais árvores, arbustos e ervas de interesse são cultivados próximos às casas; servindo de alimento, renda e uma série de produtos e benefícios para os agricultores que os mantêm (Kumar e Nair, 2004, citado por Clement *et al*, 2009). Na Amazônia, os pomares são uma importante forma de agricultura tradicional, pois podem produzir continuamente durante dezenas de anos (Van Leeuwen e Gomes, 1995, citado por Clement *et al*, 2009). São praticados o uso de “tecnologias suaves” (termo definido por Hecht e Posey, 1989, citado por Clement *et al*, 2009) como fertilizantes orgânicos, aditivos inorgânicos, cobertura vegetal do solo, fogo controlado, e controle de pragas e invasores (Woods e McCann, 1999, citado por Clement *et al*, 2009).

No pomar caseiro foram escolhidas três fruteiras cultivadas em ambas as propriedades: açaí (*Euterpe precatoria* Mart.), pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth.) e cupuaçu [*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.]. As

fruteiras estão dispostas em grupos de 15 a 20 indivíduos, em fase adulta com aproximadamente 8 anos de cultivo. (Fig. 2)



Figura 2 - Vista do “pomar caseiro” em área de Latossolo Amarelo.

O clima da região é classificado como Afi, tropical úmido, de acordo com a classificação de Köppen. A umidade relativa do ar é bastante elevada em toda a região, em torno de 80%. O solo predominante na área é o Latossolo Amarelo de textura argilosa.

4.2 Coleta de dados

A coleta de solos foi realizada no dia 28 de maio de 2009, em ambas as propriedades foram escolhidas seis plantas/cultura. Foram coletados solos em três pontos ao redor de cada planta e depois homogeneizando esses solos para compor uma amostra. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com fatorial 2 x 3, com 6 repetições. Sendo dois ambientes (Terra Preta e Latossolo Amarelo), sob o cultivo de três fruteiras (açai, pupunha e

cupuaçu) com seis repetições para cada fruteira em cada ambiente, constituindo 18 amostras em cada propriedade, totalizando 36 amostras coletadas.

A mesma técnica foi utilizada para as duas propriedades. Com o terçado foi realizada a limpeza da saia das plantas, depois, com o auxílio de pequenas pás de jardim foram retiradas três amostras de solo deformado (com estrutura não preservada) a 0-10 cm de profundidade, na área da copa de' cada planta, higienizando previamente as pás e terçado com álcool etílico hidratado a 98,2%. (Fig. 3)

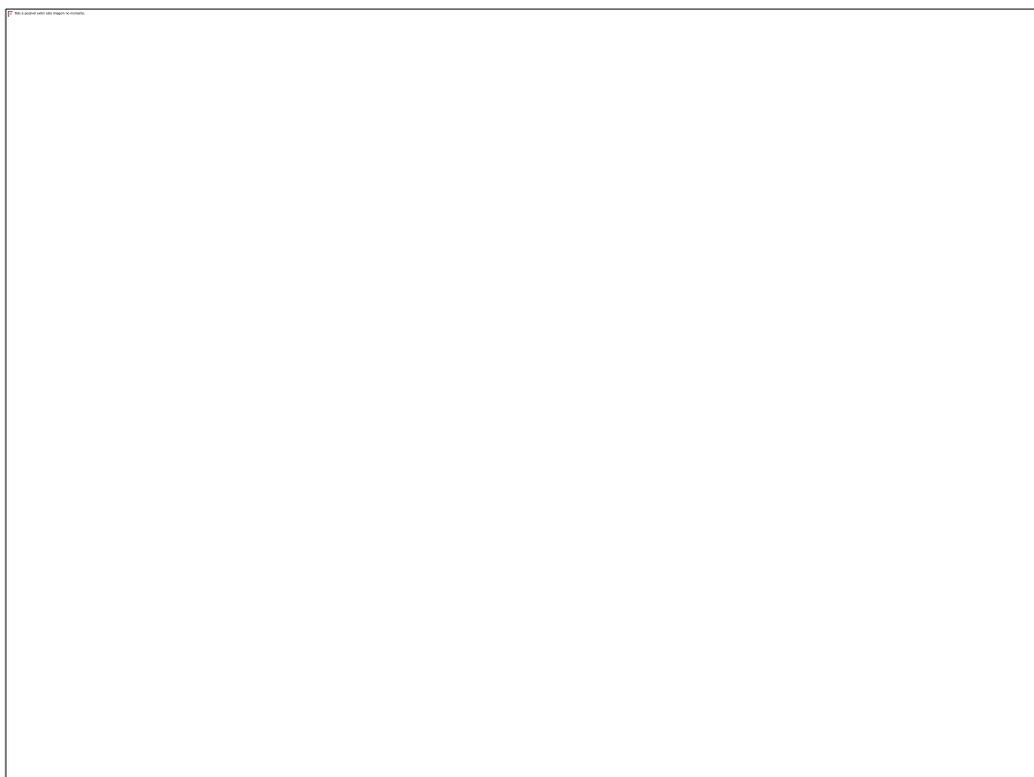


Figura 3. Coleta de solos sob cultivo de pupunheira, em área de Terra Preta.

Após as coletas, as amostras, com aproximadamente 500g, foram colocadas em sacos plásticos transparentes identificados e em seguida acondicionados em caixa de isopor com gelo seco, para manter sua umidade durante o transporte (Anderson e Ingram, 1993). As amostras foram transportadas do campo sob gelo seco até a Coordenação de Pesquisas em

Ciências Agronômicas – CPCA do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, preservadas em gelo seco e enviadas (28/05/2009) pelos correios, via Sedex 10, para o Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura CENA-USP, em Piracicaba-SP, onde ficaram armazenadas em temperatura de - 80°C por cinco dias até o processamento para a extração do DNA total, que foi realizado no dia 02 de junho de 2009.

Do total de solo coletado em cada ponto amostral, apenas uma sub-amostra com cerca de 0,25 g foi utilizada para análise microbiológica. Cerca de 400g foi encaminhada para análise química e o solo restante de cada amostra ficou armazenado a -80° C.

Cada amostra de solo destinada à análise microbiológica foi deformada, homogeneizada em saco plástico e espalhada sobre folha de alumínio. Uma amostra de 0,25 g de solo foi coletada e transferida para microtubo a fim de proceder a extração do DNA total do solo. O DNA total foi extraído para cada amostra.

4.2.1 Análise química de solos

A caracterização química dos solos (análises de macro e micronutrientes) foi realizada no Laboratório de Análises Químicas do Departamento de Ciência do Solo da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/ Universidade de São Paulo – USP.

Os atributos químicos analisados foram: pH, matéria orgânica (MO), P disponível, N total, S, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ trocáveis, Al, soma de bases (SB), T, índice de saturação por bases (V), saturação por alumínio e os micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn e Zn). Os resultados das análises de solos constam no Anexo (Anexo 1-3).

4.2.2 Extração do DNA total do solo

Para a extração do DNA total do solo foi utilizado o *Kit Power Soil DNA Extraction™* (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA). Brevemente, 0,25 g de solo

foi adicionado em microtubos contendo granada finamente moída e as células foram lisadas por agitação horizontal a 4 ms^{-1} por 5 segundos (agitador de tubos modelo MA 162, Marconi). Após a lise celular, o DNA total do solo foi extraído de acordo com as instruções do fabricante. O DNA purificado foi quantificado por comparação com padrão de massa após eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) corado com brometo de etídeo em tampão TSB (Brodie *et al.* 2003). Como padrão de tamanho e quantidade de DNA foi utilizado o marcador de massa *DNA Mass Ladder* (Invitrogen) e para verificar a integridade da molécula empregou-se *NotI* (Invitrogen).

4.2.3 PCR-DGGE

Reações de PCR para uso em DGGE foram realizadas em termociclador (modelo GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) seguindo as condições estabelecidas nos respectivos trabalhos de referência dos *primers*, com pequenas alterações quando necessário (Tabela 1). Todas as reações de amplificação para uso em DGGE foram preparadas para um volume final de 25 μL , usando 2.5 μL de tampão para PCR 10 X, 1.25 mM MgCl_2 , 0.5 mM de cada dNTP, 5 pmoles de cada *primer*, 1 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen) conforme especificado na Tabela 1.

A verificação do tamanho dos *amplicons* resultantes de cada reação foi realizada por comparação com o marcador molecular *Low DNA Mass ladder* (Invitrogen) e padrão de tamanho de DNA 100 pb (Invitrogen) após corrida eletroforética a 90 V por 30 minutos em gel de agarose 1%, usando tampão TSB (Brody e Kern, 2004). Os géis foram fotodocumentados pelo programa *Kodak digital science 1D* (Scientific Imaging Systems).

4.2.3.1 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante – DGGE

As discriminações dos produtos de PCR foram feitas em diferentes géis de DGGE, combinando os perfis das comunidades de um mesmo grupo microbiano presentes nos solos sob os diferentes usos da terra analisados, comparativamente, da seguinte forma: Terra Preta vs. Latossolo Amarelo vs.

cultivo açaí, cupuaçu e pupunha. Os conjuntos de dados obtidos (presença/ausência de bandas) para cada grupo bacteriano (Alfa, Beta e Gammaproteobacteria) foram analisados por Análise de agrupamento hierárquico, Análise de Componentes Principais, Análise de Similaridade – ANOSIM e Análise de escalonamento multidimensional não-métrico – NMDS.

Análises de DGGE foram realizadas usando o sistema phorU2 (Ingeny, Leiden, The Netherlands). Foi utilizado solução tampão 0,5 X de TAE (10 mM de Tris-acetato e 0,5 mM de EDTA, pH 8,0), solução desnaturante 80% (7 M de uréia e 40% de formamida) e solução 0%, sem uréia e formamida, nas condições apresentadas na Tabela 2. As metodologias tiveram como base os trabalhos referenciados nesta mesma tabela, com adaptações quando necessário.

Após a eletroforese, os géis foram corados com nitrato de prata (0,2%) e digitalizados em *ImageScanner* Modelo-PowerLook 1120 USG (Amersham Biosciences). A plataforma de *software* do *BioNumerics* versão 5.1 (Applied Maths NV, Belgium) foi utilizada para analisar os perfis de DGGE. A tolerância com respeito ao posicionamento das bandas foi de 0,8%. Análises de agrupamento hierárquico foram feitas usando o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages*) e a correlação foi calculada usando o coeficiente de similaridade de *Jaccard*.

A consistência dos agrupamentos foi avaliada pelos valores de correlação cofenética. Análises multivariadas de ordenação (Análise de Componentes Principais e Análise de escalonamento multidimensional não-métrico - NMDS) foram feitas usando a mesma plataforma de *software* do *BioNumerics* e os pacotes do *CANOCO for Windows 4.5* (Biometris, Wageningen, Holanda), respectivamente. Os dados de presença e ausência de bandas foram ordenados e analisados com os atributos químicos dos solos usando o método NMDS.

Tabela 1 – Sequências iniciadoras utilizadas nas reações de PCR-DGGE, programas no termociclador e variações no preparo das reações.

Código Primer	Especificidade e <i>rrn</i> operon	Sequência (5' → 3')	Referência	Conjunto de primers	Programa termociclador/variações no preparo das reações (25 µL)
203f	<i>α-proteobacterias</i>	GGATGAGCCCGCGGCCTA	Gomes <i>et al.</i> , 2001	<i>α</i> 203f/1492r	94 °C 4 min; 10 ciclos “touch down” ^{***} + 25 ciclos: 94 °C 1 min, 65 a 56 °C 1 min, 72 °C 2 min ; 72 °C 10 min/2.5 µL 10 x buffer , 1.25 mM MgCl ₂ , 0.5 mM dNTP, 0.25 µL Formamida, 0.25 µL BSA, 1.0 mM primers, 10 ng/µL DNA, 2.0 U Taq DNA Polimerase.
1492r	<i>Bacteria</i> , 16S	TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT	Heuer <i>et al.</i> , 1997		
<i>β</i> 984f	<i>β-proteobacterias</i>	CGCACAAAGCGGTGGATGA	Gomes <i>et al.</i> , 2001	<i>β</i> 984f/1378r	94 °C 4 min; 10 ciclos “touch down” ^{***} + 25 ciclos: 94 °C 1 min, 65 a 56 °C 1 min, 72 °C 2 min ; 72 °C 10 min/2.5 µL 10 x buffer , 1.25 mM MgCl ₂ , 0.5 mM dNTP, 0.25 µL Formamida, 0.25 µL BSA, 1.0 mM primers, 10 ng/µL DNA, 2.0 U Taq DNA Polimerase.
395f	<i>γ-proteobacterias</i>	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG	Mühling <i>et al.</i> , 2008	<i>γ</i> 395f/871r	
871r	<i>Bacteria</i> , 16S	ACTCCCCAGGCGGTCDACTTA	Mühling <i>et al.</i> , 2008		
f984GC	<i>α-proteobacterias</i>	gc. AACGCGAAGAACCTTAC	Heuer <i>et al.</i> , 1997	f984GC/1378r	
1378r	<i>α e β - proteobacterias</i>	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG	Heuer <i>et al.</i> , 1997		94 °C 4 min; 10 ciclos “touch down” ^{***} + 25 ciclos: 94 °C 1 min, 65 a 56 °C 1 min, 72 °C 2 min ; 72 °C 10 min/2.5 µL 10 x buffer , 1.25 mM MgCl ₂ , 0.5 mM dNTP, 0.25 µL Formamida, 0.25 µL BSA, 1.0 mM primers, 10 ng/µL amplicons, 2.0 U Taq DNA Polimerase.
f518GC	<i>γ-proteobacterias</i>	gc.-AACGCGAAGAACCTTAC	Heuer <i>et al.</i> , 1997	f518GC/785r	
785r	<i>γ-proteobacterias</i>	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG	Heuer <i>et al.</i> , 1997		
gc.		CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGG CGGGGGCA	Heuer <i>et al.</i> , 1997		

*f – forward primer, r – reverse primer, gc. – sequência rica em G+C inserida na extremidade 5'.

** “touch down” – 10 ciclos decrescentes da fase de ligação, iniciando de 65 e terminando em 56 °C.

Tabela 2 - Condições de eletroforese em gel com gradiente desnaturante que serão utilizadas para análise de fragmentos parciais SSU rDNA de diferentes tamanhos.

PCR	Tamanho produto (pb)*	Gradiente desnaturante (%)	Gel poliacrilamida (%)	Eletroforese	Referência
F984-GC/R1378 ^{a,b}	394	40 - 65	6	16 h a 100 V e 60° C	Heuer <i>et al.</i> , 1997
F518-GC/R785 ^c	267	40 - 65	6	16 h a 100 V e 60° C	Heuer <i>et al.</i> , 1997

^a*Alfaproteobacteria* ^b*Betaproteobacteria* e ^c*Gammaproteobacteria*

*Tamanho dos produtos de amplificação discriminados por DGGE.

Análises de similaridade (ANOSIM) foram feitas com o programa *Primer5 for Windows* versão 5.2.6 (Plymouth Marine Laboratory, Primer-E, Reino Unido) e a riqueza de *amplicons* foi analisada com o *software Statistica* versão 6.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA), e no Excel utilizando ANOVA e Teste de Tukey quando necessário. As ANOSIM foram realizadas com os conjuntos de dados gerados por DGGE a fim de testar o efeito dos diferentes solos (Terra Preta e Latossolo Amarelo) e das culturas (açai, pupunha e cupuaçu) nas estruturas de comunidades dos diferentes grupos microbianos estudados (Alfa, Beta e Gammaproteobacteria). A matriz de distância foi construída sem transformação dos dados e empregando *Bray-Curtis* (Legendre e Legendre, 1998) como medida de distância.

Foram aplicados testes não-paramétricos Chao2 e Jackknife2, que são inferências para análise de fatorial relacionada à significância estatística, para estimar a riqueza das estruturas de comunidades de bactérias dos filos Alfa, Beta e Gammaproteobacterias, sob os diferentes cultivos em solos de Terra Preta e Latossolo Amarelo. A estimativa de riqueza foi baseada nas bandas raras ou únicas presentes no DGGE. O programa utilizado foi o CANOCO 4.5 (Ter Braak e Smilauer, 2002).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Análises de solos

Os atributos químicos analisados foram: pH, matéria orgânica (MO), P disponível, S, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ trocáveis, Al, acidez potencial (H + Al), soma de bases (SB), T = (SB + (H+Al)), saturação por bases (V), saturação por alumínio (m), os micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn e Zn) e N total (Anexo, 1-3).

As análises químicas mostraram semelhanças nos ambientes de Terra Preta e Latossolo Amarelo, sendo considerada, para esse estudo, a primeira propriedade em solos de Terra Preta Contemporânea e a segunda em solos de Latossolo Amarelo.

5.1 Análises dos padrões de bandas gerados por DGGE e estatísticas

As discriminações dos produtos de PCR foram feitas em diferentes géis de DGGE, combinando os perfis das comunidades de um mesmo grupo microbiano presentes nos solos sob os diferentes usos da terra analisados, comparativamente, da seguinte forma: Terra Preta vs. Latossolo Amarelo vs. Culturas cultivadas (açai, pupunha e cupuaçu). Foram obtidos três conjuntos de dados (presença/ausência de bandas) para cada solo e grupo microbiano estudado (Alfa, Beta e Gammaproteobacteria). Baseado nestes conjuntos de dados, foram realizadas as análises de agrupamentos hierárquicos, dos componentes principais, ANOSIM e, NMDS.

A classificação feita por método hierárquico permitiu a construção de dendrogramas elucidativos contendo a sequência em que ocorreram divisões ou uniões dos diferentes perfis das comunidades microbianas revelados por DGGE. A heterogeneidade destes perfis está representada pela posição dos seus nós na linha base de similaridade (Figuras 4, 5 e 6). A distorção na matriz original dos dados foi quantificada pelo coeficiente de correlação cofenética, o qual expressou valores que garantem confiabilidade à interpretação dos agrupamentos gerados pelo método de ligação UPGMA.

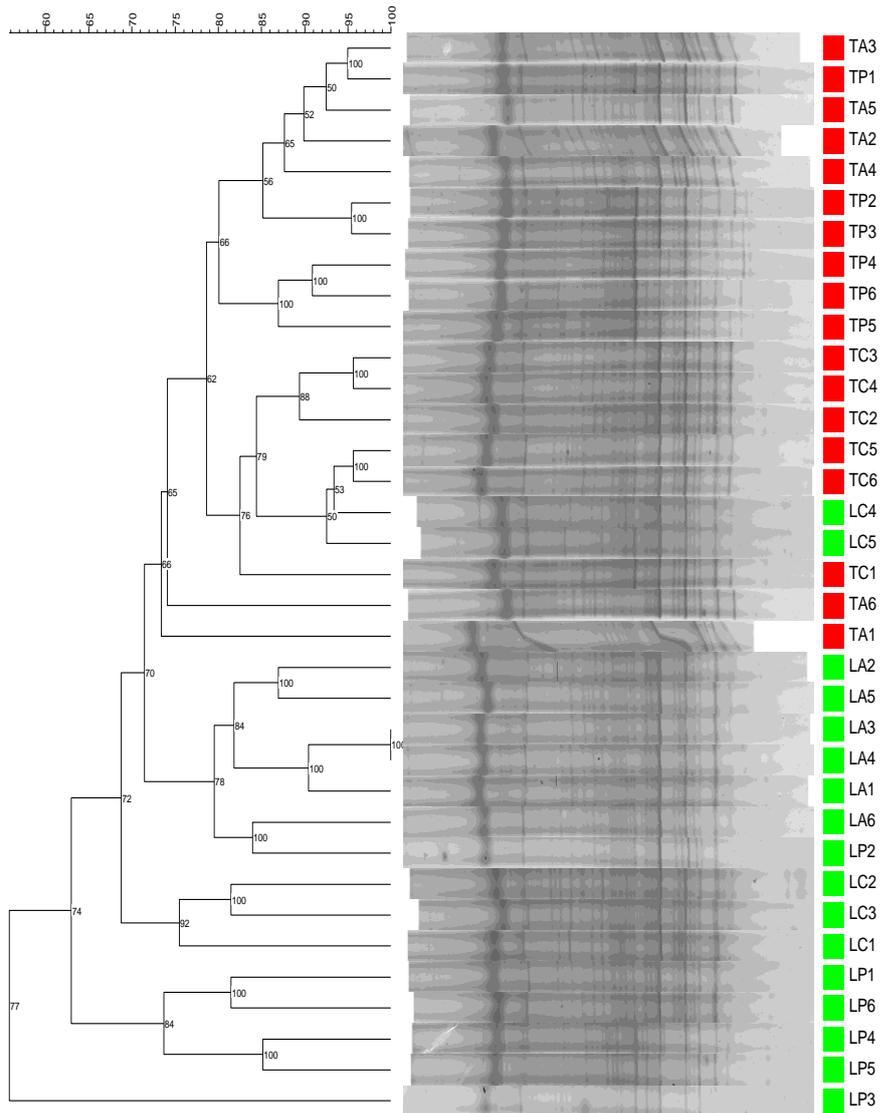


Figura 4 - Agrupamentos hierárquicos definidos a partir de *fingerprints* DGGE de comunidades de *Alfaproteobacteria* presentes em solos de Terra Preta [2] e Latossolo Amarelo [2], amostrados em maio de 2009, nas áreas de estudo localizadas na Amazônia Central brasileira. Os valores numéricos nos nós dos ramos indicam o coeficiente de correlação cofenética associado com cada cluster. As letras

A, P e C e os números de 1 a 6, correspondem aos solos sob cultivo de açaí, pupunha e cupuaçu e repetições, respectivamente.

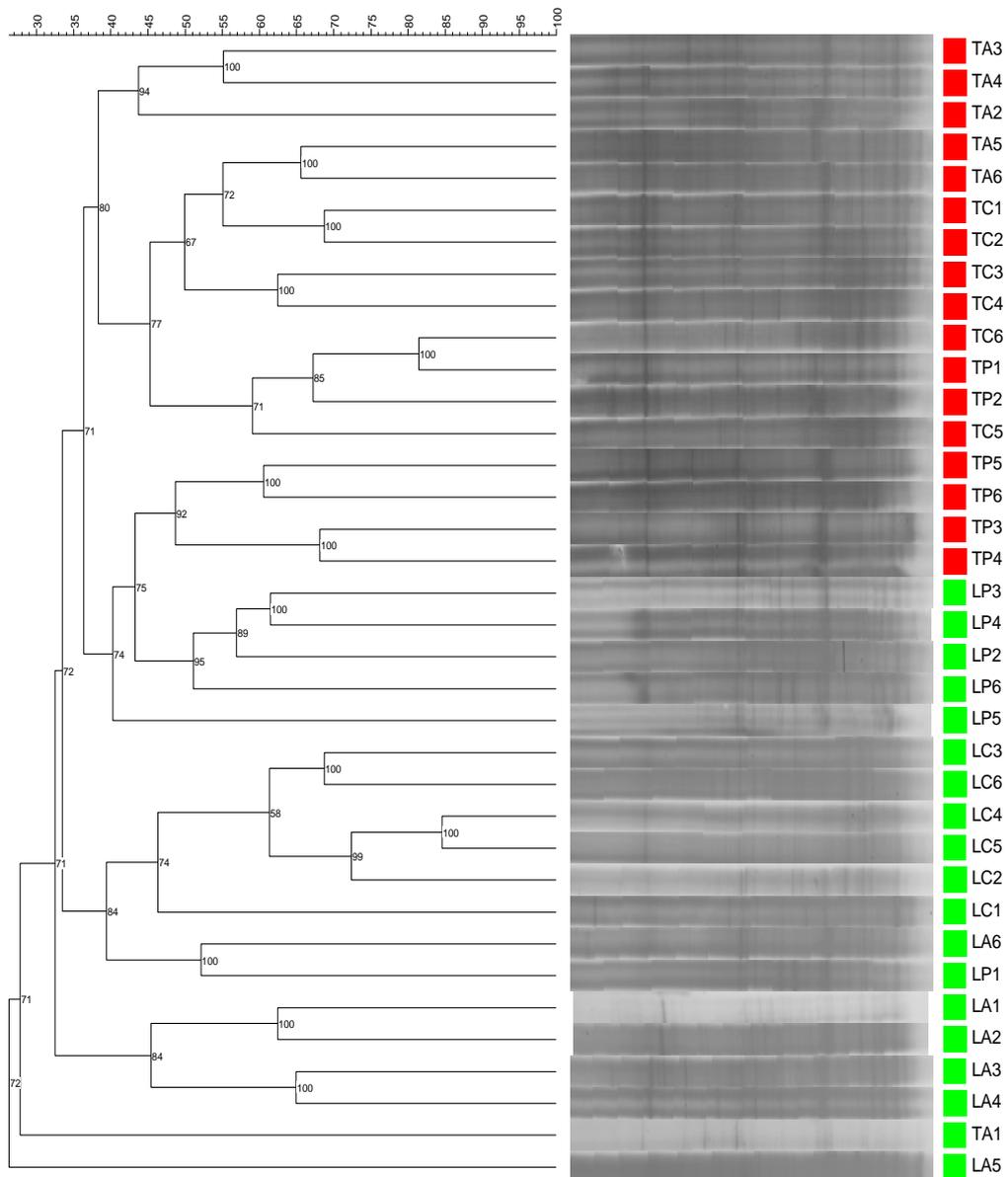


Figura 5 - Agrupamentos hierárquicos definidos a partir de *fingerprints* DGGE de comunidades de *Betaproteobacteria* presentes em solos de Terra Preta e Latossolo Amarelo, amostrados em maio de 2009, nas áreas de estudo localizadas na Amazônia Central brasileira. Os valores numéricos nos nós dos ramos indicam o coeficiente de correlação cofenética associado com cada cluster. As letras A, P e C e os números de 1 a 6, correspondem aos solos sob cultivo de açaí, pupunha e cupuaçu e repetições, respectivamente.

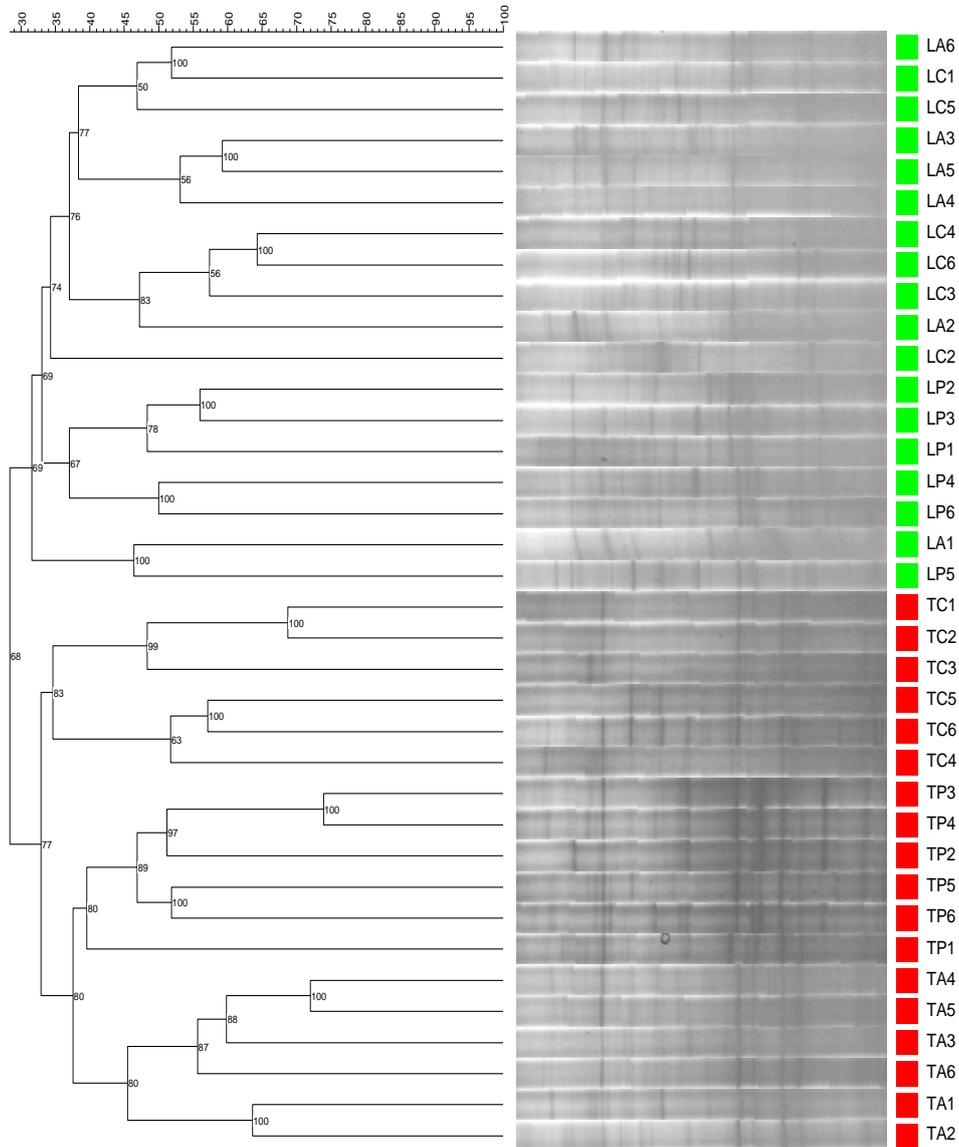


Figura 6 - Agrupamentos hierárquicos definidos a partir de *fingerprints* DGGE de comunidades de *Gammaproteobacteria* presentes em solos de Terra Preta [2] e Latossolo Amarelo [2], amostrados em maio de 2009, nas áreas de estudo localizadas na Amazônia Central brasileira. Os valores numéricos nos nós dos ramos indicam o coeficiente de correlação cofenética associado com cada cluster. As letras A, P e C e os números de 1 a 6, correspondem aos solos sob cultivo de açaí, pupunha e cupuaçu e repetições, respectivamente.

De maneira geral, os agrupamentos hierárquicos dos três grupos bacterianos agruparam-se de forma distinta quando analisados aos tipos de solos (Latosolo Amarelo e Terra Preta). Os resultados demonstraram que há agrupamento diferenciado sendo selecionado pelo ambiente. Segundo Moreira e Siqueira, (2006) modificações significativas nas propriedades físico químicas do solo, causadas pelos diversos usos, seja por adição ou remoção de elementos e/ou práticas de cultivo poderão causar alterações na comunidade microbiana. Rodrigues (2008) constituiu três bibliotecas genômicas, onde foram analisadas comunidades bacterianas sob o cultivo de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e camu-camu - (*Myrciaria dubia*), observando uma prevalência de bactérias das classes Acidobacteria, Betaproteobacteria e Alfacaproteobacteria. Em estudo realizado por Roesch et al. (2007) detectaram por meio de análises comparativas com as seqüências depositadas do banco genético do NCBI, seqüências pertencentes às classes Alfacaproteobacteria, Gammaproteobacteria e Betaproteobacteria, em solos cultivados com milho. Araújo et al. (2011) em estudo de comunidades microbianas de solo do Cerrado que foram analisadas por técnicas moleculares RISA (Análise do Espaço Intergênico Ribossomal) e T-RFLP (Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição Terminal), foram observadas seqüências de Alfacaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria e Deltaproteobacteria além de terem sido encontradas seqüências de Proteobacteria não classificadas, em amostras de solo de quatro fitofisionomias de Cerrado.

5.2 Estimativas de riqueza para Alfa, Beta e Gammaproteobacteria – Índices Chao 2 e Jackknife2

Com base nos índices de Chao 2 e Jackknife2 os resultados estimados para o grupo Betaproteobacteria o ambiente de Terra Preta apresentou-se mais rico, e para o grupo Gammaproteobacteria o ambiente de Latossolo Amarelo foi estimado de maior riqueza (Tabela 3).

Tabela 3 - Estimativas de riqueza de estruturas de comunidades bacterianas, em solos na Amazônia Central, por meio de dois estimadores não paramétricos Chao 2 e Jackknife2, com variância para Chao2.

	Cultivo	Solo*	Estimativa de riqueza Chao2	Jackknife 2	Variância Chao 2
<i>Alfaproteobacteria</i>	Acaí	LA	41,78	42,93	4
	Pupunha		40,92	44,27	0,86
	Cupuaçu		30,84	32,85	1
	Açaí	TP	46,56	44,93	5
	Pupunha		29,01	27,30	0,17
	Cupuaçu		35,12	38,87	1,5
<i>Betaproteobacteria</i>	Acaí	LA	53,61	61,17	1,5
	Pupunha		57,98	65,67	1,6
	Cupuaçu		40,22	43,37	1
	Acaí	TP	61,24	70,53	1,28
	Pupunha		59,54	67,57	1,16
	Cupuaçu		51,74	58,07	1,5
<i>Gammaproteobacteria</i>	Acaí	LA	59,18	67,90	0,94
	Pupunha		60,12	68,10	1,25
	Cupuaçu		50,96	56,57	0,85
	Acaí	TP	45,13	49,83	1,8
	Pupunha		41,57	46,77	1,28
	Cupuaçu		44,63	52,13	1,27

*Solo: TP – Terra Preta e LA – Latossolo Amarelo

A riqueza observada nos grupos de Alfa, Beta e Gammaproteobacterias, foi baseada nos dados de matrizes de presença e ausência gerados pelo DGGE (Figuras 7-9). Foram obtidas as médias do número de bandas observadas para cada solo sob o cultivo, tendo seis repetições para cada experimento. Utilizou-se ANOVA, para verificar a diferença entre os principais fatores (ambientes de Terra Preta e Latossolo Amarelo) e o efeito da interação entre as culturas neles cultivadas (açaí, pupunha e cupuaçu), seguida do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

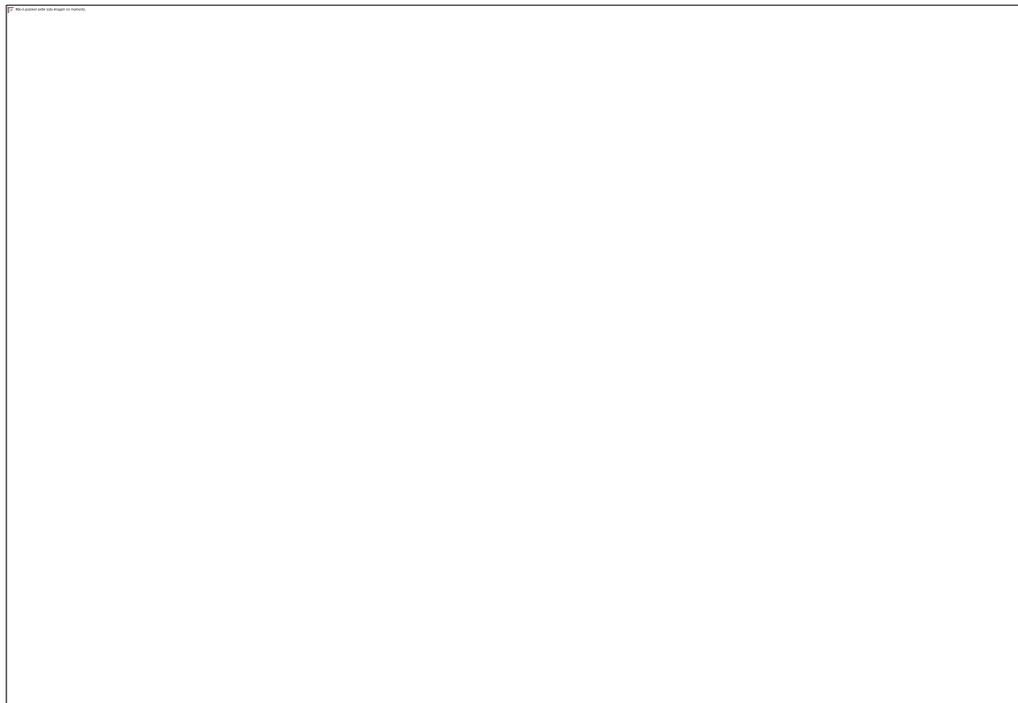
A riqueza observada nos grupos bacterianos seguiu a seguinte distribuição: para o grupo de Alfaproteobacterias não houve distinção do número de UTOs quando comparado os ambientes de Latossolo e Terra Preta.

Para o grupo de Betaproteobacteria houve maior riqueza na área de Terra Preta sendo significativo até mesmo quando comparado entre as culturas.

Para o grupo de Gammaproteobacteria o solo sob o cultivo do cupuaçu apresentou maior índice de riqueza na área de Latossolo Amarelo.



Figura 7 - Riqueza das comunidades bacterianas Alfaproteobacteria, revelada nos padrões de bandas DGGE obtidos a partir de 6 amostras (pontos amostrais) de solos de Terra Preta e Latossolo Amarelo sob três diferentes cultivos (açai, pupunha e cupuaçu). Médias seguidas de mesma letra na



horizontal, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Figura 8 - Riqueza das comunidades bacterianas Betaproteobacteria revelada nos padrões de bandas DGGE obtidos a partir de 6 amostras (pontos amostrais) de solos de Terra Preta e Latossolo Amarelo sob três diferentes cultivos (açai, pupunha e cupuaçu). Médias seguidas de mesma letra na horizontal, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

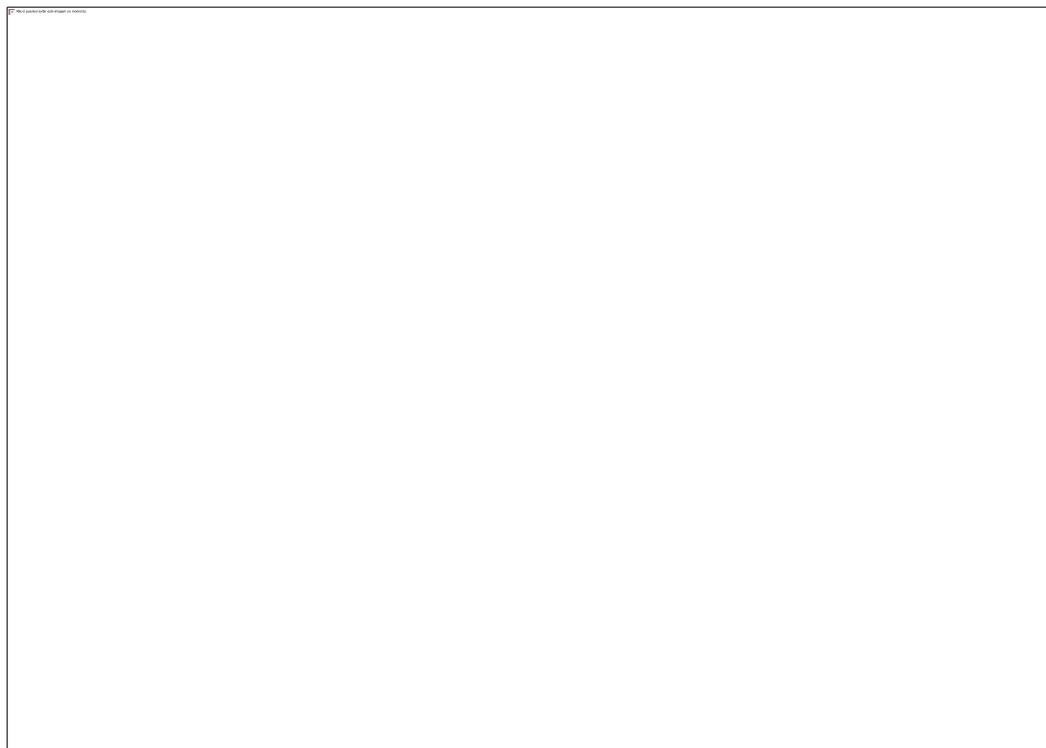


Figura 9 - Riqueza das comunidades bacterianas revelada nos padrões de bandas DGGE obtidos a partir de 6 amostras (pontos amostrais) de solos de Terra Preta e Latossolo Amarelo sob três diferentes cultivos (açai, pupunha e cupuaçu). Médias seguidas de mesma letra na horizontal, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

5.3 Análises de similaridade (ANOSIM)

As ANOSIM foram realizadas com os conjuntos de dados gerados por DGGE a fim de testar o efeito do uso das diferentes culturas e tipo de solos nas estruturas de comunidades bacterianas estudados. A matriz de distância foi construída sem transformação dos dados e empregando *Bray-Curtis* (Legendre e Legendre, 1998) como medida de distância. Os valores de R obtidos usando 1000 permutações (Tabela 4) expressam o nível de separação das estruturas de comunidades bacterianas em função do tipo de solo variando em uma escala de 0 (indistinguível) a 1. Interpretam-se os valores de $R > 0,75$ como indicativos de grupos totalmente distintos; $0,5 < R < 0,75$ como grupos com sobreposição, mas claramente

diferenciados e $R < 0,5$ como grupos semelhantes, de acordo com o manual do programa *Primer5* (Clarke e Gorley, 2001).

Com base nos valores de R expressos pela ANOSIM, as estruturas de comunidades de Alfaproteobacterias dos solos reveladas nos perfis de DGGE apresentaram grupos com sobreposição, mas claramente separados nos espaços de ordenação do estudo quando comparados TP vs LA, bem como os grupos de Betaproteobacterias sob cultivo de açaí e Gammaproteobacterias sob o cultivo de açaí e cupuaçu. As estruturas de comunidades bacterianas formaram grupos bem separados nas ordenações TP vs LA ($R > 0,75$) os grupos de Betaproteobacterias sob cultivo de açaí e Gammaproteobacteria sob cultivo de pupunha. A similaridade entre as estruturas de comunidades bacterianas dos solos sob TP vs LA evidenciou grupos semelhantes para Betaproteobacterias sob o cultivo de Pupunha ($R < 0,5$).

Tabela 4- Descrição das análises de similaridade (ANOSIM) e NMDS.

	Cultura	NMDS			ANOSIM TP vs. LA
		Stress ^a	Correlação ^b (%)	Variabilidade ^c (%)	
<i>Alfaproteobacteria</i>	Acaí	0.09615	53,4	53,4	0,50
	Pupunha	0.13162	58,0	58,0	0,54
	Cupuaçu	0.05638	65,1	65,1	0,50
<i>Betaproteobacteria</i>	Acaí	0.14014	58,2	58,2	0,52
	Pupunha	0.13764	74,8	74,8	0,01
	Cupuaçu	0.12868	69,4	69,3	0,85
<i>Gammaproteobacteria</i>	Acaí	0.12846	68,2	62,8	0,61
	Pupunha	0.13089	70,4	70,4	0,91
	Cupuaçu	0.12846	68,2	68,2	0,66

^aIndica a fidelidade da regressão utilizada na análise (100 permutações).

^bIndica a correlação das estruturas de comunidades microbianas e os atributos físico-químicos do solo para o primeiro eixo da ordenação.

^cPorcentagem de variabilidade do conjunto de dados referente às estruturas de comunidades microbianas explicada pelo primeiro eixo da ordenação.

TP – Terra Preta; LA – Latossolo Amarelo.

Valores de *Stress* $< 0,05$ indicam que a configuração das amostras no espaço de ordenação apresenta baixa probabilidade de má interpretação; valores $< 0,1$

garantem boa representação; valores $<0,2$ sugerem interpretação juntamente com outros métodos, e valores $>0,3$ indicam uma representação não aceitável (ter Braak e Smilauer, 2002).

Baseado nos valores de Stress, de maneira geral, as amostras sugerem interpretação juntamente com outros métodos, por essa razão utilizou-se também a ANOSIM.

Os dados de presença e ausência de bandas foram ordenados com os atributos físico-químicos dos solos usando o método multivariado NMDS (Figuras 10, 11, 12). Na análise de NMDS foi plotado um ponto para cada amostra. A distância entre as amostras foi avaliada usando *Jaccard*. A fidelidade da relação entre as distâncias das amostras no diagrama e os valores reais de similaridade entre elas encontra-se expressa na Tabela 4 (valores de *Stress*), juntamente com a correlação e a variabilidade resultantes da análise.

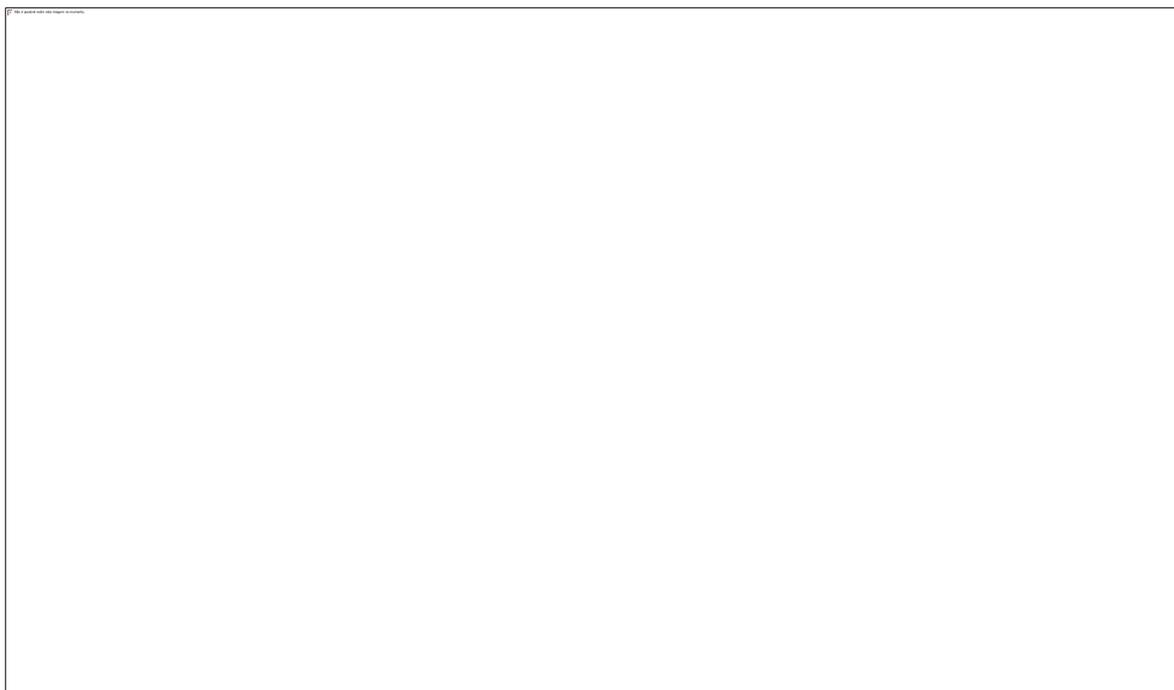
As ordenações dos dados de presença e ausência de bandas com os atributos dos solos analisados foram caracterizadas por *biplots* que aproximaram os perfis das comunidades microbianas às variáveis ambientais. Assim, os diagramas de ordenação representam as principais características da distribuição das comunidades ao longo de um gradiente ambiental definido pelos atributos químicos dos solos. Para facilitar a interpretação, os atributos dos solos foram representados por setas. O comprimento e a inclinação do vetor são parâmetros significantes na interpretação das ordenações.

5.4 Análises de NMDS dos perfis de DGGE

As análises de NMDS dos perfis de DGGE mostraram que as comunidades bacterianas (*Alfa*, *Beta* e *Gammaproteobacterias*) presentes nos *habitats* dos solos diferiram em estrutura e que essas diferenças estiveram relacionadas a alguns atributos do solo (ver ANEXOS A e B), especialmente aqueles associados a Alumínio e Ferro. Dos atributos químicos avaliados, Fe, Al, S, H+Al, Mn, pH e porcentagem de saturação por alumínio (m) foram os únicos efeitos significativos na

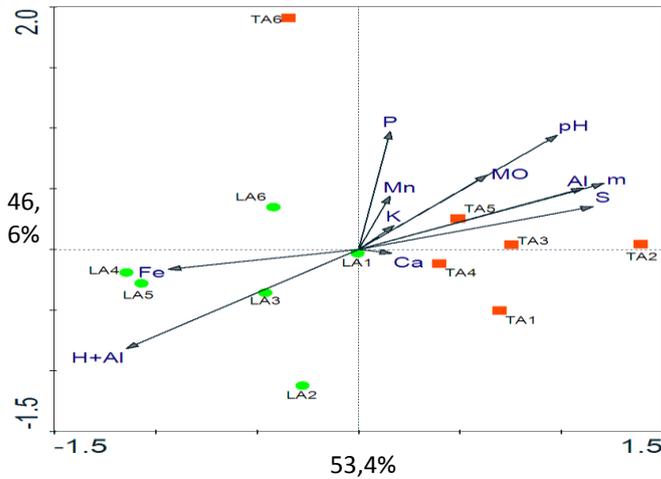
condicional ($p < 0,05$), enquanto V, Ca, MO e B tem um efeito significativo sobre a comunidade ($0,10 < p < 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Efeito da condicional NMDS segundo as variáveis ambientais sob a distribuição da estrutura das comunidades de bactérias observadas.



Na sequência as Figuras 10, 11 e 12 apresentada a seguir, cada dendrograma está acompanhado de uma Análise de Componentes Principais feita com o mesmo conjunto de dados usado na classificação hierárquica. Este método de análise de gradiente indireto consiste em uma técnica estatística multivariada que permitiu a distribuição dos perfis das comunidades microbianas ao longo de eixos de ordenação com base na presença e ausência de bandas detectadas por DGGE. Os valores percentuais associados a cada eixo da ordenação (X, Y) informam a explicabilidade destes eixos ao longo das mudanças percebidas nas estruturas de comunidades dentro do espaço de ordenação. Conjuntamente, os dois eixos plotados em cada ordenação apresentada explicam mais de 50% da distribuição dos dados conforme dados da Tabela 4.

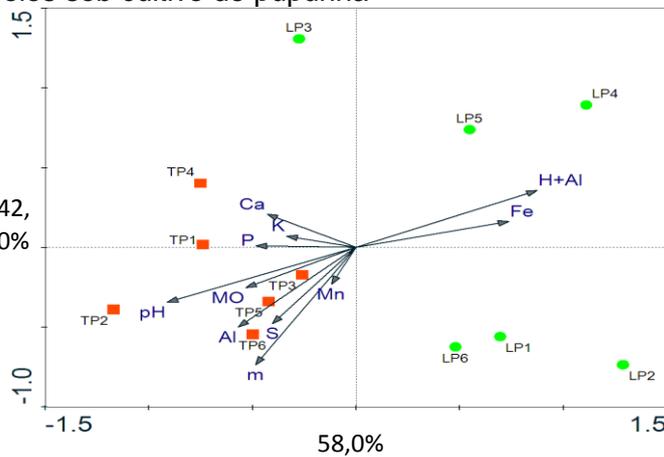
Solos sob cultivo de açaí



Não considerando as variáveis ambientais, o eixo 1 explica 53,4% da variabilidade dos dados e o eixo 2 explica 46,6%.

As variáveis ambientais explicam 100% da variabilidade. Desta "fatia" da variabilidade, 53,4% é explicado no eixo 1.

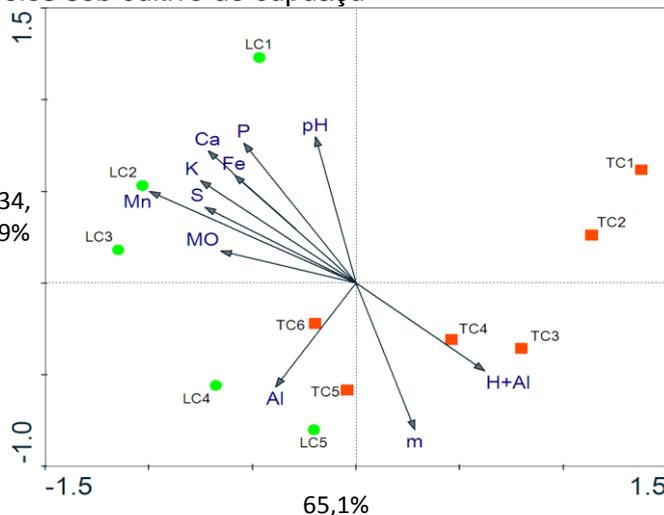
Solos sob cultivo de pupunha



Não considerando as variáveis ambientais, o eixo 1 explica 58,0% da variabilidade dos dados e o eixo 2 explica 42,0%.

As variáveis ambientais explicam 100% da variabilidade. Desta "fatia" da variabilidade, 58,0% é explicado no eixo 1.

Solos sob cultivo de cupuaçu

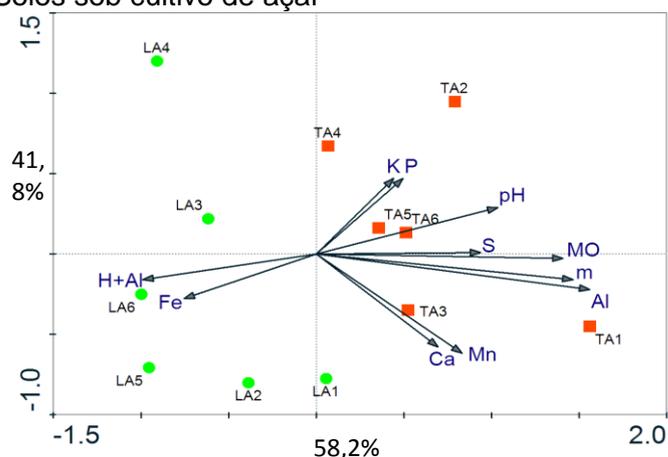


Não considerando as variáveis ambientais, o eixo 1 explica 65,1% da variabilidade dos dados e o eixo 2 explica 34,9%.

As variáveis ambientais explicam 99,3% da variabilidade. Desta "fatia" da variabilidade, 65,1% é explicado no eixo 1.

Figura 10 - Análises de NMDS (*Non-Metric Multidimensional Scaling*) baseadas nas estruturas de comunidades de Alfaproteobacteria, em solo sob o cultivo de açaí, pupunha e cupuaçu, conforme discriminadas pela técnica de DGGE, e nos atributos químicos dos solos. Os números 1 a 6 após as letras de identificação referenciam as repetições, respectivamente. ● - Latossolo Amarelo ■ - Terra Preta.

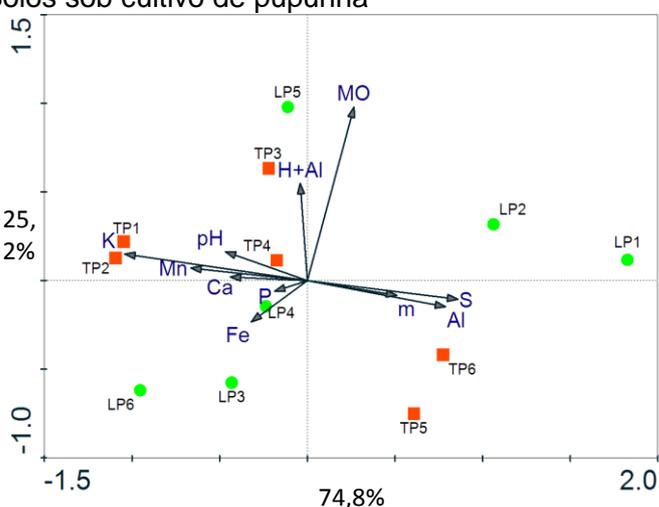
Solos sob cultivo de açaí



Não considerando as variáveis ambientais, o eixo 1 explica 58,2% da variabilidade dos dados e o eixo 2 explica 41,8%.

As variáveis ambientais explicam 100% da variabilidade. Desta "fatia" da variabilidade, 58,2% é explicado no eixo 1.

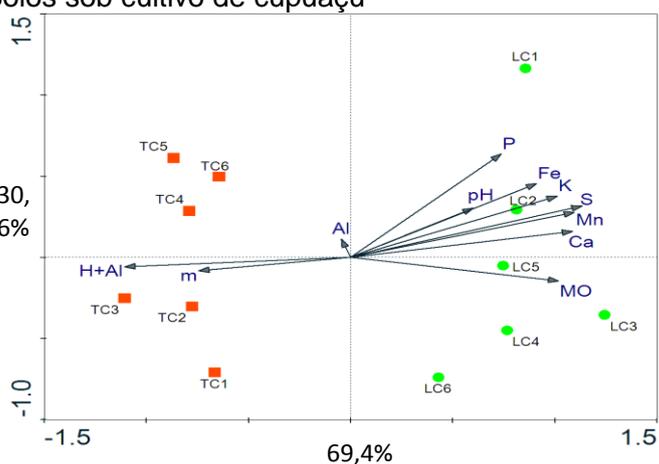
Solos sob cultivo de pupunha



Não considerando as variáveis ambientais, o eixo 1 explica 74,8% da variabilidade dos dados e o eixo 2 explica 25,2%.

As variáveis ambientais explicam 100% da variabilidade. Desta "fatia" da variabilidade, 74,8% é explicado no eixo 1.

Solos sob cultivo de cupuaçu

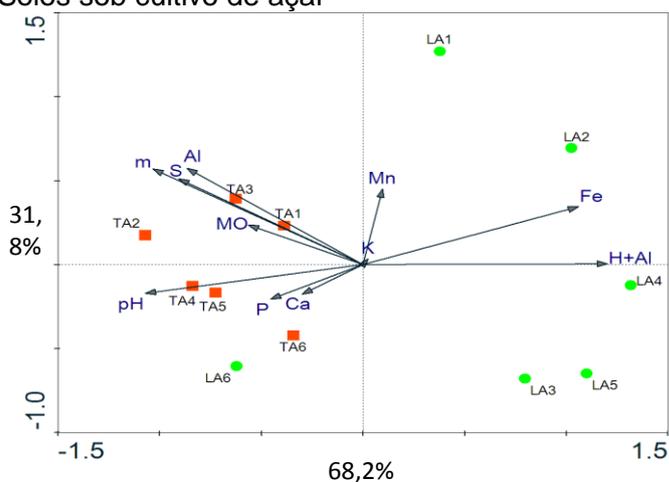


Não considerando as variáveis ambientais, o eixo 1 explica 69,4% da variabilidade dos dados e o eixo 2 explica 30,6%.

As variáveis ambientais explicam 99,7% da variabilidade. Desta "fatia" da variabilidade, 69,3% é explicado no eixo 1.

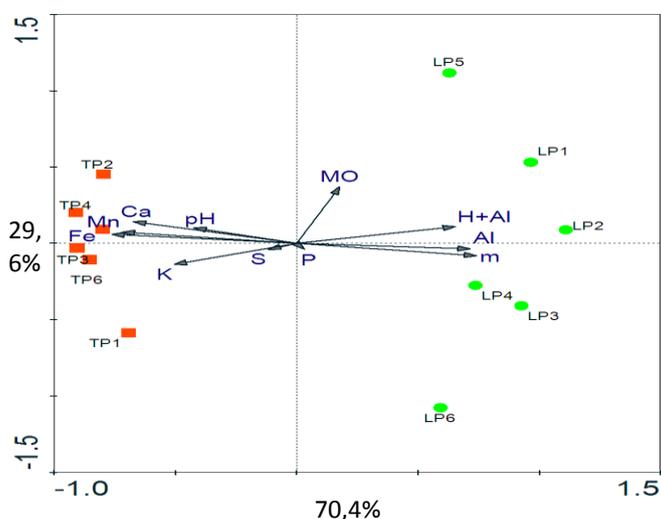
Figura 11 - Análises de NMDS (*Non-Metric Multidimensional Scaling*) baseadas nas estruturas de comunidades de Betaproteobacteria, em solos sob o cultivo de açaí, pupunha e cupuaçu, conforme discriminadas pela técnica de DGGE, e nos atributos químicos dos solos. Os números 1 a 6 após as letras de identificação referenciam as repetições, respectivamente. ● - Latossolo Amarelo ■ - Terra Preta.

Solos sob cultivo de açaí



Não considerando as variáveis ambientais, o eixo 1 explica 68,2% da variabilidade dos dados e o eixo 2 explica 31,8%.

As variáveis ambientais explicam 100% da variabilidade. Desta "fatia" da variabilidade, 62,8% é explicado no eixo 1..



Solos sob cultivo de pupunha

Solos sob cultivo de cupuaçu

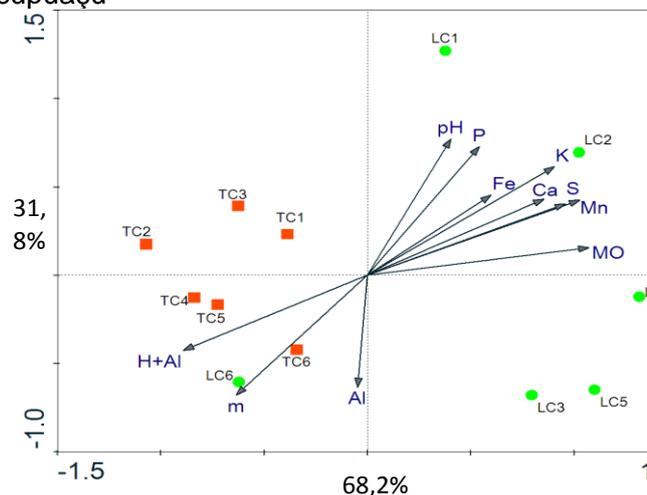


Figura 12 - Análises de NMDS (*Non-Metric Multidimensional Scaling*) baseadas nas estruturas de comunidades de Gammaproteobacteria, em solos sob o cultivo de açaí, pupunha e cupuaçu, conforme discriminadas pela técnica de DGGE, e nos atributos químicos dos solos. Os números 1 a 6 após as letras de identificação referenciam as repetições, respectivamente. ● - Latossolo Amarelo ■ - Terra Preta.

Os resultados obtidos com as análises de NMDS foram semelhantes àqueles obtidos com base nos perfis de DGGE e mostraram que as comunidades de Alfa, Beta e Gammaproteobacterias diferiram em estrutura e que essas diferenças estiveram mais fortemente correlacionadas ao ambiente (Latossolo Amarelo e Terra Preta) do que ao cultivo.

A diferença entre comunidades bacterianas pode estar relacionada com o histórico do uso da terra, como observado por Grossman et al. (2010), assim como pode estar relacionada aos atributos químicos do solo como foi observado em estudo de comunidades bacterianas realizado por Navarrete et al. (2010). Em revisões realizadas por Garbeva, van Veen e van Elsas (2004), o tipo de planta e o tipo de solo influenciam a comunidade microbiana do solo de uma forma complexa. Os autores mencionam, ainda, que ambos os fatores são determinantes em moldar a estrutura desses micro-organismos.

Os resultados do presente trabalho estão conforme os resultados de comunidades bacterianas em estudo realizado por Souza et al. (2013) no qual os solos rizosféricos de feijão caupi, solos não rizosféricos e solos rizosféricos adjacentes diferiram em estruturas das comunidades bacterianas e essas diferenças foram diretamente relacionadas aos atributos químicos dos solos, pois estas explicaram 74% e 7,2% da variabilidade total dos dados. Dentre os atributos analisados no estudo, o P, Al e Fe foram os que mais relacionados com a variabilidade dos dados. No presente trabalho os resultados mostraram que as comunidades bacterianas (Alfa, Beta e Gammaproteobacterias) presentes nos habitats dos solos diferiram em estrutura e que essas diferenças estiveram relacionadas a alguns atributos do solo, especialmente aqueles associados a Al e Fe e observado anteriormente nos resultados obtidos com base nos perfis DGGE. Estes resultados evidenciam que as estruturas de comunidades microbianas podem ser avaliadas por PCR-DGGE do gene 16S rRNA e podendo ser um indicador eficaz na detecção de mudanças na estrutura de comunidades microbianas em função de alterações ambientais, causadas por práticas de manejo e/ou associação à variabilidade de atributos químicos mensurados nas áreas, conforme sugeriu Clegg (2006).

6 CONCLUSÃO

Com base no delineamento amostral e na técnica de *fingerprinting* (DGGE), e estatísticas multivariadas, concluiu-se que as culturas de açaí, pupunha e cupuaçú cultivadas em solos de Latossolo Amarelo e Terra Preta contemporânea são capazes de influenciar diferencialmente as estruturas de comunidades de Alfaproteobacterias.

Para esse estudo, o ambiente de Terra Preta contemporânea parece favorecer a maior riqueza para os grupos de Betaproteobacterias, quando comparado aos solos de Latossolo Amarelo. Fato contrário foi observado para o grupo de Gammaproteobacterias levando a um indicativo de maior riqueza para os solos de Latossolo Amarelo.

Fe, Al e porcentagem de saturação por alumínio (m) foram os principais fatores abióticos que influenciaram na estrutura das comunidades bacterianas estudadas.

A técnica de DGGE confirmou a sua aplicação na caracterização da dinâmica de populações bacterianas em função do uso da terra.

Em síntese, o “pomar caseiro”, quando observado a estrutura de comunidades bacterianas do solo, avaliadas por técnicas moleculares e estatísticas multivariadas, juntamente com os atributos químicos dos solos, forneceram informações para o manejo sustentável dos ecossistemas amazônicos por meio de sistemas agro-florestais na paisagem estudada da região de Balbina, Amazônia Central do Brasil.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alfaia, S.S.; Rodrigues, M.R.L. e Uguen, K. 2005. Dinâmica do Nitrogênio nos Solos na Amazônia. In: Noda, H.; Souza, L.A.G.; Silva Filho, D.F. (Eds). *Agricultura Sustentável na Amazônia*. XXX anos de Pesquisas Agronômicas no INPA. Editora do INPA p. 1-16.

Alves, R. M. 2002. *Caracterização genética de populações de cupuaçuzeiro, Theobroma grandiflorum (Wild. ex. Spreng.) Schum., por marcadores moleculares microsatélites e descritores botânico-agronômicos*. 2002. 146p. II. Tese (doutorado em Genética). Piracicaba. 2002.

Amazonas, 2006. *Áreas de produção de açaí no estado*. In: <www.sds.am.gov.br>. Acesso 14/09/2008.

Anderson, J.M.; Ingam, J.S.I. (Ed.). *Tropical soil biological and fertility: a handbook of methods*. 2nd ed. Wallingford: CAB International, 1993. 221p.

Araújo, I.C. 1996. Potencialidade da pupunheira: uma visão do ponto de vista do agribusiness. In: *Workshop sobre as culturas de cupuaçu e pupunha na Amazônia*, 1. Manaus. Anais. Manaus: EMBRAPA-CPAA.

Araújo, J. F. *Diversidade Bacteriana do solo em diferentes fitofisionomias do bioma cerrado e perspectivas biotecnológicas*. 2011. (Tese de Doutorado). Pós Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia. Universidade Católica de Brasília, Brasília.

Araújo, M.C. 2008. *Uma coleção nuclear de pupunha na Amazônia brasileira*. Dissertação de Mestrado, UFAM, Manaus, Amazonas. 91 pp.il.

Azevedo, J.L. 1998. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: Melo I.S.; Azevedo J.I., (Eds). *Ecologia microbiana*. Editora EMBRAPA, Japariúna, S.P, p.444-461.

Benchimol, S. 1997. *Amazônia 96: Fisco e Contribuintes*. Edição Universidade do Amazonas, Manaus-AM. 193pp.

- Benlloch, S.; Martinez-Murcia, A.J.; Rodriguez-Valera, F. 1995. Sequencing of bacterial and archaeal 16S rRNA genes directly amplified from a hypersaline environment. *Systematic and Applied Microbiology*, 18:574-581.
- Bobbio, F.O.; Druzian, J.I.; Abrão, P.A.; Bobbio, P.A.; Fadellis, S.; 2000. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 20, pp.6.
- Bonaccini, L. A. 1997. *Produza palmito: a cultura da pupunha*. Cuiabá: SEBRAE, 96p.
- Borneman, J.; Triplett, E. W. 1997. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:2647-2653.
- Bovi, M. L. A.; Castro, A. Assai. In: CLAY, J. W.; Clement, C. R. 1993. *Income generating forests and conservation in Amazonia*. Rome: FAO. p.58-67.
- Brian, M. B. 1988. *Etnobotany of the Chacobo Indians and their Palms Advanced in Economic Botany*, The New York Botanic Garden: New York,
- Brodie, E.; Edwards, S.; Clipson, N. 2003. Soil fungal community structure in a temperate upland grassland soil. *Microbiol Ecology*, New York, 45:105-114.
- Brody, J.R.; Kern, S.E. 2004. Sodium boric acid: Atriz-less, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *BioTechniques*, New York, 36:214-216.
- Bruggen, A. H. C.; Semenov, A. M. 2000. In search of biological indicators of soil health an disease suppression. *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, 15:13-24.
- Buckley, D.H.; Schimidt, T.M. 2003. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 5:441-452.
- Bunemann, E.K.; Schewenke, G.D.; Van Zwieten, L. 2006. Impact of agricultural inputs on soil organisms - a review. *Australian Journal of Soil Research*, 44:379-406.

Calzavara, B.B.G. 1978. *As possibilidades do açaizeiro no estuário amazônico*. Belém: (Boletim Técnico). Faculdade de Ciências Agrárias do Pará. p.103.

Calzavara, B.B.G.; Muller, C.H.; Kahwage, O. N. N. 1984. *Fruticultura Tropical: o cupuaçuzeiro – cultivo, beneficiamento e utilização do fruto*. EMBRAPA-CPATU: Belém, 101p.

Canhos, V.P.; Vazoller, R.F. 1999. *Biodiversidade do Estado de São Paulo. Microrganismos e Vírus*. FAPESP, p.3-23.

Carvalho, J.E.U.; Müller, C.H.; Benchimol, R.L.; Kato, A.K.; Alves, R.M. 1999. *Copoasu [Theobroma grandiflorum (Willd. Ex. Spreng.) Schum.]: cultivo y utilización: manual técnico*. Caracas: FAO, Tratado de Cooperación Amazonica. 152p.

Cavalcante, P. B. *Frutas Comestíveis da Amazônia*. 1991. Coleção Adolfo Ducke. Belém. Museu Paraense Emílio Goeldi, 5ª ed. 279 p.

Chagas Junior, A.F.; Oliveira, L.A.; Oliveira, A.N.; Willerding, A.L. 2009. Efetividade de rizóbios e caracterização fenotípica dos isolados que nodulam feijão-caupi em solos da Amazônia Central. *Acta Amazonica*, 39:489-494.

Chauvel, A.; Lucas, Y.; Boulet, R. 1987. On the genesis of soil mantel of the region of Manaus, Central Amazonia, Brasil. *Experientia*. v. 43, p. 234-241.

Chávez Flores, W.B. 1987. *Estudos genéticos fenotípicos de unia população introduzida de pupunha (Bactris gasipaes H.B.K.) sem espinhos na região de Manaus*. Dissertação de Mestrado. Manaus, INPA/FUA, 65 p.

Chávez Flores, W.B.; Noda, H.; Clement, C.R. 1990. Genetic/pheno typic studies on spines in Pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K., Palmae). *Revista Brasileira de Genética*, 13(2):293-303.

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

Cho, J.C.; Giovannoni, S. J. 2003. *Parvularcula bermudensis* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium that forms a deep branch in the Alphaproteobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:1031-1036.

Clarke, K.R. Gorley, R.N. PRIMER v5: user manual/tutorial. 2001. PRIMER-E, Plymouth, UK.

Clegg C.D. 2006. Impact of cattle grazing and inorganic fertilizer additions to managed grasslands on the microbial community composition of soils. *Appl Soil Ecol.*, 31:73-82.

Clegg, C. D.; Lovell, R. D. L.; Hobbs, P. J. 2003. The impact of grassland management regime on the community structure of selected bacterial groups in soils. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 43:263–270.

Clement, C.R. 1999. 1492 and the loss of the Amazonian crop genetic resources. I. The relation between domestication and human population decline. *Economic Botany*, 53(2): 188-202.

Clement, C.R. 2000. Pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth, Palmae). Jaboticabal: Funep, Série Frutas Nativas. 48 pp.

Clement, C.R.; Aguiar, J.P.L.; Arkcoll, D.B.; Firmino, J.L.; Leandro, R.C. 1989. Pupunha brava (*Bactris dahlgreniana* Glassman): progenitora da pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.)? Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi, série Botânica, 5(1):39-55.

Clement, C.R.; Mora Urpí, J. The pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K., Arecaceae): multi-use potential for the lowland humid tropics. *Journal of Economic Botany*, v.41, n.2, p.302-311, 1987.

Clement, C.R.; Val. A.L.; Oliveira, J.A. 2003. T & C Amazônia. FUCAPI (Fundação Centro de Análise, Pesquisa e Inovação Tecnológica), Manaus, AM.1(3): 21-32.

Clement, C.R.; Yuyama, K.; Chávez Flores, W.B. 2001. Recursos genéticos de pupunha (Genetic resources of pejibaye). In: Sousa, N.R.; Souza, A.G.C. (Eds.).

Recursos fitogenéticos na Amazônia Ocidental: conservação, pesquisa e utilização. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus. p.143-187.

Clement, C.R.; Müller, C.H.; Flores, W.B.C. 1982. Recursos genéticos de espécies frutíferas da Amazônia Brasileira. *Acta amazonica*, Manaus, v.12, n. 4, p.677-695.

Coelho Neto, R.A.; Pereira, B.G; Noda, H.; Boher, B. 2004. Murcha bacteriana no Estado do Amazonas, Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, n. 29, p.21-27.

Cury, J. C. 2006. *Diversidade de Bacteria e Archaea em solos de mangue e marisma*. Tese. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Campus de Piracicaba.

EMBRAPA. 1990. *A questão agrícola da Amazônia - aptidão das terras*. Embrapa - CPATU. Belém, Embrapa - CPATU. Microcenários, p.135.

Ferreira, S.J.F., Luizão, F.J., Miranda, S.A.F. 2006. Nutrients in soil solution in an upland forest submitted to selective logging in central Amazonia. *Acta Amazonica*, Manaus, 36(1):59-67.

Franken, W; Leopoldo, P.R.; Bergamin Filho, H. 1985. Fluxo de nutrientes através de águas naturais em floresta de terra firme na Amazônia Central. In: *Workshop on Biogeochemistry of Tropical Rain Florest: Problems for Research. Proceedings*. Piracicaba, São Paulo. p. 29-37.

Freitag, T.E.; Prosser, J. I. 2003. Community structure of ammonia-oxidizing bacteria within anoxic marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:1359-1371.

Garbeva, P.; Van Veen, J.A.; Van Elsas, J.D. 2004. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*, 42:243-70.

Garbeva, P.; VanVeen, J.A.; Van Elsas, J.D. 2004. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant an soil type ad implications for disease suppressiveness. *Ann. Rev. Phytopathol*, 42:243-270.

Garrity, G.M.; Bell, J.A.; Lilburn, T. 2004. Bradyrhizobiaceae. The proteobacteria: Part C, the alpha-, beta-, delta-, epsilon proteobacteria. p.438-476. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. Release 5.0, May 2004. Springer-Verlag, New York.

Garrity, G. M.; Holt, J. G. The road map to the manual. In: Boone, D.R, Castenholz, R.W. (Eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, New York: Berlin: SpringerVerlag, 2001, v.1, p.119-166.

Genbank. *RefSeq: NCBI Reference Sequence Database*. A comprehensive, integrated, non-redundant, well-annotated set of reference sequences including genomic, transcript, and protein. Acesso: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>.

Glaxton, S.J.; Campbell, C.D.; Bardgett, R.D.; Mawdsley, J.L.; Clegg, C.D.; Ritz, K.; Griffiths, B.S.; Rodwell, J.S.; Edwards, S.J.; Davies, W.J. 2004. Assessing shifts in microbial community structure across a range of grassland of differing management intensity using CLPP, PLFA and community DNA techniques. *Applied Soil Ecology*, 25:63-84.

Goodland, R.; Irwin, H. 1975. *A selva Amazônica: do inferno verde ao deserto vermelho?* - São Paulo, Ed. Itatiaia, Ed. da Universidade de São Paulo. 156pp.

Greengenes. *The 16S rDNA Data and Tools*. Acesso: <<http://greengenes.lbl.gov>>.

Grossman, J.M. ; O'Neill, B.E. ; Tsai, S.M. ; Liang, B. ; Neves, E. ; Lehmann, J.; Thies, J.E. 2010. Amazonian anthrosols support similar microbial communities that differ distinctly from those extant in adjacent, unmodified soils of the same mineralogy. *Microbial Ecology*, 60:192-205.

Gürtler, V.; Stanisich, V.A. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, 142:3-16.

Harborne, J.B.; Saito, N.; Detoni, C.H. 1994. Anthocyanins of *Cephaelis*, *Cynomorium*, *Euterpe*, *Lavatera* and *Pinanga*. *Biochem Syst Ecol*, 22:835-836.

Hecht, S.B. 1985. Environment, development and politics: capital accumulation and the livestock Sector in eastern Amazonia. *World Development*, 13, p.663-684.

- Hecht, S.B.; Posey, D. A. 1989. Preliminary results on soil management techniques of the Kayapó indians. *Advances in Economic Botany*, 7:174-187.
- Henderson, A. 1995. *The palms of the Amazon*. University Press, Oxford.
- Heuer H.; Krsek M.; Baker P.; Smalla, K.; Wellington, E.M.H. 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3233-3241.
- Hewood, V.H. 1993. *Flowering Plants of The World*. B.T. Batsford Ltda.: London, p. 301.
- Hugenholtz, P.; Goebel, B.M.; Pace, N.R. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol*, 180:4765-4774.
- Hunter-Cevera, J.C. 1998. The value of microbial diversity. *Current Opinion in Microbiology*, 1(3):278-285.
- Ibekwe, A.M.; Kennedy, A.C.; Frohne, P.S.; Papiernik, S.K.; Yang, C.H.; Crowley, D.E. 2002. Microbial diversity along a transect of agronomic zones. *FEMS Microbial Ecology*, 39:183-191.
- IBGE. 2003. Instituto brasileiro de geografia e estatística. *Produção da extração vegetal e da silvicultura*. Rio de Janeiro - RJ, v.18, 43p.
- Jensen, J.F., Kvist, L.P., Christensen, S.B. 2002. An antiplasmodial lignan from *Euterpe precatoria*. *J Nat Prod*, 65:1915-1917.
- Jesus, E.C.; Marsh, T.L.; Tiedje, J.M.; Moreira, F.M.S. 2009. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. *International Society for Microbial Ecology Journal*, on-line.
- Johnson, M.J.; Lee, K.Y.; Scow, K.M. 2003. DNA fingerprinting reveals links among agricultural crops, soil properties, and the composition of soil microbial communities. *Geoderma: An International Journal of Soil Science*, 114:279-303.

Kahn, F.; Granville, J.J. 1992. *Palms in forest ecosystems of Amazonia*. Berlin: Springer Verlag, 226p.

Karlem, D.L.; Ditzler, C.A.; Andrews, S.S. 2003. Soil quality: Why and how? *Geoderma: An International Journal of Soil Science*, 114(3-4):145-156.

Keller, M.; Zengler, K. 2004. Tapping into microbial diversity. *Nature Reviews in Microbiology*, 2:141-150.

Kern D.C.; Costa, M.L. 1997. *Os solos antrópicos*. In: LISBOA, P. B. (Org.) Caxiuanã. Belém, Museu Paraense Emílio Goeldi, p.105-119.

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

Kowalchuk, G.A.; Buma, D.S.; de Boer, W.; Klinkhamer, P.G.L.; Van Veen, J.A. 2002. Effects of aboveground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganism. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 81:509-521.

Kumar, B.M.; Nair, P.K.R. 2004. The enigma of tropical homegardens. *Agroforest. Syst.*, n. 61, p.135-152.

Lambais, M.R.; Cury, J.C.; Maluche–Baretta, C.R.; Büll, R.C. 2005. Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. In: Vidal-Torrado, P.; Alleoni, L.R.F.; Cooper, M.; Silva, A.P. & Cardoso, E.J., orgs. Tópicos em ciência do solo. Viçosa, MG, *Sociedade Brasileira de Ciência do Solo*, 4:43-84.

Legendre, P.: Legendre, L. 1998. *Numerical ecology*, 2nd Engl ed. Elsevier, Amsterdam.

Lehmann, J.; Kern, D.C.; Glaser, B.; Woods W.I. 2003. *Amazonian Dark Earths: origin, properties, management*. Dordrecht. Kluwer Academic Publisher. 523 p.

Locatelli, M. Souza, V.F.; Vieira, A.H.; Quinsen, R.C. et al. 2001. Nutrientes e biomassa em sistemas agroflorestais com ênfase no cupuaçuzeiro, em solo de baixa

fertilidade. Porto Velho: Embrapa Rondônia, *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, 1:17 p.

Luizão, F.J.; Fearnside, P.M.; Cerri C.E.P.; Lehmann, J. 2009. The maintenance of soil fertility in Amazonian managed systems. pp. 311-336. In: M. Keller, M. Bustamante, J. Gash & P. da Silva Dias. (eds.). *Amazonia and Global Change*. Geophysical Monograph Series, v.186, American Geophysical Union (AGU), Washington, DC, U.S.A., 565 pp. Doi: 10. 029/2008GM000742

M.M.A. 1998. Ministério do Meio Ambiente, Suframa/Sebrae. *Produtos Potenciais da Amazônia*, Açaí, GTA: Brasília, vol. 19.

Macrae, A. 2000. The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31:77-82.

Madaleno, I. 2000. *Urban agriculture in Belém, Brazil*. *Cities*, 17(1):73-77.

Madigan, M.; Martinko, J. 2005. *Brock Biology of Microorganisms*, 11th edn. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.

Malik, S.; Beer, M.; Megharaj, M.; Naidu, R. 2008. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environment International*, 34:265-276.

Margulis, L.; Jorgensen, J.Z.; Dolan, S.; Kolchinsky, R.; Rainey, F.A.; Lo, S.C. 1998. The Arthromitus stage of *Bacillus cereus*: intestinal symbionts of animals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:236–1241.

Martins, A.L.U. 1998. *Quintais urbanos em Manaus: organização, espaço e recursos naturais*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM.

Mccaig, A.E.; Glover, L.A.; Prosser, J.I. 2001. Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimens by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:4554-4559.

Ministério do Meio Ambiente, Suframa/Sebrae. 1998. *Produtos Potenciais da Amazônia, Açaí*. GTA: Brasília, v. 19.

Mittermeier, R. A.; Mittermeier, C. G.; Brooks, T. M.; Pilgrim, J. D.; Konstant, W. R.; Fonseca, G. A. B.; Kormos, C. 2003. Wilderness and Biodiversity Conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(18):10309-10313.

Mora Urpí, J.; Arias, A.B. & Oquendo, C.A. 1999. Cultivares de pejibaye para palmito. In: Mora Urpi, J.; Echeverria, J.G., eds. *Palmito de Pejibaye (Bactris gasipaes Kunth): su cultivo e industrialization*. San José, CR., UCR, p.39-47.

Mora Urpí, J.; Clement, C.R. 1985. Reces and populations of peach palm in the Amazon basin. In: Clement, C.R. & Coradin, L. (eds). *Final Report, Peach palm (Bactris gasipaes H.B.K.)*. Germoplasma Bank. USAID, Proyect Report.111 p.

Mora Urpí, J.; Weber, J.C.; Clement, C.R. 1997. *Peach palm. Bactris gasipaes Kunth. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops*. 20. Gatersleben: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research - IPK / Rome: International Plant Genetic Resources Institute - IPGRI, 83p.

Moreira, F.M.S., Siqueira, J.O. 2006. *Microbiologia e bioquímica do solo*. 2a ed. UFLA, Lavras, Brasil. 729 p.

Morris, C.E.; Bardin, M.; Berge, O.; Frey-Klett, Fromin, N.; Girardin, H.; Guinebretiere, M.H., Lebaron, P.; Thiery, J.M.; 2002. Troussellier, M. Microbial biodiversity: approaches to experimental design and hypothesis testing in primary scientific literature from 1975 to 1999. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66:592-616.

MS. 2002. *Alimentos regionais brasileiros*. Ministério da Saúde, Diretoria Técnica da Coordenação Geral da Política de Alimentação e Nutrição, Brasília. Série Comunicação e Educação em Saúde, 21:140pp.

Müzyer, G.; E.C. Dewaal, A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain

reaction-amplified genes coding for 16S ribosomal RNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3):695-700.

Muyzer, G.; Ramsing, N.B. 1995. Molecular methods to study the organization of microbial communities. *Water Science Technology*, 32:1-9.

Myers, R.M.; Fischer, S.G.; Lerman, L.S.; Maniatis, T. 1985. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, Oxford, 13:3131-3145.

Navarrete A.A.; Cannavan, F.S.; Taketani R.G.; Tsai, S.M. 2010. A Molecular Survey of the Diversity of Microbial Communities in Different Amazonian Agricultural Model Systems. *In Diversity*, 2(5):787-809.

Navarrete, A.P. *Estrutura e diversidade da comunidade microbiana em solos sob diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental*. 2009. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Centro de Energia Nuclear na Agricultura. 119p.

Nicholaides, J.J.; Sanchez, P.A.; Bandy, D.E.; Villachica, J.H.; Coutu, A.J.; Valverde, C.S. 1983. Crop production systems in the Amazon Basin. In: Moran, E. (ed.) *The dilemma of Amazonia Development*, Westview, p. 101-153.

Nogueira, M.A.; Albino, U.B.; Brandão-Junior, O.; Braun, G.; Cruz, M.F.; Dias, B.A.; Duarte, R.T.D.; Gioppo, N.M.R.; Menna, P.; Orlandi, J.M.; Raimam, M.P.; Rampazo, L.G.L.; Santos, M.A.; Silva, M.E.Z.; Vieira, F.P.; Torezan, J.M.D.; Hungria, M.; Andrade, G. 2006. Promising indicators for assessment of agroecosystems alteration among natural, reforested and agricultural land use in southern Brazil. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 115:237-247.

Oliveira, A.N.; Oliveira, L.A. 2003. Sazonalidade, colonização radicular e esporulação de Fungos Micorrízicos Arbusculares em plantas de cupuaçuzeiro e de pupunha na Amazônia Central. *Revista Ciência Agrária*, 40:145-154.

Oliveira, A.N.; Oliveira, L.A.; Andrade, J.S.; Chagas Júnior, A. F. 2006. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia central, Amazonas, Brasil. *Ciênc. Tecnol. Aliment*, 26:853-860.

Pace, N.R. 2006. Time for a change. *Nature*, 441(7091)289-289. Acesso: <http://www.nature.com/nature/journal/v441/n7091/full/441289a.html>

Pace, N.R.; Stahl, D.A.; Lane, D.J.; Olsen, G.J. 1986. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Advances in Microbial ecology*, 9:1-55.

Patiño, V.M. 1989. Comportamiento de plantas nativas Colombianas bajo cultivo: situación actual del cultivo del chontaduro. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, v. 17, n. 65, p. 259-264.

Peixoto, R.S.; Coutinho, H.L.C.; Madari, B.; Machado, P.L.O.A.; Rumjanek, N.G.; Van Elsas, J.D.; Seldin, L.; Rosado, A.S. 2006. Soil aggregation and bacterial community structure as affected by tillage and cover cropping in the Brazilian Cerrados, 90:16-28.

Pereira, W.L.M.; Veloso, C.A.C.; Gama, J.R.N.F. 2000. Chemical properties of an Oxisol of Eastern Amazonia Under Pasture. *Sci.Agric*, 57, 3.

Peters, S.; Koschinsky, S.; Schwieger, F.; Tebbe, C. C. 2000. Seccession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-Single-StrandConformation Polymorphism-based genetics profiles of small-subunit rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3):930-936.

Pommerville, J. C. 2004. *Alcamo's Fundamentals of Microbiology*. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, MA.

Prance, G.T. 1975. Estudos sobre a vegetação das Campinas Amazônicas. I. Introdução a uma série de publicações sobre a vegetação das Campinas Amazônicas. *Acta Amazonica*, 5(3):207-209.

Prance, G.T.; Silva, M.F. Árvores de Manaus. Manaus: CNPq/INPA. 1975. 312p.

Ramos, A.; Bovi, M.L.A.; Folegatti, M.V.; Diotto, A. 2004. Efeitos da fertirrigação sobre a produção de palmito de pupunheira. *Hortic. Bras.*, 22:734-739.

Ranjard, L.; Poly, F.; Nazaret, S. 2000. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Research in Microbiology*, 51(3):167-177.

Rappé, M.S.; Giovannoni, S.J. 2003. The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology*, 57:369-394.

RDP Ribosomal Database Project at Michigan State University. Acesso: <<http://rdp.cme.msu.edu/html>>

Reisdorff, C., Lieberei, R., Souza, A.G.C. 1996. Studies on the Variability of Cupuaçu Plants (*Theobroma grandiflorum* (Wild. ex Spreng.) Schum.) Growing in Different Cultivation Systems on a Degraded Area: State of Development and Productivity of 3 -Years old Trees. In: *Conference on Fruit Production in the Tropics and Subtropics, 1., Proceedings*. Berlin. p. 68-77.

Rodrigues, F. da S. *Análise filogenética de bactérias rizosféricas de duas espécies frutíferas da amazônia central pela construção de biblioteca genômica 16s rRNA*. 2008. Dissertação (Agricultura no Trópico Úmido (ATU)) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. 211 f.

Rodrigues, F.S.; Oliveira, L.A.; Astolfi-Filho, S.; Leomil, L. 2009. Construção e análise de biblioteca genômica de latossolo sob cultivo de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) na Região Amazônica. In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009. 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia.

Rodrigues, T.E. 1996. Solos da Amazônia. In: Alvarez, V.H.; Fontes, L.E.F.; Fontes, M.P.F. *O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil e o Desenvolvimento Sustentado*. Viçosa, MG: SBCS; UFV, DPS. p.19-60.

Rodriguez, D.P.; Astolfi-Filho, S.; Clement, C.R. 2004. Molecular Marker-Mediated Validation of Morphologically Defined Landraces of Pejibaye (*Bactris gasipaes*) and

Their Phylogenetic Relationships. *Genetic Resources and Crop Evolution Netherlands*, 51(8):871-882.

Roesch, L.F.W.; Passaglia, L.M.P.; Bento, F.M.; Triplett, E.W.; Camargo, F.A.O. 2007. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho. *R. Bras. Ci. Solo*, 31:1367-1380.

Rogez, H. 2000, Açaí: preparo, composição e melhoramento da qualidade. Belém-PA: EDUFPA, 1:313 p.

Rondon, M. R. August, P.R.; Bettermann, A.D.; Brady, S.F.; Grossman, T.H.; Liles, M.R.; Loiacono, K.A.; Lynch, B.A.; Macneil, I.A.; Minor, C.; Tiong, C.L.; Gilman, M.; Osburne, M.S.; Clardy, J.; Handelsman, J.; Goodman, R.M. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6):2541-2547.

Rosseló-Mora, R.; Amann, R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Review*, 25(1):39-67.

Salati, E.; Santos, A.A.; Lovejoy, T.E., Klabin, I. 1998. *Porque salvar a floresta amazônica*. Manaus. Editora INPA. 114p.

Sanchez, P.A., Villachica, J.H.; Band, D.E. 1987. Soil Fertility dynamics after clearing a tropical rainforest in Peru. *Soil Science Society American Journal*, 47:1171-1178.

Schlegel, H.G.; Jannasch, H.W. 1992. Prokaryotes and their habitats. In: Ballows, A., Truper, H. G.; Dworkin, M.; Harder, W. & Schleifer, K.-H. (eds.). *The prokaryotes*. New York: Springer Verlag. v. 1, p.75-125.

Schmidt, T. M.; Pace, B.; Pace. N. R. 1991. Detection of DNA contamination in Taq polymerase. *BioTechniques*, 11:176-177.

Schubart, H.O.R.; Franken, W.; Luizão, F.J. 1984. Uma floresta sobre solos pobres. *Ciência Hoje*, 2(10), p.26-32.

Schwieger, F; Tebbe, C.C. 2000. Effect of field inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33 on the composition of bacterial communities in rhizospheres of a target plant (*Medicago sativa*) and a non-target plant (*Chenopodium album*) - Linking of 16S rRNA gene-based single-strand conformation polymorphism community profiles to the diversity of cultivated bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 66:3556-3565.

Semedo, R.J.C.; Barbosa, R.I. 2007. Árvores frutíferas nos quintais urbanos de Boa Vista, Roraima, Amazônia brasileira. *Acta Amazonica*, 37:4.

Smalla, K.; Wieland, G.; Buchner, A.; Zock, A.; Parzy, J.; Kaiser, S.; Roskot, N.; Heuer, H.; 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*, 67:4742-4751.

Sombroek, W.; Ruivo, M.L.; Fearnside, P.M.; Glaser, B.; Lehmann, J. 2003. Amazonian dark earths as carbon stores and sinks. In: Lehmann, J.; Kern, D.C.; Glaser, B.; Woods, W.I. (Ed). *Amazonian dark earths: origin, properties & management*. Dordrecht: Kluwer Academic Publ., p. 125-139.

Souza, A. das G. C. de; Sousa, N. R.; Silva, S. E. L. da; Nunes, C. D. M.; Canto, A. do C.; Cruz, L. A. de A. 1996. *Fruteiras da Amazônia*. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI; Manaus: EMBRAPA-CPAA, Biblioteca Botânica Brasileira, v. 1, 204p.

Souza, R.C.de; Hanada, R.E. Cannavan, F.; Tsai, S.M. 2013. Estrutura das comunidades bacterianas em rizosfera de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. de terra preta da Amazônia. III Congresso Nacional de Feijão Caupi, abril. Anais do congresso, Recife.

Sposito, G.; Zabel, A. 2003. The assessment of soil quality. *Geoderma: Na International Journal of Soil Science*, 114(3/4):143-144.

Stackebrandt, E.; Murray, R.G.E.; Trüper, H.G. 1988. Proteobacteria classis nov., a Name for the Phylogenetic Taxon That Includes the Purple Bacteria and Their Relatives. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 38(2):321-325.

Steenwerth, K.L.; Jackson, L.E.; Calderon, F.J.; Stromberg, M.R.; Scow, K.M. 2002. Soil microbial community composition and land use history in cultivated and grassland ecosystems of coastal California. *Soil Biology and Biochemistry*, 34:1599-1611.

SUFRAMA, 2003. Superintendência da Zona Franca de Manaus, 2003. Potencialidades Regionais: Estudo da viabilidade econômica do Açaí (www.suframa.gov.br/suframa_publicacao_noticias). Acesso 14/09/2009.

SUFRAMA, 2007. Com valor agregado, açaí "revolucionaria" a pequena Codajás. (www.suframa.gov.br/suframa_publicacao_noticias). Acesso 14/09/2009.

Ter Braak, C. J. F.; Smilauer, P. 2002. *CANOCO Reference manual and CanoDraw for Windows user's guide: Software for Canonical Community Ordination* (version 4.5). Ithaca, Microcomputer Power, 500p.

Thies, J. E. 2004. Eco-biological soil assessment: Analytical approaches through molecular methods. *Proceedings of I International Conference: Soil and compost ecology*. September, León, Spain, p. 15-17.

Torsvik, V.; Daae, F.L.; Sandaa, R.A.; Ovreas, L. 1998. Novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology*, 64:53-52.

Torsvik, V.; Ovreas, L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5(3):240-245.

Trüper, H.G. 1992. Prokaryotes: an overview with respect to biodiversity and environmental importance. *Biodiversity and Conservation*, 1(2):227-236.

Uhl, N.W.; Dransfield, J. 1987. *Genera Palmarum: A Classification of Palms Based on the Work of Harold E. Moore, Jr.* Allen Press, Lawrence, Kansas.

Vallaey, T.; Topp, E.; Muyzer, G.; Macheret, V.; Laguerre, G.; Rigaud, A.; Soulas, G. 1997. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 24:279-285.

- Van Leeuwen J.; Gomes, J.B.M. 1995. O pomar caseiro na região de Manaus, Amazonas, um importante sistema agroflorestal tradicional. In: *Actas II Encontro da Sociedade Brasileira de Sistemas de Produção*. Londrina: IAPAR, p.180-189.
- Vasconcelos, M. N. L.; Silva, M. L.; Maia, J. G. S.; Gottlieb, O. R. Estudo químico das sementes do cupuaçu. *Acta Amazônica*, 3(5):293-295, 1975.
- Venter, J.C.; Remington, K.; Heidelberg et al. 2004. Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 304:66–74.
- Venturieri, G.A. 1993. *Cupuaçu: a espécie, sua cultura, usos e processamento*. Belém: Clube do Cupu. 108p.
- Venturieri, G.A.; J.P.L. Aguiar. 1988. Composição do chocolate de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). *Acta Amazônica*, 18:3-8.
- Viana, V.M.; Dubois, J.C.L.; Anderson, A. A importância dos Sistemas Agroflorestais para a Amazônia. In: REBRA/ FUNDAÇÃO FORD (ed.). *Manual agroflorestal para a Amazônia*, Rio de Janeiro: REBRA, v.1, 1996.
- Villachica, H. 1996. Cultivo del pijuayo (*Bactris gasipaes* Kunth) para palmito em la Amazonia. Lima, TCA-Secretaria Pro-tempore, 153p.
- Walker, I.; Franken, W. 1983. Ecosistemas frágeis: a floresta da terra firme da Amazônia Central. *Ciencia Interamericana*, 23:9-21.
- Ward, D.M.; Bateson, M.M.; Weller, R.; Ruff-Roberts, A.L. 1992. Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. *Advances in Microbial Ecology*, 12:219-286.
- Woese, C.R, Fox, G.E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci*, 74(11):5088-90.
- Woese, C.R.; Olsen, G. J.; Ibba, M.; Soll, D. 2000. Aminoacyl- tRNA synthetases, the genetic code, and the evolutionary process. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64:202–236.

Woods, W.I.; McCann, J.M. 1999. Anthropogenic origin and persistence of Amazonian dark earths. Yearbook, *Conference of Latin Americanist Geographers*, 25:7-14.

Xavier, G.R.; Silva, F.V.; Zilli, J.E.; Rumjanek, N.G. 2004. *Adaptação de método para extração de DNA de microrganismos associados a raízes de plantas*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. Embrapa Agrobiologia. Documentos, v. 171, 24p.

Yabuuchi, E.; Kosako, Y.; Oyaizu, H.; Yano, I.; Hotta, H.; Hashimoto, Y.; et al. 1992 Proposal of Burkholderia gen nov. and transfer of seven species of the genus Pseudomonas homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol Immunol*, 36:1251-1275.

Yuyama, K.; Chávez F. W. B.; Clement, C. R. 2002. Pupunheira. In: Bruckner, C.H. (Ed.) *Melhoramento de Fruteiras Tropicais*. Viçosa, UFV. p.411-422.

Yuyama, K.; Flores, W. B. C.; Pereira, B. G.; Silva, I. A. Efeito da densidade de plantas e da adubação NPK na Produção Inicial de Palmito de Pupunheira. 2005. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*, 29:373-378.

Yuyama, L. K. O.; Aguiar, J. P. L.; Yuyama, K.; Clement, C. R.; Macedo, S.H.; Fávaro, D.I.T.; Afonso, C.; Vasconcellos, M.B.A.; Pimentel, S.A.; Badolato, E.S.G.; Vannucchi, H. 2003. Chemical composition of the fruit mesocarp of three peach palm (*Bactris gasipaes*) populations grown in Central Amazonia, Brazil. *International Journal Of Food Sciences And Nutrition*, 54:49-56.

Zilli, J.E.; Rumjanek, N.G.; Xavier, G.R.; Coutinho, H.L.C.; Neves, M.C.P.N. 2003. Diversidade microbiana como indicador da qualidade do solo. *Cad. Ci. Tecnol.*, 20:391-411.

Anexo A – Análise e caracterização química dos solos. Atributos químicos analisados: pH, matéria orgânica (MO), P disponível, N total, S, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ trocáveis, Al, soma de bases (SB), T, índice de saturação por bases (V), saturação por alumínio.

RESULTADOS DE ANALISES QUIMICAS DE SOLO																
Amostra		pH	M.O	P	S	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	T	V	m		
Nº. Lab.	Identif.	CaCl ₂	g dm ⁻³	mg dm ⁻³		mmolc dm ⁻³									%	
19499	LA 1	3,6	38	7	11	0,8	2	2	27	109	5,8	114,8	5	82		
19500	LA 2	3,5	36	7	*	0,9	2	2	5	135	4,9	139,9	4	51		
19501	LA 3	3,6	27	7	4	0,8	3	2	5	109	5,8	114,8	5	15		
19502	LA 4	3,4	33	8	5	0,8	2	1	2	150	3,8	153,8	2	34		
19503	LA 5	3,6	35	9	4	0,9	4	2	3	135	6,9	141,9	5	30		
19504	LA 6	3,6	26	6	7	0,6	3	1	5	109	4,6	113,6	4	52		
19505	TP1	3,7	33	10	4	1,0	6	3	9	98	10,0	108,0	9	47		
19506	TP2	4,0	47	15	4	1,0	17	7	7	88	25,0	113,0	22	22		
19507	TP3	3,9	47	15	6	0,9	11	11	2	80	22,9	102,9	22	8		
19508	TP4	3,9	39	13	8	0,6	21	14	1	72	35,6	107,6	33	3		
19509	TP5	3,8	35	15	5	0,6	13	11	1	80	24,6	104,6	24	4		
19510	TP6	3,8	38	9	6	0,7	11	6	29	72	17,7	89,7	20	62		
19511	LP1	3,7	40	9	5	0,5	3	1	32	98	4,5	102,5	4	88		
19512	LP2	3,8	49	11	7	0,7	3	3	33	109	5,7	114,7	5	85		
19513	LP3	3,7	32	7	5	0,6	3	1	36	98	4,6	102,6	4	89		
19514	LP4	3,9	54	44	6	0,5	8	2	34	98	10,5	108,5	10	76		
19515	LP5	3,7	60	7	3	0,4	5	2	27	121	7,4	128,4	6	78		
19516	LP6	3,7	30	6	4	0,6	2	1	25	98	3,6	101,6	4	87		

19517	TC1	3,7	36	13	5	1,6	12	5	9	121	18,6	139,6	13	33
19518	TC2	3,7	32	7	4	0,6	5	1	8	109	6,6	115,6	6	55
19519	TC3	3,7	24	7	4	0,7	2	1	6	98	3,7	101,7	4	64
19520	TC4	3,6	32	7	3	0,7	2	1	11	121	3,7	124,7	3	75
19521	TC5	3,4	25	8	4	0,6	5	2	40	150	7,6	157,6	5	84
19522	LC1	4,2	33	55	9	7	17	16	5	58	40	98	41	11
19523	LC2	3,8	53	37	9	5,3	15	11	12	80	31,3	111,3	28	28
19524	LC3	3,7	36	13	5	1,9	14	7	19	72	22,9	94,9	24	45
19525	LC4	3,7	46	7	6	5,0	11	9	16	88	25	113,0	22,0	39
19526	LC5	3,5	40	12	8	1,3	5	3	29	98	9,3	107,3	9,0	76
19527	LC6	3,5	30	5	5	1,1	6	3	30	121	10,1	131,1	8	75
19528	TA1	3,6	47	7	6	0,8	5	3	21	121	8,8	129,8	7	70
19529	TA2	3,8	36	8	10	1	2	3	16	98	6	104	6	73
19530	TA3	3,6	43	10	12	0,7	3	2	18	98	5,7	103,7	5	76
19531	TA4	3,7	48	12	7	1	4	3	19	98	8	106	8	70
19532	TA5	3,8	37	9	9	0,7	3	2	15	98	5,7	103,7	5	72
19533	TA6	3,8	52	13	6	1	3	3	19	98	7	105	7	73

S = Ca (H₂PO₄)₂ 0,01 mol/L (10 ml TFSA/25 mL); (*) Elemento não analisado; (-) Resultado <0,01.

Anexo B – A caracterização química de micronutrientes dos solos (B, Cu, Fe, Mn e Zn).

RESULTADOS DAS ANÁLISES DE MICRONUTRIENTES						
Amostra		B	Cu	Fe	Mn	Zn
Nº. Lab.	Identif.	mg dm ⁻³				
19499	LA 1	*	-	193	1,4	0,3
19500	LA 2	0,29	-	150	0,8	0,7
19501	LA 3	037	-	149	0,9	2,6
19502	LA 4	0,31	-	171	0,6	0,5
19503	LA 5	0,36	4	170	0,8	0,2
19504	LA 6	0,24	-	101	0,5	0,2
19505	TP1	0,27	-	124	3,5	10,3
19506	TP2	0,21	0,1	193	6,2	2,0
19507	TP3	0,18	-	195	3,1	1,0
19508	TP4	0,19	-	188	7,0	1,0
19509	TP5	0,21	-	220	2,9	1,0
19510	TP6	0,17	-	202	3,9	1,1
19511	LP1	0,23	-	87	0,4	0,2
19512	LP2	0,19	-	43	0,9	0,3
19513	LP3	0,28	-	107	0,5	0,4
19514	LP4	0,22	-	50	0,6	0,1
19515	LP5	0,23	-	99	0,5	0,1
19516	LP6	0,23	-	99	0,4	0,1
19517	TC1	0,25	0,3	184	1,4	1,0
19518	TC2	0,26	-	129	0,8	0,2
19519	TC3	0,23	-	88	0,6	0,2
19520	TC4	0,33	-	135	0,9	0,3
19521	TC5	0,36	-	165	1,3	0,6
19522	LC1	0,14	0,5	344	3,0	2,0
19523	LC2	0,21	-	195	4,5	1,6
19524	LC3	0,25	0,2	163	2,5	0,6
19525	LC4	0,24	-	222	2,6	0,5
19526	LC5	0,25	0,5	166	1,1	0,5
19527	LC6	0,25	-	195	1,4	0,3
19528	TA1	0,36	-	101	1,0	0,4
19529	TA2	0,31	-	103	0,8	0,2
19530	TA3	0,29	-	109	0,7	-
19531	TA4	0,23	-	91	0,7	0,2
19532	TA5	0,23	-	59	0,8	0,2
19533	TA6	0,26	-	140	1,2	0,2

Método utilizado: Cu, Fe, Mn, Zn – DTPA – TEA; pH 7,3; B: BaCl₂.2H₂O 0,125% micro-ondas (10 MI TFSA/20mL BaCl₂ 0,125%); (*) Elemento não analisado; (-) Resultado <0,01.

ANEXO C – Concentração

de nitrogênio (N) nas

amostras de solo.

1305	LA 1	2352
1306	LA 2	2408
1307	LA 3	1876
1308	LA 4	2352
1309	LA 5	2010
1310	LA 6	1708
1311	TP1	2100
1312	TP2	2097
1313	TP3	2106
1314	TP4	2016
1315	TP5	2044
1316	TP6	2156
1317	LP1	2159
1318	LP2	2436
1319	LP3	1792
1320	LP4	2548
1321	LP5	2100
1322	LP6	1820
1323	TC1	2324
1324	TC2	2044
1325	TC3	1652
1326	TC4	1848
1327	TC5	2072
1328	LC1	2856
1329	LC2	3528
1330	LC3	2408
1331	LC4	2744
1332	LC5	2324
1333	LC6	2184
1334	TA1	2520
1335	TA2	2016
1336	TA3	1848
1337	TA4	2408
1338	TA5	1904
1339	TA6	2156
