

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

TESE

Efeito de Cultivares de Batata e de Agrotóxicos
Sobre os Perfis de rDNA de Comunidades
Bacterianas do Solo

Enderson Petrônio de Brito Ferreira

2006



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

**EFEITO DE CULTIVARES DE BATATA E DE AGROTÓXICOS SOBRE
OS PERFIS DE rDNA DE COMUNIDADES BACTERIANAS DO SOLO**

ENDERSON PETRÔNIO DE BRITO FERREIRA

Sob a Orientação da Dra.
Norma Gouvêa Rumjanek

e Co-orientação do Dr.
Gustavo Ribeiro Xavier

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em
Ciências**, no curso de Pós-Graduação
em Fitotecnia, Área de Concentração
em Produção Vegetal.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2006

631.46
F383e
T

Ferreira, Enderson Petrônio de Brito,
1973-

Efeito de cultivares de batata e de agrotóxicos sobre os perfis de rDNA de comunidades bacterianas do solo / Enderson Petrônio de Brito Ferreira. – 2006.

81 f. : il.

Orientador: Norma Gouvêa Rumjanek.
Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia.

Bibliografia: f. 72-81.

1. Biologia do solo - Teses. 2. Microorganismos do solo - Teses. 3. Solos - Teor de pesticidas - Teses. 4. Plantas - Efeito dos fungicidas - Teses. I. Rumjanek, Norma Gouvêa, 1953- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Agronomia. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

ENDERSON PETRÔNIO DE BRITO FERREIRA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de Concentração em Produção Vegetal.

TESE APROVADA EM: 22/02/2006

Norma Gouvêa Rumjanek, Ph.D. Embrapa Agrobiologia
Orientadora

André Nepomuceno Dusi, Ph.D. Embrapa Hortaliças

Antônio Carlos de Souza Abboud, Ph.D. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Claudia Miranda Martins, Dra. Universidade Federal Rural do Semi-Árido

Manlio Silvestre Fernandes, Ph.D. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Dedico aos meus pais e a toda minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom maior da vida;

Aos meus pais, pelas pessoas batalhadoras e maravilhosas que são, por nunca terem deixado de acreditar na possibilidade de realização deste objetivo e por terem, de maneira incondicional, apoiado e incentivado todos os passos até aqui;

Aos meus irmãos, que mesmo de longe nunca deixou faltar o carinho, a amizade e a força para seguir em frente;

A Marcela Motta Drechsel pelo carinho, companheirismo e cumplicidade em todos os momentos;

Aos meus orientadores, Dra. Norma Gouvêa Rumjanek e Dr. Gustavo Ribeiro Xavier, meu muito obrigado pela paciência e pelas orientações;

Ao Dr. André Nepomuceno Dusi, pesquisador da Embrapa Hortaliças, por ceder as amostras de solo e as cultivares de batata utilizadas nos experimentos;

Aos companheiros e companheiras do laboratório de Ecologia Microbiana, Flávia, Cláudia, José Roberto, Jerri, Glória, Wardsson, Paulo Ivan, Samuel, Alanir, Raquel, Anelise, Adriano, Marcela Aboim, Mazinho e D. Terezinha, pela convivência diária e grande ajuda nas horas críticas;

Aos (às) amigos (as): Eli Lino, Márcio Pimentel, Alejandro, Rosângela Stralio, Lúcia Boddey, Luciana Silva, Luciano Toledo, Diego Mureb, Marivaine, Patrícia, Claudia Pozzi, Marilene, Roberto, Fábio, Guilherme, Roriz, Thiago, Pércles, Antônio, Ricardinho, Diego, Roberta, Silvia, Joventino, Ilzo, Flávio Kubota, Flávio Cordeiro, Luz Jimenez, Marinete, e Elias, obrigado por tudo;

A todos os funcionários da Embrapa Agrobiologia, em especial a João Luiz pelas incontáveis ocasiões em que se mostrou sempre disposto e disponível para resolver todos os problemas de falta de material e mão-de-obra, meu muito obrigado;

Ao Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, CAPES, FINEP, Embrapa Agrobiologia e Embrapa Hortaliças pelos suportes acadêmico, técnico, material e financeiro;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, meu sincero **MUITO OBRIGADO**.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Enderson Petrônio de Brito Ferreira, nascido em 29 de novembro de 1973 na cidade de Aracaju-SE, filho de Pedro Ferreira Neto e Maria Engracinda de Brito Ferreira, concluiu o 2º Grau no ano de 1991, na Escola Agrotécnica Federal de São Cristóvão (SE), formando-se em Técnico em Agropecuária. De março a junho de 1991 foi estagiário do CNPCôco, atual Embrapa Tabuleiros Costeiros. Ingressou no curso de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no ano de 1995, concluindo o referido curso em dezembro de 1999. Foi bolsista de Iniciação Científica do CNPq de outubro de 1996 a fevereiro de 2000, desenvolvendo suas atividades de pesquisa na Embrapa Agrobiologia, sob a orientação das Dras. Maria Cristina Prata Neves e Norma Gouvêa Rumjanek. Ingressou no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em março de 2000 sob a orientação das Dras. Maria Cristina Prata Neves e Norma Gouvêa Rumjanek, defendendo a Dissertação de Mestrado em fevereiro de 2002. Em março de 2002 ingressou no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob a orientação de Dra. Norma Gouvêa Rumjanek e Dr. Gustavo Ribeiro Xavier, tendo defendido a Tese de Doutorado em fevereiro de 2006.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 A Cultura da Batata (<i>Solanum tuberosum</i> L.).....	4
2.1.1 Dados históricos	4
2.1.2 A produção mundial de batata	4
2.1.3 A cultura da batata no Brasil	4
2.1.4 Aspectos botânicos	5
2.1.5 Necessidades climáticas	6
2.1.6 Microrganismos associados à cultura da batata (<i>Solanum tuberosum</i> L.).....	6
2.1.7 Principais cultivares de importância no Brasil	7
2.1.8 Características morfológicas e agrônômicas das principais cultivares de batata plantadas no Brasil	7
2.2 Principais Doenças da Cultura da Batata	8
2.2.1 Problemas fitossanitários	8
2.2.1.1 Principais doenças bacterianas da batata	9
2.2.1.2 Principais doenças fúngicas da batata	9
2.2.1.3 Principais viroses fitopatogênicas da batata	10
2.3 Tratamento Fitossanitário Adotado Para a Cultura da Batata no Brasil	11
2.3.1 Principais princípios ativos de inseticidas utilizados na cultura da batata no Brasil	12
2.3.1.1 Aldicarb	12
2.3.1.2 Clorpirifós	13
2.3.1.3 Deltametrina	13
2.3.2 Principais princípios ativos de fungicidas utilizados na cultura da batata no Brasil	15
2.3.2.1 Metalaxil	15
2.3.2.2 Mancozeb	15
2.3.2.3 Tebuconazole	16
2.4 Estudos de Ecologia Microbiana Usando Marcadores Moleculares	16
CAPÍTULO I INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CULTIVARES DE BATATA (<i>Solanum tuberosum</i> L.) NA COMUNIDADE BACTERIANA ASSOCIADA AO RIZOPLANO	18
RESUMO	19
ABSTRACT	20
3.1 INTRODUÇÃO	21
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.2.1 Desenvolvimento de Marcador de Posição de Bandas Para Gel de DGGE	23
3.2.2 Coleta do Solo e Instalação dos Experimentos	23
3.2.3 Coleta das Raízes e Extração de Células do Rizoplano	23
3.2.4 Extração de DNA	24
3.2.5 Condições da PCR e DGGE	24
3.2.6 Análise Estatística	25
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
3.3.1 Marcador de Posição de Bandas Para Gel de DGGE	26
3.3.2 Efeito das Diferentes Cultivares na Comunidade Bacteriana Associada ao Rizoplano de Batata	27
3.3.2.1 Perfis da comunidade bacteriana visualizados em gel de DGGE	27

3.3.2.2	Análise por dendrogramas de similaridade do efeito das diferentes cultivares sobre a comunidade bacteriana associada ao rizoplaneo	28
3.3.2.3	Análise por PCA do efeito das diferentes cultivares sobre a comunidade bacteriana associada ao rizoplaneo	33
3.4	CONCLUSÕES	36

CAPÍTULO II ALTERAÇÕES NA COMUNIDADE BACTERIANA DO SOLO CULTIVADO COM BATATA (*Solanum tuberosum* L.) EM RESPOSTA À APLICAÇÃO DE AGROTÓXICOS

	RESUMO	38
	ABSTRACT.....	39
	4.1 INTRODUÇÃO.....	40
	4.2 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.2.1	Coleta do Solo e Instalação dos Experimentos	42
4.2.2	Desenvolvimento de Meio de Cultivo Para Microrganismos do Solo	42
4.2.3	Enriquecimento da Comunidade Microbiana em Meio Solo	43
4.2.4	Extração de DNA	43
4.2.5	Condições da PCR e DGGE	43
4.2.6	Análise Estatística	44
	4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.3.1	Preparo do Meio Solo e Enriquecimento Microbiano	45
4.3.2	Efeito dos Agrotóxicos na Comunidade Bacteriana do Solo	45
4.3.2.1	Perfis da comunidade bacteriana do solo visualizados em gel de DGGE	45
4.3.2.2	Análise por dendrogramas de similaridade do efeito da aplicação de inseticidas e fungicidas sobre a comunidade bacteriana do solo	50
4.3.2.3	Análise por PCA do efeito da aplicação de inseticidas e fungicidas sobre a comunidade bacteriana do solo	59
4.3.2.4	Efeito da aplicação de inseticidas e fungicidas sobre a comunidade bacteriana do solo a partir da similaridade destas comunidades em relação ao controle	62
4.3.3	Comparação dos efeitos da aplicação de Inseticidas e Fungicidas Sobre a Comunidade Bacteriana do Solo Cultivado com Batata	68
	4.4 CONCLUSÕES	70
	5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
	6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Ingredientes ativos, grupos químicos e estrutura dos principais inseticidas e fungicidas utilizados na cultura da batata	12
Tabela 2: Evolução de síntese dos ingredientes ativos e produtos comerciais pertencentes ao grupo dos peretróides	14
Tabela 3: Características morfo-fisiológicas das cultivares de batata utilizadas para o estudo de seus efeitos na comunidade bacteriana associada ao rizoplane	24
Tabela 4: Grupo químico, dose de ingrediente ativo.ha ⁻¹ , modo de aplicação e período de aplicação dos agrotóxicos usados no experimento com batata cv. Achat	43
Tabela 5: Percentual de explicação das informações utilizadas para o agrupamento por PCA das comunidades bacterianas do solo	59
Tabela 6: Quadro de análise de variância da similaridade dos tratamentos em relação ao controle, realizado em delineamento de blocos ao acaso com parcela sub-dividida.....	63
Tabela 7: Percentual de similaridade nas diferentes épocas de coleta em relação ao controle da comunidade bacteriana do solo cultivado com batata e submetida à aplicação de inseticidas e fungicidas	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Produção e produtividade da cultura da batata no Brasil nos últimos 10 anos.....	5
Figura 2:	Gel de DGGE das espécies bacterianas testadas como marcadores de posição de bandas	26
Figura 3:	Géis de DGGE de comunidades bacterianas associadas ao rizoplano de diferentes cultivares de batata.....	28
Figura 4:	Dendrogramas de similaridade representativos de comunidades bacterianas associadas ao rizoplano de diferentes cultivares de batata, construídos a partir da matriz de similaridade gerada pelo coeficiente de Jaccard, utilizando-se o método de UPGMA para agrupamento.....	30
Figura 5:	Dendrogramas de similaridade construídos a partir das características morfo-fisiológicas das diferentes cultivares de batata, gerados pelo coeficiente de Jaccard, utilizando-se o método de UPGMA para agrupamento.....	32
Figura 6:	Agrupamento por PCA das comunidades bacteriana associada ao rizoplano de diferentes cultivares de batata	34
Figura 7:	Gel de DGGE de comunidades bacterianas do solo da área do SIPA crescidas em meio solo, submetida ao tratamento com inseticidas e fungicidas.....	47
Figura 8:	Gel de DGGE de comunidades bacterianas de APC crescida em meio solo, submetida ao tratamento com inseticidas e fungicidas	48
Figura 9:	Gel de DGGE de comunidades bacterianas de AFS crescidas em meio solo, submetida ao tratamento com inseticidas e fungicidas	49
Figura 10:	Dendrogramas de similaridade representativos das comunidades bacterianas do solo do SIPA cultivado com batata submetida à aplicação de inseticidas, construídos a partir da matriz de similaridade gerada pelo coeficiente de Jaccard, utilizando-se o método de UPGMA para agrupamento.....	52
Figura 11:	Dendrogramas de similaridade representativos das comunidades bacterianas do solo de APC cultivado com batata submetida à aplicação de fungicidas, construídos a partir da matriz de similaridade gerada pelo coeficiente de Jaccard, utilizando-se o método de UPGMA para agrupamento.....	53
Figura 12:	Dendrogramas de similaridade representativos das comunidades bacterianas do solo de AFS cultivado com batata submetida à aplicação de inseticidas, construídos a partir da matriz de similaridade gerada pelo coeficiente de Jaccard, utilizando-se o método de UPGMA para agrupamento.....	54
Figura 13:	Dendrogramas de similaridade representativos das comunidades bacterianas do solo do SIPA cultivado com batata submetida à aplicação de fungicidas, construídos a partir da matriz de similaridade gerada pelo coeficiente de Jaccard, utilizando-se o método de UPGMA para agrupamento.....	56
Figura 14:	Dendrogramas de similaridade representativos das comunidades bacterianas do solo de APC cultivado com batata submetida à aplicação de fungicidas, construídos a partir da matriz de similaridade gerada pelo coeficiente de Jaccard, utilizando-se o método de UPGMA para agrupamento.....	57
Figura 15:	Dendrogramas de similaridade representativos das comunidades bacterianas do solo de AFS cultivado com batata submetida à aplicação de fungicidas, construídos a partir da matriz de similaridade gerada pelo coeficiente de Jaccard, utilizando-se o método de UPGMA para agrupamento.....	58

Figura 16: Agrupamento por PCA das comunidades bacterianas do solo cultivado com batata submetidas à aplicação de inseticidas.....	60
Figura 17: Agrupamento por PCA das comunidades bacterianas do solo cultivado com batata submetidas à aplicação de fungicidas.....	61
Figura 18: Regressão da similaridade das comunidades bacterianas do solo cultivado com batata submetida à aplicação dos diferentes inseticidas e fungicidas, em relação ao controle, nos diferentes solos, em função das diferentes coletas.....	67

LISTA DE ABREVIACÕES

16S	Subunidade 16S do ribossomo;
18S	Subunidade 18S do ribossomo;
16S rRNA	Gene que codifica a subunidade 16S do ribossomo;
18S rRNA	Gene que codifica a subunidade 18S do ribossomo;
A	Adenina;
AFS	Área de floresta secundária;
APC	Área de produção comercial;
ARDRA	Restrição de DNA Ribossomal Amplificado;
C	Citosina;
DAE	Dias após a emergência;
DAP	Dias após o plantio;
DNA	Ácido deoxirribonucléico;
DGGE	Eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes;
FBN	Fixação biológica do nitrogênio;
G	Guanina;
LPS	Lipopolissacarídeos;
P	Fósforo;
PCA	Análise de componentes principais;
PCR	Reação em cadeia da polimerase;
PEC	Proteínas do envelope celular;
<i>phlD</i>	Gene que codifica o antibiótico 2,4 diacetilfloroglucinol;
PVY	<i>Potato vírus Y</i> ;
RAPD	Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso;
rDNA	DNA ribossomal;
RISA	Análise do Espaçador Intergênico Ribossomal;
RNA	Ácido ribonucléico;
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal;
SIPA	Sistema integrado de produção agroecológica;
SSCP	Polimorfismo Conformacional da Fita Simples;
T	Timina;
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i> ;
T-RFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição Terminal.

RESUMO GERAL

FERREIRA, Enderson Petrônio de Brito. **Efeito de cultivares de batata e de agrotóxicos sobre os perfis de rDNA de comunidades bacterianas do solo.** Seropédica, UFRRJ, 83p. (Tese, Doutorado em Fitotecnia, Produção Vegetal)

A agricultura mundial tem passado por grandes transformações ao longo dos anos em função da necessidade de produzir quantidades crescentes de alimento, suprir as deficiências nutricionais e/ou condições de cultivo dos solos agrícolas, necessidade de agregar maior produtividade às cultivares, livrar as culturas de pragas e doenças e promover maior sustentabilidade à atividade agrícola. As mudanças ocorridas nas práticas agrícolas têm levado a uma queda na qualidade do solo e em mudanças na comunidade microbiana do solo cuja manipulação, através de práticas de manejo do solo e das culturas, é uma estratégia básica para o desenvolvimento da sustentabilidade dos sistemas agrícolas. No entanto, o uso intensivo do solo não necessariamente afeta negativamente algumas propriedades do solo, como biomassa e atividade microbiana, mas suas conseqüências dependem principalmente das práticas agrícolas adotadas que alteram a qualidade e a quantidade dos resíduos vegetais adicionados ao sistema ou pelo uso de compostos orgânicos. Por outro, a aplicação de agrotóxicos, como inseticidas e fungicidas, nem sempre tem recebido a devida atenção em relação aos efeitos sobre a microbiota do solo. Esta tese teve por objetivo avaliar os efeitos da aplicação de agrotóxicos e o uso de diferentes cultivares sobre a comunidade bacteriana do solo. O uso de diferentes cultivares de batata mostrou que a estrutura da comunidade bacteriana associada ao rizoplane de diferentes cultivares de batata sofreu mudanças, tanto entre as cultivares quanto em relação às épocas de coleta, em que as mudanças observadas nesta comunidade foram fortemente influenciadas pelas características morfo-fisiológicas intrínsecas das cultivares. Foi observada uma diminuição na discriminação entre as comunidades bacterianas associadas ao rizoplane das diferentes cultivares à medida que as plantas atingiram o final do ciclo. A aplicação dos inseticidas e fungicidas resultou em uma sucessão bacteriana pela qual as populações bacterianas foram mais homogêneas nas terceira e quarta coletas, em comparação com as 2 primeiras coletas, não tendo sido observados efeitos significativos para a aplicação dos agrotóxicos. Por causa disto, foi observada mudanças significativa na comunidade bacteriana apenas nas 2 primeiras coletas. O efeito dos inseticidas e fungicidas dentro de cada solo foi muito específico, variando nas primeira e segunda coletas. Entretanto, a comunidade bacteriana do solo de área de produção convencional mostrou a maior diferença para a comunidade bacteriana do controle. O efeito da aplicação dos inseticidas na comunidade bacteriana dos diferentes solos foi muito similar, enquanto que o efeito dos fungicidas foi característico para cada um, provavelmente em função de seus efeitos diretos sobre o grupo dos fungos que apresentam uma relação estreita com a comunidade bacteriana do solo. As comunidades bacterianas dos solos do sistema integrado de produção agroecológica e de área de floresta secundária mostraram as menores variações em relação à comunidade bacteriana do controle, indicando uma maior resistência à aplicação dos agrotóxicos associada a estes solos. Contudo, a comunidade bacteriana do solo de área de floresta secundária mostrou maior resistência à aplicação dos agrotóxicos do que a comunidade bacteriana do solo do sistema integrado de produção agroecológica. A técnica de PCR-DGGE se mostrou bastante eficiente na determinação dos efeitos de inseticidas e fungicidas sobre a comunidade bacteriana do solo.

Palavras-chave: Biologia do solo, microrganismos do solo, marcador molecular, agrotóxicos.

GENERAL ABSTRACT

FERREIRA, Enderson Petrônio de Brito. **Effect of potato cultivars and pesticides application on the rDNA profiles of soil bacterial communities**. Seropédica, UFRRJ, 83p. (Thesis, Doctorate, Plant Sciences)

The increase sustainability of the agricultural activity has made agriculture to change along the years to allow increasing crop yield by supplying nutritional deficiency and/or cropping conditions of soils and by cleaning-off crops from pests and diseases. This changes nevertheless have lead to a break-down in soil quality followed by shifts on the soil microbial community, which is strongly related to soil sustainability. However, the intensive use of the soil not necessarily affects negatively some soil properties such as, microbial biomass and activity, which is more a matter of the agricultural practices adopted which may modify the quality and quantity of the vegetal residue incomes or the use or not of organic composts. Furthermore, the studies aiming to comprehend the effects of agrochemicals, as insecticides and fungicides, on soil microorganism communities still show a lack of knowledge which may help on the design of strategies to develop agricultural systems aiming to achieve sustainable agriculture. This thesis has as objective to evaluate the effects of agriculture practices on the soil bacterial community. Two situations were chosen to be analyzed: application of agrochemicals and, the use of different cultivars. The results showed that the variation of rhizoplane bacterial community was due to both, cultivar and plant age. Differences on the bacterial community associated to each cultivars seem to be a result from intrinsic physiological characteristics of the cultivar. Remarkable differences among rhizoplane bacterial community were found at the earliest plant age, tending to decrease at the later stages. The application of the insecticides and fungicides resulted in a bacterial succession in which the bacterial populations were more homogeneous in both third and fourth harvests, compared to the first and second ones, without significant effects to the pesticides application. Because of that, it was observed significant shifts on bacterial community only in the first and second harvests and they were far from the third and fourth harvests. The effects of insecticides and fungicides within each soil were very specific with effects varying in the both first and second harvests. However, the soil bacterial community of the conventional potato production area showed the greatest difference to the control. The effect of insecticide application on the soil bacterial community of the different soils was very similar, while the effects of fungicides were characteristic for each one, probably by their effects on fungi groups closely related to the bacterial communities. Bacterial communities from both agroecological integrated production system and secondary forest area soils showed the lowest shifts in relation to the control, indicating greater resistance in these soils. However, the soil bacterial community from secondary forest area showed greater resistance to the pesticides application than the soil bacterial community from agroecological integrated production system. The PCR-DGGE based method showed to be reliable to evaluate the impacts of different pesticides application on the soil bacterial communities.

Key-words: Soil biology, soil microorganisms, molecular marker, pesticides.

1 INTRODUÇÃO GERAL

A microbiota é parte integrante do solo e sua atividade é condicionante para o funcionamento e manutenção da sustentabilidade dos ecossistemas. Esses componentes têm sido propostos como bioindicadores da qualidade do solo pois devido à sua capacidade de responder rapidamente às mudanças ambientais, vêm sendo utilizados nos estudos de monitoramento dos efeitos antrópicos no ambiente. No entanto, avaliar a qualidade do solo e converter a informação obtida em um parâmetro relevante para o monitoramento desse marcador, são ainda desafios a serem alcançados (WINDING et al., 2005). Em parte, tais desafios podem estar relacionados ao fato dos microrganismos estarem presentes de maneira heterogênea e atuando no solo em vários nichos diferentes, como agentes fundamentais na decomposição da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes, além de atuarem exercendo diversas outras funções ecológicas nos agroecossistemas (PASCOAL & CÁSSIO, 2004; BAGINSKY et al., 2005).

A população da microbiota do solo, também interage ativamente com a comunidade vegetal via o reconhecimento de exsudados vegetais e síntese de sinais moleculares capazes de intermediar interações inter e intra-específicas (NAGAHASHI & DOUDS, 2003; WASAKI et al., 2005). Ainda assim, existe pouca informação sobre a ecologia desses microrganismos e sua interação com plantas em outros processos de importância agrícola. Além disso, outro desafio diz respeito à diversidade da fração microbiana do solo. Segundo TORSVIK & ØVREÅS (2002), os microrganismos estão presentes no solo em uma concentração de aproximadamente $4,4 \times 10^{10}$ células por grama de solo. Recentemente, através da aplicação de novos modelos matemáticos que estimam a diversidade bacteriana e que são mais apropriados para determinar a contribuição de espécies raras do que os métodos descritos anteriormente, GANS et al. (2005) concluíram que em áreas de ecossistema não impactado, o número total de tipos de DNA pode chegar a $8,3 \times 10^6$ diferentes genomas por grama de solo. Considerando que apenas uma pequena parte da diversidade microbiana pode ser cultivada, em torno de 1 a 10% do total dos microrganismos do solo (COWAN, 2000), é possível que existam muitas outras funções desempenhadas pelos microrganismos que ainda não são conhecidas.

O cenário atual indica que, por sua relação íntima com a necessidade de segurança, o desenvolvimento da biotecnologia agropecuária, como o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas, por exemplo, deverá seguir uma rota diferenciada de outros setores industriais que não têm essa característica. Via de regra, o desenvolvimento de qualquer indústria nascente enfatiza principalmente questões de mercado. A biotecnologia agropecuária, tem forçosamente que considerar um outro aspecto: informação precisa ao consumidor sobre esta nova tecnologia, utilizando como referência neste processo a mais confiável base científica. Para tanto, metodologias baseadas em marcadores moleculares vêm sendo usadas com bastante sucesso em estudos da diversidade e ecologia de comunidades microbianas independente de seu cultivo, ampliando o conhecimento nessa área.

Os métodos moleculares têm possibilitado avanços na identificação da diversidade de microrganismos presentes no solo e em outros substratos e deverão representar, no futuro, uma forma de aprofundar a melhor compreensão do papel deste componente. Esses estudos são baseados em genes, ou espaços intergênicos, chamados de marcadores moleculares. Atualmente existe um número muito grande de genes que vêm sendo empregados como marcadores moleculares, entre eles o mais usado é o gene que codifica a subunidade 16S do ribossomo (16S rRNA).

Nos primórdios dos estudos de biologia molecular, era necessária a extração de grandes quantidades de DNA para que fossem feitos os estudos, o que se constituía numa das grandes limitações. Desta forma, tornou-se necessário o desenvolvimento de uma tecnologia capaz de aumentar a quantidade do DNA extraído. A partir do conhecimento de que os organismos eram capazes de duplicar seu material genético durante o processo de divisão celular, abriu-se a possibilidade para que o mesmo fosse realizado *in vitro*, tornando o processo conhecido como “reação em cadeia da polimerase” (PCR). A metodologia básica para a realização da PCR foi desenvolvida por Kary B. Mullis, em 1985 e descrita pela primeira vez por SAIKI et al. (1985). A idéia de Mullis era desenvolver um processo pelo qual o DNA poderia ser artificialmente duplicado através de repetidos ciclos de duplicação realizado pela DNA Polimerase. A DNA Polimerase ocorre naturalmente em organismos vivos, onde sua função é duplicar o DNA durante o processo de divisão celular. No processo original da PCR concebido por Mullis, a enzima foi usada *in vitro* e a dupla fita de DNA separada em duas fitas simples por aquecimento a 96 °C. Nesta temperatura a DNA Polimerase era destruída sendo necessário, portanto, recolocar uma nova alíquota da enzima após cada estágio de desnaturação da molécula de DNA em cada ciclo. Desta forma, apesar do processo inicialmente desenvolvido por Mullis ter sido muito ineficiente, pois requeria muito tempo, grande quantidade de DNA Polimerase e muita atenção durante todo o processo da PCR, a utilização de uma enzima termoestável, a *Taq* Polimerase garantiu a otimização do processo e resultou num procedimento amplamente utilizado, que foi capaz de deslançar estudos de biologia molecular em todo o mundo.

Mais recentemente outras abordagens tecnológicas vêm sendo utilizadas. A metodologia de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante, mais conhecida como DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), é uma técnica de eletroforese que utiliza géis de poliacrilamida com gradiente de desnaturante químico. Originalmente foi desenvolvida para detectar mutações específicas no genoma humano e, posteriormente, adaptada para análise da comunidade microbiana (MUYZER et al., 1993).

Esta técnica consiste em uma eletroforese realizada em gel de acrilamida que apresenta um gradiente linear crescente de uréia e formamida capaz de desnaturar a dupla-hélice do DNA, separando moléculas de mesmo tamanho, porém, com diferenças na composição de bases nitrogenadas. A técnica está baseada no princípio de que os pareamentos feitos entre as bases nitrogenadas são complementares ocorrem entre adenina (A) e timina (T) e, citosina (C) e guanina (G). A ligação entre A e T é feita por duas pontes de hidrogênio, enquanto que o pareamento entre C e G é feito por três pontes de hidrogênio (STRYER, 1996). Com isso, o pareamento feito entre A e T é mais facilmente rompido do que aquele feito entre C e G.

Frente a determinada concentração de desnaturante, os fragmentos de DNA estarão com a dupla-hélice completamente aberta, o que reduz a taxa de migração durante a corrida eletroforética, possibilitando que aqueles com menor concentração de C+G tenham sua mobilidade reduzida logo no início do gradiente de desnaturante, enquanto que naqueles com maior concentração de C+G isso só irá ocorrer mais no final do gel, quando a concentração de desnaturante é maior, possibilitando a separação dos fragmentos. As moléculas são separadas de acordo com seus diferentes comportamentos de desnaturação causados pela diferenças em suas seqüências ou pela falta de pareamento nas áreas de mutação (BALOGH et al., 2004). Para tanto é necessário que uma das extremidades da molécula permaneça fechada, funcionando como uma âncora. Para alcançar esse objetivo, é adicionada em um dos iniciadores, usados na reação de PCR, uma seqüência de 40 a 50 pares de bases (pbs) rica em GC, chamada grampo-GC. Cálculos teóricos e análises de um grande número de diferentes mutações indicaram que o uso desse artifício permite que 95% de todas as substituições possíveis de uma única base possam ser separadas no gel de DGGE (MYERS et al., 1985).

Neste contexto, a abordagem metodológica baseada em DGGE tem contribuído para aumentar o conhecimento da estrutura da comunidade microbiana em ambientes naturais. Segundo MUYZER & SMALLA (1998), é uma das técnicas independentes de cultivo mais usadas para o estudo da composição da comunidade de microrganismos, sendo utilizada no estudo da estrutura genética de grupos funcionais (GRIFFITHS et al., 1999), distribuição espacial da população de bactérias (FELSKE & AKKERMANS, 1998) e impacto ambiental na comunidade microbiana do solo (ENGELEN et al., 1998; ZILLI, 2004).

A hipótese científica testada neste trabalho foi que, o perfil de rDNA de bactérias do solo cultivado com batata e/ou associadas ao rizoplano é modificado pelo genótipo da planta (batata) e pelo uso de agrotóxicos (inseticidas e fungicidas). Esta abordagem de estudo é de grande importância uma vez que a batata é uma das culturas geneticamente modificadas que já vem sendo cultivada em alguns países do primeiro mundo. No Brasil, os estudos de transformação já foram iniciados há algum tempo, pelos quais se conseguiu um clone GM tolerante ao *Potato vírus Y*. No entanto, existe a necessidade de gerar conhecimentos a respeito dos efeitos de atividades antrópicas sobre as interações entre a cultura da batata e os microrganismos associados a ela, para que estes conhecimentos sirvam de suporte aos estudos de biosseguranças que deverão ser realizados para a batata GM.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Cultura da Batata (*Solanum tuberosum* L.)

2.1.1 Dados históricos

A batata, também conhecida como batatinha ou batata-inglesa é nativa da Cordilheira dos Andes, onde já era consumida pelas populações nativas há mais de 8.000 anos. Ela teve grande importância na cultura Inca e nas civilizações anteriores (HARRIS, 1992). Foi introduzida na Europa por volta de 1570, através de colonizadores espanhóis, tornando-se um alimento importante, principalmente na Inglaterra. Por volta de 1620 foi levada para a Europa e para a América do Norte, onde, também, tornou-se um alimento muito popular (LOPES, 1997). No século XIX, a batata era o cultivo por excelência da Irlanda, porém, poucas variedades eram cultivadas. Acrescentando-se a isto o fato de que a batata é comercialmente propagada vegetativamente, as culturas apresentavam um alto nível de homogeneidade genética. Em 1845/6 surgiu uma nova raça do fungo patogênico *Phytophthora infestans* que, juntamente com condições climáticas que favoreceram o desenvolvimento do patógeno, causou uma epidemia que destruiu mais de 90% da batata cultivada na Irlanda, o que originou uma fome generalizada, culminando com a morte de aproximadamente um milhão de irlandeses, desencadeando uma onda imigratória em direção aos Estados Unidos. Atualmente a batata é o quarto alimento mais consumido no mundo, superada apenas pelo trigo, arroz e milho (FAO, 2005).

2.1.2 A Produção mundial de batata

A produção mundial de batata no período 1996-1998 passou de 311,2 milhões para 278,9 milhões de toneladas, o que representa um declínio de 10% no triênio, resultante dos decréscimos de 4% na área plantada e de 6% na produtividade (RESENDE et al., 1999). No último triênio, no entanto, houve uma recuperação na produção mundial que passou de 320,5 milhões em 2002 para 328 milhões de toneladas em 2004. Durante este período houve um aumento de apenas 0,44% de área cultivada, no entanto, ocorreu um acréscimo de quase 2% na produtividade da cultura (FAO, 2005).

Atualmente a China é o principal produtor dessa olerícola, sendo responsável por aproximadamente 22% da produção mundial, seguida pela Rússia (11%), Índia (7%) e Estados Unidos (6%). A China também é o país que apresenta a maior superfície cultivada com batata, com uma área plantada de 4,6 milhões de hectares (FAO, 2005).

Quando se considera isoladamente a América do Sul, verifica-se que a produção concentra-se em quatro países: Colômbia, Brasil, Peru e Argentina. Nesta região, o Brasil ocupa o segundo lugar em produção e o terceiro em área cultivada (FAO, 2005).

2.1.3 A Cultura da batata no Brasil

No Brasil, o cultivo mais intenso da batata, juntamente com outras hortaliças, iniciou-se na década de 20, no cinturão verde de São Paulo (LOPES, 1997). Atualmente, a batata é considerada a hortaliça mais importante cultivada no país, tanto em área cultivada como em preferência alimentar, porém é, também, a cultura que apresenta a maior demanda relativa por fertilizantes ($1940 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$), cerca de 5,7 vezes maior do que a soja ($338 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) (ANDA, 2000). Em 2004 foi plantada uma área superior a 138 mil hectares, com uma produção de mais de 2,8 milhões de toneladas e produtividade média acima de 20 toneladas por hectare (FAO, 2005). As lavouras de batata estão presentes desde o Rio Grande do Sul até o Distrito Federal, sendo também encontradas em microclimas da região Nordeste. Em 2004 a cultura foi plantada nos estados da Paraíba, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Paraná,

Santa Catarina, Rio Grande do Sul e no Distrito Federal. Os 3 estados brasileiros maiores produtores de batata são: Minas Gerais, São Paulo e Paraná, que juntos são responsáveis por 80% da produção nacional. Os estados de Minas Gerais e São Paulo apresentaram uma produtividade em torno de 25 ton/ha, um pouco acima da média nacional que é de 20 ton/ha, no entanto a maior produtividade foi encontrada no estado da Bahia com 32 ton/ha (ABBA, 2005). Estados como a Paraíba e o Rio Grande do Sul apresentaram uma produtividade muito baixa, em torno de 10 ton/ha. Essa baixa produtividade resulta, em grande parte, da carência de cultivares adaptadas às condições climáticas e resistentes às doenças típicas da cultura (BISOGNIN, 1996 *apud* BENELLI et al., 2004). As regiões Sul e Sudeste são as principais produtoras, contribuindo com 95,1% da produção nacional (ABBA, 2005). Socialmente a batata é uma importante fonte de emprego no campo, sendo grande a demanda por mão-de-obra em torno da lavoura. Além da importância na zona rural, a comercialização e o processamento da batata são também atividades de forte impacto econômico e social na zona urbana (ÁVILA et al., 1999).

A produção média brasileira de batata dos últimos 10 anos foi de 2,78 milhões de toneladas. Nos últimos 3 anos houve uma queda na produção da cultura, no entanto a produtividade vem apresentando um aumento desde o ano de 1996 (Figura 1). Apesar da área cultivada ter reduzido de 160 para 138 mil hectares, de 2002 a 2004, a produtividade vem se mantendo estável (FAO, 2005).

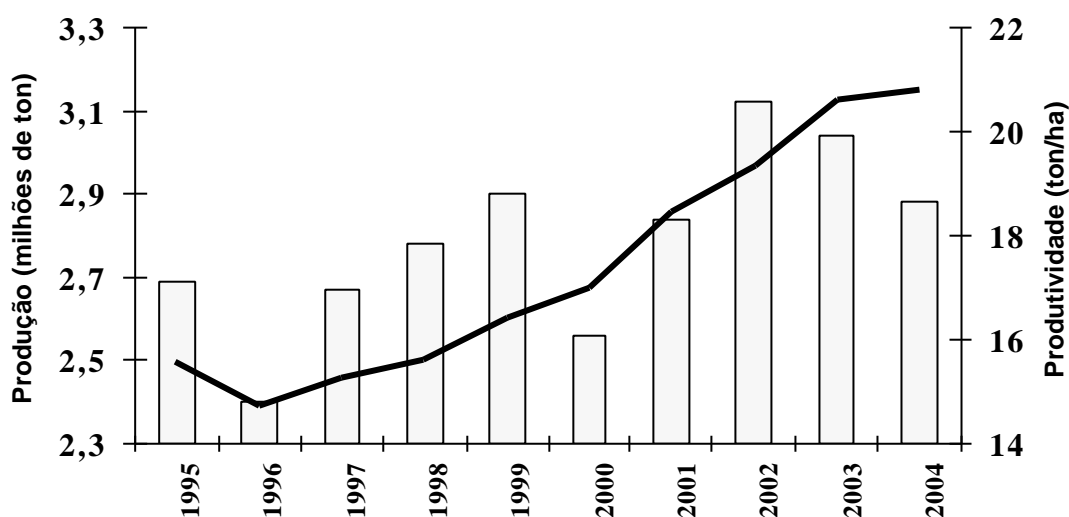


Figura 1: Produção (em milhões de toneladas) e produtividade (toneladas.ha⁻¹) da cultura da batata no Brasil nos últimos 10 anos.

Fonte: FAO (2005)

2.1.4 Aspectos botânicos

A batateira é uma solanácea que apresenta caules eretos, herbáceos e suas raízes originam-se na base desses caules ou hastes. O sistema radicular é delicado e superficial, com raízes concentrando-se até 30 cm de profundidade. Suas folhas são compostas por folíolos arredondados e as flores hermafroditas apresentam-se reunidas em inflorescência no topo da planta. Predomina a autopolinização, que origina um pequeno fruto verde, que contém numerosas sementes minúsculas e viáveis (FILGUEIRA, 2000). Os tubérculos são caules adaptados para reserva de alimentos e também para reprodução, que resultam do engrossamento da extremidade dos estolões, que são caules modificados e subterrâneos, semelhantes a raízes. Entretanto, podem formar-se tubérculos aéreos nas axilas das folhas quando o transporte de substâncias de reserva, sintetizadas nas folhas, é bloqueado por ação mecânica ou pelo ataque de pragas (ÁVILA et al., 1999).

2.1.5 Necessidades climáticas

A batata é classificada como uma cultura de clima temperado, porém cresce nas regiões tropicais com altitude elevada. As maiores produtividades são obtidas em países onde os dias duram de 13 a 17 horas na época de tuberização, com temperaturas médias entre 15 e 18° C e com irrigação (HAEDER & BERINGER, 1983). A cultura é muito sensível ao estresse hídrico, sendo necessário o fornecimento adequado de água desde o início da tuberização até a maturidade (van LOOM, 1981; HANG & MILLER, 1986). As exigências climáticas da cultura são peculiares e precisas, ressaltando-se que o fator limitante é a temperatura elevada, especialmente a temperatura noturna, pois quando esta se mantém acima de 20° C durante 60 noites ou mais, não ocorre a tuberização (EWING, 1997).

2.1.6 Microrganismos associados à cultura da batata (*Solanum tuberosum* L.)

Os exsudados radiculares influenciam seletivamente no crescimento de bactérias e fungos que colonizam a rizosfera, através da alteração das propriedades químicas do solo nas regiões próximas às raízes das plantas, tornando este substrato seletivo ao crescimento destes microrganismos (YANG & CROWLEY, 2000). Baseado nas diferenças dos exsudados radiculares e na rizodeposição em diferentes zonas das raízes, a comunidade microbiana da rizosfera pode variar quanto à estrutura e composição de espécies nas diferentes zonas em relação ao tipo de solo, espécie de planta, estado nutricional, idade, estresse, doença ou outro fator ambiental (MAHAFFEE & KLOPPER, 1997; GRIFFITHS et al., 1999).

GLANDORF et al. (1993) isolaram bactérias do gênero *Pseudomonas* de rizosfera de batata, capim e trigo. Os isolados foram caracterizados pelos padrões de lipopolissacarídeos (LPS) e das proteínas do envelope celular (PEC), tendo sido obtidos cerca de 30 padrões distintos para cada cultura. A maioria dos padrões de LPS e PEC observados foram específicos para cada cultura, sugerindo uma interação preferencial da cultura com certas populações de *Pseudomonas*. BERG et al. (2005) estudaram as diferenças entre as comunidades bacterianas endofíticas e ectofíticas comparando as comunidades isoladas da rizosfera, filosfera e dos tecidos radiculares. Foi observado que a rizosfera e os tecidos radiculares são os principais reservatórios das bactérias antagonistas a *Verticillium dahliae* e *Rhizoctonia solani* com alta similaridade entre as comunidades que as colonizavam, tendo sido encontrada *Pseudomonas putida* como a espécie mais importante colonizando estes microambientes. A presença do gene *phlD*, envolvido na produção do antibiótico 2,4 diacetilfloroglucinol foi observada apenas entre os isolados de *Pseudomonas* obtidos da rizosfera e dos tecidos radiculares. Esses estudos confirmam que existe uma interação específica entre a espécie de planta e a comunidade microbiana que interage com a mesma e que diferentes regiões da planta, ou do substrato no qual ela se encontra, exercem também, algum efeito seletivo sobre a comunidade microbiana.

Em um experimento onde foram inoculadas combinações de duas espécies de fungos micorrízicos (*Glomus etunicatum* e *Glomus fistulosum*) e uma espécie de bactéria (*Bacillus subtilis*), VOSÁTKA & GRYNDLER (2000) observaram que algumas inoculações resultaram em um alto número de minitubérculos, alto peso por minitubérculos e alto peso de minitubérculos por planta. Contudo, o efeito da micorrização apresentou variação entre as duas variedades de batata enquanto os efeitos sinérgicos da co-inoculação com diferentes bactérias isoladas da rizosfera não foi significativo na maioria dos casos.

A batata apresenta um processo eficiente de simbiose com os fungos micorrízicos. O estabelecimento da simbiose entre a batata e os fungos micorrízicos é essencial para uma eficiente aquisição de fósforo (P), e a compatibilidade é indicada pelo aumento do nível de infecção radicular em plantas submetidas a estresse de P. Além disso, em condições de baixa disponibilidade de P, as plantas de batata micorrizadas são capazes de recuperar até 42% a

mais do P disponível no solo do que as plantas não micorrizadas. Embora as atividades específicas das enzimas fosfatases ácidas e ATPases sejam muito pouco influenciadas pela infecção dos fungos micorrízicos, quando se compara com raízes não micorrizadas, as raízes micorrizadas têm caracteristicamente uma maior concentração de proteínas e, conseqüentemente, têm uma melhoria na atividade destas enzimas (McARTHUR & KNOWLES, 1993a). O efeito da espécie micorrízica na promoção do crescimento da planta difere na habilidade de cada uma em colonizar as raízes (McARTHUR & KNOWLES, 1993b). No entanto, os fungos micorrízicos podem promover um aumento ou diminuição da produção, dependendo do isolado de micorriza e do genótipo do hospedeiro (DUFFY & CASSELLS, 2000).

2.1.7 Principais cultivares de importância no Brasil

O desenvolvimento de novas cultivares normalmente é realizado visando atingir características agronômicas desejáveis. De uma forma mais geral, pode-se citar como características agronômicas importantes a alta produtividade, precocidade e resistência a pragas. No entanto, a depender da importância econômica da cultura, o melhoramento genético pode ser realizado para atingir objetivos mais específicos, como por exemplo, maior concentração de determinadas substâncias, tolerância a condições de saturação hídrica ou pH.

O conhecimento das características das cultivares é de grande importância para o melhorista ou taxonomista e também para os técnicos envolvidos no processo de produção de batata-semente. A precocidade, tuberização, e período de dormência constituem as características fisiológicas mais importantes a serem consideradas. A resistência ou tolerância a pragas, adaptação às condições de clima, capacidade de armazenamento e de transporte, susceptibilidade a efeitos fisiológicos e comportamento quanto ao esverdeamento dos tubérculos completam a série de características que permitem a identificação de uma cultivar de batata (JABUOMSKI & FURUMOTO, 1987). Apesar do mercado de batata apresentar um caráter muito dinâmico em relação às cultivares plantadas ano após ano, as cultivares Ágata, Asterix, Bintje, Monalisa e Achat assumem atualmente um papel importante no mercado brasileiro (DUSI, comunicação pessoal).

2.1.8 Características morfológicas e agronômicas das principais cultivares de batata plantadas no Brasil.

Ágata: É uma cultivar precoce a muito precoce com alto rendimento de tubérculos. Susceptível à Fitófтора das folhas; muito pouco susceptível ao *potato vírus Y*; imune ao cancro; resistente ao patotipo A da *Globodera Rostechiensis* (nematóide dourado). As plantas apresentam hastes finas a moderadamente finas, que se espalham muito e de cor verde muito pronunciada; folhas moderadamente grandes, de silhueta bastante fechada e de cor verde bastante clara; folículos grandes a muito grandes e largos com nervuras superficiais; floração pobre de inflorescências pequenas e flores brancas. Os tubérculos são ovais de casca amarela e predominantemente lisa, polpa de cor amarelo-claro, com teor muito baixo de matéria seca e olhos superficiais e tem seu melhor uso cozido ou assado. Os brotos são cilíndricos, largos, de cor violeta avermelhado pouco pronunciado e escassamente pilosos; botão final semi-grande e de cor vermelha pouco pronunciada, ramificações semi-longas a longas (ABBA, 2005).

Asterix: Cultivar semi-tardia com alto rendimento de tubérculos de tamanho moderado. É resistente ao nematóide e ao cancro (verruca), imune ao coração oco, boa resistência a *potato vírus A*, *potato vírus X* e *potato vírus Y*, resistência moderada à sarna comum e à requeima, boa resistência ao crescimento secundário e aos danos mecânicos. As plantas são altas e apresentam hastes eretas de silhueta aberta a moderadamente aberta, apresentam folhas grandes a médias de cor verde-escuro a verde; floração com número elevado de flores de cor violeta avermelhado; apresenta número de frutos moderado a

pouco. Os tubérculos são oval-alongados de casca vermelha e média rugosa a rugosa; polpa de cor amarelo-claro com ótimo teor de matéria seca e olhos superficiais a rasos (NIVAA, 2003). Por seu alto teor de matéria seca, apresenta muito boas características tanto para o cozimento quanto para fritas. No entanto, é bastante utilizada industrialmente na fabricação de “French Fries” (Pré-fritas congeladas) em função do seu formato oval-alongado propiciar um ótimo aproveitamento no corte em palitos (ABBA, 2005). Os brotos são cônicos, de cor violeta avermelhado moderadamente intensa a intensa; botão final com pilosidade moderada ou pouca. É a variedade cujo cultivo mais cresceu na Europa nos últimos anos (NIVAA, 2003).

Bintje: Esta é uma cultivar semiprecoce, com formação precoce dos tubérculos e que apresenta um bom rendimento. Este cultivar é susceptível à Fitófitoras das folhas e dos tubérculos e imune ao *potato vírus A*. As plantas apresentam hastes pouco numerosas, robustas e firmes, de cor violeta moderadamente pronunciada nas axilas das folhas; folhas grandes, bastante rígidas, de cor verde moderadamente escura e fosca; folículos grandes e ovais com nervuras bastante superficiais; floração bastante pobre, de inflorescência bastante pequena e pobre de flores brancas e pequenas. Os tubérculos oval-alongados; casca de cor amarelo claro e geralmente lisa; polpa de cor amarelo claro com bom teor de matéria seca e olhos bastante superficiais, de sabor neutro, de cor firme e bastante consistente quando cozida, adequada para todos os métodos de preparação, em especial para a preparação de batatas fritas comuns e de pacote. Os brotos são inicialmente ovais, mais tarde esbeltos e coniformes, de cor violeta azulado e densamente pilosos; botão final estreito, um pouco aberto de cor violeta azulado; ramificações bastante numerosas e estoloniformes (ABBA, 2005).

Monalisa: Cultivar bastante precoce, com rendimento de tubérculos de bom a muito bom. Bastante susceptível à Fitófitoras dos tubérculos, muito pouco susceptível ao *potato vírus Y*, pouco susceptível ao vírus do enrolamento das folhas, imune ao *potato vírus A* e ao cancro. As plantas são altas e apresentam hastes grossas ou normais que se espalham ou são semi-eretas de silhueta semi-aberta a fechada, apresentam folhas grandes a médias de cor verde clara; floração com número de flores moderado a pouco e flores brancas; apresenta muito pouco ou nenhum fruto. Os tubérculos são ovais de casca amarela e predominantemente lisa, poupa de cor amarelo-claro, bastante consistente e de cor firme quando cozido, baixo teor de matéria seca e olhos superficiais. Os brotos são cilíndricos, de cor violeta avermelhado pouco pronunciado e escassamente pilosos; botão final semi-grande e de cor vermelha pouco pronunciada, ramificações semi-longas a longas, consumo *in natura* (NIVAA, 2003; ABBA, 2005).

Achat: Cultivar de origem alemã. As plantas são de porte médio, entretanto sob certas condições de clima e solo tornam-se baixas, dando a impressão de não serem produtivas. Apresentam em média 4 a 5 hastes por planta, que são pouco vigorosas. As folhas são pequenas, de cor verde-escura e ligeiramente enrugadas, tornando um pouco difícil o reconhecimento de viroses, como a que causa o enrolamento das folhas. A parte aérea é muito sensível a agrotóxicos contendo estanho. É susceptível à pinta preta e à requeima e apresenta boa resistência à murcha bacteriana. Não foi observado florescimento desta cultivar em nossas condições de cultivo. Os tubérculos são de formato alongado-achatado ou avalado-achatado, olhos superficiais, película amarela lisa e brilhante, polpa amarela, brotação semi-precoce, com brotos roxo-avermelhados. São medianamente sensíveis ao esverdeamento e a manchas internas (JABUOMSKI & FURUMOTO, 1987).

2.2 Principais Doenças da Cultura da Batata

2.2.1 Problemas fitossanitários

Os artrópodes, de maneira geral, constituem um dos maiores problemas da cultura da batata e seu controle é um dos fatores responsáveis pelo aumento do custo de produção da

cultura, devido ao preço dos inseticidas e aos custos de aplicação. Além dos danos diretos que causam ao se alimentarem das plantas, os insetos, principalmente os pulgões, são responsáveis pela transmissão de viroses, principais responsáveis pela degenerescência da batata semente. Dentre os insetos, destacam-se: lagarta-rosca, minador-das-folhas ou bicho-mineiro, vaquinha ou bicho-alfinete, traça-da-batata e os pulgões (ÁVILA et al., 1999).

Assim como os danos causados pelos artrópodes, as doenças também constituem uma constante preocupação para o bataticultor. Já foram registradas mais de 100 doenças para a cultura da batata, muitas delas devastadoras, podendo causar perda total da produção se o controle não for adequado. Existem doenças transmissíveis, de origem biótica, causadas por bactérias, fungos, vírus, nematóides e outros, bem como doenças não transmissíveis, de origem abiótica, identificadas como “distúrbios fisiológicos” (ÁVILA et al., 1999).

2.2.1.1 Principais doenças bacterianas da batata

As principais doenças bacterianas da cultura da batata são a Murcha-bacteriana, a Podridão-mole e a Sarna-comum, que são causadas, respectivamente, por *Ralstonia solanacearum*, *Pectobacterium* spp e *Streptomyces* spp (ÁVILA et al., 1999).

A Murcha-bacteriana é favorecida por temperatura e umidade altas, assim como, a Podridão-mole. A bactéria *Ralstonia solanacearum* está presente em todos os solos do país, podendo atacar muitas espécies de plantas, embora a raça 3, que predomina nas regiões sul e sudeste do Brasil, seja mais específica da batata. Esta doença é responsável por perdas muito significativas em solos muito úmidos se não for feita a rotação de culturas ou se foi utilizada batata-semente contaminada (ÁVILA et al., 1999).

A Podridão-mole é causada por bactérias cuja principal característica é a produção de enzimas pectolíticas em grande quantidade, chamadas pectobactérias (COLMER & KEEN, 1986; PIRHONEN *et al.*, 1991; SALMOND, 1994), que ocasiona a rápida maceração dos tubérculos (podridão mole) ou dos tecidos da haste (canela preta e podridão da haste). *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* é considerada a única capaz de causar sintomas típicos de canela preta a partir de tubérculos infectados (PÉROMBELON & KELMAN, 1980), mas qualquer uma das três pode estar presente no tecido infectado, dependendo principalmente da temperatura. No Rio Grande do Sul, a coleta de plantas com sintomas de canela preta resultou na obtenção de 408 isolados (OLIVEIRA et al., 2003).

A cultura da batata tem sofrido importantes perdas econômicas, devido à sarna comum que ocasiona lesões corticosas nos tubérculos, tanto superficiais quanto profundas. A doença é causada por diferentes espécies e raças de bactérias do gênero *Streptomyces*, que formam conídios e filamentos, estruturas normalmente relacionadas a fungos (LABRUYÉRE, 1971).

A espécie *S. scabies* (Thaxter) é a mais encontrada causando a sarna comum, mas outras espécies como *S. acidiscabies*, *S. turgidiscabies* e *S. caviscabies*, também, podem incitar sintomas da doença. Estas quatro espécies diferenciam-se entre si por critérios morfológicos, fisiológicos e genéticos (FAUCHER et al., 1995; TAKEUCHI et al., 1996; MIYAJIMA et al., 1998).

2.2.1.2 Principais doenças fúngicas da batata

A requeima causada pelo fungo *Phytophthora infestans* (Mont.) é uma das mais importantes, podendo comprometer todo o campo de produção em questão de poucos dias (STEVENSON, 1983; LOPES & SANTOS, 1994).

A presença da requeima da batateira no Brasil é anterior a 1913 e ocorre em praticamente todos os locais onde essa olerícola é cultivada, sendo mais severa sob alta umidade relativa do ar e temperaturas moderadas de 12 a 20 °C. Sob temperaturas acima de 30 °C, a requeima dificilmente ocorre, mas o patógeno permanece vivo, podendo provocar danos assim que as condições climáticas se tornarem favoráveis (LOPES & SANTOS, 1994;

ZAMBOLIM et al., 2000). A cultura da batata tem sido cultivada em épocas favoráveis ao desenvolvimento da doença. O problema torna-se ainda maior com o uso de cultivares suscetíveis, como Bintje. Os produtores insistem no plantio dessa cultivar devido à sua alta produtividade e boas características agronômicas certos de que poderão controlar a requeima com o uso de produtos químicos em caráter preventivo (COSTA et al., 2002).

A pinta-preta em batata, causada por *Alternaria solani*, pode-se tornar muito destrutiva, quando o patógeno encontra condições ambientais adequadas ao seu desenvolvimento. Este fungo tem seu desenvolvimento ideal em condições de altas temperaturas e umidade relativa do ar (ÁVILA et al., 1999).

Sabe-se que, em geral, as cultivares de maturidade precoce mostram-se mais suscetíveis à doença que as tardias. Entretanto já foram selecionados genótipos precoces com boa resistência ao fungo (BRUNE & REIFSCHNEIDER, 1989; BRUNE et al., 1990; BRUNE & REIFSCHNEIDER, 1992; BRUNE et al., 1994). A infecção na planta começa pelas folhas mais velhas, avançando portanto da parte mais baixa da planta em direção ao topo. Além disso, a suscetibilidade aumenta com a idade da planta.

Para contornar o problema, existe a opção da aplicação de fungicidas na cultura. Entretanto, esta opção acarreta maior necessidade de mão-de-obra e de insumos, encarecendo os custos de produção. Além da maior poluição ambiental causada pelo uso de agrotóxicos, que muitas vezes não controlam o patógeno. Portanto, o uso de variedades resistentes torna-se a alternativa mais viável a longo prazo (BRUNE, 1999).

2.2.1.3 Principais viroses fitopatogênicas da batata

O *Potato leafroll vírus*, causador da doença conhecida como enrolamento das folhas da batata, é a espécie tipo do gênero *Polerovirus*, pertencente à família *Luteoviridae* (TALIANSKY et al., 2003). Estão espalhados por todos os continentes, tendo sido disseminados, provavelmente, em material vegetativo de batata originário da região andina. As partículas de *Potato leafroll vírus* são isométricas e apresentam 25 nm de diâmetro e transmitido de maneira circulativa por afídeos, principalmente por pulgões (*Myzus persicae*). Quando o pulgão alimenta-se de uma planta infectada, o vírus circula pelo aparelho bucal e trato digestivo, sendo então transmitido a outras plantas. Embora a aquisição do vírus pelo afídeo seja rápida, geralmente sua transmissão para uma outra planta requer um período de 24 a 48 horas. Este período fornece uma oportunidade de minimizar a infestação do vírus através da aplicação de inseticidas para o controle do pulgão. O *Potato leafroll vírus* tem uma faixa hospedeira limitada, cerca de 20 espécies de solanáceas foram experimentalmente infectadas com o vírus. *Potato leafroll vírus* é um patógeno comum de batata e alguns isolados ocasionalmente são encontrados em tomate, mas não infectam outras culturas (TALIANSKY et al., 2003). As alterações apresentadas pela planta de batata, infectada pelo *Potato leafroll vírus*, dependem da cultivar, da concentração de vírus na planta e das condições climáticas. O enrolamento das folhas provocado por fatores abióticos como estresse hídrico, ou por outros patógenos como *Rhizoctonia solani*, pode ocasionalmente ser confundido com os induzidos pelo *Potato leafroll vírus* (FIGUEIRA, 1999).

O *Potato vírus Y*, causador da doença denominada mosaico da batateira, pertence ao gênero dos *Potyvirus* e sabe-se que é capaz de infectar mais de 342 espécies de plantas em 69 gêneros e 27 famílias. O *Potato vírus Y* infecta principalmente plantas da família das Solanáceas por todo o mundo, como: batata, pimentão, tomate e fumo, apresentando maiores taxas de infectividade em climas quentes. Este vírus pode causar sérios danos à produção das culturas, chegando a reduzir em até 80% de produtividade, como no caso da batata e é uma das maiores causa da rejeição de batatas-semente em programas de certificação de batata livre de vírus.

Existem várias estirpes de *Potato vírus Y* que, no entanto, podem ser divididas em três grupos principais, a estirpe comum (PVY^O), que ocorre em todo o mundo e, a estirpe necrótica (PVY^N) e a estirpe PVY^C, que têm uma distribuição um pouco mais restrita, mas que também estão presentes nos principais países produtores de batata do mundo (De BOKX, 1981; ANDRADE & FIGUEIRA, 1992; BRUNT et al., 1996 *apud* FIGUEIRA, 1999). As estirpes são caracterizadas com base nos sintomas produzidos nas plantas em um conjunto de cultivares selecionadas de batata e fumo. Estes sintomas podem variar desde o aparecimento de mosaico severo, com deformação e eliminação da área foliar, enrugamento e enrolamento da ponta do folíolo para baixo, em função do crescimento diferenciado dos tecidos da nervura central e do limbo foliar, até um leve mosqueado nas folhas (FIGUEIRA, 1999). A severidade depende da estirpe do vírus, tolerância do hospedeiro, tempo de infecção e fatores ambientais. Normalmente, o controle do mosaico da batata tem sido feito usando uma variedade de metodologias, incluindo: uso de tubérculos certificados livre de vírus para o plantio, eliminação de ervas daninhas, destruição dos restos culturais e uso de cultivares resistentes.

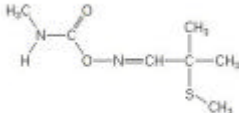
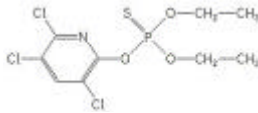
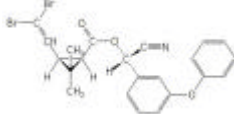
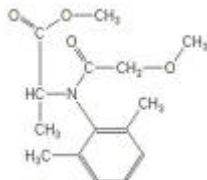
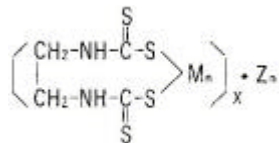
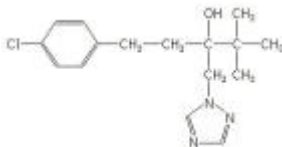
O *Potato vírus X* é uma estirpe-tipo do gênero *Potexvirus*. É um vírus que se encontra disseminado no mundo inteiro e foi durante muito tempo considerado sem importância para a cultura da batata. Entretanto pode causar a diminuição do tamanho dos tubérculos, induzindo perdas acima de 10% na produção. Quando associado ao *Potato vírus Y* causa sintomas bastante severos em plantas de batata, na forma de mosaico rugoso, que leva a perdas maiores, que variam de 5 a 75% da produção (MIZUBUTI, 1981). Este vírus não tem sido importante na produção de batata-semente no Brasil. Entretanto, com a recente mudança na epidemiologia dos vírus que infectam a batata, em que o *Potato vírus Y* tem aumentado a sua ocorrência nos campos brasileiros de produção de semente e com a iminente importação de grandes quantidades de batata-semente dos países sul-americanos pertencentes ao Mercosul, onde a incidência de PVX tem sido significativa, pode vir a se tornar um problema num futuro próximo (FIGUEIRA, 1999).

A aplicação de inseticidas para o controle dos pulgões, responsáveis pela disseminação de viroses, não se justifica no caso do *Potato vírus Y*, devido ao mesmo ser de transmissão não circulativa. No entanto, no caso de vírus de transmissão circulativa, a medida se justifica desde que haja baixa incidência do vírus no campo (ÁVILA et al., 1999).

2.3 Tratamento Fitossanitário Adotado Para a Cultura da Batata no Brasil

Em função do grande número de doenças que acometem a cultura da batata e de que é muito difícil a obtenção de cultivares que apresentem resistência a uma ampla faixa de agentes causadores de doenças, as medidas fitossanitárias normalmente empregadas são baseadas no uso de agrotóxicos para o controle dos agentes causais. O controle de doenças veiculadas por insetos, como as viroses, é feito usando inseticidas de diversos grupos químicos e que apresentam variados mecanismos de ação. De forma semelhante, o controle de infestação de doenças bacterianas e fúngicas é feito com a aplicação de bactericidas e fungicidas que, também, apresentam vários grupos químicos. Na Tabela 1 são mostrados alguns dos principais grupos químicos usados no controle de pragas e doenças na cultura da batata no Brasil. No entanto, estes agrotóxicos são notadamente conhecidos como agente de poluição, podendo ser acumulados em vários níveis da cadeia trófica e no meio ambiente.

Tabela 1: Ingredientes ativos, grupos químicos e estrutura dos principais inseticidas e fungicidas utilizados na cultura da batata.

Ingrediente Ativo	Grupo Químico	Estrutura
Inseticidas		
Aldicarb	Carbamato	
Clorpirifós	Organofosforado	
Deltametrina	Piretróide	
Fungicidas		
Metalaxyl + Mancozeb	Fenilamida + Etilenobisditiocarbamato	<p>Metalaxil</p>  <p>Mancozeb</p> 
Tebuconazole	Triazol	

2.3.1 Principais princípios ativos de inseticidas utilizados na cultura da batata no Brasil

2.3.1.1 Aldicarb

Aldicarb pertence ao grupo químico dos Carbamatos e tem ação acaricida, inseticida e nematicida. Os inseticidas pertencentes ao grupo dos carbamatos são derivados de ácido carbâmico. O aldicarb atua nas sinapses nervosas inibindo competitivamente o neurotransmissor acetilcolinesterase (WRIGHT, 1981 *apud* SIKORA & HARTWIG, 1991), da mesma forma que os organofosforados e, comportam-se de maneira quase idêntica em sistemas biológicos, mas com duas diferenças principais. Primeiro alguns carbamatos são potente inibidores de aliesterase (esterases alifáticas, cujas funções exatas não são conhecidas) e sua seletividade é muitas vezes mais pronunciada contra acetilcolinesterase de diferentes espécies. Segundo, a inibição da acetilcolinesterase por carbamatos é reversível, sendo chamado de *carbamilada*, enquanto que, quando inibida por organofosforado, resulta em uma *fosforilação* (WARE & WHITACRE, 2004). O primeiro inseticida deste grupo a ser usado com sucesso foi carbaril (Sevin®), que foi usado pela primeira vez em 1956, que vem sendo usado em todo mundo em maior quantidade que todos os outros carbamatos utilizados. As principais qualidades apresentadas por este inseticida que têm garantido o sucesso do uso

foram: apresentam toxicidade dermal e oral muito baixa em mamíferos e um espectro de ação muito amplo no controle de insetos (WARE & WHITACRE, 2004). O movimento e degradação de resíduos de aldicarb é um processo complexo afetado não só pelo solo e suas propriedades hidrogeológicas, como também, pelas condições climáticas e práticas agrícolas (JONES & ESTES, 1995).

2.3.1.2 Clorpirifós

O clorpirifós é um princípio ativo pertencente ao grupo químico dos organofosforados. Organofosforado é o termo que inclui todos os inseticidas contendo fósforo. Todos os organofosforados são derivados de um dos ácidos fosfóricos e geralmente são os pesticidas mais tóxicos aos vertebrados. Suas qualidades inseticidas foram observadas pela primeira vez na Alemanha durante a 2ª guerra mundial. Todos os organofosforados são ésteres de fósforo apresentando uma combinação variada de oxigênio, carbono, enxofre e nitrogênio. São divididos em três grupos, os alifáticos, os fenis e os heterocíclicos derivados.

O modo de ação dos organofosforados se dá através da inibição da enzima acetilcolinesterase. Esta enzima apresenta dois sítios distintos conhecidos como esterático e aniônico que servem como pontos de ligação para a acetilcolina. As moléculas de inseticidas organofosforados apresentam uma conformação estrutural que permite o encaixe no sítio esterático da acetilcolinesterase através do grupamento fosfato. Ao contrário da acetilcolina que é prontamente hidrolisada com a acetilação, a hidrólise da enzima fosforilada ocorre de maneira lenta (OMOTO, 2000). Diz-se que a enzima encontra-se fosforilada quando o inseticida encontra-se ligada a ela. Essa ligação é feita de forma irreversível. A inibição resulta na acumulação de acetilcolina nas junções neurônio/neurônio e neurônio/músculo ou sinapses, causando rápida contração dos músculos involuntários e finalmente, paralisia (WARE & WHITACRE, 2004).

Algumas espécies de bactérias entéricas e de *Pseudomonas* são capazes de utilizar o clorpirifós como fonte de carbono, causando a degradação deste ingrediente ativo quando presente no solo (SINGH et al., 2003; SINGH et al., 2004). Apesar do clorpirifós apresentar uma meia vida no solo relativamente baixa, em torno de 8 dias, seus resíduos só desaparecem completamente após 120 dias do tratamento do solo (PANDEY & SINGH, 2004). Esse efeito pode ser aumentado em função da dosagem aplicada ou repetição da aplicação, o que aumenta a dosagem do produto. Segundo MOHAN et al. (2004), quanto maior a quantidade do produto aplicada, menor será a percentagem degradada.

2.3.1.3 Deltametrina

A deltametrina pertence ao grupo químicos dos piretróides. O piretro natural foi muito pouco usado em atividades agrícolas em função de seu custo e instabilidade à luz solar. Nas últimas décadas, muitos materiais sintéticos semelhante à piretrina foram desenvolvidos. Originalmente eles foram chamados de piretróides sintéticos, mas atualmente a melhor designação para eles é simplesmente piretróides. Os piretróides tiveram uma evolução interessante, a qual é convenientemente dividida em quatro gerações (Tabela 2).

A primeira geração contém somente um piretróide, que apareceu em 1949. Sua síntese era muito complexa, envolvendo 22 reações químicas para alcançar o produto final.

Tabela 2: Evolução de síntese dos ingredientes ativos e produtos comerciais pertencentes ao grupo dos piretróides.

Geração	Ingredientes Ativos	Produto(s) Comercial(is)	
Primeira Geração	Aletrina	Pynamin®	
	Tetrametrina	neo-Pynamin®, Pynamin®	
Segunda Geração	Resmetrina	Synthrin®	
	Bioresmetrina	-	
	Fonotrina	Sumithrin®	
Terceira Geração	Fenvaleratos	Pydrin®, Tribute® e Bellmark®	
	permetrinas	Ambush®, Astro®, Dragnet®, Flee®, Pounce®, Prelude®, Talcord® e Torpedo®	
	Bifetrina	Capture® e Talstar®	
	<i>lambda</i> -cialotrina	Demand®, Karate®, Scimitar® e Warrior®	
	Cipermetrina	Ammo®, Barricade®, Cymbush®, Cynoff® e Ripcord®	
	Ciflutrina	Baythroid®, Countdown®, Cylense®, Laser® e Tempo®	
	Deltametrina	Decis®	
	Esfevenlerato	Asana® e Hallmark®	
	Quarta Geração	Fenpropatrina	Danitol®
		Flucitrinato	Cybolt® e Payoff®
Fluvalinato		Mavrik® e Spur®	
Praetrina		Etoc®	
<i>tau</i> -fluvinato		Mavrik®	
Teflutrina		Evict®, Fireban®, Force® e Raze®	
Tralometrina		Scout X-TRA® e Tralex®	
<i>zeta</i> -cipermetrina	Mustang® e Fury®		

A segunda geração inclui a Tetrametrina, surgida em 1965, seguida, em 1967, pela Resmetrina, que era 20 vezes mais eficaz que o piretro, e pela bioresmetrina (50 vezes mais eficaz que o piretro), posteriormente a Bioallethrin®, em 1969, e finalmente fonotrina, em 1973.

A terceira geração, que surgiu nos anos de 1972-73, inclui os fenvaleratos e as permetrinas. Estes tornaram-se os primeiros piretróides usados na agricultura por causa de sua

excepcional atividade inseticida e fotoestabilidade. Eles não sofriam efeito da luz UV solar e seus resíduos permaneciam ativos nas folhas das culturas por um período de 4 a 7 dias.

Os piretróides usados atualmente pertencem à quarta geração e de todos os piretróides já sintetizados, são aqueles que apresentam maior eficiência inseticida por apresentar eficácia em doses muito baixas de ingrediente ativo. Os últimos integrantes dessa geração são: acrinatrina (Rufast®), imiprotina (Pralle®), registrada em 1998 e *gama*-cialotrina (Pytech®) que está em desenvolvimento. Todos os compostos pertencentes à quarta geração são fotoestáveis e por causa de sua baixa volatilidade promovem um efeito residual mais longo, em torno de 10 dias sob condições favoráveis (WARE & WHITACRE, 2004). No solo, os piretróides apresentam duas fases de degradação: inicialmente ocorre uma rápida dissipação na superfície do solo, devido à fotólise, volatilização e perdas físicas seguido de uma degradação química e microbiana mais lenta (HILL & SCHAALJE, 1985 *apud* LAABS et al., 2000).

Os piretróides compartilham modos de ação similares, que lembram o modo de ação do DDT, e são considerados venenos axônicos. Eles atuam principalmente nos canais de sódio das células nervosas do sistema nervoso central e periférico dos insetos (BLOOMQUIST, 1998). Os canais de sódio se abrem no momento de transmissão de um impulso nervoso e se fecham imediatamente após a despolarização da célula nervosa. Esses inseticidas se posicionam em algumas unidades dos sítios de ligação dos canais de sódio de tal modo que eles permanecem abertos por um tempo maior, prolongando-se assim o período de influxo de sódio após um potencial de ação. Com isso, potenciais de ação repetidos são desencadeados e os insetos morrem devido a hiperexcitabilidade provocada por estes inseticidas. Os piretróides atuam apenas nos canais de sódio abertos no momento da despolarização da membrana do axônio (OMOTO, 2000).

2.3.2 Principais princípios ativos de fungicidas utilizados na cultura da batata no Brasil

2.3.2.1 Metalaxil

O metalaxil é um fungicida sistêmico pertencente ao grupo químico das fenilamidas, muito solúvel em água (8,4 g.L⁻¹ a 22 °C) e não é volátil (WAUCHOPE et al., 1992 *apud* WILSON et al., 2001). O metalaxil é um inibidor específico da síntese de RNA ribossômico, privando a célula de seus ribossomos e, portanto, diminuindo a síntese protéica, no entanto, o mecanismo exato dessa interferência, não é conhecido (GHINI & KIMATI, 2002).

O metalaxil apresenta uma meia-vida relativamente baixa no solo, de aproximadamente 15 dias, no entanto, procedimentos de secagem e re-umedecimento do solo resultam em uma significativa diminuição do potencial de degradação deste ingrediente ativo pelos microrganismos nativos do solo (PESARO et al., 2004). Dados obtidos de conteúdo de DNA no solo e contagem direta de células indicaram uma redução de 51% e 24%, respectivamente, na biomassa microbiana, após o solo ter sido seco e re-umedecido (PESARO et al., 2004). Foi observada a mesma tendência para estes dois parâmetros quando o mesmo solo foi submetido a congelamento e aquecimento (PESARO et al., 2003).

Em altas doses o metalaxil é tóxico aos microrganismos, contudo, quando incorporado ao solo resulta em um aumento nos níveis de nitrato e amônio, estimulando a atividade microbiana (MONKIEDJE et al., 2002). Porém, apesar de haver uma relação não linear entre a concentração e a porcentagem de adsorção no solo (SUKUL & SPITELLER, 2001) essa porcentagem de adsorção é baixa, em torno de 25%, dependendo do tipo de solo (MONKIEDJE & SPITELLER, 2002).

2.3.2.2 Mancozeb

O mancozeb é um fungicida de contato pertencente ao grupo químico dos etilenobisditiocarbamatos. Este fungicida apresenta atividade de amplo espectro e seu modo

de ação exato não é conhecido. No entanto, a inibição do desenvolvimento fúngico se dá pela metabolização do mancozeb que é reduzido a um radical de isotiocianato, contendo átomos de carbono, nitrogênio e enxofre, que inativam grupos sulfídricos dos aminoácidos (ECKERT, 1988). O risco do desenvolvimento da resistência a estes fungicidas é geralmente considerado baixo porque eles possuem um modo de ação multi-sítio (GEORGOPOLUS, 1977).

O efeito do mancozeb sobre a atividade enzimática microbiana ocorre em baixas concentrações (GUVEN et al., 2003), no entanto, este princípio ativo é pouco tóxico e degradado rapidamente na presença de umidade e oxigênio (JACOBSEN & BOSSI, 1997).

2.3.2.3 Tebuconazole

O tebuconazole é um fungicida sistêmico, pertencente ao grupo químico dos triazóis e atua como um potente inibidor para o esteroide fúngico 14 α -amilase, o único membro da superfamília de citocromo P450, presente em animais, plantas e fungos. Seu mecanismo de ação envolve a inibição seletiva da atividade da enzima esteroide 14 α -demetilase do fungo, em relação à mesma enzima presente na planta (LAMB et al., 1998), resultando em uma redução na síntese do 24-metilenodihidrolanosterol, um precursor de ergosterol em fungos (KUCK et al., 1995 *apud* MA et al., 2004). O sítio primário de atuação dos inibidores de biossíntese de ergosterol é a dimetilação do C-14 (GHINI & KIMATI, 2002). Apesar da inibição da atividade da enzima esteroide 14 α -demetilase ocorrer de forma seletiva, priorizando a enzima fúngica, foi observado que a aplicação do fungicida em uma dose 3 vezes superior àquela capaz de inibir a atividade da enzima no fungo *Ustilago maydis*, é capaz de reduzir em 50% a atividade desta mesma enzima presente em sorgo (LAMB et al., 2001).

Em estudos *in vitro*, RAMIREZ et al. (2004) observaram que o efeito inibitório do tebuconazole, apesar de apresentar efeito inibidor frente a *Fusarium graminearum*, pode ocorrer um estímulo ao crescimento desse fungo a depender das condições de umidade e temperatura.

2. 4 Estudos de Ecologia Microbiana Usando Marcadores Moleculares

Os métodos moleculares têm possibilitado avanços na identificação da diversidade de microrganismos presentes no solo e em outros substratos e deverão representar no futuro uma forma de aprofundar a melhor compreensão do papel deste componente. Esses estudos são baseados em genes, ou espaços intergênicos, chamados de marcadores moleculares. Atualmente existe um número muito grande de genes que vêm sendo empregados como marcadores moleculares, entre eles o mais usado é o gene que codifica a subunidade 16S do ribossomo (16S rRNA).

PACE *et al.* (1985) foram os primeiros autores a sugerirem o uso do gene 16S rRNA como um marcador molecular para o estudo de populações microbianas em amostras do ambiente, independente do seu cultivo. Segundo LUDWIG & SCHLEIJER (1994), *apud* por HEUER & SMALLA (1997), tanto o 16S como o 23S rDNA são moléculas ideais, como marcadores moleculares filogenéticos, devido à sua distribuição universal, sua conservação estrutural e funcional, e seu tamanho, que permite uma suficiente divergência na seqüência. Devido a sua importância para classificações filogenéticas (WOESE *et al.*, 1990), à quantidade de seqüências disponíveis em banco de dados (PACE, 1996; MAIDAK *et al.*, 1999), o gene 16S rRNA é a seqüência alvo mais usada para análise filogenética e tipagem de bactéria ao nível de espécie (LAGUERRE *et al.*, 1994; LI *et al.*, 1993; WEISBURG *et al.*, 1991).

Normalmente o gene 16S está presente no genoma das bactérias em mais de uma cópia, apresentando, na maioria dos casos, mutações entre as cópias (REISCHL et al., 1998; MARCHANDIN et al., 2003; CONVILLE & WITEBSKY, 2005). Esta heterogeneidade intragenômica dos múltiplos operons do gene 16S pode não ter um efeito profundo na

classificação taxonômica (COENYE & VANDAMME, 2003), no entanto, a aplicação deste gene para estudos de ecologia microbiana usando técnicas baseadas nas diferenças do percentual de G+C entre os indivíduos, para a separação de fragmentos de DNA, como DGGE e TGGE, por exemplo, pode causar certa confusão à medida que um único indivíduo poderá apresentar um perfil com mais de um fragmento. Uma alternativa seria o uso de genes presentes nos microrganismos em cópia única ou que não apresentem mutações entre as cópias. O gene que codifica a subunidade β da RNA polimerase (*rpoB*) parece estar presente no genoma dos microrganismos em uma cópia simples e conservada (WALSH et al., 2004), mostrando-se capaz de evitar problemas com a heterogeneidade intra-específica (DAHLLOF et al., 2000; KHAMIS et al., 2005; RENOUF et al., 2006).

CAPÍTULO I

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CULTIVARES DE BATATA (*Solanum tuberosum* L.) NA COMUNIDADE BACTERIANA ASSOCIADA AO RIZOPLANO

RESUMO

FERREIRA, Enderson Petrônio de Brito. **Influência de diferentes cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.) na comunidade bacteriana associada ao rizoplano**

A bataticultura apresenta uma grande importância econômica e social sendo responsável pela intensa utilização de mão-de-obra, além de apresentar grande importância alimentar, sendo atualmente o quarto alimento mais consumido no mundo. As cultivares de batata exploradas comercialmente mostram grande variedade em relação ao ciclo de maturação, teor de matéria seca e resistência a doença, podendo resultar em alterações na comunidade microbiana associada à cultura. Foi conduzido um experimento em casa-de-vegetação com as cultivares Achat, Bintje, Ágata, Monalisa e Asterix, plantadas em amostras de solo do Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA) com o objetivo de avaliar possíveis diferenças nos perfis de rDNA da comunidade bacteriana associada ao rizoplano de batata em função da cultivar. Foram realizadas 3 coletas aos 15, 30 e 60 dias após a emergência (DAE). A análise da comunidade bacteriana associada ao rizoplano das cultivares foi realizada através da técnica PCR-DGGE usando o gene 16S rRNA como marcador molecular. Os resultados mostraram que a comunidade bacteriana associada ao rizoplano de diferentes cultivares de batata sofreu mudanças, tanto entre as cultivares quanto em relação às épocas de coleta, em que as mudanças observadas nesta comunidade foram fortemente influenciadas pelas características morfo-fisiológicas intrínsecas das cultivares. Foi observada uma diminuição na discriminação entre as comunidades bacterianas associadas ao rizoplano das diferentes cultivares à medida que as plantas atingiram o final do ciclo.

Palavras-chave: DGGE, comunidade bacteriana, rizoplano, *Solanum tuberosum*.

ABSTRACT

FERREIRA, Enderson Petrônio de Brito. **Influence of different cultivars of potato (*Solanum tuberosum* L.) on bacterial communities associated to the rhizoplane**

Potato cropping shows great social and economical importance and, it is responsible by a very expressive part of the labor force of agricultural workers, besides being the forth product used as human food. Comercial potato cultivars show a great variety of characteristics related to maturation stage, accumulated dry matter content and disease resistance, which could be associated to specific microbial populations that colonize plant tissues, its surface or even the rhizospheric soil. An experiment was carried out under greenhouse conditions in which 5 potato cultivars: Achat, Bintje, Ágata, Monalisa and Asterix were cultivated in pots filled with soil from an Agroecological Integrated Production System (RJ, Brazil) aiming to determine the shifts on the rDNA profiles of bacterial communities associated to the cultivar rhizoplanes. It were performed 3 harvests at 15, 30 and 60 Days After Sowing (DAS). The analyses of the bacterial community associated to the potato rhizoplane were performed by PCR-DGGE method, using the gene 16S rRNA as molecular marker. The results showed that the variation of rhizoplane bacterial community was due to both, cultivar and plant age. Differences on the bacterial community associated to each cultivars seem to be a result from intrinsic physiological characteristics of the cultivar. Remarkable differences among rhizoplane bacterial community were found at the earliest plant age, tending to decrease at the later stages.

Key-words: DGGE, bacterial community, rhizoplane, *Solanum tuberosum*.

3.1 INTRODUÇÃO

A relação das plantas com a comunidade microbiana do solo pode ocorrer sob diversas formas, seja através de associações que promovam desvantagens às plantas, como, por exemplo, nos casos em que essa relação resulta em doenças, ou associações positivas, em que os microrganismos fornecem algum tipo de vantagem às plantas, seja no controle de fitopatógenos e/ou pragas ou na promoção do crescimento vegetal (produção de fitormônios, FBN, solubilização de fosfato, entre outros) e se beneficiam recebendo nutrientes das plantas. De acordo com SUNG et al. (2006), as plantas são capazes de aumentar a concentração microbiana no solo, fornecendo exsudatos através das raízes que são usados pelos microrganismos como substrato para seu crescimento. A composição química dos exsudatos radiculares é extremamente variável entre diferentes espécies e, mesmo dentro de uma espécie pode haver variação entre cultivares e variedades. Além do genótipo vegetal, a composição química dos exsudatos radiculares é resultado da interação de diferentes fatores, tais como, estado nutricional, idade, doença e outros fatores ambientais que também afetam diretamente a comunidade microbiana presente na rizosfera (MAHAFFEE & KLOPPER, 1997; GRIFFITHS et al., 1999).

As cultivares de uma mesma espécie de planta normalmente apresentam diferenças, morfológicas ou fisiológicas, que as distinguem umas das outras. Portanto, quando sob a mesma condição de cultivo, estas respostas fisiológicas diferenciadas são potencialmente capazes de promover uma seleção da flora microbiana normalmente associada ao tecido vegetal (GOMES et al., 2003). Tem sido demonstrado como a comunidade microbiana associada ao tecido vegetal é dependente da cultivar, o que sugere que, pelo menos, parte das características observadas num novo material pode ser decorrente da interação direta com grupos específicos de microrganismos. Num estudo onde foi aplicada a técnica de PCR-DGGE em 4 cultivares de milho cultivados em solos de Várzea e de Cerrado foi encontrada uma considerável diversidade de espécies de *Paenibacillus* presentes na rizosfera (SILVA et al., 2003). Foi observada uma clara distinção entre as populações de *Paenibacillus* associadas às plantas crescidas em solo de Cerrado e de Várzea, mostrando que o tipo de solo foi o fator que mais influenciou a seleção destas populações, corroborando resultados encontrados previamente por CHIARINI et al. (1998). No entanto, foi observada, também, uma tendência de agrupamento das cultivares em dois grupos, cada um com duas cultivares, o que deve ter sido consequência das características intrínsecas das cultivares de cada grupo (SILVA et al., 2003).

CHIARINI et al. (1998) observaram que, durante o crescimento de plantas de milho, a densidade da comunidade microbiana associada não variou significativamente, porém a estrutura desta comunidade sofreu mudanças marcantes durante a fase inicial de desenvolvimento das plantas, tendendo a se manter mais estável nas fases subsequentes, sugerindo a importância da seleção de microrganismos no início do desenvolvimento vegetal.

A comunidade microbiana também responde a estresses sofridos pela planta. Foi observado que, quando foi provocado o desfolhamento em diferentes cultivares de azevém (*Lolium perene*) houve uma distinção na comunidade microbiana do solo em função da cultivar estudada (MACDONALD et al., 2004).

Em um estudo com 4 cultivares de canola que diferiam na susceptibilidade ao patógeno *Verticillium longisporum*, GRANÉR et al. (2003) observaram que, já nas sementes, assim como nos tecidos das plantas, ocorria uma diversidade na flora endofítica de pelo menos 2 dos 4 cultivares estudados e que cerca de 50% dos isolados obtidos destes 2

cultivares apresentaram uma inibição moderada a forte, contra o patógeno, o que pode contribuir para a resistência ao patógeno.

Apesar da batata ser uma cultura de grande importância nacional e mundial, sendo o quarto alimento mais consumido no mundo (FAO, 2005), não há estudos que caracterizem as comunidades microbianas associadas a diferentes cultivares.

Este capítulo teve por objetivo determinar a influência de diferentes cultivares de batata sobre a comunidade bacteriana associada ao rizoplano.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1- Desenvolvimento de Marcador de Posição de Bandas Para Gel de DGGE

Para o desenvolvimento do marcador foram usadas as estirpes de bactérias: BR 11080 (*Azospirillum lipoferum*), BR 11281 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*), BR 11001 (*Azospirillum brasilense*), LMG 6138 = BR 111 (*Bradyrhizobium japonicum*), BR 11175 (*Herbaspirillum seropedicae*), BR 11140 (*Azospirillum amazonense*), BR 620 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*), BR 3804 (*Mesorhizobium plurifarum*), BR 112 (*Sinorhizobium fredii*), BR 11340 (*Burkholderia* sp.), VB 32T (*Azoarcus indigenus*), CFN 42 = BR 10026 (*Rhizobium etli*), USDA 76 = BR 113 (*Bradyrhizobium elkanii*), ORS 571 = BR 5410 (*Azorhizobium caulinodans*), LMG 6125 = BR 7801 (*Mesorhizobium loti*), *Agrobacterium rizogenes*, CNF 299 = BR 10016 (*Rhizobium tropici* IIA) e *Bacillus thuringiensis*. As estirpes foram obtidas da coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia. Após crescimento em meio de cultura, o DNA das estirpes acima citadas foi extraído, amplificado por PCR e submetidos à DGGE conforme descrito abaixo. A reação de PCR foi realizada, tanto para as estirpes isoladamente, quanto para a mistura de DNA das estirpes selecionadas.

3.2.2 Coleta do Solo e Instalação dos Experimentos

Amostras de solo foram coletadas no Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA), localizado no município de Seropédica (RJ). O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação, em vasos de 1,5 kg, onde foram plantados tubérculos das cultivares Achat, Bintje, Ágata, Monalisa e Asterix, cujas características morfo-fisiológicas são apresentadas na Tabela 3. O experimento foi montado em um delineamento de blocos ao acaso com 3 coletas e 5 repetições. As coletas foram realizadas aos 15, 30 e 60 dias após a emergência (DAE).

3.2.3 Coleta das Raízes e Extração de Células do Rizoplano

A parte aérea das plantas foi cortada a aproximadamente 5 cm do solo e descartada. Após ter sido retirado do vaso, o solo foi cuidadosamente separado das raízes e estas colocadas em sacos plásticos e acondicionadas em caixa térmica contendo gelo. As raízes foram então suavemente agitadas para eliminar o excesso de solo rizosférico, lavadas em solução salina (NaCl 0,85%) e secas em papel toalha autoclavado. Foi pesado 1 g de raízes e transferido para tubo falcon de 50 mL contendo 20 mL de solução salina. Os tubos foram agitados em agitador de ação pulsada (150 RPM; 30 min). Foi transferida uma alíquota de 8 mL para tubo falcon de 15 mL, seguida de centrifugação (10.000 RPM; 30 min; 4 °C). O sobrenadante foi descartado e adicionado 1 mL de água esterilizada. O tubo foi agitado em vórtex para a ressuspensão do precipitado e a solução foi transferida para microtubo de 1,5 mL. Em seguida o material foi centrifugado (10.000 PRM; 15 min), o sobrenadante foi eliminado e o tubo contendo o precipitado foi estocado em freezer (-20 °C).

Tabela 3: Características morfo-fisiológicas das cultivares de batata utilizadas para o estudo de seus efeitos na comunidade bacteriana associada ao rizoplano.

Características	Achat	Bintje	Agata	Monalisa	Asterix
Haste					
Vigor	Pouco	Muito	Pouco	Médio	Médio
Número	4 a 5	3 a 4	8 a 10	5 a 6	4 a 5
Tamanho da folha	Pequena	Grande	Média	Grande	Média
Cor da folha	Verde escura	Verde escura	Verde clara	Verde clara	Verde clara
Altura da planta	Média	Média-alta	Baixa	Alta	Alta
Maturação	Semi-precoce	Tardia	Precoce	Precoce	Semi-tardia
Floração	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
Cor da flor	-	Branca	Branca	Branca	Violeta avermelhada
Tubérculo					
Forma	Alongado achatado	Oval alongado	Oval	Alongado	Oval alongado
Cor da película	Amarela clara	Amarela clara	Amarela violácea	Amarela	Vermelha
Textura	Lisa fosca	Lisa brilhante	Lisa brilhante	Lisa brilhante	Rugosa
Olhos	Superficiais	Superficiais	Superficiais	Superficiais	Profundos
Cor da polpa	Amarela pálida	Amarela pálida	Amarela pálida	Amarela	Amarela
Broto					
Cor	Violeta avermelhado	Violeta azulado	Violeta avermelhado claro	Violeta avermelhado	Violeta avermelhado
Doenças					
Requeima (<i>Phytophthora infestans</i>)	Resistente	Susceptível	Susceptível	Resistência moderada	Resistência moderada
Enrolamento das folhas (<i>Potato Leafroll virus</i>)	Susceptível	Susceptível	Resistência moderada	Resistência moderada	Resistência moderada
Mosaico (<i>Potato virus Y</i>)	Resistente	Susceptível	Susceptibilidade moderada	Susceptibilidade moderada	Resistente

Adaptado de: ABBA (2005); APASSUL (2005); ÁVILA et al. (1999); JABUOMSKI & FURUMOTO (1997); NIVAA (2003).

3.2.4 Extração de DNA

Seguiu-se o protocolo descrito por SCHWIEGER & TEBBE (1998) e modificado por XAVIER et al. (2004). O precipitado microbiano estocado (-20 °C) foi ressuspensão em 0,6mL de tampão de lise TES (0,05M NaCl; 0,01M EDTA; 0,05M Tris HCl pH 8,0; 1% SDS) e agitado em vórtex. Em seguida, as amostras foram submetidas a cinco etapas de congelamento/descongelamento: imersão em nitrogênio líquido (5min), aquecimento (65 °C; 180 RPM; 5 min) e agitação (180 RPM; 10 s). Aplicou-se, então, 8,4 µL de proteinase K (20 mg.mL⁻¹) nas amostras que foram incubadas sob agitação (180 RPM; 65 °C; 1 hora). Em seguida, adicionou-se, 0,6 mL (1 volume) de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), submeteu-se as amostras a centrifugação (9.000 RPM; 6 min). O sobrenadante foi transferido cuidadosamente para novos microtubos, onde foram adicionados 0,6 mL (1 volume) de clorofórmio-álcool isoamílico, repetindo-se a centrifugação anterior. Uma alíquota de aproximadamente 0,5 mL do sobrenadante foi transferida para um novo microtubo e 0,5 volumes de isopropanol gelado foram adicionados. As amostras foram, então, incubadas (60 min; -20 °C) e centrifugadas (13.000 RPM; 20 min). Removido o sobrenadante, o precipitado foi centrifugado a vácuo para a secagem e ressuspensão em 50 µL de tampão TE (10mM Tris; 1mM Na-EDTA; pH 8,0).

3.2.5 Condições da PCR e DGGE

As reações de amplificação foram realizadas em triplicata, nas diluições 1:5, 1:10 e 1:20. As reações foram feitas em um volume final de 35 µL e consistiu em 1 µL da diluição do DNA, tampão (10 mM), MgCl₂ (3,5 mM), dNTP (0,2 µM cada), BSA (0,17 µg.µL⁻¹), *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) (0,7 U) e os iniciadores 1401-R e 968CG-F (0,2 µM cada). Os iniciadores e as condições da reação de PCR: aquecimento inicial (95 °C; 3 min), 40 ciclos compostos de desnaturação (94 °C; 30 s), anelamento (55 °C; 30 s) e extensão (72 °C; 30 s) e, uma etapa final de extensão (72 °C; 5 min) estão descritos em GELSOMINO et al. (1999).

Após a amplificação, os produtos das três reações de PCR, provenientes das diluições, foram combinados em um único microtubo.

Um volume de 12 a 20 µL de cada amostra de DNA amplificado foi aplicado em gel desnaturante de poliacrilamida 6 % (N-acrilamida, N`-metilbisacrilamida, 37:1) dissolvida em tampão TAE 0,5X (Tris-base, 20 mM pH 7,8; acetato de sódio 10 mM e Na-EDTA, 0,5 mM). O gradiente de desnaturante utilizado foi de 50 a 65%, obtido usando-se duas soluções, uma contendo apenas solução de poliacrilamida e a outra uréia (7M) e formamida (40% v/v) e poliacrilamida. A eletroforese foi realizada no sistema *DcodeTM* (Bio-Rad) sob voltagem constante (120 V; 60 °C; 16 horas) e ao final o gel foi corado com uma solução de Syber Gold (Molecular Probe) (20X) e visualizado sob luz ultravioleta no sistema de foto-documentação IMAGO (B&L).

3.2.6 Análise Estatística

A partir dos perfis de bandas dos géis de DGGE, foram elaboradas matrizes binárias de presença e ausência de bandas para cada uma das repetições, em cada coleta, em função da posição que as bandas ocupavam no gel. Para bandas presentes em determinado tratamento era anotado o valor numérico “1”, se ausente, era anotado o valor numérico “0” (KOZDRÓJ & ELSAS, 2001). Como o estudo foi composto de 5 repetições, foi construída uma única matriz, a partir das 5 repetições, em que cada repetição foi adicionada na planilha ao final da anterior (ABOIM, 2004). A partir desta matriz binária foi feita a análise de agrupamento por dendrograma para a qual foi utilizado, para o cálculo da similaridade, o coeficiente de Jaccard e o método UPGMA para agrupamento, através do programa NTSYS-PC v. 2.10 (Applied Biostatistics). Também foi realizada uma Análise de Componentes Principais (PCA) usando o programa CANOCO v. 4.5. As informações mostradas na Tabela 3 foram transformadas em uma matriz binária e submetidas a uma análise de agrupamento por dendrograma, para comparar com os resultados obtidos a partir dos géis de DGGE.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Marcador de Posição de Bandas Para Géis de DGGE

Previamente à análise do efeito das diferentes cultivares de batata sobre a comunidade bacteriana associada ao rizoplano, foi realizada a escolha de espécies bacterianas para serem usadas como marcadores de posição de bandas em géis de DGGE. A escolha das estirpes bacterianas para compor o marcador foi realizada com base no número e na posição que a banda representativa de cada estirpe bacteriana aparecia no gel (Figura 2). Desta forma, as estirpes bacterianas que apresentavam um número elevado de bandas (Figura 2, linhas 2, 5, 7, 11, 12, 14, 15, 16 e 18) ou apresentavam a banda na mesma posição que outras estirpes (Figura 2, linhas 1, 4, 6 e 17) foram descartadas, não fazendo parte do marcador.

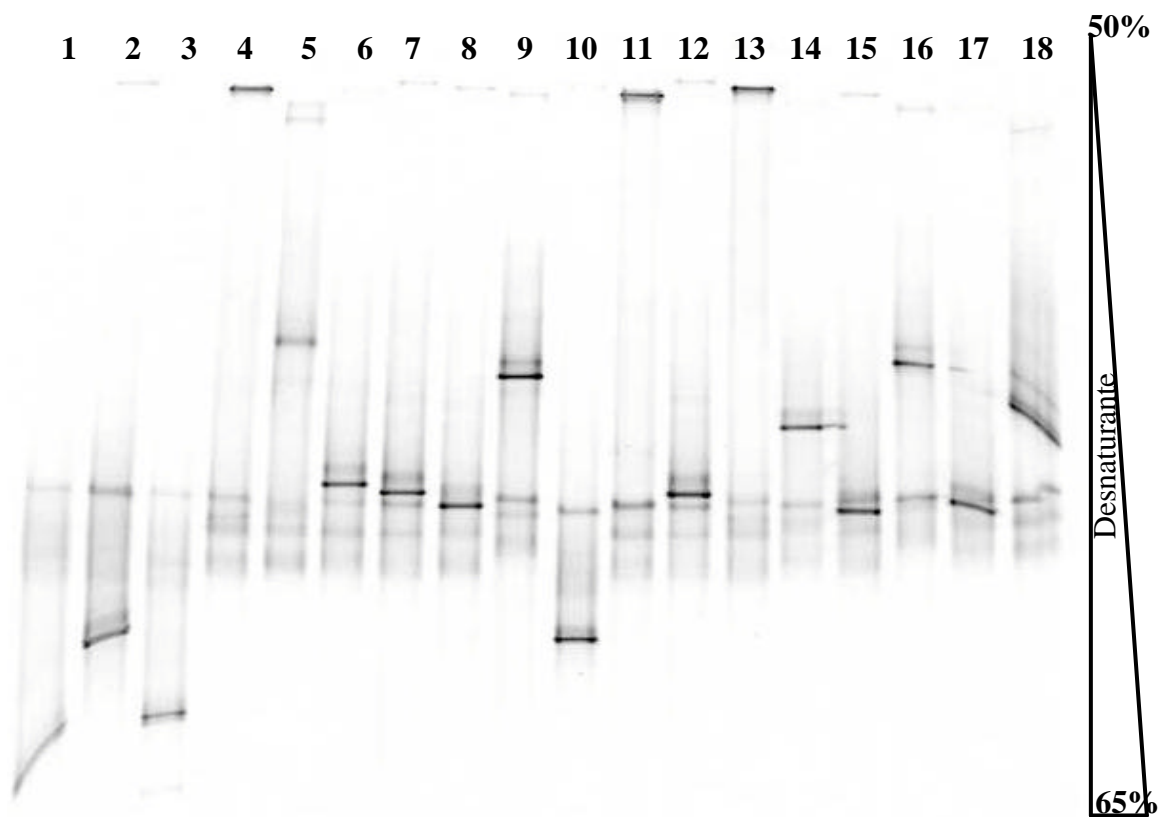


Figura 2: Gel de DGGE das espécies bacterianas testadas como marcadores de posição de bandas. Linha 1- BR 11080; 2- BR 11281; 3- BR 11001; 4- BR 111; 5- BR 11175; 6- BR 11140; 7- BR 620; 8- BR 3804; 9- BR 112; 10- BR 11340; 11- VB 32T; 12- BR 10026; 13- BR 113; 14- BR 5410; 15- BR 7801; 16- *Agrobacterium rizogenes*; 17- BR 10016; 18- *Bacillus thuringiensis*.

Com base nos critérios descritos acima foram selecionadas as estirpes bacterianas *Azospirillum brasilense* (BR 11001), *Mesorhizobium plurifarum* (BR 3804), *Sinorhizobium fredii* (BR 112), *Burkholderia* sp (BR 11340) e *Bradyrhizobium elkanii* (BR 113), para compor o marcador de posição de bandas, usado com marcador (M) nos géis da Figura 3.

3.3.2 Efeito das Diferentes Cultivares na Comunidade Bacteriana Associada ao Rizoplano de Batata

3.3.2.1 Perfis da comunidade bacteriana visualizados em gel de DGGE

O DNA de células bacterianas associadas ao rizoplano de cultivares de batata foi amplificado com iniciadores universais que flanqueiam a região V6-V8 do 16S rDNA e submetido a uma eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes. A Figura 3 mostra os perfis desta comunidade bacteriana associada ao rizoplano das diferentes cultivares, obtidos por PCR-DGGE, aos 15, 30 e 60 dias após a emergência. Como pode ser observado nesta Figura, algumas bandas, indicadas por setas, estão presentes em todas as cultivares e em todas as coletas, indicando o que parece ser um grupo bacteriano bastante inespecífico, permanecendo associado ao rizoplano da planta independentemente da cultivar ou do estágio de desenvolvimento da mesma. Por outro lado, dada a sua habilidade em interagir com o tecido vegetal da planta é possível que tenha uma atuação significativa, talvez como promotor de crescimento vegetal, ou simplesmente que trata-se de um grupo saprofítico capaz de colonizar eficientemente o rizoplano.

Em um estudo com *Trifolium repens* e *Lolium perenne*, no qual a rizosfera foi estudada em 3 compartimentos (solo, solo rizosférico e rizoplano), foi observado que o solo era predominantemente colonizado por grupos de bactéria Gram-positivas, *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*, *Proteobacteria* e *Holophaga-Acidobacterium*. Já a região rizosférica, incluindo o rizoplano e solo rizosférico, apresentava um efeito seletivo favorecendo as gama-*Proteobacteria*, em detrimento às Gram-positivas e às *Holophaga-Acidobacterium*, levando a uma dominância de bactérias pertencentes ao grupo das *Pseudomonas* (MARILLEY & ARAGNO, 1999). Nesse estudo, foi observado que a diversidade filogenética diminuía à medida que as amostras iam sendo coletadas mais próximas das raízes das plantas. As bactérias do grupo *Pseudomonas* são notadamente conhecidas como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (GUPTA et al., 2005; PICARD & BOSCO, 2005), apesar de algumas espécies ou mesmo estirpes serem causadoras de doenças ou interferirem de forma negativa no desenvolvimento da planta (BERGGREN et al., 2005). OLSSON & PERSSON (1999) observaram que, em solo rizosférico, quanto maior o grau de aderência do solo às raízes de cevada, havia um favorecimento de bactérias pertencentes ao grupo *Cytophaga-Flavobacterium* e uma diminuição correspondente em bactérias pertencentes ao grupo *Pseudomonas*.

A técnica de DGGE tem permitido um avanço rápido do conhecimento da comunidade microbiana do solo e daquela associada ao tecido vegetal. E apesar de ainda serem pouco conhecidos os fatores que determinam a composição e a estrutura destas comunidades, os dados obtidos sugerem que elas são o resultado da interação das características intrínsecas à planta com os fatores edafo-climáticos. Além disso, a estrutura da comunidade rizobacteriana é altamente dinâmica e influenciada por vários fatores, tais como a idade da planta, o uso de fertilizantes e bio-inoculantes (ROESTI et al., 2005).

Ao contrário das bandas comuns, na Figura 3 podem ser observadas bandas, indicadas por círculos, que só ocorrem em determinada cultivar ou em determinado estágio de seu desenvolvimento. Alguns estudos mostram que diferentes cultivares da mesma planta exsudam pelas raízes quantidades (KATO-NOGUCHI & INO, 2005) e tipos diferentes (STEVENS et al., 2000; GRAYER et al., 2004; KERDCHOECHUEN, 2005) de determinados compostos que podem estar relacionados às alterações observadas na comunidade microbiana associada ao rizoplano destas plantas (GU & MAZZOLA, 2003).

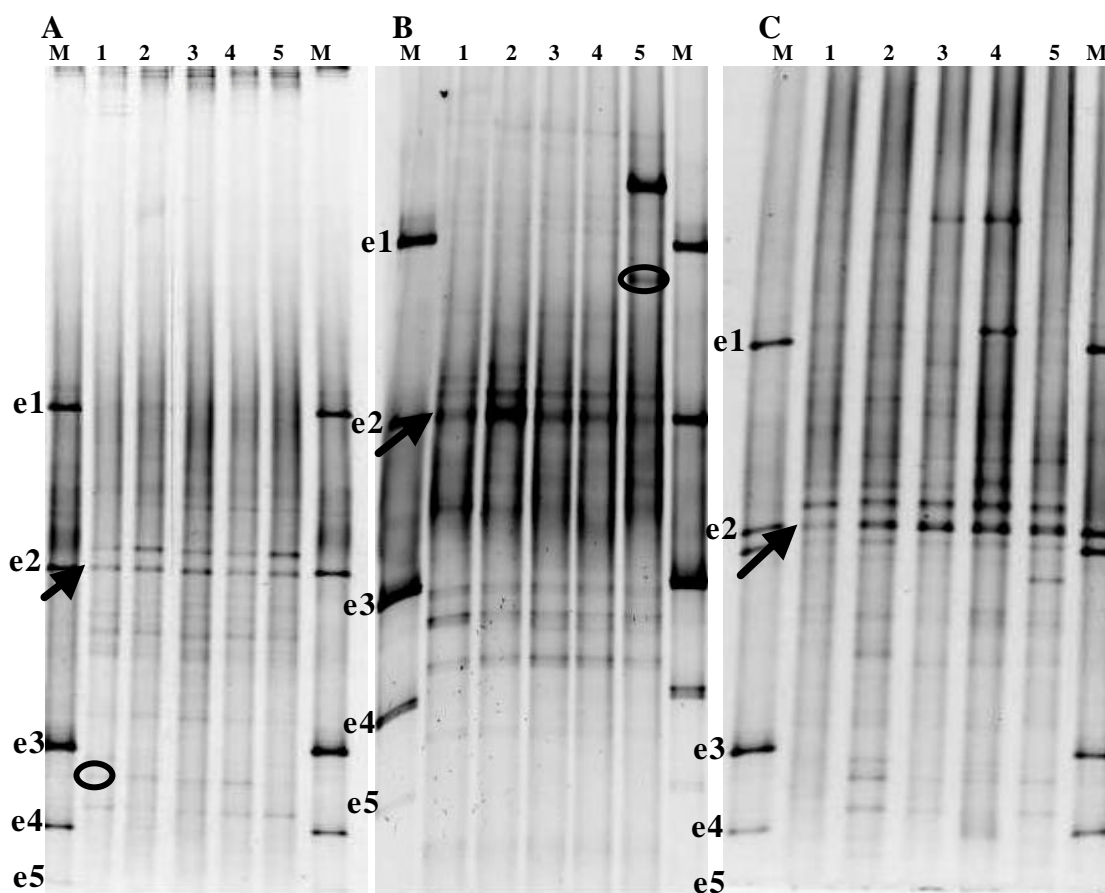


Figura 3: Géis de DGGE de comunidades bacterianas associadas ao rizoplano de diferentes cultivares de batata. A) 1ª coleta, B) 2ª coleta, C) 3ª coleta; 1- Achat, 2- Bintje, 3- Ágata, 4- Monalisa, 5- Asterix. Marcador (M): e - estirpe, e1 (BR 113); e2 (BR 112); e3 (BR 3804); e4 (BR 11340) e e5 (BR 11001).

A identificação destes grupos específicos, que pode ser realizada a partir da clonagem e sequenciamento de fragmentos de DNA retirados do gel, possibilitaria uma melhor avaliação da especificidade destes grupos, assim como, a possível identificação de grupos bacterianos úteis para serem usados como agentes de controle biológico ou promotores de crescimento vegetal.

3.3.2.2 Análise por dendrogramas de similaridade do efeito das diferentes cultivares sobre a comunidade bacteriana associada ao rizoplano

Preferencialmente, os estudos de ecologia microbiana baseados em marcadores moleculares deveriam comparar amostras que foram submetidas à eletroforese em um mesmo gel. Isto porque é difícil garantir uma padronização da técnica que possibilite a comparação direta de um gel com o outro. Porém, dado o número limitado de amostras que podem ser carregadas em um único gel, entre 15 a 25 amostras, na maioria das vezes se faz necessário que as repetições ou até mesmo os tratamentos sejam submetidos a eletroforese em géis diferentes, o que exige uma metodologia ou ferramenta eficiente para a análise dos diferentes géis. Atualmente a análise de géis de DGGE, costuma ser realizada através de programas de computador que fazem a busca das bandas, geram as matrizes de similaridade e fazem o agrupamento dos tratamentos em dendrogramas, o que pelo menos em teoria, torna possível a junção, no mesmo dendrograma, de repetições provenientes de géis diferentes. Estes programas padronizam os géis a partir de marcadores que devem estar presentes em todos os

géis. O uso de marcadores nos géis de DGGE corrigem possíveis distorções que tenham ocorrido durante a eletroforese ou mesmo durante a digitalização do gel.

Uma característica importante para um marcador de gel de DGGE é que ele precisa apresentar um elevado número de bandas, distribuídas ao longo de toda a extensão do gel, para que os processos de correção das distorções e junção de repetições diferentes sejam realizados de forma eficiente. Caso o marcador não apresente as características necessárias, o agrupamento de um mesmo tratamento obtido de diferentes repetições pode gerar dissimilaridades não inerentes ao tratamento ou a um possível efeito da repetição, mas sim, a uma limitação metodológica resultante da falta de características favoráveis no marcador.

Dada a dificuldade de se obter um marcador com as características desejáveis e, que o marcador apresentado na Figura 3 não corrigiu eficientemente as distorções apresentadas nos géis de DGGE, uma alternativa usada neste trabalho foi a geração de matrizes binárias, obtidas pela presença e ausência de bandas conforme KOZDRÓJ & ELSAS (2001) de cada repetição e, em seguida adicionar na base de dados cada matriz ao final da outra (ABOIM, 2004), obtendo-se uma única matriz, porém, com os dados de todas as repetições.

Desta forma, o dendrograma resultante, apesar de não conter a variabilidade dentro de cada tratamento, pelo fato de ser formado a partir de um número muito maior de dados, tem sido considerado adequado para mostrar os níveis de similaridade entre os tratamentos que estão sendo estudados. Além disso, deve-se levar em consideração que a comprovação do comportamento geral de um dendrograma é função da interpretação conjunta das relações que estão sendo apontadas mas, também, do que já existe de conhecimento sobre o assunto, ou seja, estes dados corroboram resultados e interpretações anteriores e, se necessário mostram novas hipóteses que, se possível, deverão ser testadas através de métodos mais robustos. Sendo assim, o método citado é uma alternativa consistente para a falta de um marcador adequado ou, mesmo, de um programa de computador capaz de padronizar dados obtidos de diferentes géis. Os resultados de estudos nos quais os agrupamentos das comunidades microbianas foram realizados por este método têm possibilitado interpretações, tanto quanto os trabalhos nos quais a análise foi realizada a partir da padronização dos dados por meio de programas de computador específicos.

Na Figura 4 são mostrados os dendrogramas representativos da comunidade bacteriana associada ao rizoplano das diferentes cultivares de batata, nas diferentes épocas de coleta. A 1ª coleta foi realizada aos 15 DAE, época correspondente ao final da fase de germinação. A 2ª coleta foi realizada aos 30 DAE, portanto, durante a fase de desenvolvimento vegetativo. E a última coleta, realizada aos 60 dias, correspondeu à fase reprodutiva, onde apesar de ter sido observada a tuberização em todas as cultivares, elas apresentavam diferentes estágios de desenvolvimento, sendo que as cultivares Asterix e Monalisa, apresentavam os tubérculos-mãe em avançado estágio de decomposição em pelo menos 4 das 5 repetições.

Observou-se que as cultivares Asterix e Monalisa aparecem fazendo parte do mesmo grupo na 1ª e 2ª coletas, com índices de similaridade médio de aproximadamente 65%. Na terceira coleta, entretanto, estas cultivares aparecem em grupos diferentes, com apenas 35% de similaridade. As cultivares Asterix e Achat aparecem fazendo parte do mesmo grupo em todas as coletas, sendo que a similaridade entre elas é de aproximadamente 53%, 65% e 40% na 1ª, 2ª e 3ª coletas, respectivamente. Pode-se observar, também, que a cultivar Bintje aparece no mesmo grupo das cultivares Asterix e Achat nas 1ª e 3ª coletas. A cultivar Ágata apresenta o comportamento mais distinto quando comparada com as demais cultivares, apresentando os menores índices de similaridade.

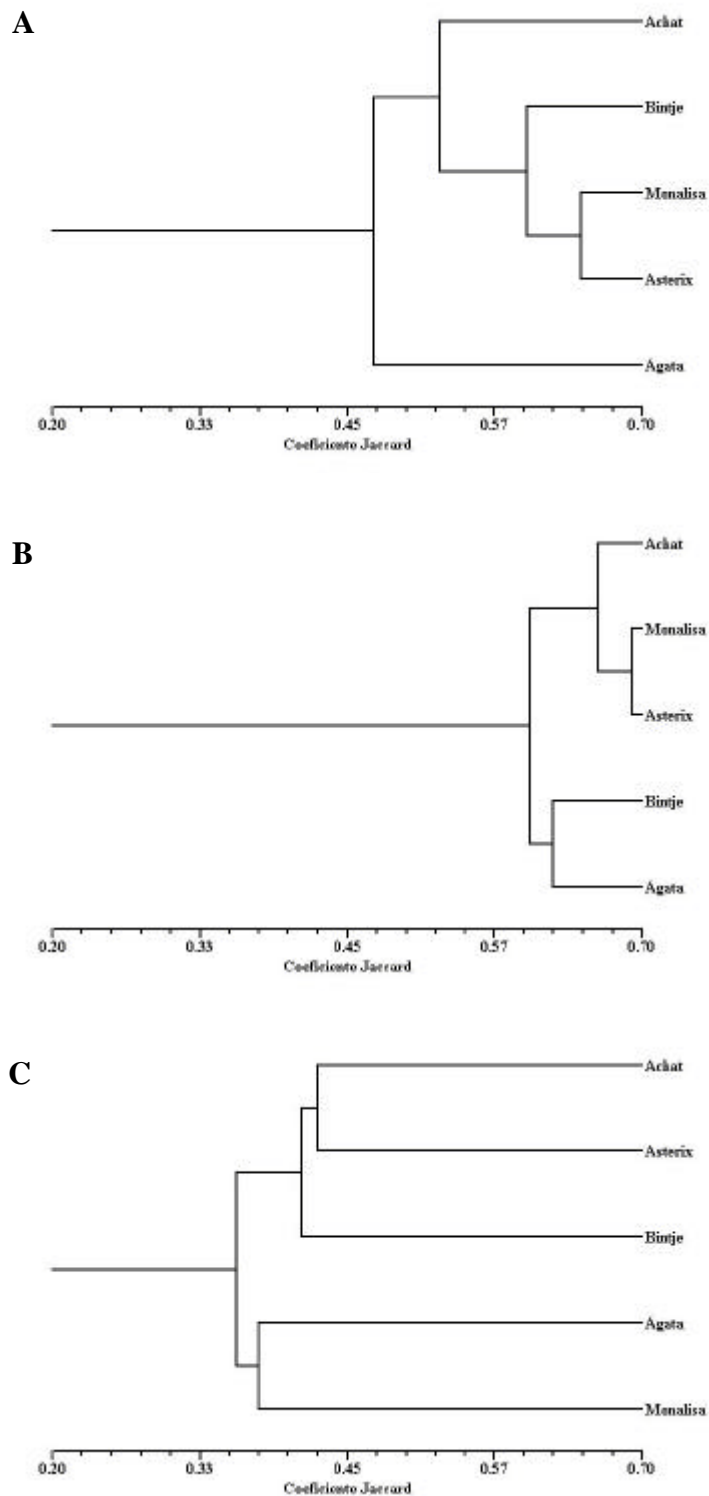


Figura 4: Dendrogramas de similaridade representativos de comunidades bacterianas associadas ao rizoplano de diferentes cultivares de batata, construídos a partir da matriz de similaridade gerada pelo coeficiente de Jaccard, utilizando-se o método de UPGMA para agrupamento. Plantas coletadas aos 15 DAE – 1ª coleta (A), 30 DAE – 2ª coleta (B) e 60 DAE – 3ª coleta (C).

Apesar da similaridade entre os grupos ter variado bastante entre as coletas, 48%, 60% e 36% nas 1ª, 2ª e 3ª coletas, respectivamente, parece haver em termos da composição da

comunidade bacteriana, uma tendência da redução da similaridade à medida que as plantas se desenvolviam, o que foi acompanhado inclusive, em alguns casos, da decomposição do tubérculo-mãe.

Por outro lado, na 3ª coleta, observa-se um estreitamento no nível de similaridade entre as diferentes cultivares. A maior similaridade foi de aproximadamente 43% entre Asterix e Achat e a menor de 35% entre os 2 grupos maiores, o que corresponde a uma faixa de variação de aproximadamente 7%.

Se um cálculo semelhante for efetuado para a coleta realizada aos 15 DAE, o valor obtido será de aproximadamente 17%, indicando que as comunidades bacterianas nesta fase conseguem distinguir melhor entre as cultivares. Já o dado obtido para a 3ª coleta indica que neste estágio ocorreu uma diversidade bacteriana menos específica que dificultou o agrupamento das cultivares, possivelmente em função dos processos de decomposição do tubérculo-mãe e, também, pelas características específicas do experimento, onde nesta fase se observava uma alta compactação das raízes nos vasos, o que, também, pode ter contribuído para o aumento das taxas de decomposição.

O fato das cultivares Monalisa e Asterix apresentarem os tubérculos-mãe em avançado estágio de decomposição pode ter estimulado determinados grupos bacterianos saprófitos nestas cultivares em detrimento das outras. Já a variação observada na formação dos grupos em cada coleta pode ser função dos diferentes estágios de maturação característico de cada cultivar, o que pode estar influenciando os tipos e/ou quantidades de compostos orgânicos exsudados pelas raízes. Segundo (ROESTI et al., 2005), a comunidade bacteriana associada ao rizoplaneo é bastante dinâmica e pode ser altamente influenciada pelo estágio de desenvolvimento da planta.

De modo geral, nas duas primeiras coletas, Monalisa e Asterix foram os materiais mais similares quando se analisa a composição da comunidade bacteriana, sugerindo uma maior similaridade no metabolismo destas cultivares, quando em comparação com as outras estudadas, na fase inicial do ciclo quando, normalmente, tem sido descrita a maior influência da planta sobre as comunidades microbianas associadas (ENGLISH & MITCHELL, 1998; GOMES et al., 2003; IBEKWE & GRIEVE, 2004). Portanto, o maior efeito da planta em relação à seleção da comunidade bacteriana provavelmente ocorreu na 2ª coleta em função de que na 1ª coleta as plantas ainda retiravam grande parte dos nutrientes do tubérculo-mãe e, por isso, a interação com a comunidade bacteriana deveria ser, ainda, muito inespecífica.

O agrupamento realizado por dendrogramas de similaridade a partir das características morfo-fisiológicas apresetadas na Tabela 3 (Figura 5) mostra uma tendência de agrupamento muito semelhante àquele observado no agrupamento por dados de presença e ausência de bandas (Figura 4). Ou seja, a cultivar Monalisa agrupa com a cultivar Asterix nas duas primeiras coletas (15 e 30 DAE) e com a cultivar Ágata na última coleta (60 DAE), mantendo o mesmo agrupamento observado para os dados de presença e ausência de bandas. Além disso, observa-se na Figura 5 que, na 1ª coleta, a cultivar Achat aparece no mesmo grupo que Monalisa e Asterix e, na 3ª coleta, as cultivares Bintje e Achat aparecem fazendo parte do mesmo grupo, repetindo os agrupamentos resultantes dos dados de ausência e presença de bandas.

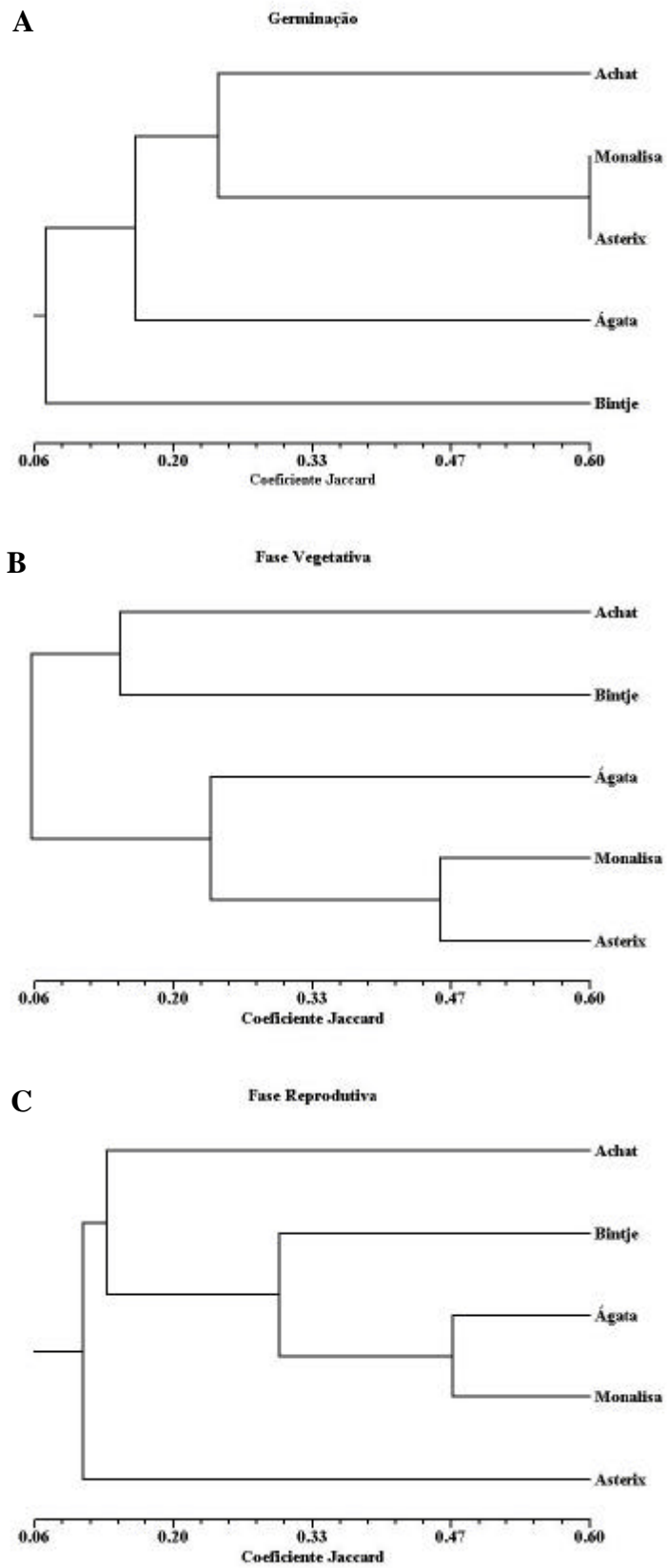


Figura 5: Dendrogramas de similaridade construídos a partir das características morfo-fisiológicas das diferentes cultivares de batata, gerados pelo coeficiente de Jaccard, utilizando-se o método de UPGMA para agrupamento.

3.3.2.3 Análise por PCA do efeito das diferentes cultivares sobre a comunidade bacteriana associada ao rizoplano

A Figura 6 mostra o agrupamento por PCA da comunidade bacteriana associada ao rizoplano das diferentes cultivares de batata nas diferentes épocas de coleta. A soma dos dois primeiros componentes principais explicam 70,5%, 58,2% e 60,6% da informação para as 1^a, 2^a e 3^a coletas, respectivamente, o que é considerado adequado para este tipo de análise em termos de explicar a variabilidade encontrada.

A análise realizada por PCA, comparada com a análise obtida por métodos de agrupamento baseados em índices de similaridade, fornece maiores detalhes das interações existentes entre as variáveis estudadas uma vez que decompõe a variação dos dados em vários componentes e mostra a informação de forma multidimensional. Desta forma, é possível que determinados agrupamentos observados em dendrogramas possam ser melhor visualizados em PCA. Portanto, este tipo de análise complementa as informações observadas nos dendrogramas e ajuda a interpretar melhor estas informações. O eixo mais importante para a interpretação dos resultados é, normalmente, o eixo X por explicar a maior parte da variação dos dados. Neste caso, a diferença entre os eixos X e Y nas 3 coletas foi de no máximo 10%, indicando que ambos os eixos, nas 3 coletas, são praticamente semelhantes quando se considera a interpretação dos resultados.

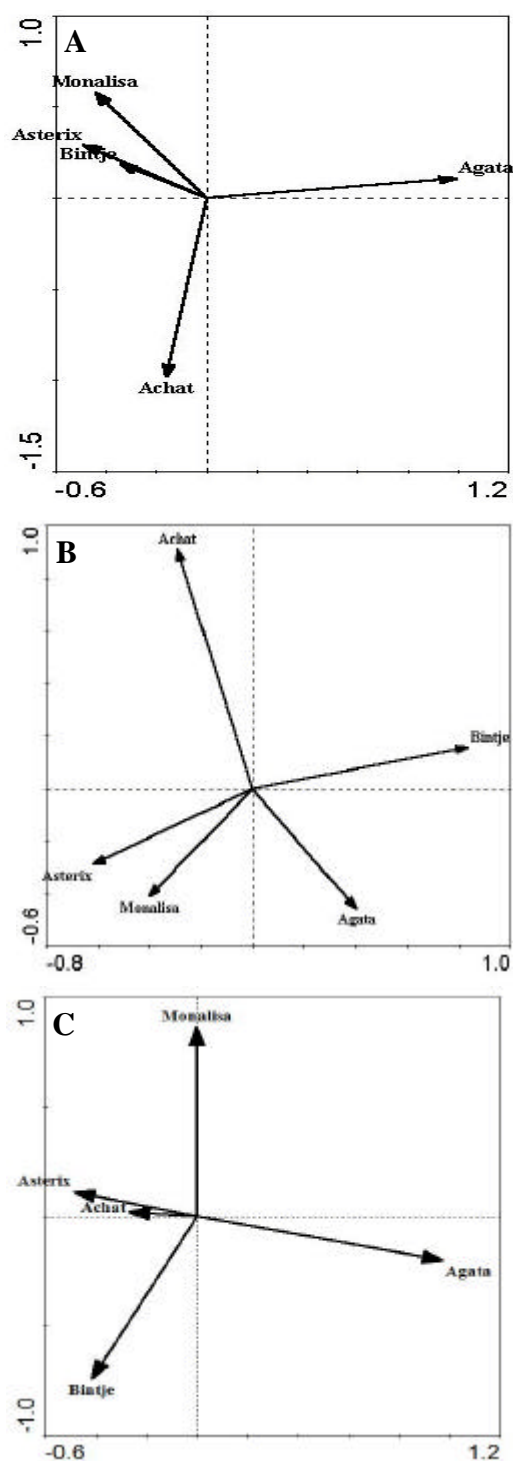


Figura 6: Agrupamento por PCA das comunidades bacteriana associada ao rizoplano de diferentes cultivares de batata. Plantas coletadas aos 15 DAE – 1ª coleta (A), 30 DAE – 2ª coleta (B) e 60 DAE – 3ª coleta (C). 1ª coleta (CP1= 40,1%; CP2=30,4%), 2ª coleta (CP1= 31,3%; CP2=26,9%) e 3ª coleta (CP1= 33,8%; CP2= 26,8%)

Analisando o eixo X nas 3 coletas, observa-se que as cultivares Achat, Monalisa e Asterix aparecem sempre juntas enquanto, a cultivar Ágata se mantém sempre afastada de todas as outras. A cultivar Bintje, por outro lado, apenas na 2ª coleta, se separa das cultivares Achat, Monalisa e Asterix. As cultivares Achat, Monalisa e Asterix apresentam a cor dos brotos como uma característica comum, além de apresentarem algum nível de resistência à

requeima e número de hastes semelhante. Estas características morfo-fisiológicas em comum indicam uma certa semelhança no nível de metabolismo o que pode estar conferindo a estas cultivares semelhanças fisiológicas que resultam exsudatos radiculares mais similares entre si o que poderia estar atuando no processo seletivo da comunidade bacteriana, explicando assim o agrupamento observado em todas as coletas. Já a cultivar Bintje, que se afasta deste grupo na 2ª coleta, é completamente diferente destas 3 cultivares em relação a estas características morfo-fisiológicas, no entanto, apresenta outras características morfo-fisiológicas semelhantes às da cultivar Achat (tolerância ao enrolamento das folhas, cor das folhas, cor da película do tubérculo, profundidade dos olhos e cor da polpa), de Monalisa (floração, cor da flor, cor da película do tubérculo, textura da película do tubérculo e profundidade dos olhos) e de Asterix (floração e forma do tubérculo) (Tabela 3), o que explicaria o fato desta cultivar aparecer no mesmo grupo de Achat, Monalisa e Asterix em pelo menos 2 coletas. A cultivar Ágata é a que apresenta o maior número de características morfo-fisiológicas diferentes das demais cultivares (cor do broto, número de hastes, altura da planta, forma do tubérculo e cor da película), o que talvez explique o afastamento observado em todas as coletas. Observa-se, também, que a cultivar Monalisa mostra um deslocamento ao longo do eixo X em direção à cultivar Ágata da 1ª para a 3ª coleta. Estas duas cultivares são de maturação precoce e, provavelmente, esta característica esteja exercendo alguma influência sobre a comunidade bacteriana do solo ao final do ciclo e esteja colaborando para o agrupamento entre estas duas cultivares.

No eixo Y (Figura 6) observa-se que a cultivar Achat, que agrupa junto com Monalisa e Asterix pelo eixo X, tende a se afastar destas duas cultivares. Observa-se na Tabela 3 que, para as características morfo-fisiológicas com informações para todas as cultivares, de um total de 17 características, a cultivar Achat compartilha 3 características com Monalisa e Asterix enquanto que Monalisa e Asterix têm 7 características em comum. Esse alto número de características comuns entre Monalisa e Asterix provavelmente dão a estas duas cultivares uma maior possibilidade de agrupamento em função de serem fisiologicamente mais semelhantes. A cultivar Achat apresenta como principais características morfo-fisiológicas, que a diferencia de Monalisa e Asterix, a cor da folha, a altura da planta e o vigor. É possível que estas diferenças tornam a cultivar Achat fisiologicamente diferente das outras (Monalisa e Asterix), resultando em diferenças nos compostos exsudados pelas raízes e, conseqüentemente, na estrutura da comunidade bacteriana. O eixo Y, também mostra que a precocidade em relação à maturação é um fator importante no agrupamento das cultivares Monalisa e Ágata. Resultados semelhantes aos descritos foram apresentados para milho (SILVA et al., 2003) e trigo (ROESTI et al., 2005).

De uma forma geral, o agrupamento das comunidades bacterianas associadas às cultivares de batata parece estar relacionado a alguma característica morfo-fisiológica. Os resultados apresentados corroboram a hipótese de que a composição química dos exsudatos radiculares decorrente da espécie de planta, cultivar, estado nutricional, idade, estresse biótico ou abiótico e outros fatores ambientais são capazes de afetar diretamente a comunidade microbiana presente na rizosfera (MAHAFFEE & KLOPPER, 1997; GRIFFITHS et al., 1999).

3.4 CONCLUSÕES

Apesar de ter ocorrido variação na similaridade entre as cultivares de uma coleta para outra, a discriminação entre as cultivares diminuiu gradativamente indicando que, à medida que as plantas vão atingindo seu desenvolvimento final, a comunidade bacteriana associada ao rizoplano das diferentes cultivares é menos discriminante do que no estágio inicial de desenvolvimento.

Ágata foi a cultivar que mais se diferenciou das demais, provavelmente em função do grande número de características morfo-fisiológicas que a distingue das demais cultivares.

Asterix, Monalisa e Achat foram bastante similares nas duas primeiras coletas, provavelmente por serem fisiologicamente mais semelhantes em função de suas características morfo-fisiológicas.

A diferenciação da cultivar Monalisa na 3ª coleta, que se deslocou em direção à cultivar Ágata, pode ter sido influenciada pela maturação, já que ambas são de maturação precoce.

A técnica de PCR-DGGE se mostrou bastante eficiente na determinação dos efeitos das cultivares sobre a comunidade bacteriana associada ao rizoplano.

CAPÍTULO II

ALTERAÇÕES NA COMUNIDADE BACTERIANA DO SOLO CULTIVADO COM BATATA (*Solanum tuberosum* L.) EM RESPOSTA À APLICAÇÃO DE AGROTÓXICOS

RESUMO

FERREIRA, Enderson Petrônio de Brito. **Alterações na comunidade bacteriana do solo cultivado com batata (*Solanum tuberosum* L.) em resposta à aplicação de agrotóxicos**

O modelo de produção agrícola conhecido como “agricultura convencional” preconiza o uso de agrotóxicos como uma forma de garantir a produtividade das culturas frente ao ataque de pragas e doenças sofrido pelas plantas. No entanto, estes agrotóxicos são notadamente conhecidos como agentes de poluição, podendo ser acumulados em vários níveis da cadeia trófica e no meio ambiente. Além disso, os efeitos de sua aplicação sobre a microbiota do solo não são conhecidos. Foi conduzido um experimento em casa-de-vegetação onde foram aplicados os inseticidas Aldicarb, Clorpirifós e Deltametrina e os fungicidas Tebuconazole e Metalaxil+Mancozeb em batata cultivada em solos do Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA), de Área de Produção Convencional (APC) e de área de Floresta Secundária (AFS). A aplicação dos inseticidas e fungicidas resultou em uma sucessão bacteriana pela qual as populações bacterianas foram mais homogêneas nas terceira quarta coletas, em comparação com as 2 primeiras coletas, não tendo sido observados efeitos significativos para a aplicação dos agrotóxicos. Por causa disto, foi observada mudanças significativa na comunidade bacteriana apenas nas 2 primeiras coletas. O efeito dos inseticidas e fungicidas dentro de cada solo foi muito específico, variando nas primeira e segunda coletas. Entretanto, a comunidade bacteriana do solo de APC mostrou a maior diferença para a comunidade bacteriana do controle. O efeito da aplicação dos inseticidas na comunidade bacteriana dos diferentes solos foi muito similar, enquanto que o efeito dos fungicidas foi característico para cada um, provavelmente em função de seus efeitos diretos sobre o grupo dos fungos que apresentam uma relação estreita com a comunidade bacteriana do solo. As comunidades bacterianas dos solos do SIPA e de AFS mostraram as menores variações em relação à comunidade bacteriana do controle, indicando uma maior resistência à aplicação dos agrotóxicos associada a estes solos. Contudo, a comunidade bacteriana do solo de AFS mostrou maior resistência à aplicação dos agrotóxicos do que a comunidade bacteriana do solo do SIPA.

Palavras-chave: DGGE, comunidade bacteriana, batata, agrotóxico.

ABSTRACT

FERREIRA, Enderson Petrônio de Brito. **Bacterial community changes in soil cultivated with potato (*Solanum tuberosum* L.) treated with insecticides and fungicides**

The agricultural production model known as "conventional agriculture" praises the use of pesticides as the only way to guarantee satisfactory crop yield in face of the high incidence of pests and diseases which is common on production fields. However, agrochemicals are remarkably known as pollutant agents, and they can accumulate at some level on the trophic chain and in the environment. Moreover, its effects on the soil microorganisms, a vital component of soil quality, are still not well known. An experiment under greenhouse conditions was carried out to evaluate the effects of insecticides (Aldicarb, Chlorpyrifos and Deltamethrin) and fungicides (Tebuconazole and Metalaxyl+Mancozeb) on soil microbial community after the application of these pesticides in potato cultivated in soil from an Agroecological Integrated Production System (AIPS), a Conventional Potato Production Area (CPPA) and a Secondary Forest Area (SFA) nearby to the production area. The application of the insecticides and fungicides resulted in a bacterial succession in which the bacterial populations were more homogeneous in both third and fourth harvests, compared to the first and second ones, without significant effects to the pesticides application. Because of that, it was observed significant shifts on bacterial community only in the first and second harvests and they were far from the third and fourth harvests. The effects of insecticides and fungicides within each soil were very specific with effects varying in the both first and second harvests. However, the soil bacterial community of the CPPA showed the greatest difference to the control. The effect of insecticide application on the soil bacterial community of the different soils was very similar, while the effects of fungicides were characteristic for each one, probably by their effects on fungi groups closely related to the bacterial communities. Bacterial communities from both AIPS and SFA soils showed the lowest shifts in relation to the control, indicating greater resistance in these soils. However, the soil bacterial community from SFA showed greater resistance to the pesticides application than the soil bacterial community from AIPS.

Key-words: DGGE, bacterial community, potato, pesticide.

4.1 INTRODUÇÃO

A bataticultura é uma das mais importantes atividades olerícolas praticadas no Brasil, tanto em área plantada, como em preferência alimentar. Além disso, a batata destaca-se também pelas grandes quantidades de agrotóxicos utilizados, em função do grande número de pragas que atacam esta cultura (ÁVILA et al., 1999). Sob as condições brasileiras de cultivo, a cultura da batata é atacada por 26 espécies de insetos e 16 doenças, causadas por diferentes espécies de fungos, bactérias, vírus, nematóides, entre outros. O número de ingredientes ativos registrados no Ministério da Agricultura é de: 41 ingredientes ativos registrados para o controle de artrópodes e 58 ingredientes ativos registrados para o controle de outros agentes causais. Considerando que no cultivo convencional o controle das ervas daninhas é realizado pela aplicação de herbicidas, podem ser adicionados à lista mais 14 ingredientes ativos registrados para o controle das plantas invasoras (AGROFIT, 2005).

Apesar da aplicação de agrotóxicos ainda ser uma das principais estratégias utilizadas para assegurar altas produtividades das culturas, esses agrotóxicos são tóxicos ao homem, podendo causar efeitos adversos ao sistema nervoso central e periférico, ter ação imunodepressora ou serem carcinogênicos (ECOBICHON, 1993 *apud* CALDAS & SOUZA, 2000). Em um estudo com 320 compostos registrados para uso agrícola no Brasil, com base no cálculo da ingestão diária máxima teórica para cada composto utilizando-se os limites máximos de resíduos estabelecidos pela legislação brasileira e os dados de consumo alimentar, foram identificados 23 compostos apresentando potencial risco à saúde do consumidor, dos quais 18 são inseticidas, tendo sido encontrados 16 inseticidas organofosforados e 5 fungicidas (CALDAS & SOUZA, 2000).

Além do risco à saúde humana, os agrotóxicos são notadamente conhecidos como agentes de poluição, podendo ser acumulados em vários níveis da cadeia trófica e no meio ambiente. Os impactos dos poluentes no ecossistema é um assunto urgente pelo fato de existir um número cada vez maior de exemplos de distúrbios ambientais decorrentes do uso de produtos químicos. Fatores estressantes de importância para as culturas incluem contaminantes químicos tóxicos, aumento de luz UV-B, hipoxia devido a eutrofização e doenças induzidas por patógenos. Na verdade, os distúrbios ambientais são frequentemente causados pela associação de vários fatores. Portanto, é sabido que para se conhecer os efeitos dos impactos dos distúrbios ambientais nos organismos é necessário o entendimento dos efeitos dos estresses através de toda a organização biológica hierárquica, ou seja, no nível molecular, no celular, no organismo, na população, na comunidade e ecossistema (MOORE, 2001).

Uma das maneiras de se avaliar o impacto ambiental é através do estudo das populações não alvo. No caso do uso de agrotóxicos, o impacto especialmente sobre os microrganismos do solo é de suma importância, uma vez que os microrganismos desempenham papel preponderante na ciclagem de nutrientes e estabilização da matéria orgânica do solo (FEIGL et al., 1998). Além disso, atuam nos processos de sucessão ecológica, através de relações de antagonismo e/ou sinergismo que resulta no equilíbrio dinâmico da população microbiana (KENNEDY, 1999). Os impactos que interferem no desenvolvimento e atividade microbiana tendem a levar o solo a um estado de desequilíbrio microbiológico por alterar a estrutura da comunidade microbiana, podendo favorecer a prevalência ou o estabelecimento de microrganismos patogênicos ou restringir o desenvolvimento de microrganismos importantes ecologicamente (KENT & TRIPLETT, 2002; GARBEVA et al., 2004). Neste sentido, a avaliação do impacto do uso de agrotóxicos para controle de doenças, plantas invasoras e pragas sobre os microrganismos do solo

representa uma linha de pesquisa que não deve ser negligenciada (KENT & TRIPLETT, 2002).

A diversidade microbiana estrutural tem sido estudada recentemente através de métodos que se baseiam na investigação de parte da seqüência do DNA, notadamente o gene 16S rRNA em bactérias e 18S rRNA para fungos, que são amplificados pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) e, posteriormente, caracterizados através da clonagem e seqüenciamento ou, então, analisado por eletroforese através das técnicas da Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA – *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição Terminal (T-RFLP - *Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism*), Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA*), Análise do Espaçador Intergênico Ribossomal (RISA – *Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*), Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturantes (DGGE – *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), Eletroforese em Gel com Gradiente de Temperatura (TGGE – *Temperature Gradient Gel Electrophoresis*) e Polimorfismo Conformacional da Fita Simples (SSCP – *Single Strand Conformational Polymorphism*) onde um perfil da comunidade microbiana é obtido (RANJARD et al., 2000; KOZDRÓJ & ELSAS, 2001).

O objetivo deste trabalho foi avaliar, através da técnica de DGGE, o impacto do uso de diferentes agrotóxicos na estrutura da comunidade bacteriana do solo de um sistema de intergrado de produção agroecológica, de área de produção convencional e de uma mata secundária próxima à área de produção cultivados com batata.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Coleta do Solo e Instalação dos Experimentos

Amostras de solo foram coletadas no Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA), localizado no município de Seropédica (RJ) e em Área de Produção Convencional (APC) de batata e Área de Floresta Secundária (AFS) em junho de 2003 na Embrapa Hortaliças, Brasília - DF.

Foi conduzido um experimento em casa-de-vegetação, a qual apresenta uma condição de temperatura heterogênea já conhecida. Por esta razão, o experimento foi montado usando o delineamento experimental de blocos ao acaso com 3 repetições, com parcela sub-dividida no tempo e fatorial (5X3) na parcela. O fatorial foi composto pelos 3 tipos de solo e 5 agrotóxicos (Tabela 4), sendo 3 inseticidas e 2 fungicidas e 1 tratamento controle. O efeito das 4 coletas, realizadas aos 32, 47, 62 e 77 Dias Após o Plantio (DAP), foi avaliado na sub-parcela.

Os solos foram peneirados e o preparo dos vasos foi realizado misturando-se vermiculita ao solo na proporção 3:1 (3 partes de solo para 1 parte de vermiculita). Cada solo foi misturado à vermiculita separadamente com o auxílio de uma betoneira, cujo interior, antes e depois desta operação com cada solo, foi fumigado pela adição de 30 mL de Clorofórmio (CH_2Cl) e incubada durante 1 noite com a abertura lacrada, com o objetivo de evitar a contaminação do solo subsequente. O plantio das plantas de batata cv. Achat foi realizado em meados de julho de 2003 e foram feitas duas pulverizações aos 30 e 45 DAP com os inseticidas e fungicidas listados na Tabela 4, com exceção do Aldicarb, que foi incorporado ao solo no momento do preparo dos vasos. As coletas foram realizadas aos 32, 47, 62 e 77 DAP.

4.2.2 Desenvolvimento de Meio de Cultivo Para Microrganismos do Solo

Com o objetivo de avaliar a diversidade bacteriana a partir do cultivo para enriquecimento da comunidade microbiana, foi utilizado um meio de cultivo contendo ágar e solo como fonte de nutrientes (ZILLI et al., 2003). Foram testadas quantidades diferentes de solo e ágar, a fim de se obter condições ótimas para a solidificação do meio de cultivo. Os solos foram peneirados em peneira de malha (2 mm) e secos em estufas (65 °C), em seguida separou-se uma fração do solo que foi pulverizada em moinho de rolagem (SMITH & MYUNG, 1990). Posteriormente foram testadas todas as possíveis combinações entre 1,5; 2 e 4 g de ágar e 10, 20, 40 e 80 g de solo moído em 100 mL de água para a confecção do meio solo.

Tabela 4: Grupo químico, dose do ingrediente ativo.ha⁻¹, modo de aplicação e período de aplicação dos agrotóxicos usados no experimento com batata cv. Achat.

Ingrediente ativo	Grupo Químico	Dose do ingrediente ativo (kg.ha ⁻¹)	Modo de aplicação	Período de aplicação
INSETICIDAS				
Aldicarb	Carbamato	1,95	Incorporação ao solo	No plantio
Clorpirifós	Organofosforado	0,72	Pulverização	30 e 45 DAP
Deltametrina	Piretróide	0,008	Pulverização	30 e 45 DAP
FUNGICIDAS				
MetalaxII+	Fenilamida +	0,2	Pulverização	30 e 45 DAP
Mancozeb	Etilenobisditiocarbamato	1,6		
Tebuconazole	Triazol	0,2	Pulverização	30 e 45 DAP

DAP= Dias Após Plantio

4.2.3 Enriquecimento da Comunidade Microbiana em Meio Solo

Após retirar cada planta do vaso, pesou-se 10 gramas de solo em erlenmeyer. Adicionou-se 90 mL de água destilada autoclavada e colocou-se para agitar (200 RPM; 30 min). De cada amostra, foi retirada uma alíquota de 100 µL que foi inoculada em placas de Petri contendo o meio solo correspondente. As amostras foram incubadas a 25 °C durante 5 dias para o crescimento microbiano. Após este período, foram adicionados 2 mL de água destilada autoclavada e as placas foram limpas com o auxílio de uma alça de Drigalski para a coleta do material crescido. Este material foi transferido para microtubos e centrifugado (10.000 RPM; 15 min). Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi armazenado à -20 °C.

4.2.4 Extração de DNA

Seguiu-se o protocolo descrito por SCHWIEGER & TEBBE (1998) e modificado por XAVIER et al. (2004). O precipitado microbiano estocado (-20 °C) foi ressuspenso em 0,6mL de tampão de lise TES (0,05M NaCl; 0,01M EDTA; 0,05M Tris HCl pH 8,0; 1% SDS) e agitado em vórtex. Em seguida, as amostras foram submetidas a cinco etapas de congelamento/descongelamento: imersão em nitrogênio líquido (5min), aquecimento (65 °C; 180 RPM; 5 min) e agitação (180 RPM; 10 s). Aplicou-se, então, 8,4 µL de proteinase K (20 mg.mL⁻¹) nas amostras que foram incubadas sob agitação (180 RPM; 65 °C; 1 hora). Em seguida, adicionou-se, 0,6 mL (1 volume) de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugou-se as amostras (9.000 RPM; 6 min). O sobrenadante foi transferido cuidadosamente para novos tubos, onde foram adicionados 0,6 mL (1 volume) de clorofórmio-álcool isoamílico, repetindo-se a centrifugação anterior. Uma alíquota de aproximadamente 0,5 mL do sobrenadante foi transferida para um novo tubo e 0,5 volumes de isopropanol gelado foram adicionados. As amostras foram, então, incubadas (60 min; -20 °C) e centrifugadas (13.000 RPM; 20 min). Removido o sobrenadante, o precipitado foi centrifugado a vácuo para a secagem e ressuspenso em 50 µL de tampão TE (10mM Tris; 1mM Na-EDTA; pH 8,0).

4.2.5 Condições da PCR e DGGE

As reações de amplificação foram realizadas em triplicata, nas diluições 1:20, 1:40 e 1:80. As reações foram feitas em um volume final de 35 µL e consistiram de 1 µL da diluição do DNA, tampão (10 mM), MgCl₂ (3,5 mM), dNTP (0,2 µM cada), BSA (0,17 µg.µL⁻¹), *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) (0,7 U) e os iniciadores 1401-R e 968CG-F (0,2 µM cada). Estes iniciadores e as condições da reação de PCR: aquecimento inicial (95 °C; 3 min), 40 ciclos compostos de desnaturação (94 °C; 30 s), anelamento (55 °C; 30 s) e extensão (72 °C; 30 s) e uma etapa final de extensão (72 °C; 5 min) estão descritas em GELSOMINO et al.

(1999). Após a amplificação, os produtos das três reações de PCR, provenientes das diluições, foram combinados em um único microtubo.

Um volume de 12 a 20 µL de cada amostra de DNA amplificado foi aplicado em gel desnaturante de poli-acrilamida 6 % (N-acrilamida, N'-metilbisacrilamida, 37:1) dissolvida em tampão TAE 0,5X (Tris-base, 20 mM pH 7,8; acetato de sódio 10 mM e Na-EDTA, 0,5 mM). O gradiente de desnaturante utilizado foi de 50 a 65%, obtido usando-se duas soluções, uma contendo apenas solução de poliacrilamida e a outra uréia (7M), formamida (40% v/v) e poliacrilamida. A eletroforese foi realizada no sistema *DcodeTM* (Bio-Rad) sob voltagem constante (120 V; 60 °C; 16 horas) e, ao final, o gel foi corado com uma solução de Syber Gold (Molecular Probe) (20X) e visualizado sob luz ultravioleta no sistema de fotodocumentação IMAGO (B&L). Devido à limitação do número de amostras que podem ser aplicadas em um gel ser no máximo 16, optou-se por se colocar no mesmo gel todos os tratamentos referentes de uma mesma repetição.

4.2.6 Análise Estatística

A partir dos perfis de bandas dos géis de DGGE, foram elaboradas matrizes binárias de presença e ausência de bandas para cada uma das repetições, em cada coleta, em função da posição que as bandas ocupavam no gel. Para bandas presentes em determinado tratamento era anotado o valor numérico “1”, se ausente, era anotado o valor numérico “0” (KOZDRÓJ & ELSAS, 2001). Como o estudo foi composto de 3 repetições, foi construída uma única matriz, a partir das 3 repetições, em que cada repetição foi adicionada na planilha ao final da anterior (ABOIM, 2004). A partir desta matriz binária foi feita a análise de agrupamento por dendrograma para a qual foi utilizado, para o cálculo da similaridade, o coeficiente de Jaccard e o método UPGMA para agrupamento, através do programa NTSYS-PC v. 2.10 (Applied Biostatistics). As matrizes binárias também foram usadas para a Análise de Componentes Principais (PCA) usando o programa CANOCO v. 4.5. Após a construção dos dendrogramas de cada área, foram determinadas, para cada repetição, os valores de similaridade de cada tratamento em relação ao controle. Como o controle foi utilizado como referência para a medida de similaridade, ele passou a não fazer parte da análise de variância, permanecendo apenas 5 tratamentos, sendo 3 inseticidas e 2 fungicidas. As médias foram testadas a 5% de significância pelo teste de Scott-Knott. As médias também foram submetidas a uma análise de regressão para a determinação dos coeficientes de melhor ajuste ao modelo e das diferenças entre as coletas.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A estratégia utilizada neste trabalho consistiu do enriquecimento da comunidade microbiana do solo em meio de cultura contendo apenas o solo usado para o cultivo da planta como fonte de carbono e nutrientes, visando aumentar o número de células de microrganismos presentes na amostra do solo, cultiváveis no referido meio. Esta estratégia é importante porque pode fornecer nutrientes e outros compostos limitantes e necessários, difíceis de serem suplementados nos meios de cultura puramente sintéticos, os quais apresentam uma série de limitações para estudo da diversidade microbiana (COWAN, 2000; RANJARD et al., 2000). Apresenta também a vantagem de ser de baixo custo e de não necessitar de equipamentos sofisticados, comparadas a kits e protocolos de extração de DNA de solo, além de permitir uma avaliação da fração viva e ativa dos microrganismos do solo.

ZILLI (2004), avaliando os impactos de herbicidas sobre a comunidade bacteriana do solo, obteve três seqüências de bactérias com alta homologia que haviam anteriormente sido citadas como não cultivadas, o que sugeriu que o meio solo pode auxiliar na obtenção de novas bactérias ainda não cultivadas.

Diversos autores têm utilizado a técnica de DGGE como uma ferramenta para avaliação de diferentes amostras ambientais tais como: efeito de resíduos de petróleo (DUARTE et al., 2001), efeito de contaminação com gasolina (ARAÚJO et al., 2004), variação da população microbiana em diferentes cultivos (GOMES et al., 2001) e de alterações em diferentes cultivos de plantas geneticamente modificadas (HEUER et al., 2002).

4.3.1 Preparo do Meio Solo e Enriquecimento Microbiano

Das 12 possíveis combinações de quantidades de ágar e solo em 100 mL de água para a confecção do meio solo, os melhores resultados foram obtidos utilizando-se 40g de solo, 2 g de ágar em 100 mL de água, onde o meio solo apresentou solidificação e consistência semelhantes às aquelas usadas na confecção dos meios de cultura convencionais, quando normalmente são utilizados 1,5 g de ágar para cada 100 mL de água. Nas condições descritas acima e após o período de incubação de 5 dias, foi observado um crescimento microbiano abundante, mostrando a eficiência do meio de cultura em promover o enriquecimento da população microbiana.

4.3.2 Efeito dos Agrotóxicos na Comunidade Bacteriana do Solo

4.3.2.1 Perfis da comunidade bacteriana do solo visualizados em gel de DGGE

As Figuras 7, 8 e 9 mostram fotos de géis de DGGE de amostras de comunidade bacteriana provenientes da área do SIPA, da APC e de AFS próxima à área de produção. É possível observar que algumas bandas (quadrado) estão presentes em todos os tratamentos e em todas as coletas, indicando a presença de grupos de bactérias que, independentemente do tratamento aplicado ou da época de coleta, encontra-se estabelecido naquele ambiente. Além disso, podemos observar uma discriminação de determinados grupos bacterianos, seja em função do tratamento aplicado (setas) ou em função da variação ao longo do período de coleta (círculo), o que pode ser observado nas amostras provenientes do controle (Figura 7, linhas 13 a 16). Este mesmo tipo de tendência também pode ser observada para as áreas de produção convencional e de mata secundária de Brasília (Figuras 8 e 9).

Agrotóxicos são produtos que foram desenvolvidos para atuar sobre organismos alvos. Porém, podem apresentar efeito residual sobre outros organismos, tais como, insetos e microrganismos, desta forma promovendo alterações na estrutura da comunidade (SPADOTTO, 2002). São, também, reconhecidos como capazes de induzir efeitos variáveis

na biomassa e atividade microbiana do solo. Os resultados disponíveis na literatura indicam que, em geral, os efeitos dos herbicidas na biomassa microbiana são de menor importância e intensidade que os dos fungicidas, quando se considera efeitos a longo prazo (WARDLE & HUNGRIA, 1994; TOPP et al., 1997). Via de regra, a toxicidade causada pela aplicação de produtos químicos sobre os microrganismos é atenuada quando ocorre a degradação do produto, o que tem sido sugerido como estando associado à recuperação da população microbiana (TOPP et al., 1997). No entanto, dados relativos à dinâmica associada à aplicação de agrotóxicos em áreas tropicais são bastante limitados.

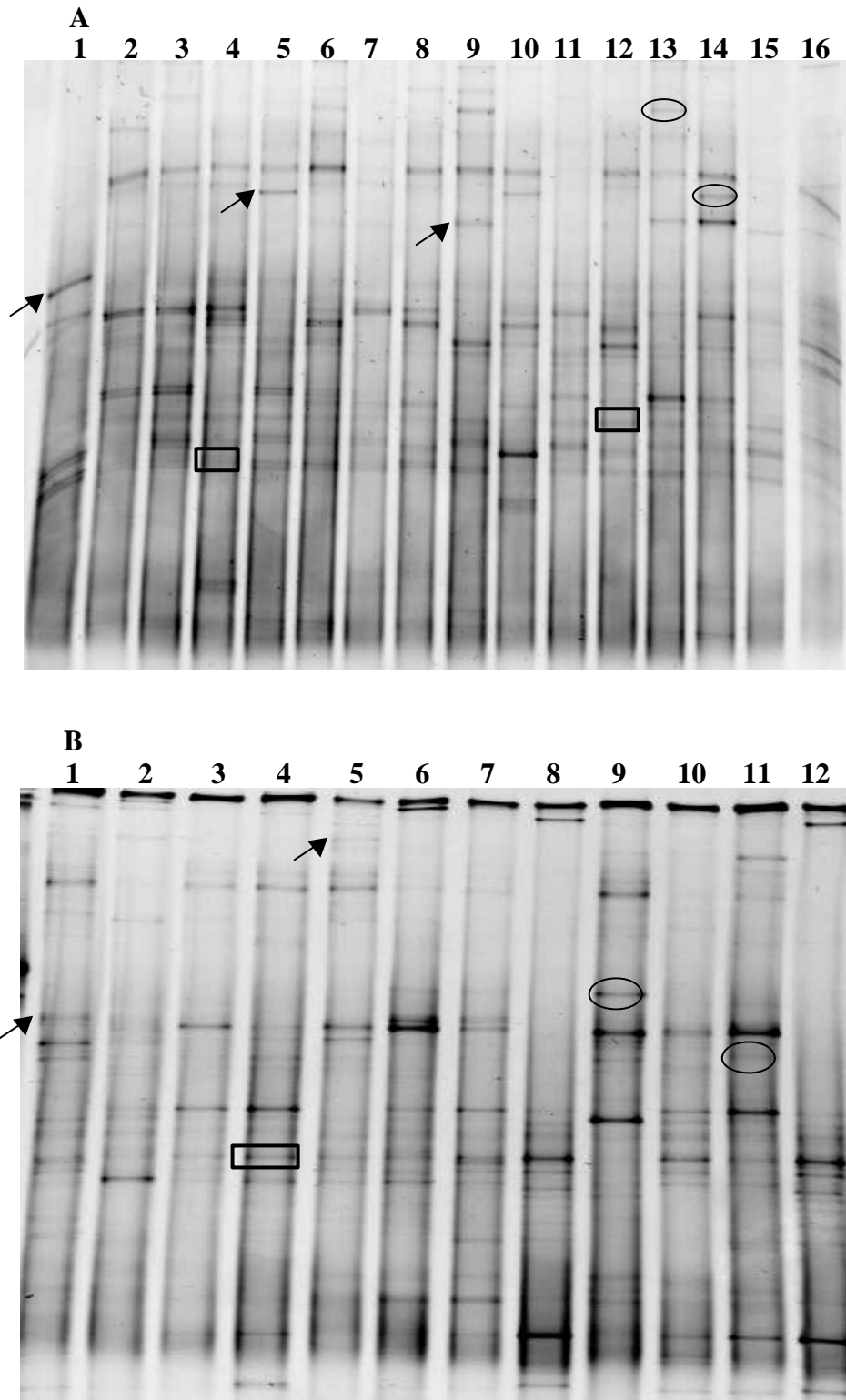


Figura 7: Gel de DGGE de comunidades bacterianas do solo da área do SIPA crescidas em meio solo, submetida ao tratamento com inseticidas e fungicidas. A) Inseticidas: Linhas 1 a 4- Aldicarb, coletas 1, 2, 3 e 4; Linhas 5 a 8- Clorpirifós, coletas 1, 2, 3 e 4; Linhas 9 a 12- Deltametrina, coletas 1, 2, 3 e 4 e linhas 13 a 16- Controle, coletas 1, 2, 3 e 4. B) Fungicidas: Linhas 1 a 4- Tebuconazole, coletas 1, 2, 3 e 4; Linhas 5 a 8- Metalaxil+Mancozeb, coletas 1, 2, 3 e 4 e Linhas 9 a 12- Controle, coletas 1, 2, 3 e 4.

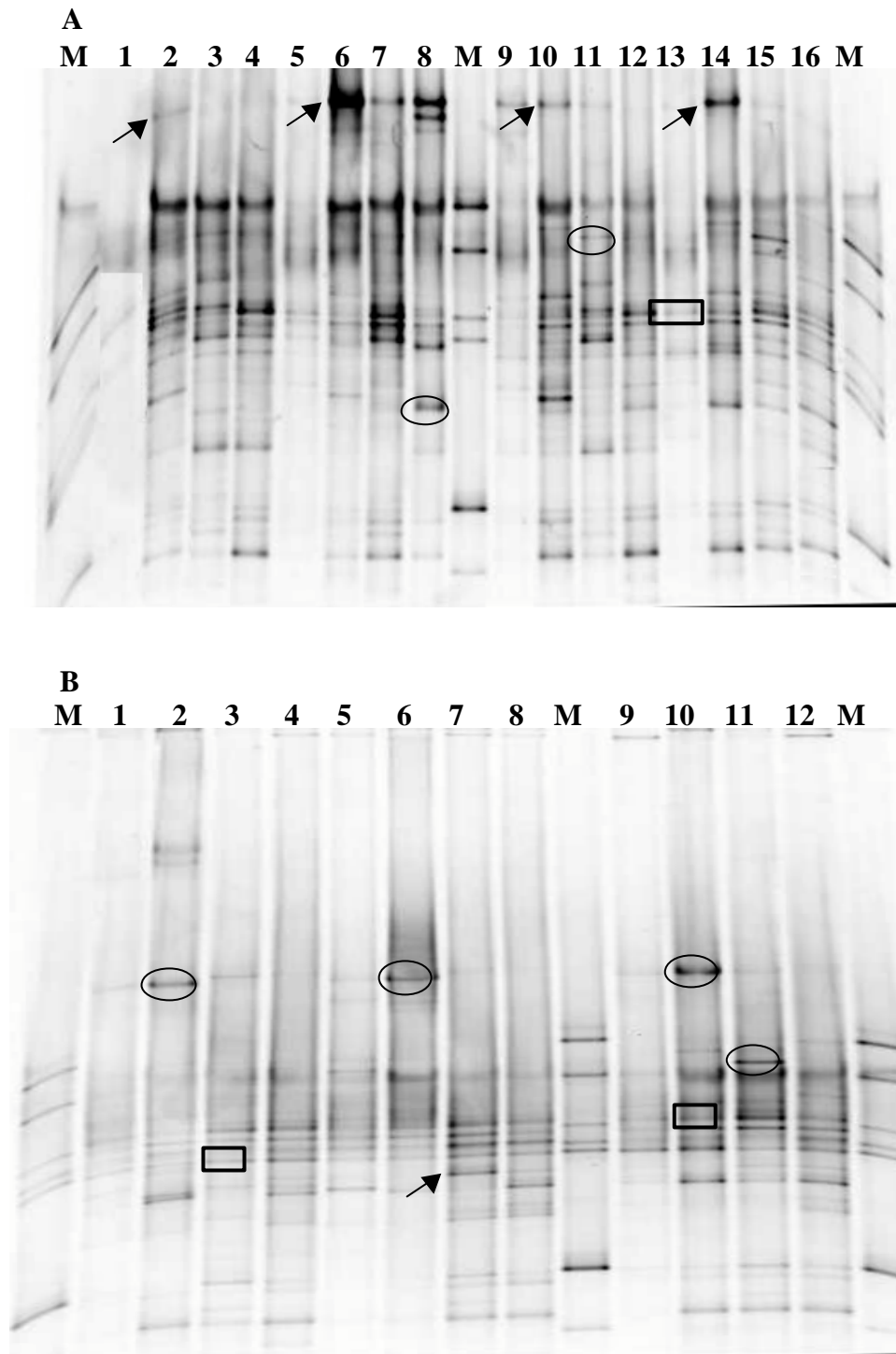


Figura 8: Gel de DGGE de comunidades bacterianas da área de APC crescida em meio solo, submetida ao tratamento com inseticidas e fungicidas. A) Inseticidas: Linhas 1 a 4- Aldicarb, coletas 1, 2, 3 e 4; Linhas 5 a 8- Clorpirifós, coletas 1, 2, 3 e 4; Linhas 9 a 12- Deltametrina, coletas 1, 2, 3 e 4 e linhas 13 a 16- Controle, coletas 1, 2, 3 e 4. B) Fungicidas: Linhas 1 a 4- Tebuconazole, coletas 1, 2, 3 e 4; Linhas 5 a 8- Metalaxil+Mancozeb, coletas 1, 2, 3 e 4 e Linhas 9 a 12- Controle, coletas 1, 2, 3 e 4.

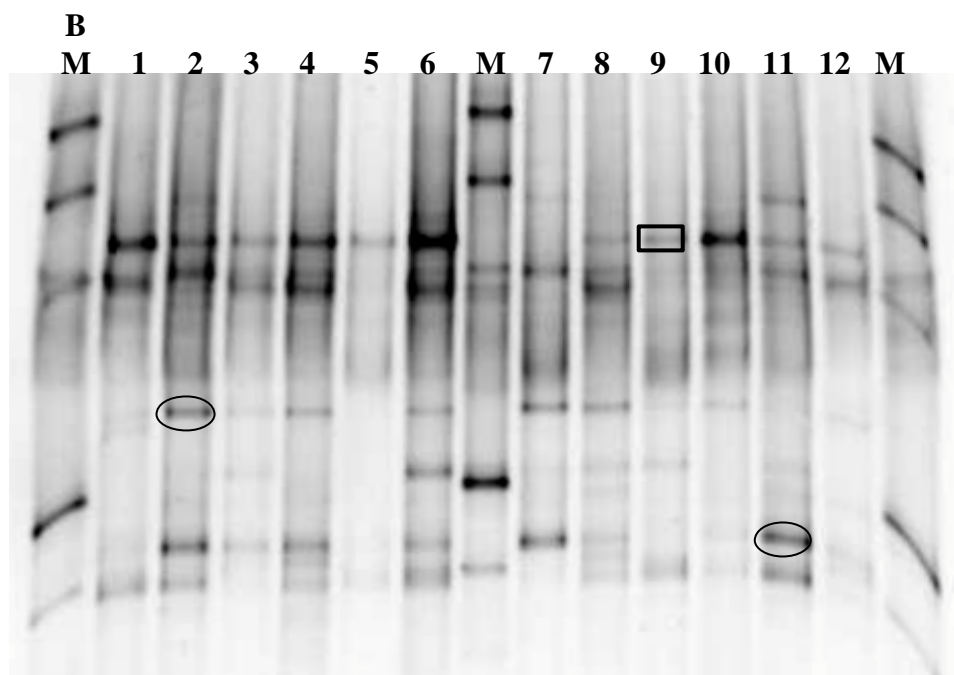
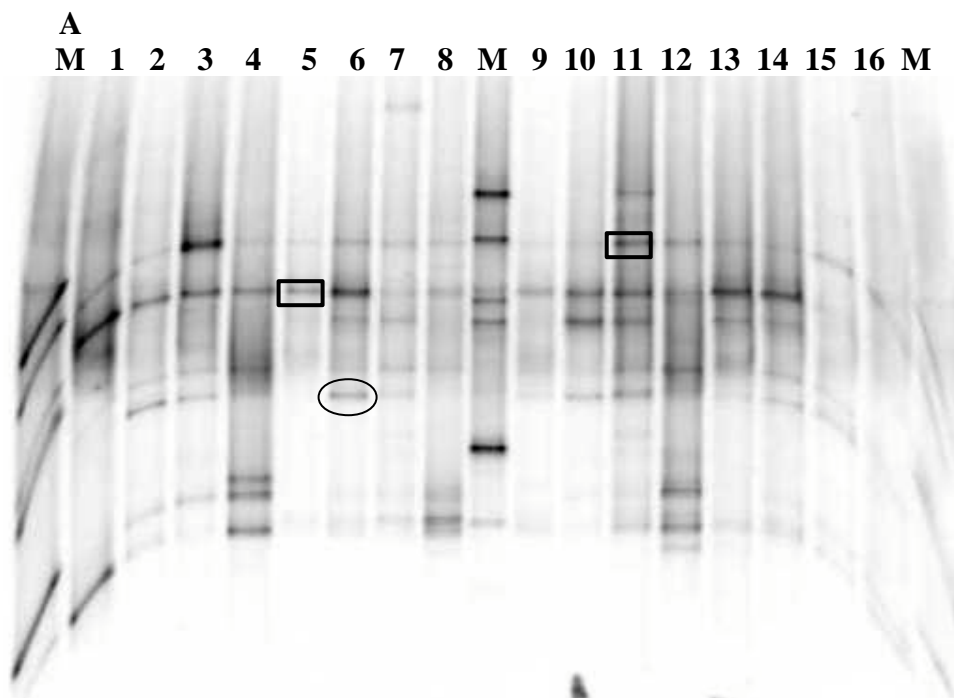


Figura 9: Gel de DGGE de comunidades bacterianas de AFS crescidas em meio solo, submetida ao tratamento com inseticidas e fungicidas. A) Inseticidas: Linhas 1 a 4- Aldicarb, coletas 1, 2, 3 e 4; Linhas 5 a 8- Clorpirifós, coletas 1, 2, 3 e 4; Linhas 9 a 12- Deltametrina, coletas 1, 2, 3 e 4 e linhas 13 a 16- Controle, coletas 1, 2, 3 e 4. B) Fungicidas: Linhas 1 a 4- Tebuconazole, coletas 1, 2, 3 e 4; Linhas 5 a 8- Metalaxil+Mancozeb, coletas 1, 2, 3 e 4 e Linhas 9 a 12- Controle, coletas 1, 2, 3 e 4.

4.3.2.2 Análise por dendrogramas de similaridade do efeito da aplicação de inseticidas e fungicidas sobre a comunidade bacteriana do solo

Nas Figuras 10, 11 e 12 são mostrados os dendrogramas representativos da comunidade bacteriana do solo do SIPA, APC e de AFS, respectivamente, cultivado com batata, submetido à aplicação de inseticidas.

A aplicação do inseticida Aldicarb resultou em um afastamento da comunidade bacteriana da área do SIPA em relação ao controle aos 30 dias após a aplicação, mantendo-se essa tendência ao longo do período (Figura 10). No solo da APC convencional a aplicação do inseticida Aldicarb, também, resultou em um afastamento em relação à comunidade bacteriana do controle, sendo que, aos 32 dias após a aplicação (1ª coleta), a similaridade entre o controle e o tratamento com Aldicarb foi de apenas 7% (Figura 11). Porém, ao longo do período de estudo, houve uma tendência de recuperação dessa comunidade no sentido de se tornar mais semelhante ao controle. Em relação ao efeito do Aldicarb sobre a comunidade bacteriana do solo da AFS, houve também um afastamento em relação ao controle que, se por um lado não foi tão acentuado no início do experimento, foi persistente ao longo de todas as coletas realizadas (Figura 12).

O Aldicarb é capaz de inibir de forma competitiva a acetil-colinesterase nas sinapses (WRIGHT, 1981 *apud* SIKORA & HARTWIG, 1991) o que deve promover um efeito predominante sobre os invertebrados do solo. Neste experimento, o processamento do solo parece ter eliminado a macro e mesofauna. No entanto, a microfauna presente nas amostras de solo, se afetada, também pode disponibilizar nutrientes para o desenvolvimento de determinados grupos bacterianos, o que justificaria o aparecimento e desaparecimento de bandas ao longo do período de coleta (Figuras 7, 8 e 9). Esta possibilidade estaria de acordo com os estudos de HART & BROOKES (1996) que observaram um aumento significativo de até 17% no C da biomassa microbiana do solo, que pode ser decorrente da disponibilização de nutrientes resultante da aplicação de aldicarb no solo, o que pode ter efeito direto sobre a comunidade microbiana do solo.

O efeito do inseticida Clorpirifós sobre a comunidade bacteriana do solo do SIPA foi semelhante ao Aldicarb, ou seja, à medida que foram feitas as aplicações, foi observado um maior afastamento desta comunidade em relação ao controle, refletindo na redução da similaridade de cerca de 58% aos 30 dias após o plantio para cerca de 46% aos 75 dias (Figura 10). Já em solo da APC foi observado um impacto inicial muito forte da aplicação dos inseticidas sobre a comunidade bacteriana do solo, reduzindo a similaridade dessa comunidade a apenas 7%. Possivelmente os efeitos dos inseticidas sobre os microartrópodos do solo pode ter disponibilizado nutrientes, possibilitando o rápido desenvolvimento de grupos bacterianos oportunistas ocorrendo, assim, a redução de similaridade entre as comunidades microbianas. No entanto, a comunidade bacteriana mostrou uma ligeira recuperação em relação ao impacto inicial, permanecendo com índices de similaridade em torno de 25% (Figura 11). Nas amostras de solo de AFS essa recuperação inicial mostrou-se bastante elevada, mas na 3ª coleta observa-se novamente uma redução na similaridade em relação ao tratamento controle, que se mantém na 4ª coleta (Figura 12).

O Clorpirifós é um organofosforado com modo de ação semelhante ao aldicarb, competindo também com a acetil-colinesterase (WARE & WHITACRE, 2004). Em um estudo conduzido por três anos consecutivos PANDEY & SINGH (2004), observaram que após o tratamento do solo com Clorpirifós, houve uma redução gradativa da população bacteriana de até 70% observada após 30 dias da aplicação. Após esse período, os autores observaram uma recuperação da população bacteriana que alcançou um número de células similar ao controle somente após 120 dias do tratamento do solo. Apesar do clorpirifós apresentar uma meia vida no solo relativamente baixa, em torno de 8 dias, seus resíduos só desaparecem completamente após 120 dias do tratamento do solo (PANDEY & SINGH,

2004). Esse efeito pode ser intensificado em função da dose aplicada ou do número de repetições da aplicação, o que aumenta a concentração do produto. Segundo MOHAN et al. (2004), quanto maior a quantidade aplicada do produto, menor será a percentagem do mesmo a ser degradada.

Além disso, no trabalho já citado, a aplicação de clorpirifós foi capaz de estimular a população fúngica em até 120% após 60 dias do tratamento do solo (PANDEY & SINGH, 2004). A partir desses resultados, é possível que no presente trabalho a redução na similaridade da comunidade bacteriana do tratamento com Clorpirifós em relação à do controle em todos os 3 solos (Figura 10, 11 e 12), esteja associada a um possível estímulo da população de fungos que passaria a competir por nutrientes com a população bacteriana. Por outro lado, no solo de APC, onde foi observada uma pequena recuperação, pode ter sido selecionada uma comunidade bacteriana mais resistente ao ingrediente ativo e que, por isso, consegue mostrar uma recuperação nas 3^a e 4^a coletas.

Dos três inseticidas testados, a Deltametrina, que apresenta a classe toxicológica mais baixa, foi o que promoveu o menor efeito sobre a população bacteriana em todos os solos (Figuras 10, 11 e 12). A Deltametrina pertence ao grupo dos piretróides e apresenta duas fases de degradação no solo: inicialmente ocorre uma rápida dissipação na superfície do solo, devido à fotólise, volatilização e perdas físicas seguido de uma degradação química e microbiana mais lenta (HILL & SCHAALJE, 1985 *apud* LAABS et al., 2000). Na literatura, o efeito da deltametrina sobre fungos quer seja sobre a germinação dos esporos ou sobre as hifas tem sido relatado como não significativo (SHARMA et al., 2004; ER & GÖKÇE, 2004) enquanto, sobre a comunidade bacteriana não são encontradas informações a respeito. Por outro lado, foi observado efeito sobre a população de artrópodos do solo sob cultivo convencional e plantio direto, tanto em relação à abundância, quanto em relação à composição das espécies (BADJI et al., 2004). Os piretróides atuam principalmente nos canais de sódio das células nervosas do sistema nervoso central e periférico dos insetos (BLOOMQUIST, 1998). Os canais de sódio são abertos no momento de transmissão de um impulso nervoso e devem se fechar imediatamente após a despolarização da célula nervosa. Esses inseticidas se posicionam em algumas unidades dos sítios de ligação dos canais de sódio, de tal modo, que eles permanecem abertos por um tempo maior, prolongando assim o período de influxo de sódio após um potencial de ação (OMOTO, 2000).

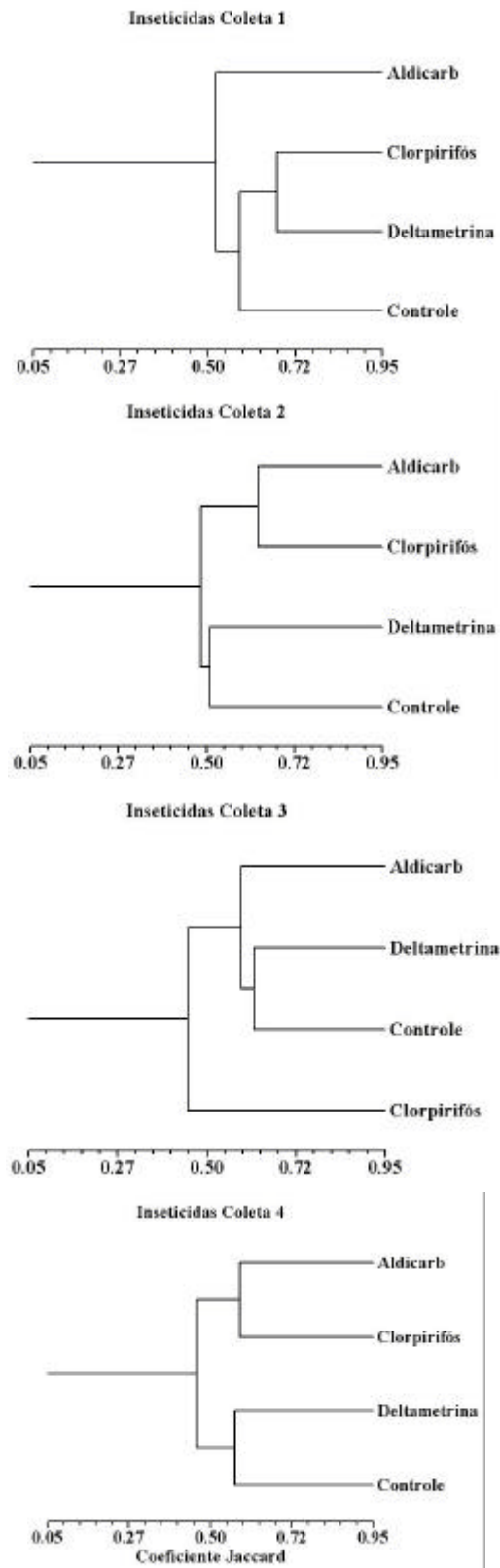


Figura 10: Dendrogramas de similaridade representativos das comunidades bacterianas do solo do SIPA cultivado com batata submetida à aplicação de inseticidas. Cada dendrograma representa uma coleta, realizadas aos 32, 47, 62 e 77 dias após emergência (DAP).

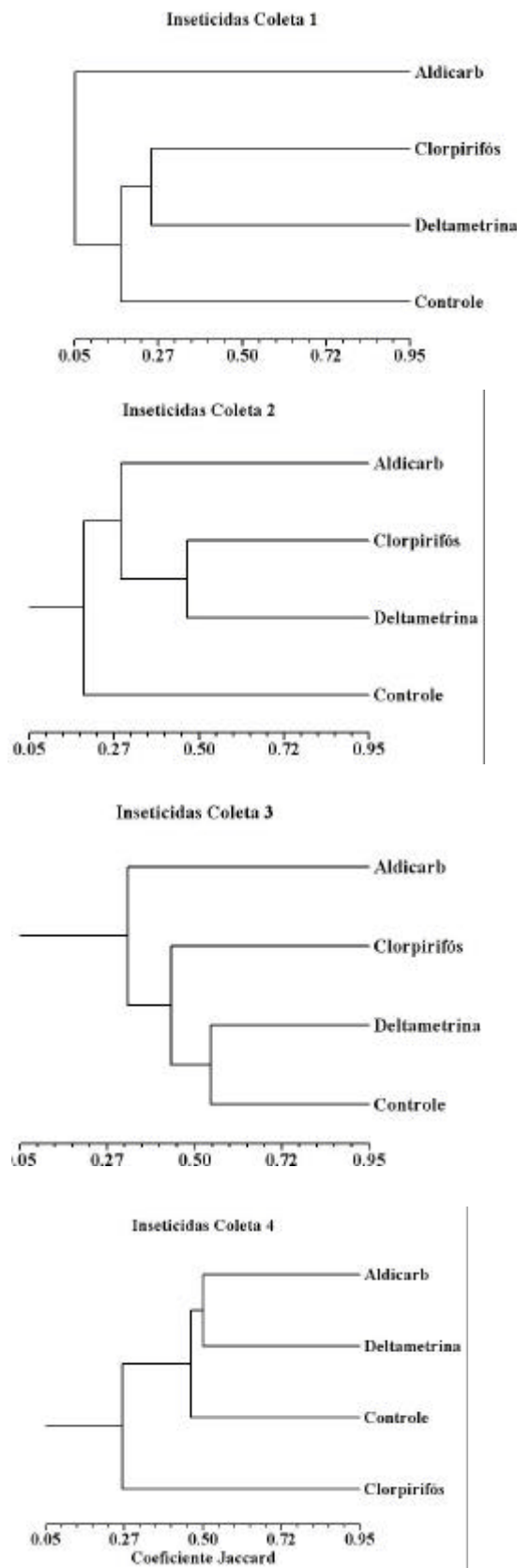


Figura 11: Dendrogramas de similaridade representativos das comunidades bacterianas do solo de APC cultivado com batata submetida à aplicação de inseticidas. Cada dendrograma representa uma coleta, realizadas aos 32, 47, 62 e 77 dias após emergência. (DAP).

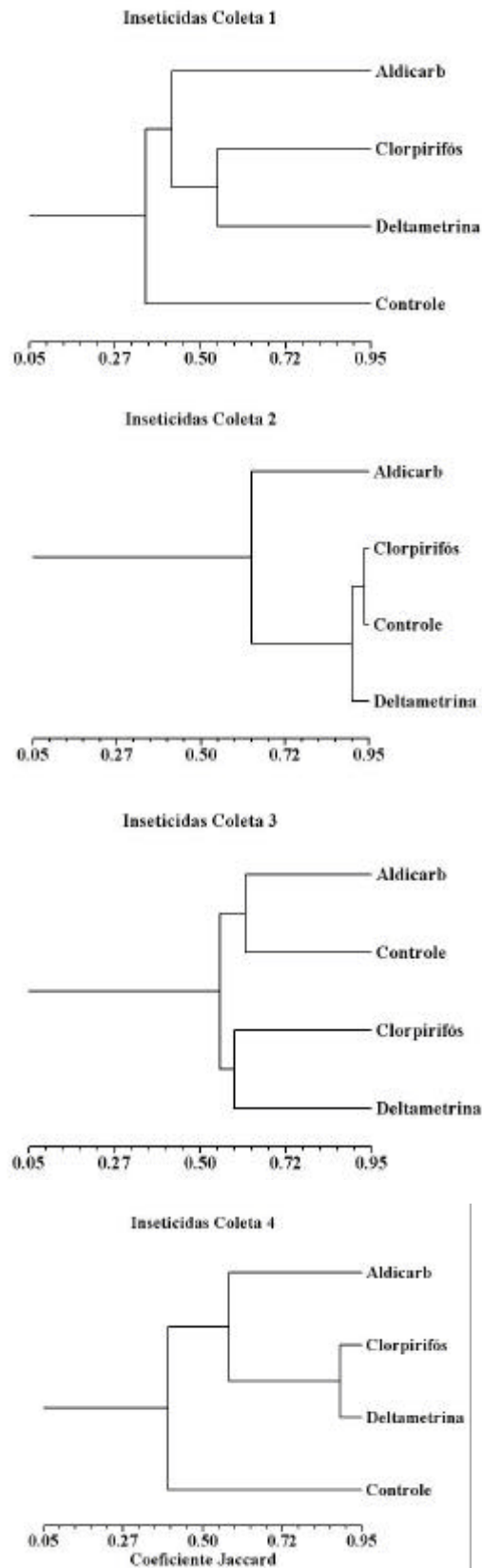


Figura 12: Dendrogramas de similaridade representativos das comunidades bacterianas do solo de AFS cultivado com batata submetida à aplicação de inseticidas. Cada dendrograma representa uma coleta, realizadas aos 32, 47, 62 e 77 dias após emergência (DAP).

O resultado da aplicação de fungicidas sobre a comunidade bacteriana do solo é apresentado nas Figuras 13, 14 e 15. Os efeitos do Tebuconazole na comunidade bacteriana do SIPA provocou uma redução da similaridade do perfil obtido em relação ao controle para 44% após 30 dias, redução esta que foi mantida ao longo do período do experimento. Esta mesma tendência foi observada para o solo de AFS. No entanto, para o solo de APC, foi observada um aumento de similaridade em relação ao controle a partir da 3ª coleta, indicando uma recuperação da comunidade bacteriana frente à aplicação do produto.

O Tebuconazole apresenta um coeficiente de adsorção muito alto no solo (NI et al., 2004). A princípio, a alta capacidade de adsorção às moléculas do solo inerente ao tebuconazole deveria reduzir o impacto sobre a população microbiana, porém as condições de temperatura e umidade do experimento podem ter minimizado este efeito. O mecanismo de ação deste composto consiste na inibição da metilação do C14 na biossíntese do ergosterol em fungos (GISI et al., 2000). Em estudos *in vitro*, RAMIREZ et al. (2004) observaram que o efeito do tebuconazole sobre *Fusarium graminearum* é dependente das condições de umidade e temperatura, podendo ocorrer tanto inibição como um estímulo ao crescimento do fungo.

A aplicação do fungicida Metalaxil+Mancozeb provocou uma oscilação na comunidade bacteriana em todos os solos, nos quais os índices de similaridade variaram muito durante o período de experimentação (Figura 13, 14 e 15). Apesar disso, pode ser observado que, semelhante com o que ocorre com a aplicação do Tebuconazole em solo de APC, houve uma tendência de recuperação da comunidade bacteriana no sentido de aproximá-la do grupo controle. Neste caso, o efeito deve ter resultado da combinação da ação dos dois ingredientes ativos do fungicida: metalaxil e mancozeb. Em altas doses o metalaxil é tóxico aos microrganismos, contudo, quando incorporado ao solo resulta em um aumento nos níveis de nitrato e amônio, o que deve estimular a atividade microbiana (MONKIEDJE et al., 2002), porém, apesar de haver uma relação não linear entre a concentração e a percentagem de adsorção no solo (SUKUL & SPITELLER, 2001) a percentagem de adsorção é geralmente baixa, em torno de 25%, dependendo do tipo de solo (MONKIEDJE & SPITELLER, 2002). De forma semelhante, o efeito do mancozeb sobre a atividade enzimática microbiana ocorre em baixas concentrações (GUVEN et al., 2003), no entanto, este ingrediente ativo é pouco tóxico e degradado rapidamente na presença de umidade e oxigênio (JACOBSEN & BOSSI, 1997). Dessa forma, é possível que o impacto sobre a comunidade bacteriana observado a partir da 3ª coleta teve seu efeito reduzido em função do desaparecimento dos ingredientes ativos no solo, o que permitiu, de uma forma geral, uma ligeira recuperação desta comunidade.

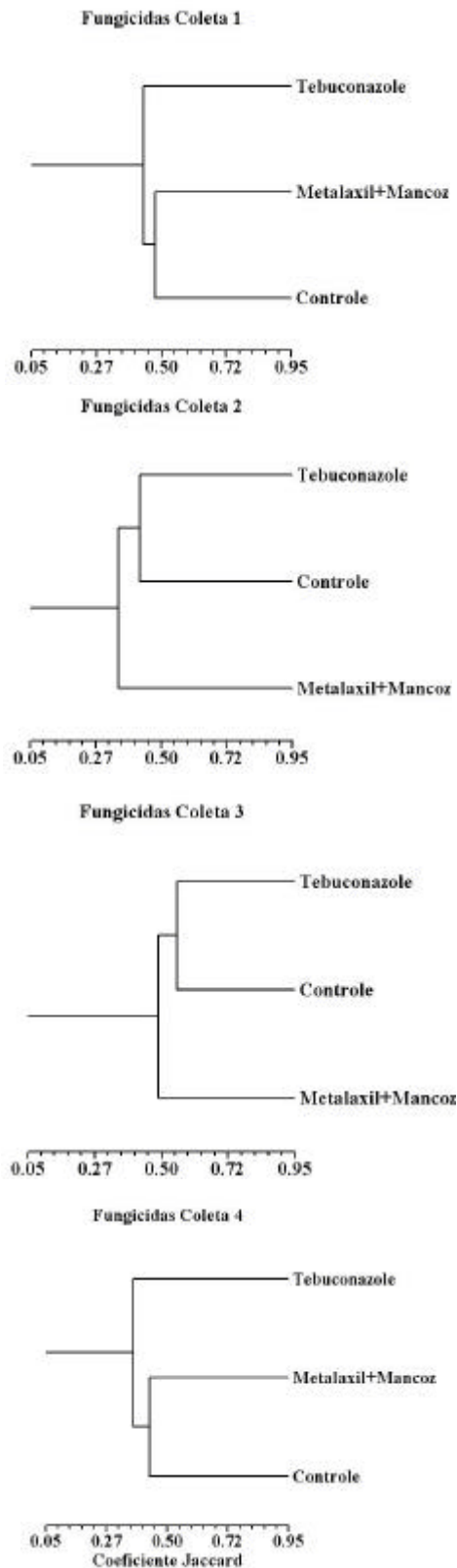


Figura 13: Dendrogramas de similaridade representativos das comunidades bacterianas do solo do SIPA cultivado com batata submetida à aplicação de fungicidas. Cada dendrograma representa uma coleta, realizadas aos 32, 47, 62 e 77 dias após emergência (DAP).

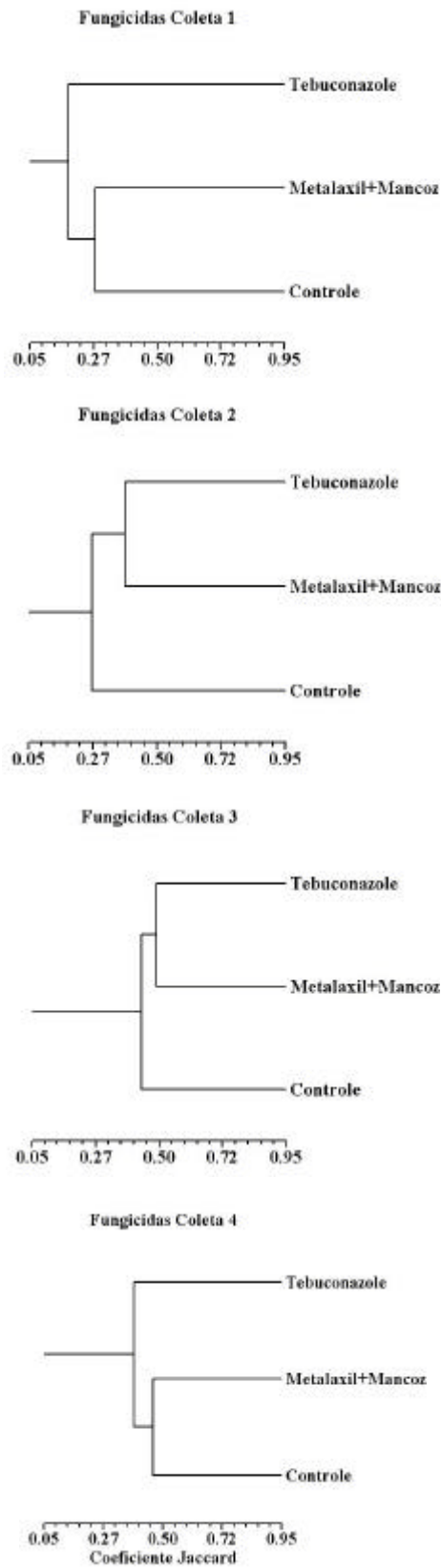


Figura 14: Dendrogramas de similaridade representativos das comunidades bacterianas do solo de APC cultivado com batata submetida à aplicação de fungicidas. Cada dendrograma representa uma coleta, realizadas aos 32, 47, 62 e 77 dias após emergência (DAP).

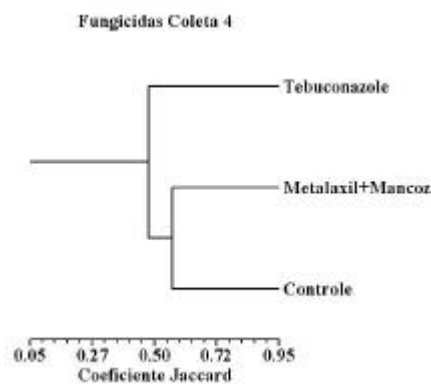
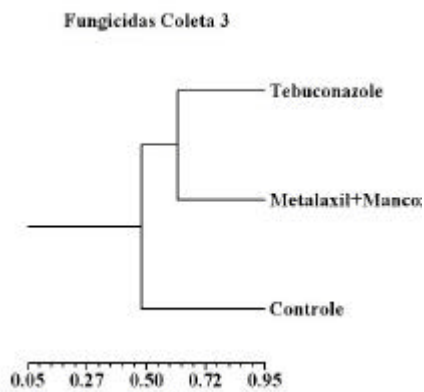
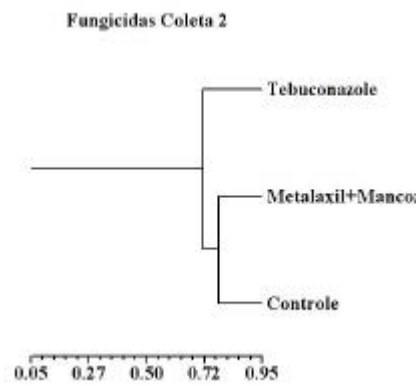
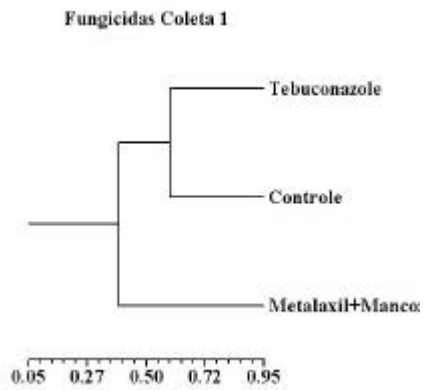


Figura 15: Dendrogramas de similaridade representativos das comunidades bacterianas do solo de AFS cultivado com batata submetida à aplicação de fungicidas. Cada dendrograma representa uma coleta, realizadas aos 32, 47, 62 e 77 dias após emergência (DAP).

4.3.2.3 Análise por PCA do efeito da aplicação de inseticidas e fungicidas sobre a comunidade bacteriana do solo

As Figuras 16 e 17 mostram o agrupamento por PCA da comunidade bacteriana do solo cultivado com batata submetida à aplicação dos agrotóxicos. Os percentuais de explicação da variação da informação de cada componente são apresentados na Tabela 5.

Como discutido no Capítulo I, a interpretação dos dados de agrupamento por dendrograma e PCA deve ser vista de forma complementar, no entanto, a PCA apresenta vantagens em função de decompor a variação dos dados em vários componentes e de mostrar a informação de forma multidimensional, possibilitando uma melhor visualização e desmembramento dos agrupamentos observados nos dendrogramas.

Os baixos valores observados na Tabela 5 para o somatório dos eixos X e Y, que varia de 27,5 a 37,3%, sugerem que, provavelmente, devem existir outros fatores, como a idade da planta ou interação da planta com fatores ambientais, que influenciaram na variabilidade dos dados.

Tabela 5: Percentual de explicação das informações utilizadas para o agrupamento por PCA das comunidades bacterianas do solo.

Componentes Principais	SOLO					
	SIPA		APC		AFS	
	Inset.	Fung.	Inset.	Fung.	Inset.	Fung.
CP1 (%)	18,4	15,6	14,2	14,4	20,9	21,3
CP2 (%)	9,5	13,3	13,3	13,2	16,4	14,3
Total (CP1 + CP2) (%)	27,9	28,9	27,5	27,6	37,3	35,6

CP1 = Componente Principal 1;

CP2 = Componente Principal 2;

Inset.= Inseticidas;

Fung.= Fungicidas.

A Figura 16 mostra a análise por PCA da comunidade bacteriana do solo da área do SIPA, de produção e de AFS, tratada com inseticidas. Apesar dos eixos explicarem uma percentagem relativamente baixa da variabilidade dos dados, observa-se uma tendência que indica que a aplicação dos inseticidas no solo das 3 áreas (Figura 16) resultou na distribuição das coletas ao longo do eixo X, enquanto que os tratamentos estão distribuídos preferencialmente ao longo do eixo Y. Neste caso, o efeito da coleta parece ter sido mais evidente em função das mesmas distribuírem-se ao longo do eixo que explica a maior parte da variabilidade dos dados, o que pode ter sido influenciado pelo fato de que as aplicações dos agrotóxicos foram feitas logo no início do experimento. No entanto, deve ser considerado nesta análise o efeito dos tratamentos pelos diferentes tratamentos uma vez que as diferenças entre X e Y não foram grandes (Tabela 5). Com exceção da comunidade bacteriana do solo do SIPA, as comunidades bacterianas submetidas ao tratamento com Aldicarb aparecem mais afastadas da comunidade bacteriana do controle do que as comunidades bacterianas submetidas ao tratamento com os outros inseticidas. O inseticida Clorpirifós também provocou um afastamento da comunidade bacteriana em relação à do controle. No entanto, em geral, o afastamento observado é menor do que aquele provocado pelo Aldicarb. Entre os inseticidas o Deltametrina aparece mais próximo do controle do que Aldicarb e Clorpirifós, indicando que este inseticida exerceu um menor efeito sobre a comunidade bacteriana do solo (Figuras 16A, 16B e 16C). Na área do SIPA, ao contrário, a aplicação de Aldicarb foi a que menos alterou a comunidade bacteriana, indicando que as características das comunidades microbianas presentes nas amostras de solo, assim como as características físico-químicas, foram importantes nos resultados obtidos neste experimento.

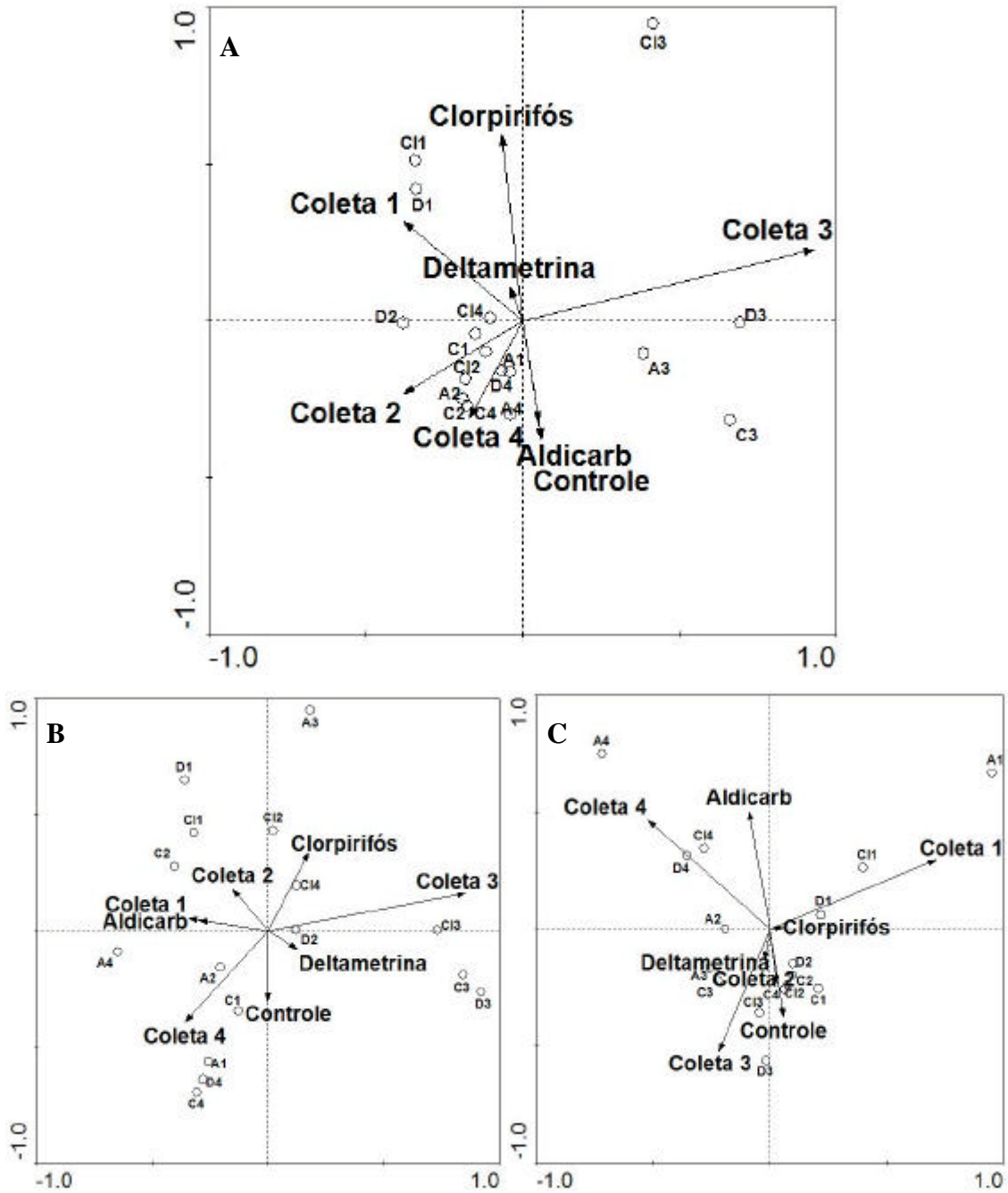


Figura 16: Agrupamento por PCA das comunidades bacterianas do solo cultivado com batata submetidas à aplicação de inseticidas. A) SIPA, B) APC e C) AFS. A1= Aldicarb, coleta 1; A2= Aldicarb, coleta 2; A3= Aldicarb, coleta 3; A4= Aldicarb, coleta 4; C11= Clorpirifós, coleta 1; C12= Clorpirifós, coleta 2; C13= Clorpirifós, coleta 3; C14= Clorpirifós, coleta 4; D1= Deltametrina, coleta 1; D2= Deltametrina, coleta 2; D3= Deltametrina, coleta 3; D4= Deltametrina, coleta 4; C1= Controle, coleta 1; C2= Controle, coleta 2; C3= Controle, coleta 3; C4= Controle, coleta 4. O percentual de explicação de cada eixo para a variabilidade dos dados estão na Tabela 5.

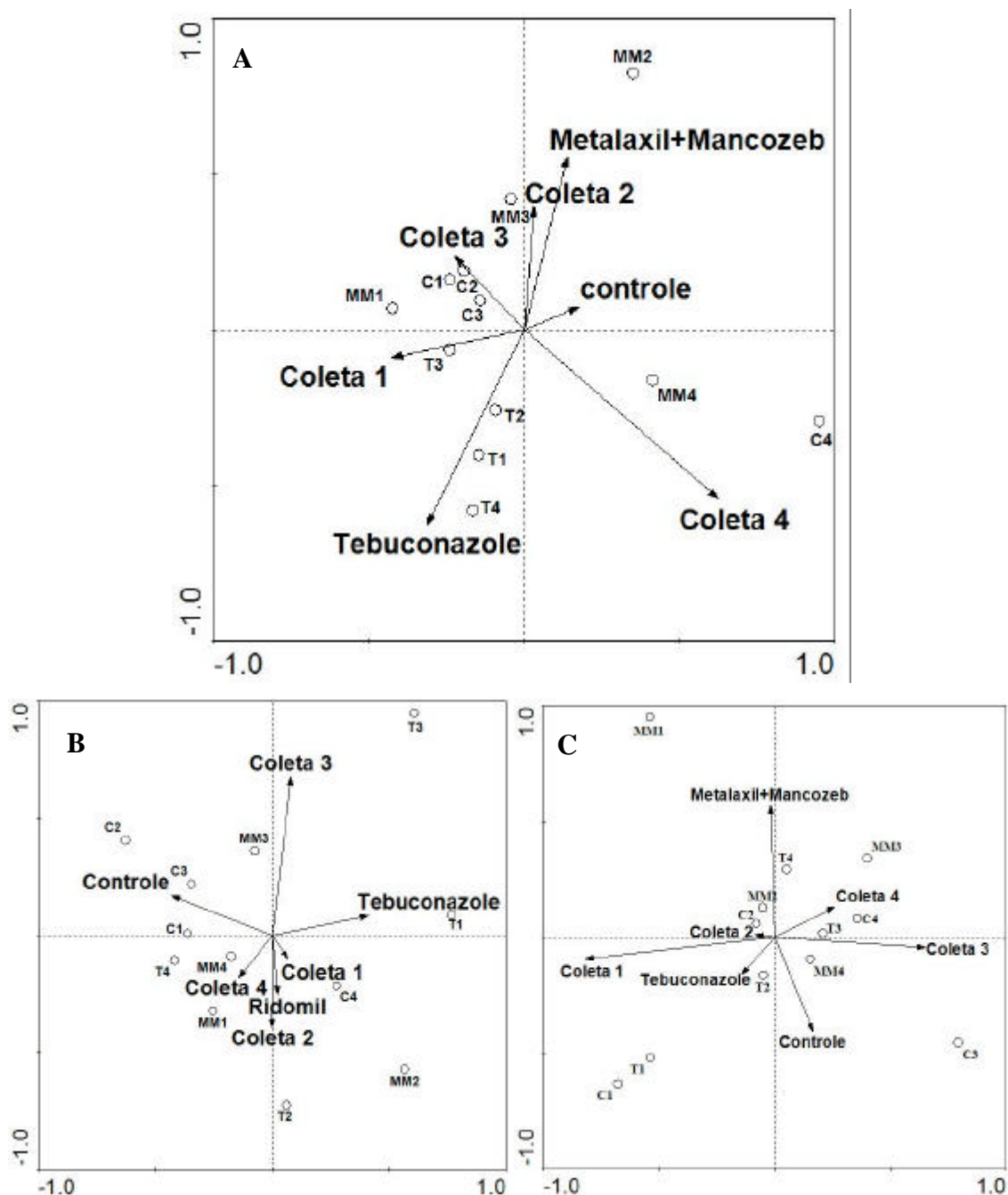


Figura 17: Agrupamento por PCA das comunidades bacterianas do solo cultivado com batata submetidas à aplicação de fungicidas. A) SIPA, B) APC e C) AFS. T1= Tebuconazole, coleta 1; T2= Tebuconazole, coleta 2; T3= Tebuconazole, coleta 3; T4= Tebuconazole, coleta 4; MM1= Metalaxil+Mancozeb, coleta 1; MM2= Metalaxil+Mancozeb, coleta 2; MM3= Metalaxil+Mancozeb, coleta 3; MM4= Metalaxil+Mancozeb, coleta 4; C1= Controle, coleta 1; C2= Controle, coleta 2; C3= Controle, coleta 3; C4= Controle, coleta 4. O percentual de explicação de cada eixo para a variabilidade dos dados estão na Tabela 5.

A Figura 17 mostra a análise por PCA da comunidade bacteriana do solo da área do SIPA, de APC e de AFS, tratada com fungicidas.

O efeito da aplicação dos fungicidas não foi muito claro e parece ter dependido do tipo de solo. Nas áreas do SIPA e de AFS (Figuras 17A e 17C) o efeito das coletas distribuiu-se ao

longo do eixo X, enquanto que o efeito dos tratamentos foi observado ao longo do eixo Y. Na APC foi observado um efeito inverso, ou seja, as coletas distribuíram-se ao longo do eixo Y enquanto que os tratamentos distribuíram-se ao longo do eixo X. Possivelmente esse efeito nas comunidades bacterianas do solo do SIPA e de AFS possa estar relacionado a um maior teor de matéria orgânica nestes solos, em relação ao solo de APC.

No sistema de produção agroecológica, o solo vem sendo manejado há vários anos com alto aporte de material orgânico enquanto que os solos de mata normalmente apresentam teores mais elevados de matéria orgânica dado os processos de decomposição e ciclagem de nutrientes intensos que ocorrem nestes ambientes. Desta forma, seriam criadas condições propícias nestes solos para o desenvolvimento de uma maior diversidade da microbiota do solo, composta por um número maior de grupos redundantes e, portanto, com maior resiliência aos impactos causados pela aplicação dos inseticidas. Além disso, tem sido visto que os solos de mata, assim como os de sistema de produção agroecológica são menos perturbados do que em relação aos solos de produção convencional, o que promove condições favoráveis para a atividade biológica (SANGINGA et al., 1992).

De forma geral, tanto para os inseticidas quanto para os fungicidas, observa-se que a coleta 3 é a que mais se afasta das demais, caracterizando que as maiores diferenças entre os tratamentos foram encontradas nesta fase do experimento. Por outro lado, as coletas 1 e 2 são mais semelhantes em relação às demais o que pode estar relacionado ao fato de que as pulverizações foram realizadas 2 dias antes de cada uma destas coletas, ou seja, este fato explicaria a semelhança entre as 2 primeiras coletas e um possível efeito cumulativo estaria relacionado ao afastamento da 3ª coleta. Na 4ª coleta é possível que os efeitos da aplicação dos inseticidas já estivessem reduzindo e, por essa razão observa-se uma tendência desta coleta tornar a se aproximar das duas primeiras. No entanto, nesta época era possível observar uma grande quantidade de raízes de batata, o que pode ter resultado num estresse e influenciado este resultado.

4.3.2.4 Efeito da aplicação de inseticidas e fungicidas sobre a comunidade bacteriana do solo a partir da similaridade destas comunidades em relação ao controle.

A partir da matriz de similaridade gerada pelo coeficiente Jaccard, foi determinado o percentual de similaridade de cada tratamento (Inseticidas: Aldicarb, Clorpirifós e Deltametrina; Fungicidas: Tebuconazole e Metalaxil+Mancozeb) em relação ao controle nas 4 épocas de coleta e nas 3 repetições.

O quadro de análise de variâncias (Tabela 6) mostra que ocorreu um efeito de bloco altamente significativo, apesar do experimento ter sido conduzido sob condições de casa-de-vegetação, indicando que o delineamento blocos casualizados escolhido, foi o mais indicado nesta situação, em função de ser capaz de isolar heterogeneidades que ocorrem dentro do perímetro de experimentação.

Tabela 6- Quadro de análise de variância da similaridade dos tratamentos em relação ao controle, realizado em delineamento de blocos ao acaso com parcela sub-dividida.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fc
Bloco	2	1592,27	11,024 ^{**}
Origem do solo (A)	2	8209,52	53,839 ^{**}
Agrotóxico (B)	4	406,44	2,814 [*]
(A X B)	8	122,79	0,850 ^{ns}
erro	28	144,43	-
Coleta (C)	3	2238,82	13,359 ^{**}
(A X C)	6	2394,62	14,288 ^{**}
(B X C)	12	174,47	1,041 [*]
(A X B X C)	24	118,31	0,706 ^{ns}
erro	90	167,59	-
Total corrigido	179	67356,55	-
CV Parcela (%)	26,48		
CV Sub-parcela (%)	28,53		
Média Geral	45,38		

Fc = F calculado;

* Significativo ($p > 0,05$);

** Significativo ($p > 0,01$);

^{ns} não significativo.

Como pode ser observado na Tabela 7, foram encontradas diferenças significativas na similaridade das comunidades bacterianas do solo em relação ao controle (colunas), resultante da aplicação dos inseticidas, somente para a comunidade bacteriana do solo de AFS, na coleta realizada aos 47 DAP, no qual o maior efeito observado resultou da aplicação do inseticida Aldicarb. Estes dados não permitem estabelecer uma tendência da magnitude do impacto sobre a comunidade bacteriana do solo causado pelos agrotóxicos testados, sugerindo que o comportamento é dependente da comunidade bacteriana específica de cada solo cultivado com batata.

Por outro lado, foram encontradas várias diferenças significativas entre os solos, dentro de cada coleta (Tabela 7 – linhas). Observa-se que a aplicação dos agrotóxicos resultou em mudanças significativas na similaridade da comunidade bacteriana do solo em relação ao controle, nos 3 solos e nas duas primeiras coletas (32 e 47 DAP). Além disso, o inseticida Aldicarb, apresentou diferença entre os 3 solos na 3ª coleta (62 DAP). De forma geral, os menores índices de similaridade foram observados na 1ª coleta (32 DAP), sendo que Aldicarb, Clorpirifós e Tebuconazole apresentaram os maiores efeitos sobre a comunidade bacteriana do solo cultivado com batata (Tabela 7). Em especial, destaca-se que a comunidade bacteriana do solo da APC apresentou os menores índices de similaridade em relação ao controle, o que sugere que uma baixa resiliência pode ser uma característica desta comunidade bacteriana que, em função disto, é fortemente impactada pela aplicação dos agrotóxicos.

Tabela 7: Percentual de similaridade nas diferentes épocas de coleta (32, 47, 62 e 77 DAP) em relação ao controle da comunidade bacteriana do solo do SIPA, APC e AFS cultivado com batata e submetida à aplicação de inseticidas e fungicidas. Médias obtidas de 3 repetições. (SIPA – Sistema Integrado de Produção Agroecológica; APC – Área de Produção Convencional; AFS – Área de Floresta Secundária)

	32 DAP			47 DAP			62 DAP			77 DAP		
	SIPA	APC	AFS	SIPA	APC	AFS	SIPA	APC	AFS	SIPA	APC	AFS
Deltametrina	55,0 Aa	17,3 Ab	36,0 Ab	52,0 Ab	34,7 Ab	91,0 Aa	53,7 Aa	51,0 Aa	58,7 Aa	54,0 Aa	50,0 Aa	40,0 Aa
Aldicarb	52,3 Aa	5,3 Ab	37,7 Aa	47,7 Aa	26,7 Ab	67,3 Ba	53,7 Aa	34,0 Ab	62,0 Aa	43,6 Aa	41,7 Aa	37,7 Aa
Clorpirifós	55,0 Aa	14,3 Ab	37,7 Aa	47,7 Ab	32,3 Ab	87,3 Aa	46,0 Aa	43,0 Aa	57,3 Aa	43,7 Aa	27,3 Aa	40,0 Aa
Metalaxil+Mancozeb	49,0 Aa	27,0 Ab	62,3 Aa	39,7 Ab	28,7 Ab	77,7 Aa	52,7 Aa	45,3 Aa	46,0 Aa	51,7 Aa	44,7 Aa	56,3 Aa
Tebuconazole	42,7Aa	17,0 Ab	37,3 Aa	44,0 Ab	26,7 Ab	77,3 Aa	49,3 Aa	42,7 Aa	52,0 Aa	31,3 Aa	40,0 Aa	44,3 Aa
CV parcela (%)	26,48											
CV sub-parcela (%)	28,53											

Médias de similaridade na mesma coluna, seguida da mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Médias de similaridade na mesma linha e em cada coleta, seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Os dados provenientes da similaridade das comunidades bacterianas do solo cultivado com batata e submetida à aplicação dos diferentes agrotóxicos com a comunidade bacteriana do controle, também, foram utilizados para determinação da regressão em função das coletas, sendo gerado um gráfico para cada agrotóxicos em cada tipo de solo (Figura 18). Cada gráfico consta de 4 pontos, representando as 4 coletas. Em cada gráfico podem ser visualizados as curvas de tendência, representando o modelo de melhor ajuste encontrado na análise da regressão, a equação que explica o melhor modelo para cada situação (solo X agrotóxico) e o coeficiente de determinação (R^2) de cada modelo. As curvas representadas por linhas pontilhadas indicam que não houve diferença significativa entre as coletas, enquanto que, as curvas representadas por linhas contínuas, indicam que foram observadas diferenças significativas entre as coletas para os valores de similaridade entre as comunidades bacterianas submetidas à aplicação de agrotóxicos e o controle.

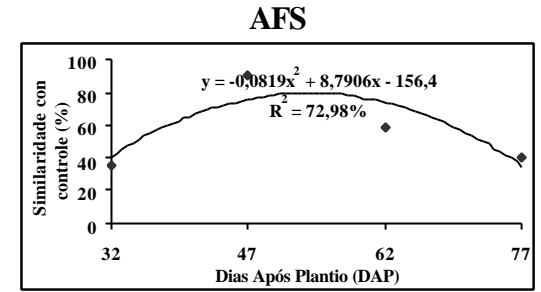
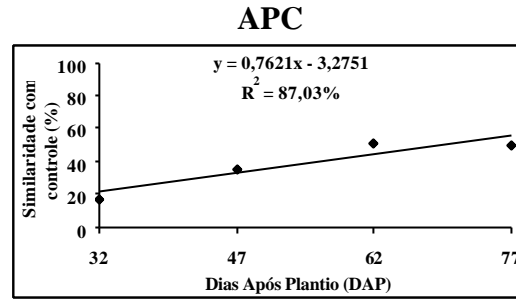
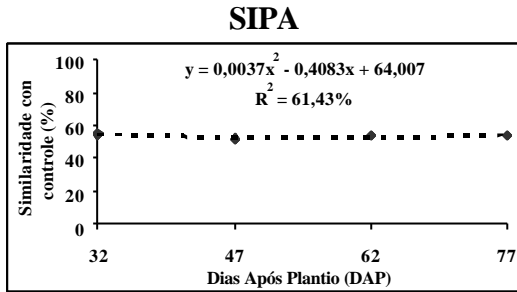
Em relação ao efeito dos inseticidas, a similaridade da comunidade bacteriana do solo, representado pelas linhas de tendência, observa-se um comportamento distinto para cada um dos solos e, em geral, para um mesmo solo, a mesma tendência de comportamento para os 3 inseticidas. Já entre os fungicidas, essa tendência não é observada, indicando uma interação mais específica de cada fungicida com os diferentes tipos de solo (Figura 18).

No solo do SIPA, observa-se que a aplicação dos agrotóxicos provocou uma redução da similaridade da comunidade bacteriana em relação ao controle. No entanto, após o impacto inicial os índices de similaridade desta comunidade permaneceram constantes durante todo o período de estudo, mantendo-se em uma faixa de 55% para os 3 inseticidas e em torno de 40% para os fungicidas. No solo da APC, a aplicação dos agrotóxicos provocou um impacto inicial muito forte, reduzindo a similaridade da comunidade bacteriana em relação ao controle para valores em torno de 10% a 15%. No entanto, ao longo das coletas há uma tendência de recuperação da comunidade bacteriana, sendo que, para os fungicidas, não foram observadas diferenças significativas entre as coletas. Já para a comunidade bacteriana do solo de AFS, observa-se um marcante efeito inicial, resultando em índices de similaridade em torno de 40% (Figura 18), sendo seguido de uma recuperação da comunidade bacteriana, exceto quando submetida ao tratamento com Metalaxil+Mancozeb. Porém, a partir da 3ª coleta a comunidade bacteriana volta a se afastar do controle. Provavelmente a comunidade bacteriana do solo da AFS apresenta uma resposta mais frágil à aplicação dos agrotóxicos, uma vez que, na maioria dos casos, a recuperação da comunidade bacteriana foi seguida de um novo afastamento em relação ao controle. Por outro lado, a comunidade bacteriana do solo do SIPA apresenta a maior resiliência, visto que, apesar de um efeito inicial que foi menor do que os observados para as outras áreas, a aplicação dos inseticidas e fungicidas resultou em uma regressão não significativa, indicando que os índices de similaridade em relação ao controle permanecem estáveis até o final do período de estudo.

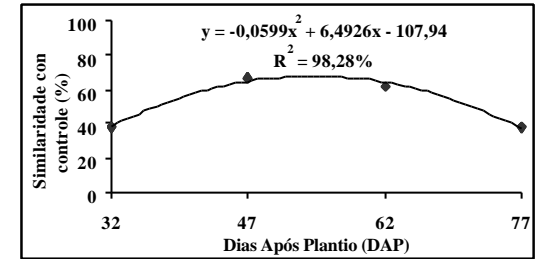
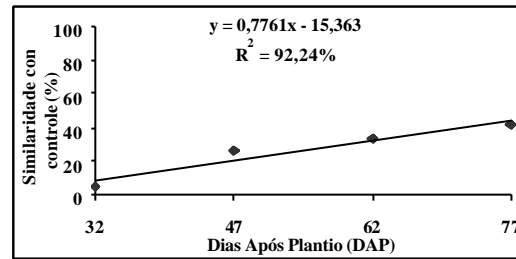
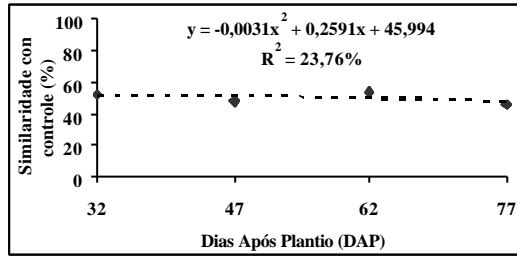
De uma forma geral, os efeitos da aplicação dos fungicidas sobre a comunidade bacteriana do solo tenderam a mostrar um comportamento menos intenso e impactos menos significativos do que os advindos da aplicação de inseticidas, sendo acompanhados de índices de similaridade ligeiramente mais elevados.

Inseticidas

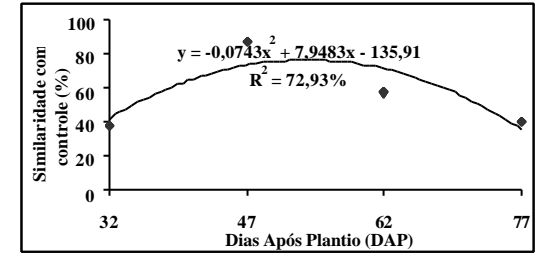
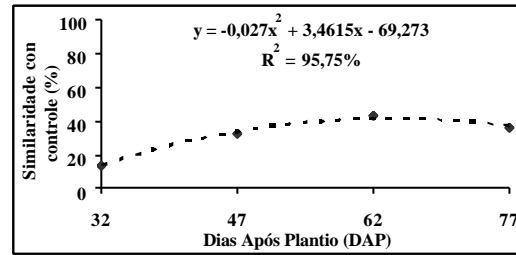
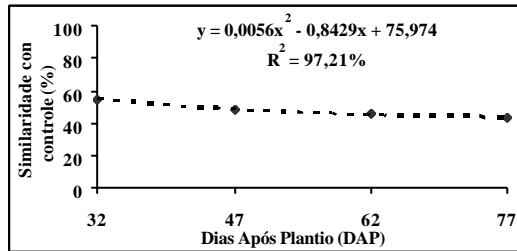
Deltametrina



Aldicarb

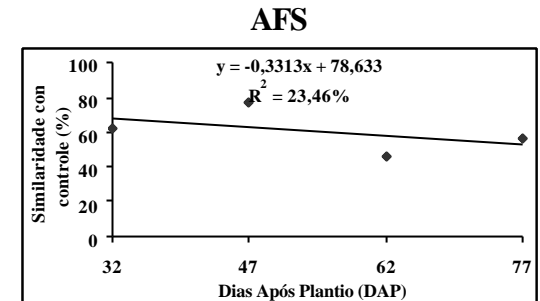
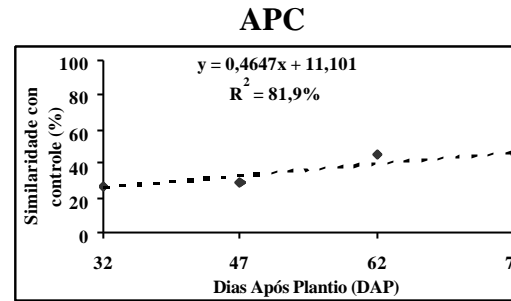
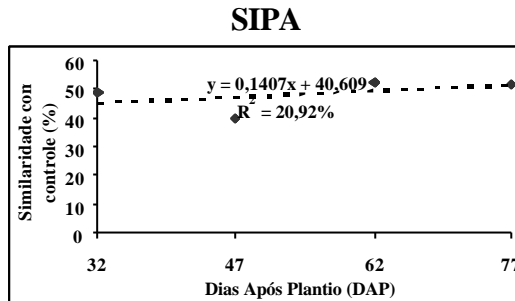


Clorpirifós



Continuação da figura
Fungicidas

Metalaxil+
Mancozeb



Tebuconazole

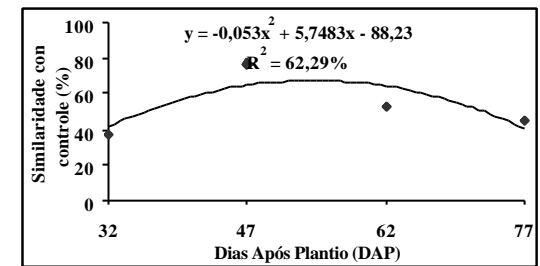
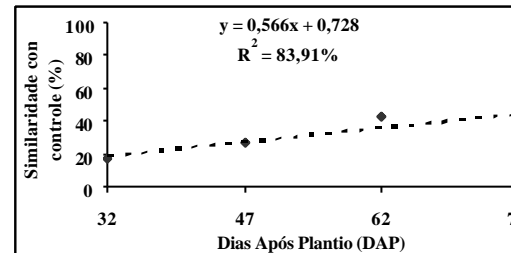
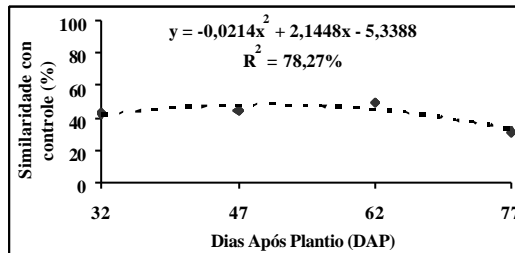


Figura 18: Regressão da similaridade das comunidades bacterianas do solo cultivado com batata submetida à aplicação dos diferentes inseticidas e fungicidas, em relação ao controle, nos diferentes solos, em função das diferentes coletas. (32, 47, 62 e 77 DAP).

Confirmando os resultados que foram mostrados na Tabela 7, os efeitos da aplicação dos diferentes agrotóxicos na similaridade da comunidade bacteriana do solo, em relação ao controle, mostrou a mesma tendência geral para todos os inseticidas e fungicidas dentro de cada solo, exceto para o inseticida Clorpirifós no solo de APC e, para o fungicida Metalaxil+Mancozeb no solo de AFS. Contudo, nos diferentes solos os comportamentos foram distintos. No caso do solo do SIPA, um sistema de produção onde o manejo adotado baseia-se no uso de adubação orgânica e compostos orgânicos, o que favorece o desenvolvimento microbiano. Estudos relatam que a adição de material orgânico provoca alterações na população dos grupos de alfa e beta-proteobactérias e actinomicetos, além de um aumento na riqueza bacteriana e aumento na população bacteriana do solo com maior %G+C (TOYOTA & KUNUNAGA, 2005; GELSOMINO & CACCO, 2006). Além disso, considera-se que o acúmulo de matéria orgânica no solo é um dos principais fatores que afetam o crescimento das comunidades microbianas (FROUZ & NOVÁKOVÁ, 2005). Com o exposto, é possível que as condições encontradas no solo do SIPA estimulem o desenvolvimento de comunidades bacterianas, permitindo que ocorra um grande número de grupos redundantes, ou seja, grupos bacterianos que desempenham a mesma função. Desta forma, mesmo que parte destes grupos tivessem sido afetados pela pulverização com os agrotóxicos, os demais grupos remanescentes com alguma tolerância aos ingredientes ativos continuariam desempenhando suas funções, minimizando a influência do tratamento o que caracterizaria a maior resiliências das comunidades bacterianas presentes neste solo.

No caso do solo de APC, o forte impacto verificado inicialmente, representado pelos baixos índices de similaridade, podem ter sido decorrentes de que, sob este tipo de manejo, normalmente é encontrada uma baixa diversidade microbiana, com grande predominância de poucos grupos ou espécies. O sistema de cultivo convencional normalmente é capaz de provocar um aumento no pH do solo, diminuição da concentração da matéria orgânica, biomassa e atividade microbiana no solo (DÍAZ-RAVIÑA et al., 2005), diminuindo a diversidade bacteriana o que acompanha a uniformidade e riqueza do substrato usado pelas populações bacterianas (LUPWAYI et al., 1998). Desta forma, é possível que a predominância de poucos grupos bacterianos caracterizam um estado de baixa resiliência o que resultou no afastamento inicial da população microbiana deste solo em relação ao controle.

Os efeitos observados no solo de AFS foram menos drásticos do que aqueles observados no solo de APC, apesar de que após uma tendência de recuperação até a 2ª coleta, semelhante à que foi observada no solo de APC, observa-se uma redução na similaridade a partir da 3ª coleta. Os solos de floresta normalmente apresentam maiores teores de matéria orgânica e diversidade microbiana (HAYNES et al., 1995) que os solos cultivados convencionalmente, o que pode ter contribuído para que o impacto inicial tenha sido menor. No entanto, é possível que durante a recuperação da comunidade bacteriana, este processo tenha sido iniciado por grupos bacterianos oportunistas que, após a redução da concentração de substratos prontamente assimiláveis, tenham reduzido sua atividade dando oportunidade de desenvolvimento de outros grupos.

4.3.3 Comparação dos efeitos da aplicação de Inseticidas e Fungicidas Sobre a Comunidade Bacteriana do Solo Cultivado com Batata

Os inseticidas usados neste experimento atuam no sistema nervoso central e periférico dos insetos, apresentando como mecanismos de ação a inibição da enzima acetilcolinesterase e ação sobre os canais de potássio. Desta forma, aparentemente não se pode relacionar um efeito direto destes ingredientes ativos sobre as células microbianas do solo. No entanto, o efeito destes compostos sobre os artrópodos do solo irá causar uma grande disponibilização de nutrientes através da morte destes organismos, possibilitando que grupos microbianos

saprofíticos sejam favorecidos e tenham seu desenvolvimento estimulado em detrimento de outros grupos, o que causaria um desequilíbrio momentâneo na relação entre as comunidades microbianas. Isto pode explicar porque o efeito dos 3 inseticidas utilizados foi semelhante entre si quando se considera apenas uma área.

No caso dos fungicidas, a ação sobre a comunidade bacteriana do solo é também indireta. No entanto, a causa do desequilíbrio se justifica no fato de que estes agrotóxicos têm um amplo espectro de ação sobre os fungos e, sendo assim, seus efeitos sobre a comunidade fúngica podem resultar em estímulos ao desenvolvimento de vários grupos bacterianos, seja em função da disponibilização de nutrientes, resultante da morte dos fungos, ou pela redução da competição por nutrientes, o que pode gerar situações específicas que resultou em comportamentos mais variados como foi observado para Metalaxil+Mancozeb e Tebuconazole. A situação inversa também deve ter ocorrido, ou seja, uma redução no número de células bacterianas de grupos que apresentem alguma relação ecológica com os fungos em função da aplicação dos fungicidas. A aplicação do Metalaxil, por exemplo, provocou uma redução de até 51% no número de células bacterianas (PESARO et al, 2004).

De uma forma geral, os resultados observados na Figura 18 indicam que os efeitos dos inseticidas sobre a comunidade bacteriana do solo foram mais impactantes do que os efeitos dos fungicidas que, no entanto, apresentaram um efeito mais semelhante entre os diferentes solo. Ainda assim, a aplicação destes agrotóxicos (inseticidas e fungicidas) alterou o equilíbrio das comunidades bacterianas dos solos estudados, o que refletiu nos índices de similaridade destas comunidades bacterianas em relação ao controle. Apesar de se encontrar na literatura um número significativo de trabalhos que mostram o efeito dos agrotóxicos sobre grupos específicos de microrganismos do solo, tais como, rizóbios e micorrizas (KISHINEVSKY et al., 1992; ABD-ALLA et al., 2000), estudos que mostrem o efeito destes compostos sobre a dinâmica das comunidades microbianas são ainda em número relativamente reduzido. Uma melhor compreensão do comportamento das comunidades visando a caracterização de parâmetros ecológicos como: resiliência, vigor, organização e relações entre as espécies em diferentes ecossistemas pode indicar o efeito do uso continuado destes produtos sobre a qualidade do ecossistema (De KRUIJF & VUUREN, 1998).

4.4 CONCLUSÕES

Ocorreu uma sucessão bacteriana em que as comunidades bacterianas foram mais heterogêneas na primeira e segunda coletas do que na terceira e quarta coletas, sendo que, nestas últimas coletas, não foram observados efeitos significativos da aplicação dos agrotóxicos.

O efeito dos inseticidas foi muito similar entre os diferentes solos, enquanto que o efeito dos fungicidas foi característico para cada solo, provavelmente por seus efeitos diretos sobre os fungos que mantêm uma relação muito próxima com as comunidades bacterianas.

A aplicação dos agrotóxicos resultou em um impacto inicial muito forte sobre a comunidade bacteriana do solo da APC, sendo que os inseticidas causaram maior impacto que os fungicidas.

A comunidade bacteriana nativa da área do SIPA foi a que mostrou o comportamento mais uniforme durante o período de observação frente à aplicação dos agrotóxicos.

A comunidade bacteriana do solo da área de AFS apesar de ter mostrado a princípio uma capacidade de recuperação, posteriormente se afastou cada vez mais do tratamento controle.

A comunidade bacteriana do solo da APC parece apresentar um certo grau de seleção aos agrotóxicos usados, refletindo-se na recuperação da comunidade bacteriana ao longo do período.

As comunidades bacterianas do solo do SIPA e de AFS sofreram as menores alterações em relação ao controle, indicando uma maior resistência relacionada a estes solos. Contudo, a comunidade bacteriana do solo de AFS mostrou maior resistência à aplicação dos agrotóxicos do que a comunidade bacteriana do solo do SIPA.

A técnica de PCR-DGGE se mostrou bastante eficiente na determinação dos efeitos de inseticidas e fungicidas sobre a comunidade bacteriana do solo.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cultura da batata figura quarto lugar entre as culturas de maior importância econômica mundial. No Brasil, a batata, apesar de ter grande importância sócio-econômica, apresenta uma área cultivada bem inferior a outras culturas, também importantes, como a soja.

O uso intensivo de insumos industrializados nesta cultura, assim como o melhoramento de cultivares, movimentam um mercado de bilhões de dólares anuais. No entanto, são raros os estudos sobre os efeitos destas práticas sobre a microbiota do solo.

Frente ao quadro mundial e nacional em relação ao uso de plantas geneticamente modificadas (GMs) e, levando em consideração o desenvolvimento e introdução batata GM no Brasil, torna-se claro que, no futuro, esta planta fará parte da realidade do mercado nacional, sem que questões preliminares a respeito do comportamento da microbiota do solo frente a práticas de manejo corriqueiras sejam respondidas, atendendo às atividades relacionadas à avaliação de biossegurança desta tecnologia em relação ao impacto ambiental sobre populações não-alvo, baseada no “Princípio da Precaução”, conceito este que norteia a discussão nos fóruns internacionais e nacionais em relação ao uso de plantas GMs.

Em todo o mundo têm sido realizados estudos sobre os possíveis impactos da transgenia em organismos não-alvo. No entanto, muito pouco é estudado, assim como, são muito escassas as respostas para os efeitos de práticas agrícolas, corriqueiramente adotadas, sobre a microbiota do solo. Os estudos básicos de impacto sobre a microbiota do solo, principalmente, no caso das culturas da batata e do milho, se justificam pela atual falta dessa informação e, estão apoiados na premissa de que é necessário se conhecer os efeitos mais simples para se poder inferir sobre questões mais complexas envolvendo plantas, manejo e ambiente.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBA - Associação Brasileira da Batata. Disponível para consulta online no site <http://www.abbabatatabrasileira.com.br>. Consultado em 07 de novembro de 2005.
- ABD-ALLA, M. H.; OMAR, S. A.; KARANXHA, S. The impact of pesticides on arbuscular and nitrogen-fixing symbioses legumes. **Applied Soil Ecology**, v. 14, p. 191-200, 2000.
- ABOIM, M. C. R. Impacto à diversidade bacteriana e sua relação com indicadores de qualidade do solo em ecossistemas agrícolas e naturais de Mata Atlântica, na região serrana do Rio de Janeiro. 2004. 97p. **Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal)- Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro.
- AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível para consulta online no site <http://www.agricultura.gov.br>. Consultado em: 24 de novembro de 2005.
- ANDA - Associação Nacional Para Difusão de Adubos. Anuário Estatístico. São Paulo, 2000, 252p.
- ANDRADE, E. R.; FIGUEIRA, A. dos R. Incidência e sintomatologia de estirpes do vírus Y (PVY) nas regiões produtoras de batata do sul de Minas Gerais. **Ciência e Prática**, Bebedouro, v. 16, p. 371-376, 1992.
- APASSUL – Associação dos Produtores e Comerciantes de Sementes e Mudanças do Rio Grande do Sul. Disponível para consulta online no site <http://www.apassul.com.br>. Consultado em 31 de dezembro de 2005.
- ARAÚJO, J. F.; SANTOS, C. S.; RIBON, A. O. B.; SILVA, C. C.; TÓTOLA, M. R. Efeito da contaminação com gasolina sobre a diversidade genética da comunidade microbiana do solo de floresta tropical por meio da técnica PCR-DGGE. In: IX Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, Curitiba, PR. **Anais...** p.170, 2004.
- ÁVILA, A. C.; LOPES, C. A.; FRANÇA, F. H.; REIFSCHNEIDER, F. J. B.; HENZ, G. P.; BUSO, J. A.; FURUMOTO, O. A cultura da batata. **Embrapa comunicações e transferência de tecnologias**, Brasília, 184p., 16 cm, (Coleção Plantar; 42), 1999.
- BADJI, C. A.; GUEDES, R. N. C.; SILVA, A. A.; ARAÚJO, R. A. Impact of deltamethrin on arthropods in maize under conventional and no-tillage cultivation. **Crop Protection**, v. 23, p. 1031-1039, 2004.
- BAGINSKY, C.; BRITO, B.; IMPERIAL, J.; RUIZ-ARGÜESO, T.; PALÁCIOS, J. M. Symbiotic Hydrogenase Activity in *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) Increases Nitrogen Content in *Vigna unguiculata* Plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71. p. 7536-7538, 2005.
- BALOGH, K.; PATÓCS, A.; MAJNIK, J.; RÁCZ, K.; HUNYADY, L. Genetic screening methods for the detection of mutations responsible for multiple endocrine neoplasia type 1. **Molecular Genetics and Metabolism** v. 83, p. 74-81, 2004.
- BENELLI, A. I. H.; DENARDIN, N. D.; FORCELINI, C. A.; DUARTE, V. Reação de cultivares de batata à podridão mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, por *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e por *P. chrysanthemi*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p. 155-159, 2004.
- BERG, G.; KRECHEL, A.; DITZ, M.; SIKORA, R. A.; ULRICH, A.; HALLMANN, J. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v 51, p. 215-229, 2005.
- BERGGREN, I.; ALSTRÖM, S.; van VUURDE, J. W. L.; MÅRTENSSON, A. M. Rhizoplane colonisation of peas by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* and a deleterious *Pseudomonas putida*. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 52, p. 71-78, 2005.

- BLOOMQUIST, J. R. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: Integrating pest genetics and ecology. **Annual Review of Entomology**, v. 43, p. 701-726, 1998.
- BRUNE, S. Resistência de batata à pinta-preta. Brasília: EMBRAPA/CNPq, p. 1-5, 1999 (Pesquisa em andamento).
- BRUNE, S.; MELO, P. E. de; LIMA, M. F. Resistência a *Alternaria solani*, características agronômicas e qualidade de fritura em clones de batata imunes a PVY e PVX. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.12, p.125-130, 1994.
- BRUNE, S.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Avaliação da resistência de batata à pinta-preta. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.7, p.20-21, 1989.
- BRUNE, S.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Identificação de fontes de resistência à pinta-preta em batata. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.10, p.100-102, 1992.
- BRUNE, S.; REIFSCHNEIDER, F. J. B.; BUSO, J. A. Resistência de genótipos de batata (*Solanum tuberosum*) à pinta-preta (*Alternaria solani*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.15, p.297-299, 1990.
- CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. K. R. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, p. 529-537, 2000.
- CHIARINI, L.; BEVIVINO, A.; DALMASTRI, C.; NACAMULLI, C.; TABACCHIONI, S. Influence of plant development, cultivar and soil type on microbial colonization of maize roots. **Applied Soil Ecology**, v. 8, p. 11-18, 1998.
- COENYE, T.; VANDAMME, P. Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 228, p. 45-49, 2003.
- COLMER, A.; KEEN, N. T. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, v. 24, p. 383-409, 1986.
- CONVILLE, P. S.; WITEBSKY, F. G. Multiple Copies of the 16S rRNA Gene in *Nocardia nova* Isolates and Implications for Sequence-Based Identification Procedures. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 2881-2885, 2005.
- COSTA, R. V.; ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; MIZUBUTI, E. S. G. Previsão da requeima da batateira. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 349-354, 2002.
- COWAN, D. A. Microbial genomes-the untapped resource. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 18, n. 1, p. 14-16, 2000.
- DAHLLOF, I.; BAILLIE, H.; KJELLEBERG, S. *rpoB*-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3376-3380, 2000.
- De BOKX, J. A. Potato virus Y. **In: HOOKER, W. J. (Ed.). Compendium of potato diseases**. Saint Paul: The American Phytopathological Society, p. 70-51, 1981.
- De KRUIJF, H. A. M.; VUUREN, D. P. van Following Sustainable Development in Relation to the North-South Dialogue: Ecosystem Health and Sustainability Indicators. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 40, p. 4-14, 1998.
- DÍAZ-RAVIÑA, M.; BUENO, J.; GONZÁLEZ-PRIETO, S. J.; CARBALLAS, T. Cultivation effects on biochemical properties, C storage and ¹⁵N natural abundance in the 0–5 cm layer of an acidic soil from temperate humid zone. **Soil and Tillage Research**, v. 84, p. 216-221, 2005.
- DUARTE, G. F.; ROSADO, A. S.; SELDIN, L.; ARAUJO, W.; ELSAS, J. D. van Analysis of bacterial community structure in sulfurous-oil-containing soils and detection of species carrying dibenzothiophene desulfurization (dsz) genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 4, p. 1052-1062, 2001.
- DUFFY, E. M.; CASSELLS, A. C. The effect of inoculation of potato (*Solanum tuberosum* L.) microplants with arbuscular mycorrhizal fungi on tuber yield and tuber size distribution. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 137-144, 2000.

- ECKERT, J. W. Historical Development of fungicide resistance in plant pathogens. **In: DELP, C. J. (ed)**, Fungicide Resistance in North America. American Phytopathological Society, p. 1-3, 1988.
- ENGELN, B.; MEINKEN, K.; VON WINTZINGERODE, F.; HEUER, H.; MALKOMES, H.P.; BACKHAUS, H. Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 8, p. 2814-2821, 1998.
- ENGLISH, J. T.; MITCHELL, D. J. Development of microbial communities associated with tobacco root systems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 20, p. 137-144, 1998.
- ER, M. K.; GÖKÇE, A. Effect of selected pesticides used against glasshouse tomato pests on colony growth and conidial germination of *Paecilomyces fumosoroseus*. **Biological Control**, v. 31, p. 398-404, 2004.
- EWING, E. E. Potato. **In: WIEN, H. C.** The physiology of vegetable crops. CABI, p. 295-344, 1997.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Agricultural production: potatoes. Disponível no site **Faostat agriculture data**. <http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture>. Consultado em 03 de dezembro de 2005.
- FAUCHER, E.; PARADIS, E.; GOYER, C.; HODGE, N. C.; HOGUE, R.; STALL, R. E.; BEAULIEU, C. Characterization of *Streptomyces* causing deep-pitted scab of potato in Québec, Canada. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, p. 222-225, 1995.
- FEIGL, B. J.; CERRI, C. C.; BERNOUX, M. Balanço do carbono e biomassa em solos na Amazônia. **In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Org).** **Ecologia Microbiana**, Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998, p.423-441.
- FELSKE, A.; AKKERMANS, A.D.L. Spatial homogeneity of abundant bacterial 16S RNA molecules in Grassland soils. **Microbial Ecology**, v.36, n.1, p. 31-36, 1998.
- FIGUEIRA, A. R. Viroses da batata: situação atual e perspectivas futuras. **Informe Agropecuário**, v. 20, p. 86-96, 1999.
- FILGUEIRA, F. A. R. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: **Ed. Universidade Federal de Viçosa**, 2000, 402p.
- FROUZ, J.; NOVÁKOVÁ, A. Development of soil microbial properties in topsoil layer during spontaneous succession in heaps after brown coal mining in relation to humus microstructure development. **Geoderma**, v. 129, p. 54-65, 2005.
- GANS, J.; WOLINSKY, M.; DUNBAR, J. Computational improvement reveals great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. **Science**, v. 309, p. 1387-1390, 2005.
- GARBEVA, P.; van VEEN, J. A.; ELSAS, J. D. van Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, n. 2, p. 243-270, 2004.
- GELSOMINO, A.; CACCO, G. Compositional shifts of bacterial groups in a solarized and amended soil as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 91-102, 2006.
- GELSOMINO, A.; KEIJZER-WOLTERS, A. C.; CACCO, G.; ELSAS, J. D. van Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 1-15, 1999.
- GEORGOPOLUS, S. G. Pathogens become resistant to chemicals. **In: HORSFALL, J. G.; COWLING, E. C. (eds)**, Plant Disease I. Academic Press, p. 327-345, 1977.

- GHINI, R. & KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas. **Embrapa Meio Ambiente**, 2002, 78p.
- GISI, U.; CHIN, K. M.; KNAPOVA, G.; FÄRBER, R. K.; MOHR, U.; PARISI, S.; SIEROTZKI, H.; STEINFELD, U. Recent developments in elucidating modes of resistance to phenylamide, DMI and strobilurin fungicides. **Crop Protection**, v. 19, p. 863-872, 2000.
- GLANDORF, D. C. M.; PETERS, L. G. L.; van Der SLUIS, I.; BAKKER, P. A. H. M.; SCHIPPERS, B. Crop specificity of rhizosphere pseudomonads and the involvement of root agglutinins. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, p. 981-989, 1993.
- GOMES, N. C. M.; FAGBOLA, O.; COSTA, R.; RUMJANEK, N. G.; BUCHNER, A.; MENDONA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Dynamics of Fungal Communities in Bulk and Maize Rhizosphere Soil in the Tropics. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 3758-3766, 2003.
- GOMES, N. C. M.; HEUER, H.; COSTA, R.; MENDONÇA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Bacterial diversity of the rizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by Temperature Gradient Gel Electrophoresis. **Plant and Soil**, v. 232, n.1/2, p.167-180, 2001.
- GRANÉR, G.; PERSSON, P.; MEIJER, J.; ALSTRÖM, S. A study on microbial diversity in different cultivars of *Brassica napus* in relation to its wilt pathogen, *Verticillium longisporum*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 224, p. 269-276, 2003.
- GRAYER, R. J.; VIEIRA, R. F.; PRICE, A. M.; KITE, G. C.; SIMON, J. E.; PATON, A. J. Characterization of cultivars within species of *Ocimum* by exudate flavonoid profiles. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 901-913, 2004.
- GRIFFITHS, B.S.; RITZ, K.; EBBLEWHITE, N.; DOBSON, G. Soil microbial community structure: effect of substrate loading rates. **Soil Biology and Biochemistry**, v.31, n.1, p.145-153, 1999.
- GRIFFITHS, B.S.; RITZ, K.; EBBLEWHITE, N.; DOBSON, G. Soil microbial community structure: effect of substrate loading rates. **Soil Biology and Biochemistry**, v.31, n.1, p.145-153, 1999.
- GU, Y-H.; MAZZOLA, M. Modification of fluorescent pseudomonad community and control of apple replant disease induced in a wheat cultivar-specific manner. **Applied Soil Ecology**, v. 32, p. 57-72, 2003.
- GUPTA, A.; RAI, V.; BAGDWAL, N.; GOEL, R. *In situ* characterization of mercury-resistant growth-promoting fluorescent pseudomonads. **Microbiological Research**, v. 160, p. 385-388, 2005.
- GUVEN, K.; TOGRUL, S.; UYAR, F.; OZANT, S. De POMERAI, D. I. A comparative study of bioassays based on enzymes biosynthesis in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* exposed to heavy metals and organic pesticides. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 658-664, 2003.
- HAEDER, H. E.; BERINGER, H. Potato: potential productivity of field crops under different environments. Phillipines: **International Rice Research Institute**, p. 307-317, 1983.
- HANG, A. N.; MILLER, D. E. Yield and physiological responses of potato to deficit, high frequency sprinkler irrigation. **Agronomy Journal**, Madison, v. 78, p. 436-440, 1986.
- HARRIS, P. The potato crop: the scientific basis for improvement. London: **Chapman and Hall**, 1992, 437p.
- HART, M. R.; BROOKES, P. C. Soil microbial biomass and mineralisation of soil organic matter after 19 years of cumulative field applications of pesticides. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 28, p. 1641-1649, 1996.
- HAYNES, R. J.; DOMINY, C. S.; GRAHAM, M. H. Effect of agricultural land use on soil organic matter status and the composition of earthworm communities in KwaZulu-Natal, South Africa. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 95, p. 453-464, 1998.

- HEUER, H. & SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities. **In: modern soil microbiology, van ELSAS, J. D.; TREVORS, J. T.; Wellington, E. M. (eds.)**, New York. 1997.
- HEUER, H.; KROPPESTEDT, R. M.; LOTTMANN, J.; BERG, G.; SMALLA, K. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere communities are negligible relative to natural factors. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 3, p. 1325-1335, 2002.
- IBEKWE, A. M.; GRIEVE, C. M. Changes in developing plant microbial community structure as affected by contaminated water. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 48, p. 239-248, 2004.
- JABUOMSKI, R.E.; FURUMOTO, O. Característica das cultivares. **In: REIFSCHNEIDER, F. J. B (Coord.)** Produção de batata. Brasília, Linha gráfica, 1987, 239p.
- JACOBSEN, O. S.; BOSSI, R. Degradation of ethylenethiourea (ETU) in oxic and anoxic sandy aquifers. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 20, p. 539-544, 1997.
- JONES, R. L.; ESTES, T. L. Summary of aldicarb monitoring and research programs in the U.S.A. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 18, p. 107-140, 1995.
- KATO-NOGUCHI H.; INO, T. Concentration and release level of momilactone B in the seedlings of eight rice cultivars. **Journal of Plant Physiology**, v 162, p. 965-969 2005.
- KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 74, n.1, p. 65-76, 1999.
- KENT, A. D.; TRIPLETT, E. W. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.56, n.2, p.211-236, 2002.
- KERDCHOECHUEN, O. Methane emission in four rice varieties as related to sugars and organic acids of roots and root exudates and biomass yield. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 108, p. 155-163, 2005.
- KHAMIS, A.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. Comparison between *rpoB* and 16S rRNA Gene Sequencing for Molecular Identification of 168 Clinical Isolates of *Corynebacterium*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 1934-1936, 2005.
- KISHINEVSKY, B. D.; LOBEL, R.; GURFEL, D.; NEMAS, C. Soil fumigation with methyl bromide as a means of increasing the occurrence of the inoculum strain in peanut nodules. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 24, p. 845-848, 1992.
- KOZDRÓJ, J.; ELSAS, J. D. van Structural diversity of microbial communities in arable soils of a heavily industrialised area determined by PCR-DGGE fingerprinting and FAME profiling. **Applied Soil Ecology**, v. 17, p. 31-42, 2001.
- LAABS, V.; AMELUNG, W.; PINTO, A.; ALTSTAEDT, A.; ZECH, W. Leaching and degradation of corn and soybean pesticides in an Oxisol of the Brazilian Cerrados. **Chemosphere**, v. 41, p. 1441-1449, 2000.
- LABRUYÈRE, R. E. Common scab and its control in seed potato crops. **Centre for Agricultural Publishing and Documentation**, v. 767, p. 1-72, 1971.
- LAGUERRE, G.; ALLARD, M. R.; REVOY, F. & AMARGER, N. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 56-63, 1994.
- LAMB, D. C.; CANNIEUX, M.; WARRILOW, A. G. S.; BAK, S.; KAHN, R. A.; MANNING, N. J.; KELLY, D. E.; KELLY, S. L. Plant Sterol 14 α -Demethylase affinity for Azole Fungicides. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 284, p. 845-849, 2001.
- LAMB, D. C.; KELLY, D. E.; MANNING, N. J.; HOLLOMON, D. W.; KELLY, S. L. Expression, purification, reconstitution and inhibition of *Ustilago maydis* sterol 14 α -

demethylase (CYP51; P450_{14DM}). **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 169, p. 369-373, 1998.

LI, X.; DORSCH, M.; Del DOT, T.; SLY, L. I.; STACKEBRANDT, E. & HAYWARD, A. C. Phylogenetic studies of the 16S rRNA group II pseudomonads based on 16S rRNA sequences. **Journal of applied Bacteriology**, v. 74, p. 324-329, 1993.

LOPES, C. A. In: **LOPES, C. A.; BUSO, J. A.** Cultivo da batata (*Solanum tuberosum* L.). Brasília: EMBRAPA/CNPq, 1997, 35p. (Instruções técnicas, 8).

LOPES, C. A.; SANTOS, J. R. M. **Doenças do tomateiro**. Brasília: EMBRAPA/CNPq, 1994.

LUPWAYI, N. Z.; RICE, W. A.; CLAYTON, G. W. Soil microbial diversity and community structure under wheat as influenced by tillage and crop rotation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, p. 1733-1741, 1998.

MA, Z.; MORGAN, D. P.; FELTS, D.; MICHAILIDES, T. J. Sensitive of *Botryosphaeria dothidea* from California pistachio to tebuconazole. **Crop Protection**, v. 21, p. 829-835, 2002.

MACDONALD, L. M.; PATERSON, E.; DAWSON, L. A.; McDONALD, A. J. S. Short-term effects of defoliation on the soil microbial community associated with two contrasting *Lolium perenne* cultivars. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p. 489-498, 2004.

MAHAFFEE, W.F.; KLOPPER, J.W. Bacterial communities of the rhizosphere and endorhiza associated with field-grown cucumber plants inoculated with a plant growth-promoting rhizobacterium or its genetically modified derivative. **Canadian Journal of Microbiology**, Saskatoon, v. 43, p. 344-353, 1997.

MAIDAK, B. L.; COLE, J. R.; PARKER, C. T.; GARRITY JR., G. M.; LARSEN, N.; LI, B.; LILBURN, T. G.; MCCAUGHEY, M. J.; OLSEN, G. J.; OVERBEEK, R.; PRAMANIK, P.; SCHIMIDT, T. M.; TIEDJE, J. M. & WOESE, C. R. A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). **Nucleic Acids Research**, v. 27, p. 171-173, 1999.

MARCHANDIN, H.; TEYSSIER, C.; BUOCHBERG, M. S.; JEAN-PIERRE, H.; CARRIERE, C.; JUMAS-BILAK, E. Intra-chromosomal heterogeneity between the four 16S rRNA gene copies in the genus *Veillonella*: implications for phylogeny and taxonomy. **Microbiology**, v. 149, p. 1493-1501, 2003.

MARILLEY, L.; ARAGNO, M. Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. **Applied Soil Ecology**, v. 13, p. 127-136, 1999.

McARTHUR, D. A. J.; KNOWLES, N. R. Influence of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi on the Response of Potato to Phosphorus Deficiency. **Plant Physiology**, v. 101, p. 147-160, 1993a.

McARTHUR, D. A. J.; KNOWLES, N. R. Influence of Species of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Phosphorus Nutrition on Growth, Development, and Mineral Nutrition of Potato (*Solanum tuberosum* L.). **Plant Physiology**, v. 102, p. 771-782, 1993b.

MIYAJIMA, K.; TANAKA, F.; TAKEUCHI, T.; KUNINAGA, S. *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 495-502, 1998.

MIZUBUTI, A. As principais viroses da batateira sob condições do Brasil Central. **Informe Agropecuário**, v. 7, p. 46-50, 1981.

MOHAN, S. V.; SIRISHA, K.; RAO, N. C.; SARMA, P. N.; REDDY, S. J. Degradation of chlorpirifos contaminated soil by bioslurry reactor operated in sequencing batch mode: bioprocess monitoring. **Journal of Hazardous Materials**, v. B116, p. 39-48, 2004.

MONKIEDJE, A.; ILORI, M. O.; SPITELLER, M. Soil quality changes resulting from the application of the fungicides mefenoxan and matalaxyl to a sandy loam soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, p. 1934-1948, 2002.

- MONKIEDJE, A.; SPITELLER, M. Sorptive behavior of the phenylamide fungicides, mefenoxan and matalaxyl, and their acid metabolite in typical Cameroonian and German soils. **Chemosphere**, v. 49, p. 659-668, 2002.
- MOORE, M. N. Biocomplexity: the post-genome challenge in ecotoxicology. **Aquatic Toxicology**, v. 59, p. 1-15, 2001
- MUYZER, G., SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, p.127-141, 1998.
- MUYZER, G.; DE WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.
- MYERS, R. M.; FISCHER, S. G.; LERMAN, L. S.; MANIATIS, T. 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, v.13, p. 3131-3145, 1985.
- NAGAHASHI, G.; DOUDS Jr, D. D. Synergism between blue light and root exudate compounds and evidence for a second messenger in the hyphal branching response of *Gigaspora gigantea*. **Mycologia**, Albuquerque, v. 96, p. 948-954, 2004.
- NI, Y.; LIANG, X.; CHEN, J.; ZHANG, Q.; MA, L. WU, W.; KETTRUP, A. Investigation on the influence of metanol on adsorption and leaching of pesticides with soil column liquid chromatography. **Chemosphere**, v. 56, p. 1137-1142, 2004.
- NIVAA, Netherlands Catalogue of Potato Varieties, The Hague, 2003.
- OLIVEIRA, A. M. R.; DUARTE, V.; SILVEIRA, J. R. P.; MORAES, M. G. Incidence of pectolytic erwinias associated with blackleg of potato in Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 49-53, 2003.
- OLSSON, S.; PERSSON, P. The composition of bacterial populations in soil fractions differing in their degree of adherence to barley roots. **Applied Soil Ecology**, v 12, p. 205-215, 1999.
- OMOTO, C. Modo de ação de inseticidas e resistência de insetos a inseticidas. **In: GUEDES, J. C.; COSTA, I. D.; CASTIGLIONI, E. Bases e técnicas do manejo de insetos**. Santa Maria: UFSM; CCR/DFS, Palotti, 2000. p. 31-50.
- PACE, N. R. New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. **ASM News**, v. 62, p. 463-470, 1996.
- PACE, N. R.; STAHL, D. A; LANE, D. J. & OLSEN, G. J. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequence. **Advances in Microbiology Ecology**, v. 9, p. 1-55, 1985.
- PANDEY, S.; SINGH, D. K. Total bacterial and fungal population after chlorpyrifos and quinalphos treatments in groundnut (*Arachis hypogea* L.) soil. **Chemosphere**, v. 55, p. 197-205, 2004.
- PASCOAL, C.; CÁSSIO, F. Contribution of Fungi and Bacteria to Leaf Litter Decomposition in a Polluted River. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 5266-5273, 2004.
- PÉROMBELON, M.; KELMAN, A. Ecology of the soft rot *Erwinia*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 12, p. 361-387, 1980.
- PESARO, M.; NICOLLIER, G.; ZEYER, J.; WIDMER, F. Impact of Soil Drying-Rewetting Stress on Microbial Communities and Activities and on Degradation of Two Crop Protection Products. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 2577-2587, 2004.

PESARO, M.; WIDMER, F.; NICOLLIER, G.; ZEYER, J. Effects of freezethaw stress during soil storage on microbial communities and methidathion degradation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, p. 1049-1061, 2003.

PESTEMER, W. Distribution and degradation of herbicides in the soil. **Mitt. Schweiz. Landw.** v. 36, p. 2–17, 1988. (In German.)

PICARD, C.; BOSCO, M. Maize heterosis affects the structure and dynamics of indigenous rhizospheric auxins-producing *Pseudomonas* populations. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 53, p. 349-357, 2005.

PIRHONEN, M.; SAARILAHTI, H.; KARLSSON, M. B.; PALVA, E. T. Identification of pathogenicity determinants of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by transposons mutagenesis. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 4, p. 276-283, 1991.

RAMIREZ, M. L.; CHULZE, S.; MAGAN, N. Impact of environmental factors and fungicides on growth and deoxinivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentina wheat. **Crop Protection**, v. 23, p. 117-125, 2004.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 151, n. 3, p. 167-177, 2000.

REISCHL, U.; FELDMANN, K.; NAUMANN, L.; GAUGLER, B. J. M.; NINET, B.; HIRSCHL, B.; EMLER, S. 16S rRNA Sequence Diversity in *Mycobacterium celatum* Strains Caused by Presence of Two Different Copies of 16S rRNA Gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 1761-1764, 1998.

RENOUF, V.; CLAISSE, O.; MIOT-SERTIER, C.; LONVAUD-FUNEL, A.; Lactic acid bacteria evolution during winemaking: Use of *rpoB* gene as a target for PCR-DGGE analysis. **Food Microbiology**, v. 23, p. 136-145, 2006.

RESENDE, L. M. A.; MASCARENHAS, M. H. T.; PAIVA, B. M. Aspectos econômicos da produção e comercialização de batata. **Informe Agropecuário**, v. 20, p. 9-19, 1999.

ROESTI, D.; GAUR, R.; JOHRI, B. N.; IMFELD, G.; SHARMA, S.; KAWALJEET, K.; ARAGNO, M. Plant growth stage, fertiliser management and bio-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria affect the rhizobacterial community structure in rain-fed wheat fields. **Soil Biology and Biochemistry**, In Press, Corrected Proof, Disponível online em 2 November 2005

SAIKI, R. K.; SCARF, F.; FALOONA, F. A.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SALMOND, G. P. C. Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p. 181-200, 1994.

SANGINGA, N.; MULONGOY, K.; SWIFT, M. J. Contribution of soil organisms to the sustainability and productivity cropping systems in the tropics. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 41, p. 135-152, 1992.

SCHWIEGER, F.; TEBBE, C. C. A new approach to utilize PCR-single strand conformation polymorphism for 16S rDNA gene-based microbial community analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64. 12, p.4870-4876, 1998.

SHARMA, J.; SATYA, S.; KUMAR, V.; TEWARY, T. K. Dissipation of pesticides during bread-making. **Chemical health and Safety**, v. 12, p. 1-6, 2004, in press.

SIKORA, R. A.; HARTWIG, J. Mode-of-action of the carbamate nematocides cloethocarb, aldicarb and carbofuran on *Heterodera schachtii*. **Revue Nématologie**, v. 14, p. 531-536, 1991.

SILVA, K. R. A.; SALLES, J. F.; SELDIN, L.; ELSAS, J. D. van Application of a novel *Paenibacillus*-specific PCR-DGGE method and sequence analysis to assess the diversity of

Paenibacillus spp. in the maize rhizosphere. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 54, p. 213-231, 2003.

SMITH, J. L.; MYUNG, H. U. Rapid procedures for preparing soil and KCl extracts for ¹⁵N analysis. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v.21, n. 12, p.2273-2279, 1990.

SPADOTTO, C. A. Uso de herbicidas no Brasil. Comitê de Meio Ambiente, Sociedade Brasileira da Ciência de Plantas Daninhas. Disponível em: <http://www.cnpma.embrapa.br/herbicidas>. Acessado em: 20 de setembro de 2004.

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. 2nd edition. **McGraw-Hill Publishing Company**, 1980, New York, 633p.

STEVENS, J. F.; TAYLOR, A. W.; NICKERSON, G. B.; IVANCIC, M.; HENNING, J.; HAUNOLD, A.; DEINZER, M. L. Prenylflavonoid variation in *Humulus lupulus*: distribution and taxonomic significance of xanthogalenol and 4'-*O*-methylxanthohumol. **Phytochemistry**, v. 53, p. 759-775, 2000.

STEVENSON, W. R. An integrated program for managing potato late blight. **Plant Disease**, v. 67, p. 1047-1048, 1983.

STRYER, L. **Bioquímica**. Capítulo 4 - DNA e RNA: Moléculas da Hereditariedade. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, 1996, 1000p.

SUKUL, P.; SPITELLER, M. Influence of biotic and abiotic factors on dissipating matalaxyl on soil. **Chemosphere**, v. 45, p. 941-947, 2001.

SUNG, K.; KIM, J.; MUNSTER, C. L.; CORAPCIOGLU, M. Y.; PARK, S.; DREW, M. C.; CHANG, Y. Y. A simple approach to modeling microbial biomass in the rhizosphere. **Ecological Modelling**, v. 190, p. 277-286, 2006.

TAKEUCHI, T.; SAWADA, H.; TANAKA, F.; MATSUDA, I. Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. causing potato scab based on 16S rRNA sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 476-479, 1996.

TALIANSKY, M.; MAYO, M. A.; BARKER, H. *Potato leafroll virus*: a classic pathogen shows some new tricks. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, p. 81-89, 2003.

TOPP, E.; VALLAEYS, T.; SOULAS, G. Pesticides: Microbial degradation and effects on microorganisms. In: ELSAS, J. D. van; TREVORS, J. T.; WELLINGTON, E. M. H. (eds). **Modern Soil Microbiology**, New York: Marcel Dekker, p. 547-575, 1997.

TORSVIK, V. L.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 240-245, 2002.

TOYOTA, K.; KUNINAGA, S. Comparison of soil microbial community between soils amended with or without farmyard manure. **Applied Soil Ecology**, In Press, Corrected Proof, Disponível online em 28 de outubro de 2005.

van LOOM, C. D. Effect of water stress on potato growth, development and yield. **American Potato Journal**, Orono, v. 58, p. 51-69, 1981.

VOSÁTKA, M.; GRYNDLER, M. Response of micropropagated potatoes transplanted to peat media to post-vitro inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 145-152, 2000.

WALSH, D. A.; BAPTESTE, E.; KAMEKURA, M.; DOOLITTLE, W. F. Evolution of the RNA Polymerase B' Subunit Gene (*rpoB*) in Halobacteriales: a Complementary Molecular Marker to the SSU rRNA Gene. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, p. 2340-2351, 2004.

WARDLE, D.A.; HUNGRIA, M. A biomassa microbiana do solo e sua importância nos ecossistemas terrestres. In: Araújo, R.S.; Hungria, M. (eds). **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: Embrapa-SPI, p.195-216, 1994.

WARE, G. W.; WHITACRE, D. M. **The Pesticide Book**, 6th Ed., Meister Media Worldwide, Willoughby, Ohio, (ISBN 1892829-11-8), 2004, 496 pp.

- WASAKI, J.; ROTHE, A.; KANIA, A.; NEUMANN, G.; RÖMHELD, V.; SHINANO, T.; OSAKI, M.; KANDELER, E. Root Exudation, Phosphorus Acquisition, and Microbial Diversity in the Rhizosphere of White Lupine as Affected by Phosphorus Supply and Atmospheric Carbon Dioxide Concentration. **Journal of Environmental Quality**, v. 34, p. 2157-2166, 2005.
- WEISBURG, W. G.; BARNS, M. S.; PELLETIER, D. A. & LANA, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 697-703, 1991.
- WILSON, P. C.; WHITWELL, T.; KLAINÉ, S. J. Metalaxyl Toxicity, Uptake, and Distribution in Several Ornamental Plant Species. **Journal of Environmental Quality**, v. 30, p. 411-417, 2001.
- WINDING, A.; HUND-RINKE, K.; RUTGERSC, M. The use of microorganisms in ecological soil classification and assessment concepts. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, p. 230-248, 2005.
- WOESE, C. R.; KANDLER, R. O. & WHEELLS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria* and *Eukarya*. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 87, p. 4576-4579, 1990.
- XAVIER, G. R.; SILVA, F. V.; ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G. Adaptação de método para extração de DNA microbiano. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, 2004, 24 p. (Embrapa Agrobiologia, Documentos, 171).
- YANG, C. H.; CROWLEY, D. E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 345-351, 2000.
- ZAMBOLIM, L., VALE, F. X. R.; COSTA, H. Doenças causadas por fungos em batata. In: **ZAMBOLIM, L., VALE, F. X. R.; COSTA, H.** (Eds). Controle de doenças de plantas. Hortaliças-Vol. 1. Visconde do Rio Branco, Suprema Gráfica e Editora, 2000, p.173-207.
- ZILLI, J. E. Avaliação do impacto dos herbicidas glifosato e imazaquin na comunidade bacteriana do solo e associada às raízes de plantas de soja. 2004. 138p. **Tese Doutorado-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Seropédica, RJ.
- ZILLI, J. E.; SANTOS, E. L.; HAGLER, L. M.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Desenvolvimento de meio de cultura para microrganismos do solo utilizando solo como fonte de nutrientes. In: XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Florianópolis, SC. **Anais...** p.130, 2003.