



**UERR**

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA  
MESTRADO ACADÊMICO EM ASSOCIAÇÃO COM EMBRAPA E IFRR**

**PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL POR ESTIRPES DE *Bradyrhizobium*  
*ingae* ISOLADAS NO CERRADO DE RORAIMA**

**Dilacy Sales Porto**

**2016**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE RORAIMA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA  
MESTRADO ACADÊMICO EM ASSOCIAÇÃO COM EMBRAPA E IFRR**

**PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL POR ESTIRPES DE *Bradyrhizobium*  
*ingae* ISOLADAS NO CERRADO DE RORAIMA.**

**Dilacy Sales Porto**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Dra. Krisle da Silva**

Dissertação submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Mestre em**  
**Agroecologia**. Área de concentração em  
Agroecologia.

**Boa Vista, RR**  
**Março de 2016**

**Copyright © 2016 by Dilacy Sales Porto.**

Todos os direitos reservados. Está autorizada a reprodução total ou parcial deste trabalho, desde que seja informada a **fonte**.

Universidade Estadual de Roraima – UERR  
Coordenação de Sistemas de Bibliotecas  
Multiteca Central  
Rua Sete de Setembro, 231 bloco – F Bairro Canarinho.  
CEP: 69. 306-530 Boa Vista – RR  
Telefone: (95) 2121.0946  
e-mail: biblioteca@uerr.edu.br

Ficha catalográfica elaborada pela biblioteca central da UERR

A474p

SALES PORTO, Dilacy.

Promoção do crescimento vegetal por estirpes de *Bradyrhizobium ingae* isoladas no cerrado de Roraima /Dilacy Sales Porto. Boa Vista: UERR, 2016.

56 p.: il. 30 cm

Dissertação (Mestrado em Agroecologia) – Universidade Estadual de Roraima. Orientadora: Profa. Dra. Krisle da Silva

1. Fixação biológica de nitrogênio. 2. Eficiência simbiótica. 3. Solubilizadores de fosfatos. 4. Compostos indólicos. II. Universidade Estadual de Roraima – UERR, Mestrado em Agroecologia. III. Título.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Dilacy Sales Porto**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agroecologia**, área de concentração em Agroecologia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM \_\_/\_\_/2016

---

Krisle da Silva Dra. Pesquisadora da EMBRAPA-RR  
Orientadora

---

Cássia Ângela Pedrozo Dra. Pesquisadora da EMBRAPA-RR

---

Gilmara Maria Duarte Pereira Professora Dra - UFRR

---

Plínio Henrique Oliveira Gomide Professor Dr.- UERR

## **DEDICATÓRIA**

A Deus, por estar sempre guiando meus passos.

Ao meu pai, Severiano Barroso, e a minha mãe, Francisca das Chagas (*in memoriam*), pelo exemplo de vida: honestidade, garra, dedicação, amor, carinho, compreensão e incentivo em todos os momentos de nossas vidas.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pela oportunidade de realizar um sonho, por ter colocado pessoas especiais no decorrer do meu percurso e por ter sido meu refúgio e a minha fortaleza nas horas mais difíceis.

Aos meus pais, Severiano Barroso e Francisca das Chagas (*in memoriam*).

À Universidade Estadual de Roraima e ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, pela oportunidade concedida para realização do mestrado.

À Embrapa Roraima pela sua excelente equipe de pesquisadores, colaboradores e suas estruturas laboratoriais que forneceram as condições necessárias para a execução deste trabalho.

À minha orientadora, Dra. Krisle da Silva, pela orientação, paciência, confiança, dedicação, pela ajuda imprescindível para melhoria deste trabalho e, principalmente, para o aperfeiçoamento do meu aprendizado e por ser responsável pela realização de um grande sonho.

À Eliane do Nascimento Cunha Farias, técnica do laboratório de microbiologia da Embrapa Roraima, que sempre me deu apoio e auxílio, por sempre estar disposta a ajudar, ensinar e aconselhar. Obrigada pela amizade.

Aos amigos e estagiários do laboratório de microbiologia da Embrapa Roraima: Brenda, Josimar, Jafet, Patricia, Ismaele, Juciane e Keila pela ajuda, paciência, risadas, conversas e companheirismo, com certeza tornaram a vida mais alegre. Vocês foram fundamentais nesses dois anos de trabalho.

Ao Pesquisador Dr. Edvan Chagas, pelo apoio na realização deste trabalho.

Ao Sr. Teles Sampaio pela coloboração incansável na execução dos experimentos.

Aos amigos e colegas de turma: Agnaldo, Bruno, Ezequiel, Hugo, Joaquim Parime, Juciane, Kellen, Muara, Paula, Pericles, Ranny, Ronilson, Tatiana. Pessoas incríveis que eu convivi nesses dois anos que ficarão na memória.

Ao Roberto, meu amado companheiro, por seu amor e dedicação, por toda força que me deu e por ter acreditado que eu conseguiria.

A minha família e ao meu filho Rafael pelo apoio, carinho e orações ao meu favor, que acreditaram e incentivaram-me a seguir em frente.

À Professora Elísia Martins, pelo seu apoio e confiança, pela amizade e pela oportunidade de crescimento profissional.

Agradeço também à banca examinadora pelas contribuições. E a todos os professores do Programa de Pós-graduação em Agroecologia, que contribuíram de forma direta ou indireta para o meu crescimento profissional e intelectual.

**A todos, o meu muito obrigada!**

“Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seus semelhantes”.

Albert Schweitzer



## RESUMO GERAL

PORTO, Dilacy Sales. **Promoção do crescimento vegetal por estirpes de *Bradyrhizobium ingae* isoladas no cerrado de Roraima**, 2016. 56 p. Dissertação (Mestrado em Agroecologia). Universidade Estadual de Roraima, Boa Vista-RR, 2016.

*Inga edulis* é uma leguminosa arbórea adaptada a solos ácidos e de baixa fertilidade e que estabelece simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio. Desta forma a seleção de bactérias eficientes para a fixação biológica de nitrogênio pode potencializar o uso desta leguminosa em áreas degradadas ou alteradas e também em sistemas agroflorestais. Portanto, os objetivos deste trabalho foram: I. Avaliar a eficiência simbiótica de oito estirpes de *Bradyrhizobium ingae*, nativas de Roraima em plantas de *Inga edulis*; II. Avaliar, *in vitro*, a capacidade destas estirpes em desenvolver características de promoção do crescimento vegetal. A avaliação da eficiência simbiótica foi conduzida através de três experimentos: um em condições de substrato e solução nutritiva esterilizada, um em vaso com solo sem esterilização e um em condições de viveiro também não esterilizado. Foram testados 12 tratamentos: a inoculação com oito estirpes de *Bradyrhizobium ingae* (ERR 490, ERR 492, ERR 493, ERR 494<sup>T</sup>, ERR 496, ERR 498 e ERR 569); duas estirpes recomendadas para *Inga marginata*, BR 6609 e BR 6610 (controle positivo); um tratamento sem inoculação e com adição de nitrogênio mineral e um tratamento sem inoculação e sem adição de nitrogênio. Os experimentos foram conduzidos por 60 dias (em condições esterilizadas) e por 100 dias nos demais experimentos. Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. A caracterização de promoção de crescimento foi avaliada através a capacidade das estirpes de *B. ingae* em solubilizar fosfato (cálcio e alumínio) e produção de compostos indólicos. Os resultados demonstraram que as estirpes de *B. ingae* foram eficientes, com destaque para três estirpes, ERR 493, ERR 498 e ERR 569 que favoreceram a produção de matéria seca da parte aérea e nitrogênio total, nos três experimentos. As estirpes de *B. ingae* também foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio e alumínio, além de sintetizar compostos indólicos. As estirpes de *B. ingae* mostraram-se eficientes para fixação de nitrogênio e para promoção de crescimentos, podendo ser utilizadas para a inoculação de mudas de *Inga edulis*.

**Palavras-chave:** fixação biológica de nitrogênio, eficiência simbiótica, solubilização de fosfato, compostos indólicos.

## GENERAL ABSTRACT

PORTO, Dilacy Sales, **Promoting plant growth by *Bradyrhizobium ingae* isolated in Roraima savannah**, 2016. 57 p. Dissertation (Master Science in Agroecology). State University of Roraima, Boa Vista-RR, 2016.

*Inga edulis* is a tree leguminous adapted to acid and low fertility soils that establish symbiosis with nitrogen-fixing bacteria. The selection of efficient bacteria to biological nitrogen fixation may potentiate the use of *Inga edulis* in degraded or changed areas and also agroforestry systems. Therefore, the aims of this work were: I. Evaluate the symbiotic efficiency of eight strains of *Bradyrhizobium* genus natives from Roraima in *Inga edulis* plants; II. Evaluate *in vitro* the ability of eight strains of *Bradyrhizobium* genus to develop plant growth promoting characteristics. The symbiotic efficiency was carried out by three experiments: green house conditions with sterile substrate and nutritive solution; green house conditions with non-sterile soils and nursery conditions with non-sterile substrate. Twelve treatments were evaluated: inoculation with eight strains of *Bradyrhizobium ingae* (ERR 490, ERR 492, ERR 493, ERR 494<sup>T</sup>, ERR 496, ERR 498 e ERR 569); inoculation with two strains indicated for *Inga marginata*, BR 6609 e BR 6610 (positive control); treatment without inoculation and with mineral nitrogen; treatment without inoculation and mineral nitrogen. The experiments were conducted for 60 days (sterile conditions) and for 100 days in the other experiments. All the experiments were conducted in a completely randomized design with four replicates. The strains were also evaluated by the ability to solubilize calcium and aluminum phosphate and indolic compounds production. The results showed that *B. ingae* strains were efficient to biological nitrogen fixation, especially three strains - ERR 493, ERR 498 and ERR 569. These strains favored the production of shoot dry matter and total nitrogen in all experiments. The *B. ingae* strains were also able to solubilize calcium and aluminum phosphate, despite synthesize indolic compounds. The strains of *B. ingae* can be used to inoculation in the *I. edulis* seedlings production.

**Keywords:** biological nitrogen fixation, symbiotic efficiency, phosphate solubilization, indolic compounds.

## ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

<b>Tabela 1.</b> Espécies descritas pertencentes ao gênero <i>Bradyrhizobium</i> .....	<b>20</b>
<b>Tabela 2.</b> Resposta de <i>Inga edulis</i> Mart. a inoculação com estirpes de <i>Bradyrhizobium ingae</i> cultivado em vasos de Leonard por 60 dias em casa de vegetação.....	<b>33</b>
<b>Tabela 3.</b> Resposta de <i>Inga edulis</i> Mart. cultivado em vasos contendo solo por 100 dias em casa de vegetação à inoculação com estirpes de <i>Bradyrhizobium ingae</i> .....	<b>35</b>
<b>Tabela 4.</b> Resposta de <i>Inga edulis</i> Mart. cultivado em substrato por 100 dias em viveiro à inoculação com estirpes de <i>Bradyrhizobium ingae</i> .....	<b>35</b>
<b>Tabela 5.</b> Matriz de correlação de Pearson ( <i>r</i> ) das variáveis utilizadas nos experimentos três de inoculação com <i>Bradyrhizobium ingae</i> em <i>Inga edulis</i> Mart.....	<b>39</b>
<b>Tabela 6.</b> Solubilização de fosfatos de cálcio e alumínio e produção de compostos indólicos por estirpes de <i>Bradyrhizobium ingae</i> .....	<b>41</b>
<b>Figura 1.</b> Efeito da inoculação com <i>Bradyrhizobium ingae</i> sobre a relação massa seca de raiz (MSR)/massa seca da parte aérea(MSPA) e índice de qualidade de Dickson (IQD) em mudas de <i>Inga edulis</i> . (A) Experimento 1 (B) Experimento 2. (C) Experimento 3. Letras diferentes nas barras indicam diferenças significativas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.....	<b>37</b>
<b>Figura 2.</b> Eficiência relativa de <i>Bradyrhizobium ingae</i> inoculados em plantas de <i>Inga edulis</i> Mart.....	<b>38</b>

## LISTAS DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

FBN - Fixação Biológica de Nitrogênio

$N_2$  - Nitrogênio atmosférico

$NH_3$  - Amônia

BFN - Bactérias Fixadoras de Nitrogênio

BPCV - Bactérias promotoras do crescimento vegetal

C/N - Carbono nitrogênio

ATP - Adenosina trifosfato

$NH_4$  - Amônio

ILPF - Integração lavoura pecuária floresta

SAFs - Sistema agroflorestais

BSF - Bactérias solubilizadoras de fosfato

P- Fósforo

Fe - Ferro

Al-Alumínio

Ca - Cálcio

AIA - Ácido indolacético

RELARE - Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão da Tecnologia de Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

AP - Altura da planta

DC - Diâmetro do coleto

NF - Números de folíolos

MSPA - Massa seca da parte aérea

NT - Nitrogênio total da parte aérea

MSR - Massa seca de raízes

NN - Número de nódulos

MSN - Massa seca dos nódulos

DAE - Dias após emergência

DO - Densidade ótica

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
2.1. Fixação biológica de nitrogênio (FBN) .....	17
2.2. Bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero <i>Bradyrhizobium</i> .....	19
2.3. Mecanismos de promoção do crescimento vegetal por <i>Bradyrhizobium</i> .....	21
2.4. Leguminosas e <i>Inga-Ingá</i> spp.....	24
<b>3. Material e Métodos</b> .....	28
3.1 Origem das estirpes .....	28
3.2 Eficiência simbiótica em mudas de <i>Inga edulis</i> Mart.....	28
3.3 Experimento 1 .....	28
3.4 Experimento 2 .....	29
3.5 Experimento 3 .....	29
3.6 Tratamentos, coleta de dados e análise estatística.....	30
3.7 Solubilização de fosfatos de cálcio e alumínio.....	31
3.8 Produção de compostos indólicos .....	32
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	32
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	43
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	44

## RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram Avaliar a eficiência simbiótica de oito estirpes de *Bradyrhizobium ingae*, nativas de Roraima em plantas de *Inga edulis* e a capacidade *in vitro*, destas estirpes em desenvolver características de promoção do crescimento vegetal. A avaliação da eficiência simbiótica foi conduzida através de três experimentos: um em condições de substrato e solução nutritiva esterilizada, um em vaso com solo sem esterilização e um em condições de viveiro também não esterilizado. Foram testados 12 tratamentos: a inoculação com oito estirpes de *Bradyrhizobium ingae* (ERR 490, ERR 492, ERR 493, ERR 494<sup>T</sup>, ERR 496, ERR 498 e ERR 569); duas estirpes recomendadas para *Inga marginata*, BR 6609 e BR 6610 (controle positivo); um tratamento sem inoculação e com adição de nitrogênio mineral e um tratamento sem inoculação e sem adição de nitrogênio. Os experimentos foram conduzidos por 60 dias (em condições esterilizadas) e por 100 dias nos demais experimentos. Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. A caracterização de promoção de crescimento foi avaliada através a capacidade das estirpes de *B. ingae* em solubilizar fosfato (cálcio e alumínio) e produção de compostos indólicos. Os resultados demonstraram que as estirpes de *B. ingae* foram eficientes, com destaque para duas estirpes, ERR 493, ERR 498 e ERR 569 que favoreceram a produção de matéria seca da parte aérea e nitrogênio total, nos três experimentos. As estirpes de *B. ingae* também foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio e alumínio, além de sintetizar compostos indólicos. As estirpes de *B. ingae* mostraram-se eficientes para fixação de nitrogênio e para promoção de crescimentos, podendo ser utilizadas para a inoculação de mudas de *Inga edulis*.

**Palavras-chave:** fixação biológica de nitrogênio, eficiência simbiótica, solubilização de fosfato, compostos indólicos.

## ABSTRACT

The aims of this work were evaluate the symbiotic efficiency of eight strains of *Bradyrhizobium* genus natives from Roraima in *Inga edulis* and the ability *in vitro* the ability of these strains to develop plant growth promoting characteristics. The symbiotic efficiency was carried out by three experiments: green house conditions with sterile substrate and nutritive solution; green house conditions with non-sterile soils and nursery conditions with non-sterile substrate. Twelve treatments were evaluated: inoculation with eight strains of *Bradyrhizobium ingae* (ERR 490, ERR 492, ERR 493, ERR 494<sup>T</sup>, ERR 496, ERR 498 e ERR 569); inoculation with two strains indicated for *Inga marginata*, BR 6609 e BR 6610 (positive control); treatment without inoculation and with mineral nitrogen; treatment without inoculation and mineral nitrogen. The experiments were conducted for 60 days (sterile conditions) and for 100 days in the other experiments. All the experiments were conducted in a completely randomized design with four replicates. The strains were also evaluated by the ability to solubilize calcium and aluminum phosphate and indolic compounds production. The results showed that *B. ingae* strains were efficient to biological nitrogen fixation, especially two strains ERR 493, ERR 498 and ERR 569. These strains favored the production of shoot dry matter and total nitrogen in all experiments. The *B. ingae* strains were also able to solubilize calcium and aluminum phosphate, despite synthetize indolic compounds. The strains of *B. ingae* can be used to inoculation in the *I. edulis* seedlings production.

**Key words:** biological nitrogen fixation, symbiotic efficiency, phosphate solubilization, indolic compounds.

## 1. INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) é um dos nutrientes mais importantes para o desenvolvimento vegetativo das plantas, sendo requerido em quantidade superior a qualquer outro elemento mineral. Sua baixa disponibilidade no solo geralmente limita a produtividade das plantas em ecossistemas naturais e agrícolas (Epstein & Bloom, 2005). No entanto, um grande estoque deste nutriente é encontrado na forma gasosa ( $N_2$ ), que para estar disponível deve ser transformado em amônia ( $NH_3$ ), o que pode acontecer por meio de descargas elétricas, processos industriais e, principalmente, pela fixação biológica de nitrogênio (FBN).

A FBN é o processo no qual microrganismos procariontes, através da enzima nitrogenase, rompem a tripla ligação do gás dinitrogênio ( $N\equiv N$ ) e transforma em amônia ( $NH_3$ ), sendo, dessa forma, possível de ser assimilado pelas plantas e por outros organismos (Moreira & Siqueira, 2006). Este processo é realizado por bactérias, denominadas de bactérias diazotróficas, que podem viver livremente, associadas ou em simbiose com vegetais (Moreira et al., 2013).

Dentro da simbiose realizada por bactérias diazotróficas, os rizóbios constituem o grupo ou as interações biológicas mais estudadas e com maior aplicação biotecnológica na agricultura. A simbiose entre rizóbios e leguminosas representa uma alternativa econômica e ecológica por dispensar total ou parcialmente a utilização de fertilizantes nitrogenados sintéticos (Hungria et al., 2007). A FBN, além de dispensar o uso desses adubos, faz com que todo o N fixado biologicamente seja aproveitado pela planta, assumindo uma importante ferramenta para recuperação de ecossistemas degradados, bem como constitui uma biotecnologia de baixo custo.

Os rizóbios induzem a formação de estruturas denominadas de nódulos nas raízes e/ou, excepcionalmente, no caule, através de uma série de mecanismos químicos e moleculares no interior do tecido vegetal. Trata-se de uma relação mutualística onde as plantas são beneficiadas pelo suprimento constante de N, ao custo de fornecer parte dos carboidratos sintetizados durante a fotossíntese para manutenção da simbiose (Cassini & Franco, 2006).

As leguminosas, por estabelecerem simbiose com rizóbios, são amplamente empregadas para recuperação de áreas degradadas ou para melhoria da fertilidade do solo. O plantio de leguminosas em áreas degradadas é amplamente utilizado e difundido pelos seus benefícios e funções protetoras em programas de reflorestamento, na recuperação de áreas degradadas, produção de serapilheira com baixa relação C/N, que favorece o desenvolvimento



de outras espécies vegetais, contribuindo principalmente para o aporte do nitrogênio no solo (Dias et al., 2007).

Espécies arbóreas leguminosas pertencentes ao gênero *Inga* possuem capacidade de formar nódulos, podendo se beneficiar da FBN, e por isso o seu uso é de grande interesse ecológico e florestal. Dentre as muitas espécies do gênero, o *Inga edulis* Mart. se destaca pela frequência com que é encontrada em quase todos os estados brasileiros (Garcia & fernandes, 2015), apresentando também ampla distribuição na América Central, Argentina, Colômbia, Peru, Venezuela (Correa & Bernal, 1995). Essa espécie é indicada, principalmente, para revegetação e recuperação de áreas degradadas, sombreamento de outras culturas em sistemas agroecológicos. No entanto, apesar de sua ampla distribuição e importância, não há rizóbios selecionados para esta leguminosa.

Além da capacidade de fixar nitrogênio, os rizóbios podem apresentar a capacidade de promover o crescimento vegetal por outros mecanismos, sendo também conhecidas como bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) (Gray & Smith, 2005). O crescimento vegetal pode ocorrer de forma direta ou indireta, sendo a primeira pela solubilização de fosfatos fixados no solo na forma de cálcio ou alumínio e a produção de fitohormônios, como o ácido indolacético (AIA), e o indireto pela produção de sideróforos ou indução de resistência sistêmica. O uso das BPCV podem auxiliar a planta a se estabelecer em solos de baixa fertilidade natural, ou mesmo degradados. No entanto, a maior parte dos estudos com BPCV está relacionada com espécies de leguminosas herbáceas de interesse agrícola como feijão, soja e outras, sendo poucos estudos envolvendo leguminosas arbóreas.

O presente trabalho foi realizado com os objetivos de avaliar a eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium ingae* inoculadas em plantas de *Inga edulis*, bem como avaliar, *in vitro*, a capacidade destas estirpes em promover o crescimento vegetal, solubilizando fosfatos de cálcio e de alumínio e produzindo compostos indólicos.

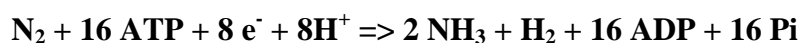
## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Fixação biológica de nitrogênio (FBN)**

O nitrogênio é o componente mais abundante na atmosfera, correspondendo a 79% dos gases. Encontra-se na forma combinada ( $N_2$ ) e é considerado elemento essencial para os organismos vivos, juntamente com o carbono, oxigênio e hidrogênio. O nitrogênio está presente na composição das biomoléculas de grande importância, tais como ATP, NADH, NADPH, clorofila, ácidos nucleicos e proteínas. Porém, a maioria dos organismos não é capaz

de utilizá-lo de forma direta, devido à força da tripla ligação de pontes de hidrogênio, que confere a alta estabilidade a esta molécula (Moreira & Siqueira, 2006).

O nitrogênio, em detrimento aos outros elementos essenciais, é requerido em maior quantidade pelas plantas, sendo que baixos teores deste elemento limitam a produtividade das espécies vegetais em muitos ecossistemas naturais e agrícolas (Epsein & Bloom, 2005). Em geral, as plantas podem obter o nitrogênio via adubações minerais, matéria orgânica do solo ou via fixação biológica de nitrogênio (FBN). A fixação biológica é realizada apenas por microrganismos procariotos, os quais possuem a enzima nitrogenase que hidrolisa 16 adenosinas trifosfato (ATP) e transfere oito elétrons por moléculas de N<sub>2</sub> fixado, reduzindo o N<sub>2</sub> a duas moléculas de amônia (Reis et al., 2006). A reação catalisada pela nitrogenase pode ser resumida da seguinte forma:



(Onde e<sup>-</sup> simboliza elétron e Pi simboliza o fosfato inorgânico).

As bactérias fixadoras de nitrogênio podem viver livres no solo ou na água, associadas à superfície do tecido vegetal, nos intestinos dos animais, ocupar espaços inter e intracelulares ou mesmo causando mudanças morfológicas e fisiológicas nas plantas (Siqueira & Franco, 1988; Moreira & Siqueira, 2006).

Os rizóbios ou bactérias fixadoras de nitrogênio induzem a formação de nódulos radiculares, que são estruturas hipertróficas habitadas por estes, onde fixam o N<sub>2</sub> atmosférico. Em contrapartida, as plantas fornecem fotoassimilados para as bactérias que se encontram no interior dos nódulos, estabelecendo uma relação mutualística.

O processo simbiótico entre rizóbios e leguminosas representa uma alternativa econômica e ecológica por dispensar total ou parcialmente a utilização de fertilizantes nitrogenados sintéticos. Durante a FBN, todo o N fixado biologicamente é aproveitado pela planta, assumindo uma importante ferramenta de recuperação de ecossistemas degradados e de baixo custo (Franco & Döbereiner, 1994; Franco & Faria, 1997).

A FBN é imprescindível à exploração agrícola racional, sendo responsável, no Brasil, pela economia de algo em torno de US\$ 10,3 bilhões de dólares em fertilizantes nitrogenados na cultura da soja (<http://www.embrapa.br>). Neste caso, a adubação sintética nitrogenada é totalmente substituída pela utilização de inoculantes contendo bactérias do gênero *Bradyrhizobium*.

## 2.2. Bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Bradyrhizobium*

As bactérias do gênero *Bradyrhizobium* são gram-negativas, aeróbias, não apresentam esporos, possuem um flagelo polar ou subpolar tornando-se móveis, apresentam crescimento lento e promovem a alcalinização do meio de cultura contendo manitol como fonte de carbono e azul de bromotimol como indicador de pH (Jordan, 1982; Menna et al., 2009). A temperatura ótima para seu crescimento ocorre entre 25 e 30 °C e em geral o tamanho da colônia não excede a um milímetro de diâmetro para um período de incubação de 5 a 7 dias (Jordan, 1982).

O gênero *Bradyrhizobium* estabelece simbiose com várias plantas hospedeiras herbáceas ou arbóreas, sendo encontrado em várias regiões do mundo, nos mais variados ecossistemas das regiões temperadas e tropicais (Menna et al., 2009). No Brasil, é grandemente encontrada em nódulos de leguminosas florestais na Amazônia (Moreira et al., 1993; Moreira, 1997).

Vários estudos realizados em solos da região Amazônica sob diferentes sistemas de uso da terra têm demonstrado alta diversidade de bactérias simbióticas que nodulam leguminosas capaz de fixar nitrogênio (Jesus et al., 2005 e 2009; Lima et al., 2005 e 2009; Nóbrega, 2006; Moreira et al., 2006, Guimaraes et al., 2012; Jaramillo et al., 2013). Entre os gêneros identificados o de maior predominância foi o de bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, com alta diversidade de estirpes.

Segundo Rufini et al. (2014), o gênero *Bradyrhizobium* destaca-se por apresentar a vantagem de ser mais estável do que outros gêneros de bactérias fixadoras de N<sub>2</sub>, pois os genes relacionados à nodulação (genes *nod*) e à fixação de nitrogênio (genes *nif*) estão localizados nos cromossomos e não em plasmídeos, os quais podem ser perdidos em condições ambientais estressantes. Atualmente, o gênero conta com 28 espécies descritas, isoladas de diversas plantas em diversas regiões do mundo (Tabela 1) no total de espécies descritas, 04 foram isoladas de plantas no Brasil, correspondendo às espécies de *B. diazoefficiens* (Delamuta et al., 2013), *B. ingae* (Silva et al., 2014), *B. manausense* (Silva et al., 2014) e *B. neotropica* (Zilli et al., 2014).

**Tabela 1.** Espécies descritas pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*.

Espécie	Planta hospedeira	Referência
<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max</i>	Jordan, 1982
<i>B. elkanni</i>	<i>Glycine max</i>	Kuykendal et al., 1993
<i>B. liaoningense</i>	<i>Glycine max</i>	Xu et al., 1995
<i>B. yuanmingense</i>	<i>Vigna unguiculata e V. radiata</i>	Yao et al., 2002
<i>B. betae</i>	<i>Betae vulgaris</i>	Rivas et al., 2004
<i>B. canariense</i>	Legumes genistóide	Vinuesa et al., 2005
<i>B. pachyrhizi</i>	<i>Pachyrhizi erosus</i>	Ramirez-Bahena et al., 2009
<i>B. jicamae</i>	<i>Pachyrhizi erosus</i>	Ramirez-Bahena et al., 2009
<i>B. iriomotense</i>	<i>Koshunensis legume</i>	Islam et al., 2010
<i>B. cytisi</i>	<i>Cytisus villosus</i>	Chahbourne et al., 2011
<i>B. denitrificans</i>	Água do lago na Alemanha	Van Berkum; Leibold; Eardly, 2011
<i>B. lablab</i>	<i>Purpureus lablab e Arachis hypogaea</i>	Chang et al., 2011
<i>B. huanghuaihaiense</i>	<i>Glycine max</i>	Zhang et al., 2012
<i>B. daqingense</i>	<i>Glycine max</i>	Wang et al., 2013
<i>B. diazoefficiens</i>	<i>Glycine max</i>	Delamuta et al., 2013
<i>B. ganzhouense</i>	<i>Acacia melanoxylon</i>	Lu et al., 2014
<i>B. icense</i>	<i>Phaseolus lunatus L.</i>	Duran et al., 2014
<i>B. ingae</i>	<i>Inga laurina</i>	Silva et al., 2014
<i>B. manausense</i>	<i>Vigna unguiculata</i>	Silva et al., 2014
<i>B. oligotrophicum</i>	Área de cultivo de <i>Oriza sativa</i>	Ohta e Hattori, 1985
<i>B. ottawaense</i>	<i>Glycine max</i>	Yu et al., 2014
<i>B. paxllaeri</i>	<i>Phaseolus lunatus L.</i>	Duran et al., 2014
<i>B. retamae</i>	<i>Sphaerocarpa retama e Retama monosperma</i>	Guerrouj et al., 2014
<i>B. rifense</i>	<i>Cytisus villosus</i>	Chahboune et al., 2014
<i>B. neotropiale</i>	<i>Centrolobium paraense</i>	Zilli et al., 2014
<i>B. ferriligini</i>	<i>Erythrophleum fordii</i>	Yao et al., 2015
<i>B. erythrophlei</i>	<i>Erythrophleum fordii</i>	Yao et al., 2015
<i>B. lupini</i>	<i>Lupinus</i>	Peix et al., 2015

(<http://www.bacterio.net/bradyrhizobium.htm>.>Acesso em 02 fev. 2016).

Das quatro espécies de *Bradyrhizobium* descritas no Brasil, duas foram isoladas no estado de Roraima, *B. ingae* (Silva et al., 2014) e *B. neotropicale* (Zilli et al., 2014). Seis novas estirpes nodulíferas do gênero *Bradyrhizobium*, isolados de *Inga laurina* (Sw) Willd, obtidas na região do cerrado Amazônico, no estado de Roraima, no qual o nome *Bradyrhizobium ingae* foi proposto (Silva et al., 2014). Estas representam as primeiras bactérias isoladas de nódulos de raízes do *Inga laurina*.

Já no trabalho realizado por Zilli et al. (2014) no cerrado de Roraima, os autores avaliaram 18 isolados de rizóbios e verificaram que o *Centrolobium paraense* é capaz de nodular com diferentes espécies de rizobio, e que 90% dos isolados apresentaram características típicas para gênero *Bradyrhizobium*. Destas bactérias, três apresentaram maior eficiência para FBN na espécie, podendo ser utilizados como inoculantes para esta leguminosa.

No Brasil, quatro estirpes pertencentes a duas espécies de *Bradyrhizobium* são utilizadas na agricultura para a cultura da soja, as estirpes *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019) e *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080); e quatro estirpes de *Bradyrhizobium* sp. para feijão caupi SEMIA 6461, SEMIA 6462, SEMIA 6463 e SEMIA 6464 (MAPA, 2011). Embora atualmente existam 96 estirpes descritas pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* recomendados para diversas culturas, as estirpes mais produzidas e utilizadas no mercado são para o cultivo da soja.

Todavia, há 43 estirpes recomendadas para o uso em leguminosas arbóreas, mas estas são pouco utilizadas. Portanto, é imprescindível a difusão dessa tecnologia para outras culturas, especialmente as leguminosas arbóreas, como alternativa para recuperação de áreas degradadas e práticas de reflorestamento, atendendo o Novo Código Florestal, BRASIL Lei 12.651/2012, que prevê a recuperação de áreas de preservação permanente e de reserva legal, e as espécies arbóreas nativas com potencial de FBN têm um papel importante nos plantios.

### **2.3. Mecanismos de promoção do crescimento vegetal por *Bradyrhizobium***

O uso de microrganismos promotores de crescimento vegetal é uma das alternativas para a agricultura sustentável, que requer o uso de práticas que permitam o aumento da produção de alimentos sem danos ao meio ambiente e à saúde, dentro do contexto econômico, social e político de cada região (Mariano et al., 2004).

As bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) são aquelas capazes de promover o desenvolvimento da planta de forma direta ou indireta. São encontradas em habitats naturais, colonizando o interior e o exterior de órgãos de plantas, sendo conhecidas

como rizobactérias por se localizarem na rizosfera (Gray & Smith, 2005). No solo existe grande número de bactérias, que podem ser divididas em: bactérias que residem no interior das células vegetais, capazes de produzir nódulos e que estão localizadas no interior dessas estruturas especializadas; e bactérias extracelulares, que não produzem nódulos, que se desenvolvem fora das células vegetais, porém, são responsáveis pela promoção do crescimento da planta através da produção de compostos que estimulam o crescimento vegetal (Gray & Smith, 2005).

Na promoção do crescimento de forma direta, as BPCV atuam na produção de fitormônios, fixação do N<sub>2</sub> atmosférico e solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis, podendo aumentar a eficiência de utilização dos adubos fosfatados e a disponibilidade de fósforo no solo (Hara & Oliveira, 2005; Marra et al., 2012). Por outro lado, a promoção do crescimento pode se dá de forma indireta, através do antagonismo a fitopatógenos, da competição e/ou produção de antibióticos e produção de sideróforos, que podem auxiliar as plantas na absorção de íons de ferro, quando há deficiência deste no meio (Peixoto Neto et al., 2002).

Estudos relacionados às BPCV, em sua maioria, têm sido bastante difundidos na agricultura com espécies de plantas anuais (Kloepper, 1996). Entretanto, pesquisas realizadas com BPCV em espécies florestais são escassas quando comparadas com as espécies anuais (Chanway, 1997). Os benefícios da utilização de bactérias como promotoras de crescimento têm se mostrado uma alternativa promissora no auxílio aos ganhos em produtividade e, podem favorecer o desenvolvimento das mudas em viveiro, diminuindo o tempo de produção e elevar a capacidade de estabelecimento dessas mudas em campo.

O fósforo, assim como o nitrogênio, é um nutriente essencial para sustentar o potencial produtivo das culturas agrícolas. Encontra-se em baixa disponibilidade no solo, apesar de estar presente tanto nas formas orgânicas como nas inorgânicas, sendo essencial para o crescimento da planta, bem como para atividade microbiana (Shmith, 2002; Martinazzo et al., 2007; Rheinheimer et al., 2008).

O uso de microrganismos solubilizadores de fosfato em inoculantes tem sido sugerido como alternativa para diminuir ou substituir o uso de fertilizantes fosfatados solúveis, fosfatos naturais existentes ou adicionados ao solo, uma vez que na maioria dos solos este nutriente não se encontra na forma disponível às plantas (Richardson, 2001).

A baixa disponibilidade de fósforo nos solos tropicais se deve à reatividade das formas solúveis de P com outros componentes químicos; cálcio, ferro, magnésio e alumínio, formando compostos de baixa solubilidade. Os fosfatos predominantes em solos ácidos são os

formados pela associação de P com Fe e/ou Al, e nos solos com pH mais elevado predominam as formas associadas ao Ca (Barroso & Nahas, 2005).

Silva et al. (2011), avaliando a presença de bactérias solubilizadoras de fosfato (BSF) em solos da Amazônia, constataram que a ocorrência de bactérias solubilizadoras de fosfato de cálcio foi maior do que as que solubilizam fosfato de alumínio. Ainda em solos da Amazônia, Chagas Junior et al. (2009), avaliando 205 isolados de rizóbios de solos na Amazônia, constataram que 68 solubilizaram P-Ca, 47 solubilizaram P-Al e 32 solubilizaram tanto P-Ca quanto P-Al.

Santos (2013), avaliando 27 estirpes, destas 24 do gênero *Bradyrhizobium*, sendo 13 isolados de solos da Amazônia, foram inoculados nas espécies leguminosas arbóreas tamboril (*Enterolobium cortortisiliquum*) e angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa*), estas foram avaliadas quanto à capacidade destas bactérias em solubilizar fosfatos inorgânicos, das quais, 17 estirpes foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio (P-Ca) a um índice de solubilização médio, sendo que nenhuma estirpe foi capaz de solubilizar fosfato de ferro (P-Fe) e de alumínio (P-Al).

Em seu trabalho pioneiro, Gerretsen (1948) relatou que plantas inoculadas com microrganismos rizosféricos apresentaram maior quantidade de fósforo do que plantas sem inoculação, confirmando a capacidade dos microrganismos de solubilizar fósforo inorgânico.

A capacidade microbiana do solo em solubilizar diferentes formas de fosfatos apresenta um importante papel no fornecimento de fósforo para as plantas, pois apresentam capacidade de disponibilizar fosfatos insolúveis, existentes ou adicionados no solo, pelos processos de quelação, reações de troca iônica, especialmente pela produção de ácidos orgânicos (Souchie et al., 2005a; Barroso & Nahas, 2008).

Vários grupos de microrganismos do solo, destacando bactérias e fungos, possuem habilidade em solubilizar e mineralizar fosfatos inorgânicos insolúveis, processo responsável por aumentar a disponibilidade de P no solo. Quanto à capacidade de solubilização, pesquisas com diferentes espécies bacterianas evidenciam que estirpes do gênero *Bacillus*, *Rhizobium* e *Pseudomonas* exibiram o maior potencial de solubilização de fósforo (Rodríguez & Fraga, 1999). Nas populações fúngicas destacam-se os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (Silva Filho et al., 2002).

As bactérias endofíticas e rizosféricas representam um grande potencial na promoção de crescimento das plantas por contribuírem com a produção de fitormônios como as auxinas (Patten & Glick, 2002; Spaepen et al., 2007). A principal auxina produzida, o ácido indolacético (AIA), tem papel fundamental no crescimento de raízes e caules, através do

alongamento das células recém-formadas nos meristemas. Com muitas raízes a planta aumenta a habilidade de se ancorar ao solo, melhora a absorção de água, nutrientes e aumenta a chance de sobrevivência no ambiente (Patten & Glick, 2002), além de aumentar a liberação de exudados.

Nos mais diferentes exudados, o aminoácido triptofano tem sido identificado como principal precursor fisiológico para via de biossíntese de AIA em plantas e microrganismos (Khalid et al., 2004). Estimulando as multiplicações celulares, e promovendo o crescimento vegetal, bem como a atividade de nitrogenase. A identificação de compostos intermediários conduziu à identificação de cinco vias diferentes usando triptofano como precursor principal.

A biossíntese de AIA com estirpes de *Azospirillum brasiliense* mostraram a existência de, pelo menos, três vias biossintéticas: duas dependentes de triptofano, via do ácido índole-3-acetamina (IAM) e via do ácido índole-3-piruvato (Ipya), e uma via independente de triptofano (Prinsen et al., 1993; Dobbelaere et al., 1999).

A produção de AIA pela via indol-3-piruvato (IpyA), a principal via na presença de triptofano, tem sido descrita em uma vasta gama de bactérias patogênicas e não patogênicas, tais como *Pantoea agglomerans*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Enterobacter cloacae*. Estudos relatam que a maioria das bactérias não patogênicas utiliza preferencialmente a rota (IpyA) (Patten & Glick, 1996).

Oliveira-Longatti et al. (2014), avaliaram 31 isolados de diferentes estirpes de bactérias de solos da Amazônia, observaram que 94% dos isolados são capazes de produzir AIA e níveis elevados de produção foram registrados a partir de adição de L-triptofano para a estirpe de *Bradyrhizobium* spp. Outros trabalhos evidenciaram a síntese de AIA por rizóbios usando o L-triptofano para aumentar a produção deste fitormônio (Costa et al., 2013; Chagas J. et al., 2009). Estes resultados indicam a importância do triptofano como um precursor do AIA.

#### **2.4. Leguminosas e *Ingá* - *Inga* spp.**

A família botânica Fabaceae (Leguminosae), com mais de 650 gêneros, é uma das mais importantes e abundantes nos trópicos e está distribuída entre herbáceas, arbustivas e arbóreas (Polhil et al., 1981; Franco et al., 2003). Está bem representada nos mais diversos ecossistemas brasileiros, com estimativa de haver cerca de 10% do total das espécies concentradas principalmente na Amazônia e no Cerrado (Faria et al., 1999). Destaca-se na Amazônia, por ser a mais importante família de plantas dentre as lenhosas e a mais numerosa em espécies nativas (Silva et al., 1989).



Uma das características mais importantes das leguminosas é conferida, em grande parte, à sua capacidade de fazer associações simbióticas com bactérias denominadas de rizóbios, que fixam nitrogênio atmosférico, fornecendo-o para a planta em uma forma assimilável (Nogueira et al., 2012). O resultado desta interação é evidenciado pela presença de nódulos nas raízes destas espécies.

Muitas espécies de leguminosas despertam grande interesse econômico, social e ecológico na recuperação de áreas degradadas na agricultura em geral, como a produção de grãos, carne, biocombustível e fibras e na alimentação humana, como alternativa da proteína animal e de importante valor nutricional (Phillips, 1993). Além disso, devido à acentuada perda de cobertura vegetal natural, o uso de leguminosas como adubo verde e cobertura vegetal é uma prática que vem sendo usada com benefício significativo na conservação e melhoria do solo, especialmente para aqueles com baixa disponibilidade de nutrientes (Bertoni & Lombardi Neto, 2008).

Mais um aspecto que vem sendo estudado é o uso das leguminosas arbóreas em sistemas agroflorestais - SAFs, na reabilitação e recuperação de áreas degradadas - e solos erodidos (Herrera et al., 1993; Franco & Faria, 1997; Franco et al., 2000; Urquiaga & Zapata, 1997; Resende et al., 2003) geralmente causados por atividade agrícola, manejo inadequado do solo com ênfase na monocultura, alta frequência do fogo e pastoreio extensivo. Portanto, a degradação ambiental pode ocorrer em diferentes níveis, porém atinge seus estágios mais avançados quando afeta o solo (Franco et al., 2003).

Uma alternativa para a recuperação de solos degradados pode ser obtida pelo uso de leguminosas arbóreas, espécies vegetais de crescimento rápido, com capacidade de fixação simbiótica de nitrogênio, podendo, inclusive, ser empregada para a aceleração da sucessão secundária progressiva (Franco et al., 1992). O uso de leguminosas florestais, inoculadas com bactérias diazotróficas, promovem o retorno da resiliência ambiental, favorecendo a sustentabilidade dos ecossistemas ao reincorporar estas áreas degradadas ao processo produtivo da floresta (Faria & Lima, 2002; Oliveira, 2008).

A inoculação de microrganismos em mudas de plantas possui eficiência comprovada pela pesquisa em diferentes espécies arbóreas, acrescentando benefícios na promoção de crescimento e favorecendo o estabelecimento das mudas em campo durante o transplante (Verissimo & Valcarcel, 1992; Dias et al., 2007; Costa et al., 2014).

O conhecimento da habilidade nodulífera e fixadora de  $N_2$  em leguminosas são responsáveis por benefícios econômicos e de grande relevância para adoção de tecnologias sustentáveis para os sistemas de produções agrícolas e ambientais e, por isso, tem recebido

atenção de pesquisas nos últimos anos. Com a utilização da inoculação com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* sp, principalmente na cultura da soja, a demanda de N é totalmente atendida pela FBN (Moreira & Siqueira, 2006) assegurando uma alta produtividade com reduzido custo de produção (Hungria et al, 2007).

As espécies do gênero ingá são leguminosas arbóreas da sub-família Mimosoideae, nativa da América Latina Tropical e difundida por toda Amazônia, América Central e Índias Ocidentais (Souza et al., 1996). Possui cerca de 300 espécies lenhosas distribuídas em 14 seções (Pennington, 1997). Destas, 131 espécies são de ocorrência no Brasil (Garcia & Fernandes 2015). Ocorre nos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Bahia, Paraíba, Pernambuco, Mato Grosso, Rio de Janeiro, São Paulo, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina (Rodrigues, 1982; Silva et al., 1989; Garcia & Fernandes 2015). Adaptada a climas tropicais e subtropicais, ocorre em diferentes tipos de solo, é uma frutífera tolerante a solos ácidos (Hands, 1998), com alta saturação de alumínio, além de apresentar capacidade de fixação de nitrogênio através da associação simbiótica com bactérias endofíticas do gênero rhizóbio (Van Kessel & Roskoski, 1983; Grossman et al., 2006) e/ou fungos micorrizicos (Marques et al., 2001).

Além da importância ecológica, o ingá apresenta potencial econômico por suas características de múltiplo aproveitamento, muito utilizada por ser de rápido crescimento, sombreamento, frutos comestíveis, madeira para lenha, produção de biomassa, controle de invasoras e proteção do solo (Falcão & Clemente, 2000) e, mais recente, na recuperação de áreas degradadas, recomposição de matas ciliares, plantios consorciados e uso em sistemas agroflorestais (Nichols et al., 2001; Palheta & Wandelli, 2002; Leblanc et al., 2006).

Nichols et al. (2001), obtiveram resultados satisfatórios no consórcio entre plantas de *Terminalia amazônica* com *Inga edulis*, o que favoreceu o crescimento da espécie e proporcionou maior índice de biomassa e teor de nitrogênio foliar à *T. amazônica*. No México, o *Ingá* é usado na agricultura orgânica, como leguminosa fixadora de nitrogênio (Grossman et al., 2006).

Leblanc et al. (2006), em experimento com serapilheira na Costa Rica, considerou a espécie *Inga edulis* muito promissora por proporcionar uma melhor cobertura ao solo favorecendo a relação C/N, além de reduzir a temperatura e a intensidade da luz sob suas copas, permite também um incremento maior de nitrogênio através da serapilheira, melhorando as condições abióticas e também bióticas do solo.

A espécie *Inga edulis* é uma espécie arbórea de interesse florestal na Amazônia, por sua característica de múltiplo aproveitamento, crescimento satisfatório e adaptação aos solos

ácidos e de baixa fertilidade (Brito & Souza, 1997). É tolerante às regiões de cerrado e resistente à seca e ao frio (Ferrão, 2001). Ocorre principalmente nas capoeiras localizadas sob solos de baixadas que alagam durante o período chuvoso (Lorenzi, 1998). Ocorre também nas áreas de planície litorânea e restinga arbórea da costa atlântica (Garcia, 1998). Na Guiana, é comum em florestas ao longo dos rios e também em declives (Roosmalen, 1985).

Apesar da ampla ocorrência em diferentes ambientes, não há dados na literatura sobre a existência de estirpes recomendadas para o *Inga edulis*. Atualmente, no Brasil, existe referência a duas estirpes de *Bradyrhizobium sp.*, BR 6609 e BR 6610, recomendadas para *Inga marginata* pelo MAPA.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Origem das estirpes

As estirpes utilizadas neste estudo foram isoladas de nódulos de *Inga laurina* (Sw.) Willd., em condições naturais no Cerrado de Roraima, no Campo Experimental Monte Cristo, pertencente a Embrapa Roraima e em um ponto localizado na cidade de Boa Vista cujas coordenadas são, (2° 50' 21''N, 60° 40' 32,25''O e 2° 57' 00''N, 60°42' 25''O, respectivamente).

Estas estirpes foram caracterizadas genotipicamente e bioquimicamente e identificadas como uma nova espécie denominada de *Bradyrhizobium ingae* (Silva et al., 2014). As estirpes descritas foram: ERR 490, ERR 492, ERR 493, ERR 494<sup>T</sup>, ERR 496, ERR 497, ERR 498, e ERR 569. Apesar das estirpes terem sido isoladas em plantas de *I. laurina*, estas foram capazes de nodular *I. edulis* Mart., mas a eficiência simbiótica não foi avaliada.

#### 3.2. Eficiência simbiótica em mudas de *Inga edulis* Mart.

A eficiência simbiótica foi avaliada em três experimentos: um em condição estéril com solução nutritiva em casa de vegetação, um em vaso com solo não estéril em casa de vegetação e um em condição de viveiro também não estéril.

Em todos os experimentos foram utilizadas sementes de *Inga edulis* coletadas no campo experimental Água Boa da Embrapa Roraima, localizado no município de Boa Vista – RR, cujas coordenadas geográficas são: 02° 39' 00''N e 60° 49' e 40''O. As sementes foram desinfestadas com álcool etílico a 92% por 30 seg, hipoclorito de sódio a 2% por 1 min e lavada seis vezes com água destilada estéril.

As estirpes utilizadas foram cultivadas em meio 79 líquido pH de 6,8 (Fred e Waksman, 1928) e incubadas a 28°C sob agitação por 72 horas. Um mililitro de meio contendo as bactérias crescidas ( $10^8$  células mL<sup>-1</sup>) foi inoculado em cada planta, aos 15 dias após a emergência.

#### 3.3. Experimento 1

O primeiro experimento foi conduzido sob condições controladas em casa de vegetação, temperatura (28°C) e luminosidade (cortina reflexiva com 50% de sobreamento) utilizando-se vasos de Leonard (Vicent, 1970). Na montagem dos vasos utilizou-se uma mistura de areia textura média e vermiculita na proporção 2:1 na parte superior, enquanto a inferior continha solução nutritiva de Hoagland com pH de 7.0 (Hoagland e Arnon, 1950) modificado por (Guimarães et al., 2012) com baixa concentração de nitrogênio (5,25 mg L<sup>-1</sup>).

Os vasos foram autoclavados (120 °C, 128 atm) duas vezes por uma hora. Foi semeada uma semente por vaso, a qual foi primeiramente desinfestada como descrito no item 2.2, inoculada com um mililitro de meio do cultivo bacteriano. Cada vaso recebeu 800 ml de solução nutritiva por semana com 1/4 de força durante 30 dias, aumentando para 1/2 força até o término do experimento. O experimento foi conduzido por 60 dias. O tratamento sem inoculação e com adição de nitrogênio recebeu 10 mg de N por vaso por semana.

### 3.4. Experimento 2

O segundo experimento foi realizado em casa de vegetação em vasos de polietileno com capacidade de 2,41 dm<sup>-3</sup> contendo solo não estéril e areia de textura média lavada, na proporção de 1:1. O solo utilizado como substrato foi o Latossolo Amarelo Distrófico, coletado na camada de 0-20 cm, na sede da Embrapa Roraima, cujas coordenadas geográficas de referência são: 02° 42' 30''N e 47° 38' 00''O. O solo utilizado no experimento apresentou as seguintes características químicas pH (H<sub>2</sub>O) de 5,2; 0,5 g kg<sup>-1</sup> de matéria orgânica; 12 mg dm<sup>-3</sup> de P; 0,05 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> de K<sup>+</sup>; 0,7 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> de Ca<sup>2+</sup>; 0,7 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> de Mg<sup>2+</sup>; 1,8 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> de H+Al e 0,1 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> de Al<sup>3+</sup>.

Foram semeadas duas sementes por vaso, as quais foram desinfestadas como descrito no item 2.2. Após a germinação foi realizado desbaste, permanecendo uma planta por vaso. Os vasos foram irrigados com 100 mL de água destilada sempre que necessário para manter o solo com umidade.

O experimento foi irrigado com solução nutritiva estéril de Hoagland e Arnon (1950) com adaptações (Guimarães et al., 2012). Para cada tratamento foi aplicado 100 mL semana<sup>-1</sup> de solução nutritiva sobre o substrato, iniciando com a concentração mais diluída (1/4 força) durante 30 dias, aumentando para 1/2 força durante 30 dias e posteriormente para 1 força até o término do experimento. O experimento foi conduzido por 100 dias.

### 3.5. Experimento 3

O terceiro experimento foi realizado em condições de viveiro em sacos de polietileno com capacidade de 3 litros, utilizando a mistura (1:1:1) de solo de textura argilosa (Latosolo vermelho amarelo), solo de textura arenosa (Latosolo amarelo) e areia de textura grossa. O Latossolo vermelho amarelo e Latossolo amarelo foram coletados no Campo Experimental Monte Cristo e Água Boa, respectivamente, ambos pertencentes a Embrapa Roraima. Após a mistura, este substrato apresentou as seguintes características químicas pH (H<sub>2</sub>O) de 5,9; 6,7 g kg<sup>-1</sup> de matéria orgânica; 2,57 mg dm<sup>-3</sup> de P; 0,04 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> de K<sup>+</sup>; 0,5 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> de Ca<sup>2+</sup>, 0,17 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> de Mg<sup>2+</sup>; 1,7 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> de H+Al e 0,08 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> de Al<sup>3+</sup>.

Foram semeadas duas sementes por saco desinfestadas como descrito anteriormente, sendo que após desbaste deixou-se uma planta por saco. A irrigação foi realizada diariamente com água potável, utilizando sistema automatizado de irrigação por aspersão. O experimento foi conduzido por 100 dias, aplicando-se solução nutritiva de acordo com descrito para o experimento de casa de vegetação com solo não estéril.

### 3.6. Tratamentos, coleta de dados e análise estatística

Os tratamentos corresponderam às oito estirpes de *Bradyrhizobium ingae* (ERR 490, ERR 492, ERR 493, ERR 494<sup>T</sup>, ERR 496, ERR 497, ERR 498 e ERR 569), duas estirpes de *Bradyrhizobium* spp. recomendadas pelo MAPA para *Inga marginata*, (BR 6609 e BR 6610), um tratamento sem inoculação e sem adição de N mineral e um tratamento sem inoculação e com adição de nitrogênio mineral (10 mg de N na forma de nitrato de amônio por planta semanalmente) no total de 12 tratamentos. O delineamento experimental utilizado nos três experimentos foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, totalizando 48 parcelas por experimento.

Aos 45 dias após semeadura de cada experimento, uma repetição de cada tratamento foi retirada para observação da presença de nódulos. Ao término de cada experimento, as plantas foram coletadas e determinados o número de nódulos (NN), a massa seca de nódulos (MSN), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca das raízes (MSR), número de folíolos (NF), altura de planta (AP), diâmetro do coleto (DC) e nitrogênio total da parte aérea (NT). Para todos os experimentos foi calculado a relação entre MSR/MSPA e o índice de qualidade de Dickson (IQD) (Dickson et al., 1960), determinado pela expressão:

$$IQD = \frac{MST (g)}{AP (cm)/DC (mm) + MSPA (g)/MSR (g)}$$

Onde MST refere-se à massa seca total (MSPA+MSR).

Também foi determinada a eficiência relativa (EFR) segundo a fórmula EFR:

$$EFR = \frac{MSPA \text{ inoculada} \times 100}{MSPA \text{ com N}}$$

Onde EFR é a eficiência relativa, MSPA inoculada é a matéria seca inoculadas com as estirpes testadas, MSPA nitrogênio é a matéria seca da parte aérea sem inoculação e com a adição de nitrogênio (Bergensen et al., 1971).

Para todas as variáveis foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk a 5% de significância. Os dados referentes à NN, MSN e NF não apresentaram distribuição normal e foram transformados para  $(x+1)^{0.5}$  antes da análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott (1974) a 5%. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o

software R versão 3.2.2 (R Core Team, 2015) por meio do pacote estatístico ExpDes.pt versão 1.1.2 (Ferreira et al., 2013). A partir das variáveis analisadas nos três experimentos de eficiência simbiótica foi calculada a correlação de Pearson ( $r$ ) também no software R.

### 3.7. Solubilização de fosfatos de cálcio e de alumínio

Foram conduzidos dois experimentos, um para avaliar a capacidade dos isolados de solubilizar fontes inorgânicas insolúveis de fosfatos de  $\text{CaHPO}_4$  (P-Ca) e outro para a solubilização de  $\text{AlPO}_4$  (P-Al). Foi utilizado o meio NBRIP (Nautiyal, 1999) no qual foi modificada a fonte de fósforo. Para a solubilização de fosfato de cálcio foi utilizado 2,6 g de  $\text{CaHPO}_4$  e o pH foi ajustado para 7.0. Para a solubilização de fosfato de alumínio foi utilizado 2,36 g de  $\text{AlPO}_4$  e o pH do meio ajustado para 4.5. Para o meio sólido foi adicionado 10 g de ágar por litro.

Para avaliação da capacidade solubilizadora de fosfato de cálcio e alumínio em placas, as bactérias foram cultivadas em meio 79 líquido por 72 horas e a densidade ótica (DO) foi ajustado para 0,5-0,7 em comprimento de onda de 630 nm. Procedeu-se então a inoculação de 10  $\mu\text{L}$  de suspensão bacteriana crescida em três pontos equidistantes na placa de Petri já contendo os meios com os fosfatos precipitados. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições. Foram incluídas duas estirpes tipos como controles positivos para avaliação da solubilização de fosfatos: BR11001<sup>T</sup> (*Azospirillum brasiliense*), BR11175<sup>T</sup> (*Herbaspirillum seropedicae*). As placas foram incubadas a 28° C por 18 dias e a cada seis dias foi medido o diâmetro do halo de solubilização (áreas translúcidas ao redor das colônias), utilizando um paquímetro digital, resultando em três medições. A partir dessas medidas foi obtido o índice de solubilização (IS) para cada isolado através da fórmula:  $\text{IS} = \text{Ø halo (mm)} / \text{Ø colônia (mm)}$  (Berraquero et al., 1976). Com base nos índices de solubilização, os isolados foram classificados como de baixa (IS até 2), média (IS de 3 a 4) e alta ( $\text{IS} \geq 5$ ) capacidade de solubilização.

Para determinação da solubilização de fosfatos insolúveis em meio líquido, aproximadamente 1 mg de células cultivadas em meio 79 sólido foi inoculado em erlenmyer de 125 mL contendo 30 mL do meio NBRIP tendo o fósforo precipitado. Para o meio contendo fósforo precipitado com alumínio foi utilizado o  $\text{AlPO}_4$  correspondendo a 12 mg de  $\text{P L}^{-1}$ . O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com três repetições. Foram incluídas duas estirpes tipos: BR11001<sup>T</sup> (*Azospirillum brasiliense*), e BR11175<sup>T</sup> (*Herbaspirillum seropedicae*). A solubilização de fosfato de cálcio em meio líquido não foi

concluída, devido ao  $\text{CaHPO}_4$  após 4 dias de incubação liberar fósforo ao meio sem a presença de bactérias (Bashan et al., 2013).

Para determinação do fósforo solubilizado, os erlenmeyers contendo os meios inoculados com as estirpes foram incubadas a  $28^\circ\text{C}$ , sob agitação constante de 150 rpm por quatro dias. No final desse período, procedeu-se a determinação do pH e em seguida feita a centrifugação a 10.000 rpm por cinco minutos. Finda a centrifugação, transferiu-se 5 mL do sobrenadante bacteriano para copo descartável de 50 mL, onde adicionou-se 10 mL da solução de ácido molibdato de amônio diluído e  $\pm 30$  mg de ácido ascórbico (EMBRAPA, 2009). Após uma hora de incubação foi realizada a leitura das amostras em espectrofotômetro SP 2000 UV, BEL, a 660 nm. A concentração de fósforo foi estimada usando uma curva padrão preparada anteriormente com 0; 0,1; 0,5; 0,75; 1; 2; 3; 4; 4,5; 5 e 6  $\text{mg L}^{-1}$  de P na forma de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

### **3.8. Produção de compostos indólicos**

Para determinação da produção de compostos indólicos, as estirpes de *B. ingae* foram cultivadas em meio 79 líquido por 72 horas, e a densidade óptica (D.O) foi ajustada para 0,6-0,8 a 630 nm. Alíquotas das soluções bacterianas (500  $\mu\text{L}$ ) foram inoculadas em 6 mL de meio 79 (sem triptofano e suplementadas com 100  $\text{mg L}^{-1}$  de triptofano) com três repetições e incubadas no escuro durante 72 horas a  $28^\circ\text{C}$  sob agitação constante de 120 rpm.

Para quantificar os compostos indólicos produzidos após este período, as culturas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, sendo 3 mL do sobrenadante vertidos em frascos aos quais foram adicionados 2 mL de reagente Salkowski (Sarwar e Kremer, 1995). Esta mistura foi mantida em ambiente escuro por 20 minutos para desenvolvimento de cor, que se apresenta rósea mais intensa quando há grande quantidade de compostos indólicos. A intensidade da coloração foi determinada num espectrofotômetro SP 2000 UV, BEL, a 535 nm. A concentração de compostos indólicos foi estimada utilizando uma curva padrão previamente preparada com meio de cultura esterilizado não inoculado e quantidades conhecidas de ácido indol acético (AIA) 0, 10, 25, 50, 75 e 100  $\mu\text{g AIA mL}^{-1}$  (Sigma Aldrich, I3750).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Neste trabalho foi investigado a capacidade de estirpes de *Bradyrhizobium ingae*, espécie recentemente descrita (Silva et al., 2014), em promover o crescimento de mudas de *Inga edulis*. De forma geral, aos 45 dias após o plantio foi observada a presença de nódulos



nos três experimentos. Estes resultados diferem do encontrados para o *I. oerstediana* e *I. jinicuil* que apresentaram nodulação aos 150 dias e 130 dias após o plantio, respectivamente (Grossman et al., 2006; Van Kessel & Roskoski, 1981). O rápido estabelecimento da simbiose entre planta e bactéria, pode ser devido ao rápido crescimento de *I. edulis*, que é uma planta adaptada a solos ácidos (Hands, 1998) que é uma característica marcante dos solos de cerrado em Roraima (Benedetti et al., 2011). As diferenças de eficiência entre os tratamentos inoculados e não inoculados foram observados aos 60 dias para condições estéreis e aos 100 dias para condições não estéreis.

No experimento sob condições de substrato esterilizado, todas as estirpes de *B. ingae* induziram a formação de mais de 200 nódulos por planta (Tabela 1) e não houve diferenças significativas em relação às estirpes recomendadas para *I. marginata*, BR 6609 e BR 6610. Quanto à MSN, dois tratamentos, ERR 490 e ERR 494<sup>T</sup> foram semelhantes a BR 6609 e superiores aos demais tratamentos. Quanto à MSR e NF não houve diferença estatística entre os tratamentos. Para AP, os tratamentos inoculados com as estirpes ERR 492, ERR 493, ERR 494<sup>T</sup>, ERR 496 e ERR 569 foram superiores aos demais tratamentos (Tabela 1). Para DC quatro estirpes se destacaram, ERR 492, ERR 493, ERR 494<sup>T</sup> e ERR 569. Para a MSPA, com exceção das estirpes ERR496 e ERR 497, todas as demais estirpes de *B. ingae* foram superiores aos tratamentos com as estirpes recomendadas BR 6609 e BR 6610. Em relação a variável NT, apenas o tratamento controle sem inoculação e sem nitrogênio foi inferior.

**Tabela 2.** Resposta de *Inga edulis* Mart. a inoculação com estirpes de *Bradyrhizobium ingae* cultivado em vasos de Leonard por 60 dias em casa de vegetação.

Tratamentos	NN (n°.)	MSN (mg)	MSR (mg)	AP (cm)	DC (mm)	NF (n°.)	MSPA (g)	NT (mg)
ERR 490	367,67 a	656,0 a	2,44	32,00 b	5,21 b	37,67	6,09 a	178,34 a
ERR 492	279,67 a	495,0 b	2,81	36,33 a	6,43 a	37,00	6,11 a	181,11 a
ERR 493	296,67 a	492,4 b	2,78	41,83 a	6,27 a	35,33	7,34 a	203,03 a
ERR 494	331,67 a	633,2 a	3,32	39,67 a	6,49 a	35,00	7,77 a	212,72 a
ERR 496	234,67 a	552,6 b	2,60	39,67 a	5,36 b	34,67	5,53 b	194,29 a
ERR 497	220,00 a	328,7 c	1,87	29,33 b	5,64 b	34,00	4,56 b	153,54 a
ERR 498	337,00 a	507,3 b	2,82	31,00 b	5,76 b	33,33	5,97 a	201,38 a
ERR 569	332,00 a	474,3 b	2,67	35,67 a	7,14 a	32,33	6,90 a	214,32 a
BR 6609	279,00 a	690,7 a	2,29	32,50 b	5,81 b	43,00	4,91 b	161,12 a
BR 6610	144,67 a	443,1 b	1,93	31,17 b	5,00 b	41,33	4,99 b	150,83 a

Controle – N	0,00 b	0,00 d	2,48	22,50 b	4,49 b	39,00	3,08 b	45,48 b
Controle + N	3,67 b	31,3 d	3,42	31,33 b	5,91 b	30,00	5,43 b	139,90 a
CV (%)**	21,8	2,62	18,69	16,73	12,09	15,4	18,03	22,78

Número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), massa seca de raiz (MSR), altura de planta (AP), diâmetro do coleto (DC), número de folíolos (NF), matéria seca da parte aérea (MSPA) e nitrogênio total na parte aérea (NT). Valores na mesma coluna seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente ( $\rho=0.05$ , teste Scott-Knott). Coeficiente de variação C.V (%).

Nos experimentos conduzidos em vasos com solo não esterilizado em casa de vegetação e em sacos para produção de mudas, houve redução no número de nódulos sendo que as médias entre as estirpes de *B. ingae* variaram de 15,75 a 104,2 e de 16,00 a 97,75, respectivamente (Tabela 2 e 3). A mesma redução ocorreu para a variável MSN, sendo também inferior ao experimento em substrato esterilizado. A redução no NN e MSN em condições não estéreis com solo pode ter ocorrido devido à presença de matéria orgânica e consequentemente à presença de nitrogênio, aliado a isso, há também a competitividade com as bactérias nativa do solo. Portanto, no processo de seleção de bactérias para inoculação em leguminosas, uma vez determinada as estirpes que se destacaram quanto à capacidade de fixar nitrogênio em condições estéreis, deve-se avaliar a competitividade com as bactérias nativas de um determinado solo, sendo recomendados também os testes em solos não estéreis (Storwers & Elkan, 1980; Franco & Faria, 1997).

No experimento 2, conduzido em casa de vegetação, as estirpes ERR 492, ERR 494<sup>T</sup> e ERR 498, se destacaram entre os demais tratamentos em relação ao NN (Tabela 2). Já para a MSN, observou-se que as estirpes ERR 492, ERR 493, ERR 494<sup>T</sup> e ERR 498 apresentaram melhores resultados juntamente com as estirpes ERR 496, ERR 497, ERR 569 e a estirpe referência BR 6610 (Tabela 2), sendo estatisticamente superiores aos demais tratamentos. Com relação à MSR, foi observado que, dos 10 tratamentos inoculados, cinco apresentaram incrementos da massa seca de raiz superior a 5,52 g planta<sup>-1</sup>, sendo que o melhor resultado foi alcançado pelo tratamento inoculado com a estirpe ERR 496 com 6,68 g.planta<sup>-1</sup>, seguido pelos tratamentos ERR 497, ERR 569, BR 6610 e tratamento nitrogenado. Quanto ao NT, as estirpes ERR 492, ERR 493, ERR 494<sup>T</sup>, ERR 496, ERR 497 e ERR 498 foram superiores aos demais tratamentos. Já para AP, DC, NF e MSPA não houve diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos avaliados.

**Tabela 3.** Resposta de *Inga edulis* Mart. cultivado em vasos contendo solo por 100 dias em casa de vegetação à inoculação com estirpes de *Bradyrhizobium ingae*.

Tratamentos	NN* (n°.)	MSN (mg)	MSR (mg)	AP (cm)	DC (mm)	NF (n°.)	MSPA (g)	NT (mg)
ERR 490	15,75 c	57,05 b	3,45 b	29,13	4,97	34,25	3,92	74,6 b
ERR 492	104,25 a	333,43 a	3,19 b	26,00	4,70	33,75	5,67	168,7 a
ERR 493	56,75 b	292,43 a	3,23 b	30,50	4,82	32,75	4,81	127,0 a
ERR 494	91,50 a	372,03 a	3,60 b	28,63	4,36	35,50	5,52	151,4 a
ERR 496	39,75 b	285,85 a	6,68 a	25,00	4,98	38,00	6,12	141,3 a
ERR 497	56,50 b	389,41 a	5,70 a	26,25	4,53	50,00	5,87	146,6 a
ERR 498	86,50 a	401,15 a	4,19 b	21,63	4,42	35,75	4,70	134,4 a
ERR 569	49,25 b	246,28 a	5,60 a	26,00	4,84	29,00	4,86	99,5 b
BR 6609	31,50 b	110,35 b	3,20 b	22,38	4,39	26,75	3,86	90,1 b
BR 6610	39,25 b	217,17 a	5,52 a	27,25	4,66	31,25	4,95	126,0 b
Controle – N	2,50 c	7,55 b	3,40 b	23,75	4,26	25,00	3,52	71,3 b
Controle + N	8,75 c	31,85 b	6,34 a	28,50	4,48	29,00	4,57	102,3 b
CV (%)**	12,38	5,43	37,06	17,03	8,64	12,73	28,86	7,12

Número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), massa seca de raiz (MSR), altura de planta (AP), diâmetro do coleto (DC), número de folíolos (NF), matéria seca da parte aérea (MSPA) e nitrogênio total na parte aérea (NT). Valores na mesma coluna seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente ( $\rho=0.05$ , test Scott-Knott). \*\*Coeficiente de variação C.V (%).

**Tabela 4.** Resposta de *Inga edulis* Mart. cultivado em substrato por 100 dias em viveiro à inoculação com estirpes de *Bradyrhizobium ingae*.

Tratamentos	NN* (n°.)	MSN (mg)	MSR (mg)	AP (cm)	DC (mm)	NF (n°.)	MSPA (g)	NT (mg)
ERR 490	16,00 c	84,73 b	3,84	22,88 b	4,89	24,75 b	3,54 b	74,9 b
ERR 492	82,50 a	267,90 a	3,13	23,88 a	4,75	30,00 b	4,94 a	141,0 b
ERR 493	85,25 a	384,53 a	4,16	23,50 a	4,73	34,75 a	5,83 a	173,0 a
ERR 494	44,75 b	266,23 a	2,90	21,00 b	4,60	36,50 a	4,17 b	126,0 b
ERR 496	60,00 b	338,53 a	3,21	24,13 a	4,57	29,75 b	3,30 b	108,8 b
ERR 497	74,50 a	326,53 a	3,71	25,25 a	4,43	31,50 b	5,40 a	173,0 a
ERR 498	97,25 a	320,75 a	4,11	28,00 a	4,35	37,50 a	6,69 a	199,5 a
ERR 569	97,75 a	430,73 a	4,94	26,75 a	4,26	33,00 a	6,34 a	222,7 a
BR 6609	6,00 c	142,88 b	3,58	22,50 b	4,12	30,00 b	3,77 b	81,9 b
BR 6610	53,50 b	203,03 b	3,39	25,25 a	4,03	35,75 a	4,18 b	114,3 b
Control -N	4,00 c	68,88 b	3,51	19,50 b	5,09	27,50 b	3,26 b	68,2 b

Control +N	9,25 c	175,05 b	4,78	25,25 a	4,90	42,00 a	5,63 a	120,7 b
CV (%)**	22,51	31,48	28,64	10,57	10,59	9,12	24,32	28,96

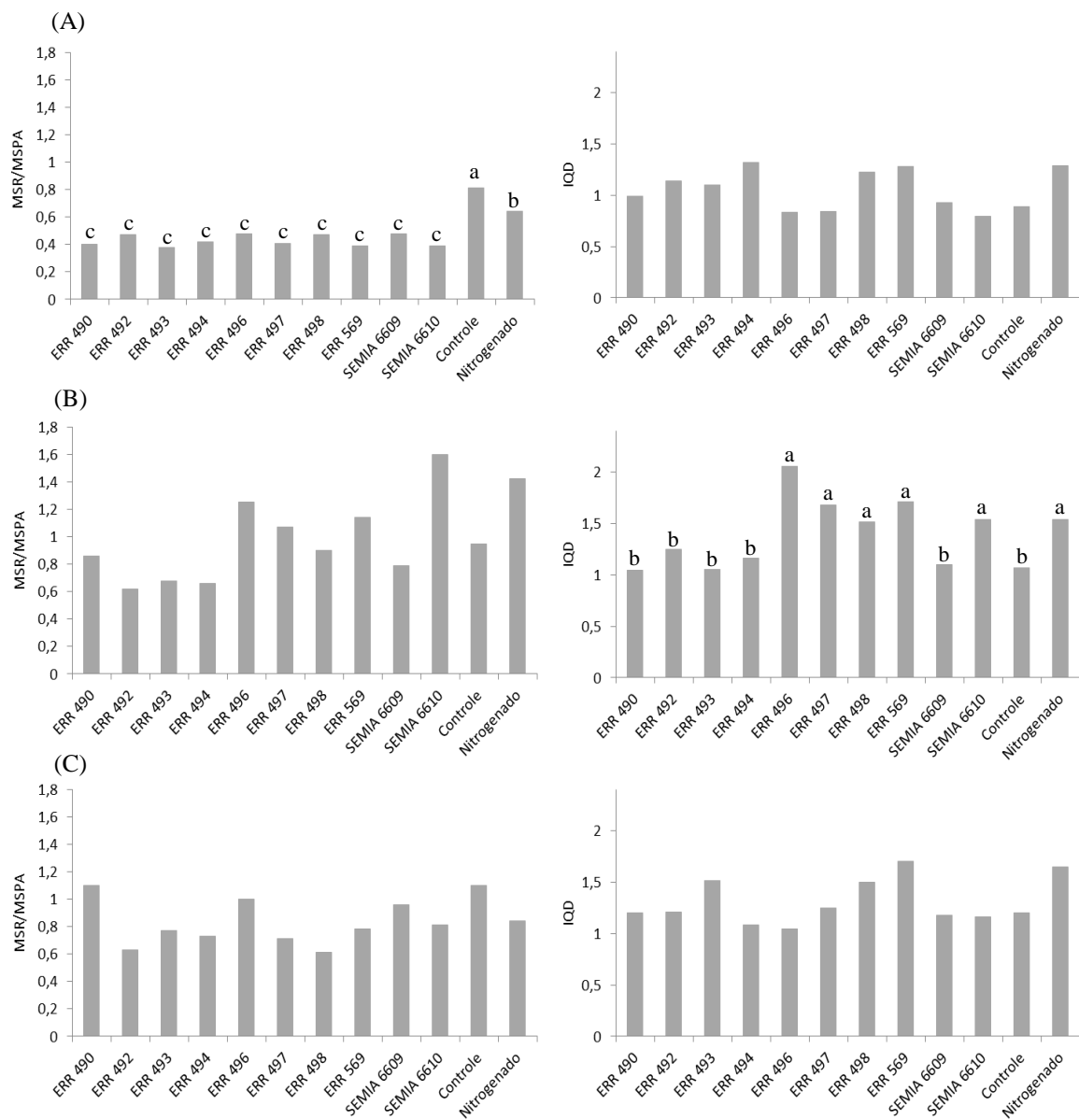
Número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), massa seca de raiz (MSR), altura de planta (AP), diâmetro do coleto (DC), número de folíolos (NF), matéria seca da parte aérea (MSPA) e nitrogênio total na parte aérea (NT). Valores na mesma coluna seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente ( $\rho=0.05$ , Scott-Knott test).\*\*Coeficiente de variação CV (%).

No experimento 3, conduzido em viveiro, para a variável NN, as estirpes ERR 492, ERR 493, ERR 497, ERR 498 e ERR 569, foram estatisticamente superiores aos demais tratamentos (Tabela 3). Quanto a MSN, com exceção da estirpe ERR 490, todas as demais estirpes de *B. ingae* foram superiores as estirpes referencias BR 6609 e BR 6610. Quanto a MSR e DC não houve diferenças significativas entre os tratamentos. Para a variável AP, seis estirpes se destacaram ERR 492, ERR 493, ERR 496, ERR 497, ERR 498 e ERR 569 sendo similares a BR 6610 e ao tratamento nitrogenado (Tabela 3). Para variável NF, as estirpes que se destacaram foram ERR 493, ERR 494<sup>T</sup>, ERR 498 e ERR 569. Para a variável MSPA as estirpes ERR 492, ERR 493, ERR 497, ERR 498 e ERR 569 e o tratamento nitrogenado foram superiores aos demais tratamentos. Quanto ao NT quatro estirpes se destacaram e foram superiores ao tratamento nitrogenado, ERR 493, ERR 497, ERR 498 e ERR 569.

Na figura 1 é apresentada a relação MSR/MSPA dos três experimentos. Apenas houve diferenças estatísticas no experimento 1 (Figura 1A) conduzido em condições estéreis em vasos de Leonard, onde o controle sem inoculação e sem nitrogênio apresentou a maior valor, seguido pelo tratamento que recebeu adubação nitrogenada. No experimento 1, os valores obtidos variaram de 0,38 a 0,81. Nos demais experimentos não houve diferenças significativas entre o tratamentos utilizados. A relação MSR/MSPA é um dos parâmetros utilizados para verificar a estabilidade de mudas florestais, onde valores muito reduzidos podem comprometer o estabelecimento no campo (Ferraz e Engel, 2011). No entanto, esse parâmetro deve ser avaliado com cautela em experimentos de inoculação, visto que o tratamento sem inoculação e sem adubação nitrogenada apresenta menor desenvolvimento da parte aérea, podendo resultar em maior valor na relação MSR/MSPA. Quanto ao IQD (Figura 1) apenas no experimento 2 em vaso com solo em casa de vegetação houve diferenças significativas entre os tratamentos, com maiores valores obtidos para os tratamentos inoculados com as estirpes ERR 496, ERR 497, ERR 498, ERR 569 e SEMIA 6610, além do tratamento sem inoculação e com adição de N (Nitrogenado). Apesar de na literatura não existir valores de referência quanto à qualidade para as diferentes espécies arbóreas nativas, o que dificulta a análise do IQD (Ferraz & Engel, 2011), neste trabalho os resultados nos três experimentos

foram superiores aos obtidos por Góes et al. (2015) para mudas de *Inga laurina*. Estes autores obtiveram através da inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio índices variando de 0,36 a 0,43 e de 0,97 com tratamento que recebeu adubação nitrogenada. Estes resultados indicam que as estirpes são eficientes na promoção do desenvolvimento de mudas de *I. edulis*, visto as estirpes de *B. ingae* não diferiram do tratamento Nitrogenado.

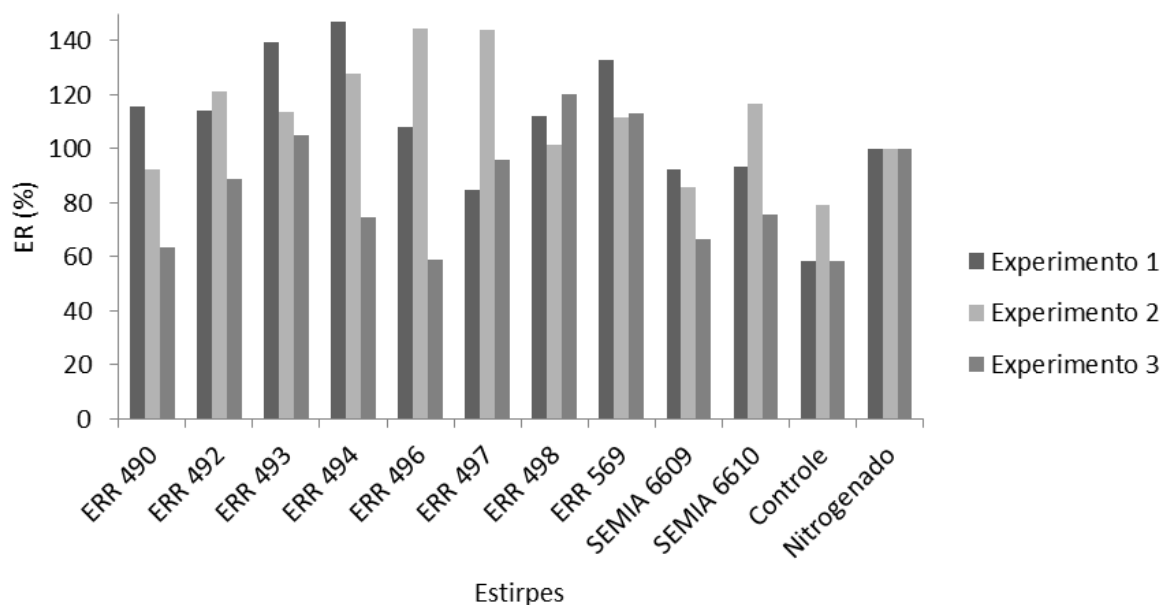
**Figura 1.** Efeito da inoculação com *Bradyrhizobium ingae* sobre a relação massa seca de raiz (MSR)/massa seca da parte aérea(MSPA) e índice de qualidade de Dickson (IQD) em mudas de *Inga edulis*. (A) Experimento 1 (B) Experimento 2. (C) Experimento 3. Letras diferentes nas barras indicam diferenças significativas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.



Quanto à eficiência relativa, os resultados indicam que há uma variação de eficiência entre as estirpes de *B. ingae* com valores superiores a 100% nos três experimentos (Figura 1).

Estes valores foram superiores ao encontrado por Marques et al.,(2001), na inoculação associada de estirpes de rizóbios e fungos micorrízicos em *Centrolobium tomentosum*, que apresentou EFR de 56,4%. Em outro estudo realizado por Grossman et al., (2006) com *Inga oerstediana*, nenhuma das estirpes apresentou eficiência relativa superior a 100%, visto que todas as estirpes foram inferiores na produção de biomassa quando comparados aos tratamentos que receberam nitrogênio nos experimentos em condições estéreis e não estéreis. Já as estirpes BR 6609 e BR 6610, avaliadas em condições estéreis inoculadas em *Inga marginata*, apresentaram eficiência relativa de 81% (Franco & Faria, 1997) e são atualmente recomendadas para inoculação nesta espécie (MAPA, 2011). Através dos resultados obtidos neste estudo, três estirpes foram selecionadas como as mais eficientes para fixação biológica de nitrogênio em *I. edulis*, a ERR 493, ERR 498 e ERR 569, pois se destacaram principalmente na produção de MSPA e, conseqüentemente NT e apresentaram eficiência relativa acima de 100%.

**Figura 2.** Eficiência relativa de *Bradyrhizobium ingae* inoculados em plantas de *Inga edulis* Mart.



Com a análise de correlação entre as variáveis avaliadas nos três experimentos (Tabela 4), verificou-se que a MSN correlacionou-se positivamente com NN, sendo altamente significativa nos três experimentos. AP e DC correlacionaram-se significativamente com NN e MSN, exceto no experimento 2 em vaso com solo. NF correlacionou-se positivamente com NN, MSN e DC no experimento em viveiro. Já a MSPA foi altamente significativo com NN, MSN, MSR e AP. Por fim, o NT teve correlação altamente significativa com NN, MSN, AP, e MSPA, indicando que estes podem ser considerados bons parâmetros para avaliação da

eficiência de estirpes em plantas de *Inga*. Apesar do NN ter correlação positiva com várias variáveis avaliadas, é recomendado que a MSN seja considerada para efeitos de seleção (Norris & Date, 1976). Outra variável de extrema importância para a seleção de estirpes superiores para fixação biológica de nitrogênio em plantas leguminosas é o incremento na produção de matéria seca ou teor de nitrogênio total em relação à massa de nódulos, isto por que existe uma correlação direta entre produção de matéria seca e a concentração de N encontrada na planta com a massa de nódulos (Döbereiner, 1966; Stowers & Elkan, 1980). Isto pode ser evidenciado nos experimentos, onde houve uma correlação de altamente significativa entre MSPA e NT. É de interesse selecionar bactérias que promovam o incremento da parte aérea e, conseqüentemente, incremento de nitrogênio para a melhoria da fertilidade do solo, visto que plantas do gênero *Inga* têm sido utilizadas principalmente para recuperação de áreas degradadas e em sistemas agroflorestais para o fornecimento de nitrogênio (Grossman et al., 2006). Além disso, plantas de *Inga* têm sido utilizadas para sombreamento no plantio com plantas de café no México, mas foi verificado que além do sombreamento o plantio de *I. jinicuil* também foi uma fonte de entrada de nitrogênio dentro deste sistema de produção (Roskoski, 1981).

**Tabela 5.** Matriz de correlação de Pearson ( $r$ ) das variáveis utilizadas nos três experimentos de inoculação com *Bradyrhizobium* em *Inga edulis* Mart.

	NN	MSN	MSR	AP	DC	NF	MSPA	NT
NN <sup>1</sup>	1.00							
	1.00							
	1.00							
MSN	0.75***	1.00						
	0.79***	1.00						
	0.70***	1.00						
MSR	0.33ns	0.25ns	1.00					
	-0.13***	0.14***	1.00					
	0.27ns	0.39**	1.00					
AP	0.45**	0.52**	0.30ns	1.00				
	0.20ns	0.08ns	-0.03ns	1.00				
	0.51***	0.36*	0.17ns	1.00				
DC	0.62***	0.41*	0.53**	0.59***	1.00			
	-0.03ns	0.11ns	0.21ns	0.37*	1.00			
	0.39**	0.30*	0.33*	0.56***	1.00			
NF	0.11ns	0.01ns	0.00ns	-0.16ns	0.05ns	1.00		
	0.17ns	0.25ns	0.12***	0.17ns	0.26ns	1.00		
	0.34*	0.31*	0.16ns	0.14ns	0.35*	1.00		
MSPA	0.74***	0.63***	0.64***	0.76***	0.75***	-0.02ns	1.00	
	0.52***	0.70***	0.23***	0.14**	0.21ns	0.36***	1.00	
	0.69***	0.67***	0.50***	0.46**	0.43**	0.43**	1.00	
NT	0.69***	0.67***	0.37*	0.68***	0.72***	0.10ns	0.78***	1.00

0.63***	0.75***	-0.04***	0.13ns	0.05ns	0.26ns	0.83***	1.00
0.75***	0.71***	0.43**	0.49***	0.45**	0.43**	0.92***	1.00

<sup>1</sup>Número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), massa seca de raiz (MSR), altura de planta (AP), diâmetro do coleto (DC), número de folíolos (NF), matéria seca da parte aérea (MSPA) e nitrogênio total na parte aérea (NT). Os valores da primeira linha são do experimento 1 em condições estéreis, da segunda experimento 2 não estéril em vaso com solo e a terceira experimento 3 substrato não estéril em viveiro. \*Significância estatística a  $\rho < 0.05$ , \*\*  $\rho < 0.01$  e \*\*\*  $\rho < 0.001$ .

Além da fixação biológica de nitrogênio, é de interesse que as estirpes selecionadas apresentem outros mecanismos de promoção do crescimento vegetal, pois isto pode resultar na produção de mudas de maior qualidade. Desta forma, foi avaliada a capacidade das estirpes em solubilizar fosfatos de cálcio e de alumínio, além da capacidade de produzir compostos indólicos. Quanto à solubilização de fosfato de cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ ) em meio sólido, das oito estirpes de *B. ingae* avaliadas, apenas duas apresentaram a formação de halo de solubilização, a ERR 490 com índice de solubilização (I.S.) de 1,57 e ERR 496 com I.S. de 1,20, ambos classificados com I.S. baixo. Das estirpes recomendadas para *I. marginata*, a estirpe BR 6609 (*Bradyrhizobium* sp.) apresentou I.S. de 4,10 (alto). As estirpes controle BR 11175<sup>T</sup> (*Herbaspirillum seropedicae*) e BR 11001<sup>T</sup> (*Azospirillum brasilense*) apresentaram I.S. de 3,23 (médio) e I.S. de 2,18 (baixo), respectivamente (Tabela 5).

Nenhuma das estirpes testadas apresentou halo de solubilização em meio sólido contendo fosfato de alumínio ( $\text{AlPO}_4$ ). Estes resultados diferem dos obtidos em outros trabalhos para solubilização de fosfato de alumínio (Hara & Oliveira, 2005; Marra et al., 2011, 2012; Oliveira-Longatti et al., 2013), no entanto, não foram utilizados os mesmos meios e mesmas fontes de fosfato de alumínio que pode justificar a ausência de halo nas estirpes de *B. inage* testadas. Quanto a quantificação da solubilização de  $\text{AlPO}_4$  em meio líquido foi verificado que das estirpes de *B. ingae* e *Bradyrhizobium* spp. avaliadas, quatro apresentaram esta característica, ERR 490 (0,34 mg P L<sup>-1</sup>), ERR 492 (0,06 mg P L<sup>-1</sup>), ERR 493(0,03 mg P L<sup>-1</sup>), BR 6609 (0,53 mg P L<sup>-1</sup>) o que corresponde a 2,83%, 0,5%, 0,25% e 4,42%, respectivamente de solubilização do total de fósforo adicionado ao meio (Tabela 5). As estirpes utilizadas como controles positivos BR 11001<sup>T</sup> e BR 11175<sup>T</sup> apresentaram 6,25% (0,75 mg P L<sup>-1</sup>) e 3,66% (0,44 mg P L<sup>-1</sup>) de solubilização, respectivamente. Portanto, a não formação de halo em meio sólido não deve ser utilizado com único critério de seleção de solubilizadores, pois bactérias podem solubilizar fosfatos (cálcio, alumínio ou ferro) sem formação de um halo visível em meios sólidos (Bashan et al., 2013). Esses resultados corroboram com Souchie et al., (2005b) nos quais constataram baixa incidência de



solubilizadores de alumínio em meio sólido, já no meio líquido todas as estirpes foram capazes de solubilizar fosfato de alumínio.

**Tabela 6.** Solubilização de fosfatos de cálcio e alumínio e produção de compostos indólicos por estirpes de *Bradyrhizobium ingae*.

Estirpes	Solubilização de CaHPO <sub>4</sub>	Solubilização de AlPO <sub>4</sub>		Produção de compostos indólicos	
	*I.S.	P solúvel (mg L <sup>-1</sup> )	Ph	% de P solúvel	Trip + Trip - (µg mL <sup>-1</sup> )
ERR 490	1,57 (baixo)	0,34	3,85	2,83	2,48 b -
ERR 492	-	0,06	4,20	0,5	4,82 a 5,77 b
ERR 493	-	0,03	4,27	0,25	2,55 b -
ERR 494 <sup>T</sup>	-	0		0	1,48 b 7,57 b
ERR 496	1,20 (baixo)	0		0	- 2,62 c
ERR 497	-	0		0	- -
ERR 498	-	0		0	- -
ERR 569	-	0		0	- -
BR 6609	4,10 (alto)	0,53	3,78	4,42	- 2,30 c
BR 6610	-	0		0	4,23 a -
BR 11175 <sup>T</sup>	3,23 (médio)	0,44	4,22	3,66	2,50 b 49,02 a
BR 11001 <sup>T</sup>	2,18 (baixo)	0,75	3,48	6,25	- 3,94 c
C.V. (%)**	-	28,09	-		13,68 35,03

\*I.S. = Índice de solubilização, sendo classe baixa (I.S ≤ 2,99), média (I.S 3 a 4) e alta (I.S ≥ 4).

\*\*C.V.= Coeficiente de variação. Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

Quanto à produção de compostos indólicos, na presença de triptofano, das oito estirpes de *B. ingae* avaliadas, quatro apresentaram produção, ERR 490, ERR 492, ERR 493e ERR 494<sup>T</sup>, com valores variando de 1,48 a 4,82 µg mL<sup>-1</sup> (Tabela 5). Além das estirpes de *B. ingae*, a BR 6610 foi capaz de sintetizar 4,23 µg mL<sup>-1</sup> de compostos indólicos juntamente com o controle positivo BR 11175<sup>T</sup> com 2,50 µg mL<sup>-1</sup>. Na ausência de triptofano, três estirpes apresentaram esta característica, ERR 492, ERR 494<sup>T</sup> e ERR 496, com valores de 5,77, 7,57 e 2,62 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Entre as estirpes recomendadas para *I. marginata*, apenas a BR 6609 sintetizou 2,30 µg mL<sup>-1</sup> de compostos indólicos na ausência de triptofano. Os controles positivos BR 11175<sup>T</sup> e BR 11001<sup>T</sup> sintetizaram 49,02 µg mL<sup>-1</sup> e 3,94 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Os resultados encontrados da síntese de compostos indólicos por *B. inage* estão similar a encontrado por outras espécies do gênero *Bradyrhizobium* nativos da Amazônia, com e sem a presença de triptofano com valores máximo obtidos de 10 µg mL<sup>-1</sup> (Oliveira-Longatti et al., 2013). Das estirpes de *B. ingae*, a ERR 494<sup>T</sup> e ERR 492

apresentaram quantidades significativas em uma via independente da presença de triptofano, sendo de interesse selecionar bactérias que sintetizam compostos indólicos por vias independentes, pois no solo a disponibilidade de aminoácidos geralmente é baixa.

A fixação biológica de nitrogênio por *Bradyrhizobium* é bem conhecida. No entanto, alguns trabalhos já relataram que estirpes deste gênero também compartilham de características de rizobactérias promotoras do crescimento vegetal, através de processos como a produção de fitormônios, solubilização de fósforo e produção de sideróforos (Antoun et al., 1998; Boiero et al., 2007; Oliveira-Longatti et al., 2013). As estirpes de *B. ingae* apresentaram mecanismos de promoção de crescimento vegetal que podem auxiliar no melhor desenvolvimento de mudas de ingá, como também podem ser futuramente testadas em não leguminosas como promotores de crescimento. Das estirpes que foram mais eficientes na fixação biológica de nitrogênio (ERR 493, ERR 498 e ERR 569), a estirpe ERR 493, além da alta capacidade de fixar nitrogênio, também apresentou capacidade de solubilizar fosfato de alumínio e produzir compostos indólicos na ausência de triptofano, demonstrando o seu potencial para promoção de crescimento e desenvolvimento de mudas de *I. edulis*. Estas características são de grande importância para a produção de mudas de leguminosas arbóreas de qualidade, pois podem auxiliar na sobrevivência destas mudas quando plantadas no campo, em condições adversas comparadas ao viveiro.

## 5. CONCLUSÕES

1. As estirpes avaliadas de *B. ingae* são capazes de nodular eficientemente plantas de *Inga edulis* Mart.
2. As estirpes ERR493, ERR 498 e ERR 569 foram as mais eficientes para fixação biológica de nitrogênio.
3. Além da fixação biológica de nitrogênio, as estirpes de *B. ingae* possuem outros mecanismos de promoção do crescimento, isto é, são capazes de solubilizar fosfatos de cálcio e de alumínio e sintetizar compostos indólicos.
4. Mudanças de *Inga edulis* se mostraram mais vigorosas quando inoculadas com estirpes de *B. ingae* em comparação as estirpes atualmente recomendadas.
5. As estirpes de *B. ingae* podem ser utilizadas para a inoculação na produção de mudas de *Inga edulis*.

## REFERÊNCIAS

- ANTOUN, H.; BEAUCHAMP, C. J.; GOUSSARD, N.; CHABOT, R.; LALANDE, R. Potencial of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* especies as plant growth promoting rhizobacteria on nonlegumes; Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.) **Plant and Soil**, v. 204, p. 57-67, 1998.
- BARROSO, C. B.; NAHAS, E. Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.4, p. 529-535, 2008.
- BARROSO, C. B.; NAHAS, E. The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. **Applied Soil Ecology**, v. 29, n. 1, p.73-83, 2005.
- BASHAN, Y. & HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: Environmental and physiological advances (1990-(1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p. 103-121, 1997.
- BASHAN, Y.; KAMNEV, A. A.; DE-BASHAN, L. E. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, p. 465-479. 2012.
- BENEDETTI, U. G.; VALE JÚNIOR, J. F.; SCHAEFER, C. E.; MELO, V. F.; UCHÔA, S. C. P. Gênese, química e mineralogia de solos derivados de sedimentos plioleustocênicos e de rochas vulcânicas básicas em Roraima, Norte Amazônico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 299-312, 2011.
- BERGENSEN, F. J.; BROCKWELL, J.; GIBSON, A. H.; SCHWINGHAMER, E. A. Studies of natural populations and mutants of *Rhizobium* in the improvement of legume inoculants. **Plant and soil**, v. 46, p. 3-16, 1971.
- BERRAQUERO, F. R.; BAYA, A. M.; CORMENZANA, A. R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**. Granada, v. 17, n. 4, p. 399-406, 1976.
- BERTONI, J; LOMBARDI NETO, F. **Conservação do Solo**, 7ª Edição, Editora Ícone. São Paulo, SP. p.355, 2008.
- BOIERO, L; PERRIG, D.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; CASSÁN, F.; LUNA, V. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and technological implications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 74, n. 4, p. 874-880, 2007.
- BRITO, V. M. DE SOUZA, L. A. G. de Formação e caracterização e eficiência fixadora de nitrogênio de uma coleção de Rizóbios para Ingá Cipó (*Ingá edulis* MART., Leguminosae, Mimosoideae). In: REUNIÃO DOS BOTÂNICOS DA AMAZÔNIA, Resumos. Salinópolis: Sociedade Botânica do Brasil/ Seccional da Amazônia, p. 82-83, 1997.

CASSINI, S. T. A.; FRANCO, M. C. **Fixação biológica de nitrogênio**: microbiologia. fatores ambientais e genéticos. In: VIEIRA, C.; PAULA Jr., T. J.; BOREM, AL. (Ed). **Feijão**. 2. ed. atual. Viçosa. MG; EFV. p. 143-170, 2006.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N. Produção de ácido indolacético por rizóbios isolados de caupi. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 54, n.6, p.812-817, 2009.

CHAHBOUNE, R.; CARRO, L.; PEIX, A.; BARRIJAL, S.; VELÁZQUEZ, E.; BEDMAR, E. J. *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov. isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.61, p.2922-2927, 2011.

CHAHBOUNE, R.; CARRO, L.; PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; BARRIJAL, S.; VELÁZQUEZ, E.; BEDMAR, E. J. 2012. *Bradyrhizobium rifense* sp. nov. isolated from effective nodules of *Cytisus villosus* grown in the Moroccan Rif. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 2927-2929, 2014.

CHANG, Y. L.; WANG, J. Y.; WANG, E. T.; LIU, H. C.; SUI, X. H.; CHEN, W. X. *Bradyrhizobium lablab* sp. nov. isolated efetive nodules of *Lablab purpureus* and *Arachis hypogaea*. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.61, p.2496-2502, 2011.

CHANWAY, C. P. Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bactéria: an emerging technology for reforestation. **Forest Science**, v.43, n.1, p. 99-112, 1997.

CORREA, Q. J. E.; BERNAL, M. H. Y. (eds). **Especies vegetales promissórias de los países del Convenio Andrés Bello**. Bogotá: Guadalupe, p.515, 1995.

COSTA, E. M. DA; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F.de; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L. V. M; MOREIRA, F. M. S. Plant growth and genetic diversity of bactéria isolated from cowpea nodules. **Pesquisa agropecuaria brasileira**, v.48 n. 9, 2013.

COSTA, M. G.; RODRIGUES, A. C. G.; ZAIA, F. C.; RODRIGUES, E. F. G. Leguminosas arbóreas para recuperação de áreas degradadas com pastagem em Conceição de Macabu, Rio de Janeiro, Brasil. **Scientia Florestalis**, v. 42, n. 101, p. 101-112, 2014.

DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.;ORMENO-ORILLO, E. .; MELO, I. S.; ROMERO, E. M. R.; HUNGRIA, M. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group la strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov, **International Journal of Sistematic and Evolutionary Microbiology**, 2013.

DIAS, P. F.; SOUTO, S. M.; FRANCO, A. A. Leguminosas arbóreas introduzidas em pastagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 1, p. 119-126, 2007.

DIAS, P. F.; SOUTO, S. M.; RESENDE, A. S.; URQUIAGA, S.; ROCHA, G. P.; MOREIRA, J. F.; FRANCO, A. A.; Transferência do N fixado por leguminosas arbóreas para capim *Survenola* crescido em consórcio. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 2, p. 352-356, 2007.

DICKSON, A.; LEAF, A.L.; HOSNER, J.F. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. **The Forestry Chronicle**, v. 36, n. 1, p. 10-13, 1960.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; TRYS, A.; VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and soil**, v. 212, p. 155-164, 1999.

DÖBEREINER, J. Evaluation of nitrogen fixation in legumes by the regression of total plant nitrogen with nodules weight. **Nature**, v. 21, p. 850-852, 1966.

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen in the tropics: social and economic contributions. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 771-774, 1997.

DURÁN, D.; REY, L.; MAYO, J.; ZÚÑIGA-DÁVILA, D.; IMPERIAL, J.; RUIZ-ARGAESO, T. S.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Bradyrhizobium paxllaeri* sp. nov. and *Bradyrhizobium icense* sp. nov. nitrogen-fixing rhizobial symbionts of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p.2072-2078, 2014.

EMBRAPA. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. 2. ed. Brasília: EMBRAPA, p. 627, 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (Embrapa)-Fixação Biológica de Nitrogênio. Disponível em:< <http://www.embrapa.br> >. Acesso em 22/02/16.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Mineral nutrition of plants: principales and perspectives**. 2. Ed. Massachussets: Sinauer, p.380, 2005.

FALCÃO, M.A. & CLEMENT, C. R. Fenologia e produtividade do ingá-cipó (*Inga edulis*) na Amazônia Central. **Acta Amazonica**, vol. 30, p. 173-180, 2000.

FARIA, S. M. DE; LIMA, H. C. Levantamento de nodulação em leguminosas arbóreas e arbustivas em áreas de influência da mineração Rio do Norte- Porto Trombetas/ PA. Seropédica – RJ, Documento n. 159, p. 1-32, Dez. 2002.

FARIA, S. M. DE; LIMA, H. C.; OLIVEIRA, F. L.; MELO, R. B.; XAVIER, R. P. Nodulação em espécies florestais: Especificidade hospedeira e implicações na sistemática de leguminosas. p. 667–686. 1999. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Ed.) **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS; Lavras: UFLA/DCS, p. 667-686, 1999.

FERRÃO, J. E. M. **Fruticultura Tropical: espécies com frutos comestíveis**. Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical, v.2. p. 580, 2001.

FERRAZ; A. V.; ENGEL, V. L. Efeito do tamanho de tubetes na qualidade de mudas de jatobá (*Hymenaea courbaril* L. Var. *stilbocarpa* (Hayne) Lee et Lang.), ipê-amarelo (*Tabebuia chrysotricha* (Mart. Ex. DC.) Sandl.) e guarucaia (*Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan). **Revista Árvore**, v. 35, p. 413-423, 2011.

FERREIRA EB, CAVALCANTI PP, NOGUEIRA. ExpDes: Experimental designs package. R package version 1.1.2. (2013). Disponível em: <http://CRAN.R-project.org/package=ExpDes>.

FRANCO, A. A. & FARIA, S. M. The contribution of N<sub>2</sub> fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 897-903, 1997.

FRANCO, A. A.; CAMPELLO, E. F. C.; FARIA, S. M. de; DIAS, L. E. The importance of biological nitrogen fixation on land rehabilitation. In: PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NEWTON, W. E., (Ed). **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer, p. 569-570, 2000.

FRANCO, A. A.; CAMPELLO, E. F.; MONTEIRO, E. M. DA S.; FARIA, S. M. **Revegetação de solos degradados**. Seropédica: EMBRAPA-CNPBS, (Comunicado Técnico, 9), p.11, 1992.

FRANCO, A. A.; RESENDE, A.S. DE; CAMPELLO, E.F.C. Importância das leguminosas arbóreas na recuperação de áreas degradadas e na sustentabilidade de sistemas agroflorestais. In: **Sistemas Agroflorestais e Desenvolvimento Sustentável**. Mato Grosso do Sul, p.1-24, 2003.

FRANCO, A.A; DOBEREINER, J. Abiologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.20, p.68-74, 1994.

FRED, E. B. & WAKSMAN, S. **Laboratory manual of general microbiology**, New York, McGraw-Hill, 1928.

GARCIA, F. C. P. **Relações Sistemáticas e Fitogeográficas do Gênero *Inga* Miller (Leguminosae, Mimosoideae, Ingae) nas Florestas da Costa Sul e Sudeste da Brasil**. Instituto de Biociências do Campus Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, Brasil. (Tese Doutorado), 1998.

GARCIA, F. C. P.; FERNANDES, J. M. *Inga* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22803>. Acesso em: 28 Dez. 2015.

GERRETSEN, F. C. The influence of microorganisms on the phosphate intake by the plant. **Plant and soil**, Dordrecht, v.1, n.1, p. 51-81, 1948.

GÓES, G.S.; GROSS, E.; BRITO-ROCHA, E.; MIELKE, M.S. Efeito da inoculação com bactérias diazotróficas e da adubação nitrogenada no crescimento e na qualidade de mudas de *Inga laurina* (SW.) Willd. (Fabaceae). **Revista Árvore**, v. 39, p. 1031-1038, 2015.

GRAY, E.J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology And Biochemistry**, Oxford, v.37, p.395-412, 2005.

GROSSMAN, J. M.; SHEAFFER, C.; WYSE, D.; BUCCIARELLI, B.; VANCE, C.; GRAHAM, P. H. An assessment of nodulation and nitrogen fixation in inoculated *Inga*

*oerstediana*, a nitrogen fixing tree shading organically grown coffee in chiapas, Mexico, **Soil Biology and Biochemistry**, v.38, n.4, p.769 –784, 2006.

GUERROUJ, K.; RUIZ-DIEZ, B.; CHAHBOUNE, R.; RAMIREZ-BAHENA, M. H.; ABDELMOUMEN, H.; QUINONES, M. A.; ELIDRISSI, M. M, VELAZQUEZ, E.; FERNANDEZ-PASCUAL, M.; BEDMAR, E. J.; PEIX, A. Definition of a novel symbiovar (sv. *retamae*) within *Bradyrhizobium retamae* sp. nov. nodulating *Retama sphaerocarpa* and *Retama monosperma*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.64, p.2927-2929, 2014.

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

HANDS, M. R. Invited Chapter: The uses of *Inga* in the acid soils of the Rainforest zone: Alley – cropping sustainability and Soil – regeneration. In: Pennington, T. D. and Fernandes, E. C. M. (eds.) the genus *Inga*: Utilization. **The Royal Botanic gardens**, kew. England, 1998.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 667-672, 2005.

HERRERA, M. A.; SALAMANCA, C. P.; BAREA, J. M. Inoculation of woody legumes with selected arbuscularmycorrhizal fungi and rhizobia to recover desertified Mediterranean ecosystems. **Applied environmental microbiology**, v.59, n.1, p.129-133, 1993.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: University of California, p. 32 California Agricultural Experiment Station Circular 347, 1950.

HUNGRIA, M; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. A importância do processo de fixação biológica de nitrogênio para a cultura da soja – componente essencial para a competitividade do produto Brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, (Documento 283), p.80, 2007

ISLAM, M. S.; KAWASAKI, H.; MURAMATSU, Y.; NAKAGAWA, Y.; SEKI, T. *Bradyrhizobium iriomotense* sp. nov. Isolated from a tumor-like root of the legume *Entada koshunensis* from Iriomote Island in Japan. **Biosci Biotechnol Biochem**. v.72, p.1416-1429, 2008.

JARAMILLO, P. M. D.; GUIMARÃES, A. A.; FLORENTINO, A.; SILVA, K. B.; NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S. Symbiotic nitrogen-fixing bacterial populations trapped from soils under agroforestry systems in the Western Amazon. **Scientia Agricola**, v.70, p.397-404, 2013.

JESUS, E. C.; MARSH, T. L.; TIEDJE, J. M. and MOREIRA, F. M. S. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **The ISME Journal**, v.3, p.1004-1011, 2009.



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

JORDAN, D. C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. Nov., a genus of slow – growing, root nodule bactéria from leguminous plants. **International Journal of Sistematic and Evolutionary Bacteriology**, Washington, v.32, n.1. p. 136-139, 1982.

KHALID, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, ZA. Secreening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, p.473-480, 2004.

KLOEPPER, J. W.; ZEHNDER, G. W.; TUZUN, S.; MURPHY, J. F.; WEI, G.; YAO, C; and Raupach, G. Toward agricultural implementation of PGPR- mediated induced systemic resistance against crop pests. In: W. tang, R. J. Cook, and A. Rovira, eds. Advances in Biological Control of Plant Diseases. **China Agricultural University Press**, Beijing, p.165-174 1996.

KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 10, p. 1459-1465, 2007.

KUYKENDALL, L. D.; SAXENA, B.; DEVINE, T. E.; UDELL, S. E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. **Canadian Journal Microbiology**, v.38, p.501-505, 1992.

LEBLANC, H. A.; NIGREN, P.; MCGRAW, R. L. Green mulch decomposition and nitrogen release from leaves of two *Inga* ssp. in an organic alley – cropping pratice in the humid tropics, **Soil Biology & Biochemistry**, v.38 p.349-358, 2006.

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

LIMA, A. S.; PEREIRA, J. P. A. R.; MOREIRA, F. M. S. Diversidade fenotípica e eficiência de estipes de *Bradyrhizobium* ssp. De solos da Amazônia, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.11, Brasília, 2005.

LORENZI, H. **Arvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, v. 2, 1998.

LU, J. K.; DOU, Y. J.; ZHU, Y. J. WANG, S. K.; SUI, X. H.; KANG, L. H. *Bradyrhizobium ganzhouense* sp. nov. an efetive symbiotic bacterium isolated from *Acacia melanoxylon* R. Br. nodules. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.64, p. 1900-1905, 2014.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução normativa nº 13, de 24 de março de 2011. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: Dez. 2015.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. **Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável.** Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, Recife, v.1, p.89-111, 2004.

MARQUES, M. S.; PAGANO, M.; SCOTTI, M. R. M. M. L. Dual inoculation of a woody legume (*Centrolobium tomentosum*) with rhizobia and mycorrhizal fungi in South-eastern Brasil. **Agroforestry Systems**, v.52, p.107-117, 2001.

MARRA, L. M.; SOARES, C. R. F. S.; OLIVEIRA, S. M.; FERREIRA, P. A. A.; SOARES, B. L.; CARVALHO, R. F.; LIMA, J. M.; MOREIRA, F. M. S. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, The Hague, v.353, p.289-307, 2012.

MARRA, L. M., OLIVEIRA, S. M., SOARES, F. S. C. R., MOREIRA, S. F. Solubilization of inorganic phosphates by inocular strains from tropical legumes. **Science Agricola**, v. 68, n. 5, p. 603-609, 2011.

MARTINAZZO, R.; SALTOS, D. R.; GATIBONI, L. C.; BRUNETO, G.; KAMINSKI, J. Fósforo microbiano no solo sob sistema plantio direto em resposta à adição de fosfato solúvel. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, n.3, p.563-570, 2007.

MENNA, P.; BARCELLOS, F. G.; HUNGRIA, M. Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the 16s Rna gene, ITS region and glnII, recA, atpD and dnaK genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Grã Bretanha, v.59, n.12, p.1-17, 2009.

MOREIRA, F. M. S. Nodulação e crescimento de 49 leguminosas arbóreas nativas da Amazônia em viveiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.21, n.3, p.581-590, 1997.

MOREIRA, F. M. S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K. & FRANCO, A. A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosa e by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, New York, v.16, n.1, p.135-146, 1993.

MOREIRA, F. M. S.; Nitrogen-fixing leguminosae-nodulating bacteria. In: MOREIRA, F. M.S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (Ed.). **Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems**. Wallingford: CABI Publishing, p.237-270. DOI 10.1079/9781845930325.0237. 2006.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. Ed. Lavras: Editora UFLA, p.729, 2006.

MOREIRA, F. T. A.; SANTOS, D. R.; SILVA, G. H.; ALENCAR, L. S. Ocorrência de bactérias do gênero *Azospirillum* ssp. Associadas a gramíneas forrageiras no semiárido nordestino. **HOLOS**, vol.3, 2013.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **Femis Microbiology Letters**, Reading, v. 170, n. 1, p. 265-270, 1999.

NICHOLS, J. D.; ROSEMEYER, M. E.; CARPENTER, F. L.; KETTLER, J. Intercropping fertilization. **Forest Ecology and Management**, v.152, p. 195-209, 2001.

NOBREGA, R. S. A. **Efeito de sistemas de uso da terra na Amazônia sobre atributos do solo, ocorrência, eficiência e diversidade de bactérias que nodulam caupi (*vigna unguiculata* (L) Walp)**. Tese (Doutorado em ciência do solo) – Universidade Federal de Lavras, 2006.

NOGUEIRA, N.O., OLIVEIRA, O. M.; MARTINS, C. A. S.; BERNARDES, C. O. Utilização de leguminosas para recuperação de áreas degradadas, **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer – Goiânia, v.8, n.14, p.2121-2130, 2012.

NORRIS, D. O.; DATE, R. A. Legume Bacteriology. In N. H. Shaw and W. W. Bryan (eds.), Tropical Pasture Research. Principles and Methods. Bulletin, 51. **Commonwealth Agric. Bureaux**, p. 134-174, 1976.

OHTA AND HATTORI, 1985. RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; CHAHBOUNE, R.; PEIX, A.; VELÁZQUEZ, E. Reclassification of *Agronomas oligotrophica* into the genus *Bradyrhizobium* as *Bradyrhizobium oligotrophicum* comb. Nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.63, p.1013-1016, 2013.

OLIVEIRA, D. E. DE; COSTA, F. S.; ZUMBA Jr., F. P. & SILVA, E. P. *Mucuna* – preta: estudo e nodulação espontânea na Amazônia Ocidental. In: XVII **Reunião Brasileira de Manejo e Conservação de Solo e Água**. RJ, 2008.

OLIVEIRA-LONGATTI, S. M.; MARRA, L.; SOARES, L. B.; BOMFETI, C. A.; DA SILVA, K.; AVELAR FERREIRA, P.A.A.; MOREIRA, F. M. S. Bacteria isolated from soils of the western Amazon and from rehabilitated bauxite-mining áreas have potencial as plant growth promoters. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, v.30, n.4, p.1239-1250, 2014.

PALHETA, R. A. & WANDELLI, E. V. **Nodulação de gliricidia sepium e Ingá edulis em sistemas agroflorestais implantados em áreas degradadas por pastagens na Amazônia Central**. In: Congresso Brasileiro de sistemas agroflorestais, 4, Ilhéus. *Sistemas agroflorestais, tendências da agricultura ecológica nos trópicos: sustento da vida e sustento de vida*. Anais. Ilhéus: CEPLAC: UESC. 2002.

PATTEN, CL, GLICK BR. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Appl Environ Microbiol**, v.68, p.3795-3801, 2002.

PATTEN, CL. AND GLICK, BR. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 207-220, 1996.

PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; FLORES-FÉLIX, J. D.; ALONSO DE LA VEJA, P.; RIVAS, R.; MATEOS, P. F.; IGUAL, J. M. MARTÍNEZ-MOLINA, E.; TRUJILLO, M. E.; VELÁZQUEZ, E. Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium lupini* and

reclassification as *Bradyrhizobium lupini* comb. Nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.65, p.1213- 1219, 2015.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.29, p.62-77, 2002.

PENNINGTON, T. D. **The genus *ingá*. Botany**. Royal Botanical Garden. p. 844. 1997.

PHILLIPS, R. D. Starchy legumes in human nutrition, health and culture. **Plant Foods for Human Nutrition**, Heidelberg, v.44, n.3, p.195-211, 1993.

POLHILL, R. M.; RAVEN P.H., STIRTON, C. H. Evolution and systematics of the Leguminosae. In; **Advances in Legume Systematics**, p.1- 26, 1981.

POSSETTE, R. F. S. & RODRIGUES, W. A. O gênero *Inga* Mill. (Leguminosae – Mimosoideae) no estado do Paraná, Brasil. **Acta Bot Brasilica**, v. 24, p. 354-368, 2010.

PRINSEN, E.; COSTACURTA, A.; MICHIELS, K.; VANDERLEYDEN, J.; VAN ONCKELEN, H. *Azospirillum brasilense* Indol-3-Acetic Acid Biosynthesis: Evidence for a Non-Tryptophan Dependent Pathway. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.6, n.5, p.609-615, 1993.

RAMIREZ-BAHENA, M. H.; PEIX, A.; RIVAS, R. CAMACHO, M.;RODRIGUEZ-NAVARRO, D. N.; MATEOS, P. F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; WILLEMS, A.; VELÁZQUEZ, E. *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov. Isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. **Internatyonal Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.59, p.1929-1934, 2009.

R. Core Team. R: A language and environment for statistical computing. [internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2013 [Accessed: 10 nov. 2015]. Available at: <http://www.R-project.org/>.

REIS, V. M. et al., Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, Manlio Silvestre. **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa: sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006.

RESENDE, A. S., XAVIER, R. P., QUESADA, D. M., URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Use of Green manures in increase inputs of Biological nitrogen fixation 24 to sugar cane. **Biology and Fertility of Soils**, v.37, p.215-220, 2003.

RHEINHEIMER, D. S.; MARTIZAZZO, R.; GATIBONI, L. C.; KAMINSKI, J.; SILVA, L. S. Amplitude no fósforo microbiano em um Argissolo em pastagem nativa submetida a roçada e à introdução de espécie forrageiras com fertilização fosfatada em diferentes épocas. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.30, n.4, p.561-567, 2008.

RHOADS, C. C.; ECKERT, G. E.; COLEMAN, D. C. Effect of pasture trees on soil nitrogen and organic matter: implications for tropical montane forest restoration. **Restoration Ecology**, v.6, n.3, p.262-270, 1999.

RICHARDSON, A. E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, n.8, p.897-906, 2001.

RIVAS, R.; WILLEMS, A.; PALOMO, J. L.; GARCIA-BENAVIDES, P.; MATEOS, P. F.; MARTINEZ-MOLINA, E.; GILLIS, M.; VELAZQUEZ, E. *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.1271-1275, 2004.

RODRIGUES, I. A **Contribuição à sistemática das espécies do gênero Inga P. Miller (Leguminosae – Mimosoideae), ocorrentes no estado do Rio de Janeiro**. 1982. 112f. Tese (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Museu Nacional, Rio de Janeiro, 1982.

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

ROOSMALEN, M. G. M. van **Fruits of the guianan flora**. Wageningen: Utrecht University, p.483, 1985.

RUFINI, M.; OLIVEIRA, D. DE P.; TROCHMANN A; SOARES, B. L.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. DE S. Estirpes de *Bradyrhizobium* em simbiose com guandu-anão em casa de vegetação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v.49, n3, p.197-206, 2014.

SANTOS, M. P. **Fixação de N<sub>2</sub>, Solubilização de Fosfato e Produção de AIA por Estirpes de *Bradyrhizobium* Simbióticas em Angico Vermelho e Tamboril**. Dissertação (mestrado) Lavras: UFLA, 2013.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 282-285, 1995.

SCOTT, A.J.; KNOTT, M.A. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, p. 507–512, 1974.

SHMITH, F. W. The phosphate uptake mechanism. **Plant and Soil**, v.245, n.1, p.105-114, 2002.

SILVA FILHO, G. N.; NARLOCH, C.; SCHARF, R. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.847-854, 2002.

SILVA, A. C. S; CHAGAS JUNIOR, A. F; OLIVEIRA, L. A; CHAGAS, L. F. B. Ocorrência de bactérias solubilizadoras de fosfato nas raízes de plantas de importância econômica em Manaus e Rio Preto da Eva, Amazonas. **Journal Biotechnology and Biodiversity**. v.2, n.1: p. 37-42, 2011.

SILVA, F. V.; MEYER, E. DE.; SIMOES-ARAÚJO, J. L.; BARBÉ, T. C. DA.; XAVIER, G. R.; O'HARA, G.; ARDLEY, J. K.; RUMJANEK, N. G.; WILLEMS, A.; ZILLI, J. E. *Bradyrhizobium manausense* sp. nov., isolated from effective nodules of *Vigna unguiculata* grown in Brazilian Amazonian rainforest soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.64, p. 2358-2363, 2014.

SILVA, K.; DE MEYER, S.; ROUWS, L. F. M.; CUNHA, E. N.; DOS SANTOS, M.A. O.; O'HARA, G.; ARDLEY, J. K.; WILLEMS, A.; PITARD, R.M.; ZILLI, J. E. *Bradyrhizobium ingae* sp. Nov., isolated from effective nodules of *Inga laurina* grown in Cerrado soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, 2014.

SILVA, M. F. DA.; CARREIRA, L.M.M.; TAVARES, A.S.; RIBEIRO, I.C.; LOBO, M.G.A.; OLIVEIRA, J. As leguminosas da Amazônia brasileira – Lista Prévia. **Acta Botânica Brasileira**, v.2, n.1, p.193-237, 1989.

SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. **Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas**. Brasília: MEC/Faepe, p. 125-178, 1988.

SOUCHIE, E. L.; CAMPELLO, E. F. C.; SAGGIN-JUNIOR, O. J. & SILVA, E. M. R. Mudanças de espécies arbóreas inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares. **Florestas**, Curitiba, v.35, p.329-334, 2005a.

SOUCHIE, E. L.; CAMPELLO, E. F. C.; SAGGIN-JUNIOR, O. J. & SILVA, E. M. R. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.11, p.1149-1152, 2005b.

SOUZA, A. DAS G. C. DE SOUZA, N. R.; SILVA, S. E. L. DA; NUNES, C. D. M.; CANTO, A. DO C.; CRUZ, L. A. DE A. **Fruteiras da Amazônia**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CPAA, p.204, 1996. (Coleção Biblioteca Botânica Brasileira, 1).

SOUZA, J. S., BASTOS, M. N. C. & GURGEL, E. S. C. O gênero ingá (Leguminosae-Mimosoideae) na Província Petrolífera de Urucu, Coari, Amazonas, Brasil. **Rodriguesia**, v. 2, p. 283-297. 2011.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiol Rev**, 31 (4): 425-48, 2007.

STOWERS, M. D.; ELKAN, G.H. **Criteria for selecting infective and eficiente strains of *Rhizobium* for use in tropical agriculture**. Durham: North Carolina Central University, INCARS. Technical Bulletin, n. 264, p. 73, 1980.

SYLVESTER-BRADLEY, R. et al. Levantamento quantitativo de micro-organismos solubilizadores de fosfato na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, Manaus, v.12, n.1, p.12-22, 1982.

URQUIGA, S.; ZAPATA, F 2000. **Manejo eficiente de la fertilización nitrogenada de cultivos anuales en América Latina y el Caribe**. Porto Alegre: Ed. Gênese, p.110, v.29, p.897-903, 1997.

VAN BERKUM, P.; LEIBOLD, J. M.; EARDLY, B. D. Proposal for combining *Bradyrhizobium* ssp. (*Aeschynomene indica*) with *Blastobacter denitrificans* and to transfer *Blastobacter denitrificans* (Hirsh and Muller, 1985) to the genus *Bradyrhizobium* as *Bradyrhizobium denitrificans* (comb. Nov.). **International Journal de Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.61, p.1011-1013, 2011.

VAN KESSEL, C. AND ROSKOSKI, J. P. Nodulation and N<sub>2</sub> fixation by *Inga jinicuil*, a woody legume in coffee plantations. III. Effect of fertilizers and soil shading on nodulation and nitrogen fixation (acetylene reduction) of *I. jinicuil* seedlings. **Plant and Soil**, v.72, p.95 -105, 1983.

VERISSIMO, E. W. & VALCARCEL, R. **Recuperação de áreas degradadas por mineração de manganês no morro do Urucum, MS.** In: Simposio Nacional de Recuperação de Áreas Degradadas, I. Anais, p.264-272. Curitiba, PR. 1992.

VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria, International biological programme handbook.** Oxford: Blackwell Scientific Publications, International Biological Programme Blackwell Scientific, v. 15, p. 164, 1970.

VINUESA, P.; LEÓN-BARRIOS, M.; SILVA, C.; WILLEMS, A.; JARABO-LORENZO, A.; PÉREZ-GALDONA, R.; WERNER, D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Bradyrhizobium canariense* sp. Nov., and acid tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary islands, along with *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.569-575, 2005.

WANG, J. Y.; WANG, R.; ZHANG, Y. M.; LIU, H. C.; CHEN, W. F.; WANG, E. T.; SUI, X. H.; CHEN, W. X. *Bradyrhizobium daqingense* sp. nov. isolated from soybean nodules. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.63, p.616-624, 2013

XU, L. M.; GE, C. CUI, Z.; LI, J.; FAN, H. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. Nov., isolated from tree root nodules of soybeans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.45, p.706-711, 1995.

YAO, Z. Y.; KAN, F. L.; WANG, E. T.; WEI, G. H.; CHEN, W. X. 2015. *Bradyrhizobium erythrophlei* sp. nov. and *Bradyrhizobium ferriligni* sp. nov. isolated from effective nodules of *erythrophleum fordii*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.65, p.1831-1837, 2015.

YAO, Z. Y.; KAN, F. L.; WANG, E. T.; WEI, G. H.; CHEN, W. X. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, v.52, p.2219-2230, 2002.

YU, X.; CLOUTIER, S.; TAMBONG, J. T.; BROMFIELD, E. S. P. *Bradyrhizobium ottawaense* sp. nov. a symbiotic nitrogen fixing bacterium from root nodules of soybeans in Canada. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.64, p.3202-3207, 2014.

ZHANG, Y. M.; LI, Y. J.; CHEN, W. F.; WANG, E. T.; SUI, X. H.; LI, Q. Q.; ZHANG, Y. Z.; ZHOU, Y. G.; CHEN, W. X. *Bradyrhizobium huanghuaiense* sp. Nov. an effective symbiotic bacterium isolated from soybean (*Glycine max* L.) nodules. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.62, p.1951-1957, 2012.

ZILLI, J. E.; BARAUNA, A. C.; DA SILVA, K. DE MEYER, S. E.; FARIAS E. N.; KAMINSKI, P.E.; DA COSTA, I. B. ARDLEY, J. K.; WILLEMS, A.; CAMACHO, N. N.; O'HARA, G. *Bradyrhizobium neotropicale* sp. nov., isolated from effective nodules of *Centrolobium paraense*, **International Journal of Sistematic and Evolionary Microbiology**, v. 64, p. 3950-3957, 2014.