

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

**SELEÇÃO DE ESTIRPES DE RIZÓBIOS PARA LEGUMINOSAS DE MÚLTIPLO
USO EM DUAS CLASSES DE SOLOS ÁCIDOS DA AMAZÔNIA CENTRAL**

NAIANA MARINHO DE SOUZA

Manaus, Amazonas
Julho, 2013

NAIANA MARINHO DE SOUZA

**SELEÇÃO DE ESTIRPES DE RIZÓBIOS PARA LEGUMINOSAS DE MÚLTIPLO
USO EM DUAS CLASSES DE SOLOS ÁCIDOS DA AMAZÔNIA CENTRAL**

Orientador: Dr. Luiz Augusto Gomes de Souza

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agricultura no Trópico Úmido.

**Manaus, Amazonas
Junho, 2013**

À minha mãe Maria Helena e à memória do pai Antônio Carlos,

Dedico.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	ii
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE QUADROS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Características da fertilidade dos solos da Amazônia.....	3
2.2. Aspectos gerais da Família Botânica Fabaceae	6
2.3. Caracterização das espécies selecionadas.....	10
2.3.1. <i>Clitoria fairchildiana</i> R.A Howard (Fabaceae, Faboideae)	10
2.3.2. <i>Inga edulis</i> Mart. (Fabaceae, Mimosoideae).....	11
3. REFERÊNCIAS.....	13
Capítulo I.....	21
1.1. INTRODUÇÃO	24
1.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
1.2.1. Caracterização fenotípica e fisiológica das estirpes	26
1.2.2. Coleta, preparo e análise do solo.....	27
1.2.3. Obtenção de propágulos, germinação das sementes, preparo de inoculante e condução do experimento	28
1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
1.3.1. Seleção de estirpes de rizóbios para ingá-de-metro em argissolo vermelho amarelo e Latossolo Amarelo	31
1.4. CONCLUSÕES	41
1.5. REFERÊNCIAS	41
Capítulo II.....	45
2.1. INTRODUÇÃO	48
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	50
2.2.1. Caracterização fenotípica e fisiológica das estirpes	50
2.2.2. Coleta, preparo e análise do solo.....	51
2.2.3. Obtenção de propágulos, germinação das sementes, preparo de inoculante e condução do experimento	52
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
2.4. CONCLUSÕES	63
2.5. REFERÊNCIAS	63

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força que tem me dado sempre para vencer os desafios da minha caminhada.

A minha família, Helena, Antônio, Alexandre, Gustavo por apoiarem desde o início a minha decisão de realizar esta fase de minha vida acadêmica em Manaus, por suportarem os meus longos momentos de ausência, afinal foram mais de dois anos de estudos e de distância deles, pelo incentivo e constante preocupação comigo e principalmente pela torcida para que tudo desse certo.

À minha sobrinha e afilhada Nandinha, por ter sido uma das minhas maiores alegrias e por de um certo modo ter suprido a minha ausência em casa.

Ao meu orientador Dr Luiz Augusto por confiar no meu trabalho, compartilhar comigo suas experiências e conhecimentos, e principalmente pela orientação segura e valiosa. Muito obrigada

Ao meu amor Cauan, que foi um presente de Deus em minha vida, amigo, companheiro em todas as horas, nos momentos mais difíceis e por me proporcionar momentos muito felizes.

Aos meus tios Ana Lúcia e Moises por me acolherem de braços abertos e me oferecem um lar, quando eu mais precisei, fazendo me sentir como se estivesse em minha própria casa.

Não posso deixar de agradecer de coração à professora Neide e ao professor Nestor Lourenço, por tudo que fizeram por mim, por me ajudarem a diminuir minhas dificuldades e a saudade de casa, quando cheguei a Manaus.

Agradeço de coração ter conhecido a Joana, que foi como uma irmã, uma amiga em todos os sentidos desta palavra.

Aos meus amigos Júnior, Renê, Gigliane, Neander, Darcle, que mesmo distantes sempre estiveram torcendo por mim.

À equipe do Laboratório de Microbiologia do Solo do INPA, que foram minha segunda família em Manaus Adilson, Manoel, Manoel Paulino. Também aos companheiros de trabalho Augusto e Aroldo.

Ao INPA e ao CNPq pelo apoio financeiro

À todos o meu Muito Obrigada!

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

- Tabela 1.1. Potencial hidrogeniônico, teores de bases trocáveis e outras propriedades químicas de um solo Argissolo Vermelho Amarelo sob sistema agroflorestal e um Latossolo Amarelo sob pastagem, no Município de Manaus, AM. **28**
- Tabela 1.2. Características fenotípicas e fisiológicas das estirpes de rizóbios da coleção do INPA, isoladas de nódulos de ingá-de-metro (*Inga edulis*), incubadas em meio YMA, pH 6,0 **30**
- Tabela 1.3. Efeito do tipo de solo nas medidas do crescimento, produção de biomassa e relação raiz/parte aérea de mudas de ingá-de-metro (*Inga edulis*), aos 91 dias após a repicagem **32**
- Tabela 1.4. Efeito da forma de suprimento de nitrogênio nas medidas do crescimento, produção de biomassa e relação raiz/parte aérea de mudas de ingá-de-metro (*Inga edulis*), aos 91 dias após a repicagem **33**
- Tabela 1.5. Efeito do tipo de solo no número de nódulos, biomassa dos nódulos secos, peso específico dos nódulos e concentração de nitrogênio foliar em mudas de ingá-de-metro (*Inga edulis*), aos 91 dias após o transplantio, sob enviveiramento **34**
- Tabela 1.6. Efeito da forma de suprimento de nitrogênio no número de nódulos, biomassa dos nódulos secos, peso específico dos nódulos e concentração de nitrogênio foliar em mudas de ingá-de-metro (*Inga edulis*), aos 91 dias após o transplantio, sob enviveiramento. **35**
- Tabela 1.7. Efeito da interação entre solos e formas de suprimento de nitrogênio para o comprimento do caule de mudas de ingá-de-metro (*Inga edulis*), aos 90 dias após o transplantio, sob enviveiramento. **36**
- Tabela 1.8. Efeito da interação entre solos e formas de suprimento de nitrogênio no número de nódulos de mudas de ingá-de-metro (*Inga edulis*), aos 90 dias após o transplantio, sob enviveiramento. **37**
- Tabela 1.9. Efeito da interação entre solos e formas de suprimento de nitrogênio na biomassa dos nódulos secos (mg) de mudas de ingá-de-metro (*Inga edulis*), aos 90 dias após o transplantio, sob enviveiramento. **39**

Capítulo 2

- Tabela 2.1. Características fenotípicas e fisiológicas das estirpes de rizóbios da coleção do INPA, isoladas de nódulos de palheteira (*Clitoria fairchildiana*), incubadas em meio YMA, pH 6,0. **54**
- Tabela 2.2. Efeito do tipo de solo nas medidas e no incremento do crescimento, produção de biomassa e relação raiz/parte aérea de mudas de palheteira (*Clitoria fairchildiana*), aos 91 dias após a repicagem **55**
- Tabela 2.3. Efeito da forma de suprimento de nitrogênio nas medidas e no incremento do crescimento, produção de biomassa e relação raiz/parte aérea de mudas de **56**

palheteira (<i>Clitoria fairchildiana</i>) aos 91 dias após a repicagem	
Tabela 2.4. Efeito do tipo de solo no número de nódulos, biomassa dos nódulos secos, peso específico dos nódulos e teores nitrogênio foliar em mudas de palheteira (<i>Clitoria fairchildiana</i>), aos 91 dias após o transplântio, sob enviveiramento	57
Tabela 2.5. Efeito da forma de suprimento de nitrogênio no número de nódulos, biomassa dos nódulos secos, peso específico dos nódulos e teores concentração de nitrogênio foliar em mudas de palheteira (<i>Clitoria fairchildiana</i>), aos 91 dias após o transplântio, sob enviveiramento	58

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1.1. Características fenotípicas de estirpes de rizóbios 831, 841 e 844, da coleção de rizóbios do INPA, isoladas de ingá-de-metro (*Inga edulis*), avaliadas para uso como inoculante microbiano **31**
- Figura 1.2. Relações entre a biomassa dos nódulos secos e os teores de N-total em resposta à inoculação com estirpes de rizóbios em ingá-de metro (*Inga edulis*) em dois solos da Amazônia Central, aos 91 dias de transplantio, sob enviveiramento **40**
- Figura 1.3. Correlação entre a biomassa dos nódulos secos e a biomassa das folhas secas de mudas de ingá-de-metro (*Inga edulis*), crescendo em dois solos da terra firme, sob enviveiramento, aos 91 dias após o transplantio. **41**

Capítulo 2

- Figura 2.1. Nódulos de palheteira (*Clitoria fairchildiana*), obtidos em ensaio de seleção de estirpe para uso como inoculante **59**
- Figura 2.2. Relações entre os teores de nitrogênio foliar e a biomassa dos nódulos secos, com diferentes formas de suprimento de N em solo Argissolo Vermelho Amarelo e Latossolo Amarelo, aos 91 dias após o transplantio **61**
- Figura 2.3. Correlações entre a concentração de nitrogênio foliar e o número de nódulos (A) e entre o nitrogênio foliar e a biomassa dos nódulos secos (B) com diferentes formas de suprimento de N em solo Argissolo Vermelho Amarelo e Latossolo Amarelo, aos 91 dias após o transplantio. **62**

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1. Informações obtidas a partir de levantamentos efetuados sobre a capacidade nodulífera de Fabaceae da Amazônia **7**
- Quadro 2. Informações sobre as pesquisas de seleção de estipes para leguminosas de múltiplo uso conduzidas no Brasil. **10**

RESUMO

Em leguminosas arbóreas, a sobrevivência e o desenvolvimento inicial das mudas após o plantio definitivo é favorecida significativamente pela inoculação com estirpes de rizóbio eficientes. A produção de mudas vigorosas e bem noduladas, permite após o plantio definitivo, melhores condições de competição com a flora invasora, além da rápida retomada de crescimento no campo, o que é importante para o reflorestamento com leguminosas. Neste trabalho, foram escolhidas duas espécies arbóreas de Fabaceae, com o objetivo de selecionar estirpes de rizóbios eficientes na fixação de N₂, para emprego como inoculante em dois solos da Amazônia Central. Foram escolhidas a ingá-de-metro (*Inga edulis*) e a palheteira (*Clitoria fairchildiana*). Os solos empregados foram Argissolo Vermelho Amarelo coletado em Sistemas Agroflorestais e o solo Latossolo Amarelo de pastagem abandonada. Antecedendo o ensaio, para depleção do nitrogênio naturalmente disponível, cultivou-se o milho (*Zea mays*) variedade 5110 durante 45 dias, após este período, as plantas foram cortadas rente à superfície do solo e em seguida os solos receberam uma adubação básica de correção. As sementes das duas espécies foram germinadas em caixas drenadas preenchidas com areia lavada e transplantadas para sacos com 2 kg de solo, mantidas em viveiro. Para ambas as espécies foram consideradas as seguintes formas de suprimento de N: plantas sem inoculação e sem adubação nitrogenada, plantas fertilizadas com N-mineral (na forma de ureia) e a inoculação individual das estirpes da Coleção de rizóbios do INPA. Para o ingá-de-metro foi empregada a inoculação individual de 10 estirpes de rizóbios: 828, 831, 832, 833, 841, 842, 844, 847, 850 e 852. Por outro lado, para a palheteira foi avaliada a inoculação individual de oito estirpes de rizóbios: 938, 941, 943, 944, 945, 949, 950 e 959. As estirpes foram inoculadas em suspensão líquida, 5 mL aplicados na base do colo de mudas transplantadas. As plantas foram acompanhadas mensalmente em crescimento e avaliadas aos três meses de enviveiramento. Foi determinada a biomassa de folhas, caule e raízes das plantas após a secagem em estufa a 65° por 72 h e também o número, biomassa e peso específico dos nódulos. Determinou-se a concentração de N-foliar e N-total acumulado pelo método de Kjeldhal. O delineamento experimental para ingá-de-metro foi o inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 2 x 12, (2 solos e 12 formas de suprimento de nitrogênio), com 10 repetições. Quanto à palheteira, o delineamento do experimento foi também o inteiramente casualizado, neste caso, com arranjo fatorial do tipo 2 x 10, (2 solos e 10 formas de suprimento de N), com 10 repetições. Demonstrou-se que o ingá-de-metro responde eficientemente a inoculação com estirpes selecionadas, permitindo a formação de mudas bem noduladas e aptas ao plantio definitivo. Aos 91 dias, as plantas apresentavam médias de 23,6 cm de comprimento do caule, 4,7 mm de diâmetro do colo, 206 nódulos plantas⁻¹ e 3,13 % de N na biomassa foliar. A adubação com N-mineral inibiu a formação e desenvolvimento dos nódulos do ingá. A eficiência simbiótica foi demonstrada pela correlação linear significativa entre a biomassa foliar e dos nódulos. As estirpes 831 e 844 apresentaram potencial para uso como inoculante microbiano da espécie pela simbiose eficiente estabelecida nos dois solos pesquisados. A palheteira mostrou adaptação às duas condições de solo da terra firme pesquisadas, entretanto, as medidas de crescimento e de desenvolvimento foram favorecidas em solo Latossolo Amarelo, e o número, biomassa de nódulos secos e concentração de N-foliar foram maiores em solo Argissolo. O fornecimento de N na forma de N-mineral inibiu a formação de nódulos, desfavorecendo o processo simbiótico. Por outro lado, a inoculação da palheteira com as estirpes de rizóbios 943, 944, 945 e 949 favoreceram o desenvolvimento das plantas e proporcionaram elevados teores de N nas folhas, e foram identificadas como as de maior potencial para uso como inoculante desta espécie nos solos de terra firme pesquisados.

Palavras-chave: Fixação biológica de N, simbiose, leguminosas arbóreas.

ABSTRACT

In leguminous tree survival and early growth of seedlings after planting definite is favored significantly by inoculation with efficient strains of rhizobia. The production of vigorous seedlings and well nodulated allows final after planting, better competition with invasive plants, and the rapid resumption of growth in the field, which is important for reforestation with legumes. In this work, were selected two tree species of Fabaceae, in order to select efficient strains of rhizobia on N₂ fixation for use as inoculum in two soils of central Amazonia. Were chosen to ingá-de-metro (*Inga edulis*) and palheteira (*Clitoria fairchildiana*). The soils used was Ultisoil, collected in agroforestry system, and soil Oxisoil in abandoned pasture. Prior to the test, so naturally available nitrogen depletion, cultured maize (*Zea mays*) variety 5110 for 45 days, after this period, the plants were cut close to the soil surface and then received a basic fertilization. The seeds of both species were germinated in drained boxes filled with washed sand and transplanted into bags with 2 kg of soil, kept in nursery. For both species were considered the following forms of N supply: plants without inoculation and without nitrogen fertilization, plants fertilized with mineral N (as urea) and inoculation of individual strains of rhizobia Collection of INPA. For ingá-de-metro was employed individual inoculation of 10 strains of rhizobia: 828, 831, 832, 833, 841, 842, 844, 847, 850 and 852. On the other hand, for the inoculation of palheteira was evaluated eight individual strains of rhizobia: 938, 941, 943, 944, 945, 949, 950 and 959. Strains were inoculated into liquid suspension, 5 ml applied to the base of the neck of transplanted. Plants were monitored monthly in growth and assessed at three months of nursery. We determined the biomass of leaves, stems and roots of plants after drying in an oven at 65 for 72 h and also the number, biomass and specific weight of the nodules. Were determined the concentration of leaf-N and N-total-cumulative by the method of Kjeldahl. The experimental design for ingá-de-metro was completely randomized design with factorial arrangement of 2 x 12 (2 soils and 12 forms of nitrogen supply), with 10 repetitions. Regarding palheteira, the design of the experiment was also randomized in this case, with a factorial arrangement of type 2 x 10 (2 soils and 10 forms of N supply), with 10 repetitions. It was demonstrated that the ingá-de-metro responds efficiently inoculation with selected strains, allowing the formation of seedlings nodulated well and fit the permanent planting. At 91 days, the plants were averages of 23.6 cm stem length, 4.7 mm diameter, 206 nodules plant-1 and 3.13% N in leaf biomass. The fertilization with mineral N inhibited the formation and development of nodules ingá. The symbiotic efficiency was demonstrated by a significant linear correlation between leaf biomass and nodules. The strains 831 and 844 showed potential for use as a microbial inoculant for ingá, to a efficient symbiosis established in the two soils studied. The palheteira showed adaptation to two soil conditions of the land surveyed, however, measures of growth and development were favored in Oxisol soil, and the number, nodule dry biomass and leaf-N concentration was higher in Ultisol soil. The N supply in the form of mineral-N inhibit the formation of nodules, discouraging the symbiotic process. On the other hand, inoculation of palheteira with rhizobia strains 943, 944, 945 and 949 favored the development of plants and provided high levels of N in the leaves, and were identified as the most potential for use as inoculant of this species in soils of land surveyed.

Keywords: biological N fixation, symbiosis, legume trees.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, um dos maiores desafios para a agricultura tem sido o desenvolvimento de sistemas agrícolas que possam produzir em quantidade e qualidade satisfatoriamente, afetando cada vez menos o solo e o ambiente, e uma das alternativas é a utilização da Fixação Biológica de Nitrogênio. Com isso, o setor produtivo, principalmente o agrícola, vem buscando novas tecnologias com enfoques mais ecológicos, rentáveis e socialmente justos. Sendo que essas tecnologias devem ser cada vez mais voltadas para a melhor utilização dos recursos naturais existentes (Neves, 2007).

As técnicas de biotecnologia, envolvendo a utilização de microrganismos para a produção de substâncias e de processos, apresentam na agricultura papel cada vez mais destacado nas últimas décadas. Tais técnicas têm possibilitado, entre outras aplicações, a geração de produtos denominados de inoculantes agrícolas (Bittencourt e Santos, 2010).

Antecedendo a produção de inoculantes, ensaios de seleção de estirpes são fundamentais na avaliação do potencial de fixação de N_2 de coleções de rizóbios. Estes ensaios podem ser conduzidos em vasos de Leonard ou em solo e precisam ser conduzidos para que uma estirpe possa ser recomendada como inoculante. Entre as características essenciais de estirpes de rizóbios recomendadas para uso como inoculante destaca-se a habilidade de nodular seus hospedeiros de interesse nas condições de campo em que crescem, estabelecendo processos eficientes de fixação de N_2 . As estirpes selecionadas devem estar adaptadas à produção de inoculantes em escala comercial, com características como a boa multiplicação em grandes fermentadores e manutenção de altas populações no veículo utilizado pra comercialização (Hungria e Araújo, 1994).

O inoculante é um insumo biotecnológico, oriundo do conhecimento da nossa biodiversidade, sendo capazes de promover o crescimento vegetal de forma direta ou indireta, através de diferentes mecanismos (Hungria, 2006; Vessey, 2003). De acordo com Schuh (2005), 72 % do inoculante produzido no Brasil são feitos com turfa, 18 % inoculantes líquidos e 10 % são inoculantes feitos com pó molhável. A oferta de inoculantes no mercado nacional é bem variada, podendo ser encontrados inoculantes turfosos, líquidos, géis, oleosos, granulados e liofilizados (Camara, 1998).

Entre um grupo de estirpes de rizóbios capazes de nodular uma leguminosa hospedeira em particular existe grande variação na quantidade de nitrogênio fixado assim como na sua efetividade, tornando-se possível a seleção de estirpes superiores. A seleção de

rizóbio se justifica com o valor de uso da leguminosa de interesse e quando não existe inoculante recomendado.

A nodulação espontânea de espécies de árvores nodulíferas em seu ambiente natural, cria a impressão de que a inoculação específica não é necessária, o que contraria estudos experimentais (Faria *et al.*, 1984; Franco *et al.*, 1986; Ribeiro Junior *et al.*, 1987, Franco e Faria, 1997; Bala, *et al.*, 2003). A inoculação com rizóbio na maioria das espécies nativas estudadas tem se demonstrado como absolutamente necessária para auto-suficiência em nitrogênio destas espécies e o plantio de leguminosas sem efetuar sua inoculação perde a sua finalidade e não deve ser estimulado.

As leguminosas tropicais não possuem um comportamento homogêneo em relação à compatibilidade com rizóbio, sendo classificadas no grupo promíscuo, quando a nodulação é induzida por um grande grupo de estirpes de rizóbios tropicais e o grupo específico, quando a hospedeira requer estirpes de rizóbios específicas para nodular (Bala, *et al.*, 2003). Porém, simplificar leguminosas tropicais nodulíferas em promíscuas ou específicas não será útil por muito tempo. Há diferenças entre promíscuo efetivo e promíscuo inefetivos. Estudos de afinidades de rizóbios em forragens leguminosas tropicais revelam que a maioria dos nódulos era do grupo promíscuo inefetivos, sugerindo que existe potencial de aumento de produção com a inoculação da estirpe apropriada de rizóbio (Halliday, 1984).

No Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), o Laboratório de Microbiologia do Solo dispõe de uma coleção de rizóbios nativos de solos da Amazônia com 450 estirpes, as quais vêm sendo avaliadas experimentalmente para uso como inoculante. Os resultados de ensaios já conduzidos reforçam a importância de selecionar simbioses compatíveis e capazes de maximizar os processos biológicos da fixação de N₂, demonstrando a necessidade de pesquisas biotecnológicas para sistemas sustentáveis, compatíveis com o ambiente amazônico e suas populações humanas.

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de selecionar estirpes de rizóbios eficientes na fixação simbiótica de N₂ para uso como inoculante em mudas de ingá-de-metro (*Inga edulis*) e palheteira (*Clitoria fairchildiana*) nos solos Argissolo Vermelho Amarelo e Latossolo Amarelo na Amazônia Central, durante a etapa de formação de mudas para o plantio definitivo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características da fertilidade dos solos da Amazônia

De acordo com a sua natureza pedológica, a planície Amazônica pode ser dividida em duas áreas distintas: a terra firme de formação terciária e a planície de inundação propriamente dita, denominada várzea ou terreno quaternário recente (Alfaia e Souza, 2002). O ecossistema de terra firme ocupa cerca de 90% dos solos da Amazônia, com predominância das classes de latossolos e argissolos, cujos processos de origem não são hidromórficos. Na terra firme, os solos apresentam boas características físicas, no entanto possuem acidez elevada que potencializa um ambiente de toxidez pela presença de alumínio trocável e baixa disponibilidade de nutrientes, especialmente nitrogênio e fósforo, comprometendo a produção agrícola.

Na região amazônica, o sistema de uso da terra caracteriza-se principalmente pela prática da agricultura itinerante, caracterizada como um sistema agroflorestal sequencial temporal, que intercala períodos de cultivo, alternados por etapas de descanso da terra definidos como de pousio. Nesta atividade, o preparo da área é realizado predominantemente com a prática de derrubada e queima da vegetação. Esta prática apresenta a vantagem de fornecer às culturas, no curto prazo, os nutrientes necessários para seu desenvolvimento, porém, a perda da cobertura vegetal dos solos torna-os susceptíveis aos efeitos do clima tropical, especialmente a ação direta da água das chuvas, originando o processo erosivo e rápido esgotamento dos recursos disponibilizados para a produção (Silva e Faria, 1995).

A queima de biomassa também resulta na retirada de compostos oxidados como nitratos, sulfatos e carbonatos do agroecossistema. Esta perda de produtividade e esgotamento do solo faz com que o produtor abandone a área de produção em poucos anos, reservando-a para o pousio, estabelecendo capoeiras de diferentes idades e busque novas áreas para o cultivo, conferindo o caráter itinerante da agricultura (Borges *et al.*, 2011). Algumas vezes o período de descanso da área chega há 20 anos antes que um novo ciclo de cultivo seja praticado.

Contrariamente aos solos da terra firme, os solos da várzea, de origem hidromórfica, classificados principalmente como gleissolos, são caracterizados pela influência da inundação periódica anual e pela elevada fertilidade, conseqüente da deposição anual de sedimentos e nutrientes provenientes dos Andes, formando regularmente uma nova camada de solo. Apesar de representar, em termos relativos, uma pequena fração da Amazônia (10%

aproximadamente) em comparação à terra firme, as áreas de várzea têm um papel muito importante, porque é nesses solos que se produz a maior parte das culturas de ciclo curto na região (Alfaia e Falcão, 1993).

Mesmo considerando a elevada fertilidade natural das várzeas, estudos evidenciam as deficiências de nitrogênio e declínio nos níveis de matéria orgânica presentes no solo (Alfaia, 1997). Porém, Kreibich *et al.* (2003) observaram em condições naturais, que o fluxo de N mineral no solo a 0-20 cm foi maior próximo de espécies leguminosas que de não-leguminosas, indicando a contribuição de espécies simbióticas de Fabaceae nas entradas desse nutriente nos solos da várzea.

Tradicionalmente, considera-se que a deficiência de nitrogênio no solo é um dos principais fatores limitantes para a agricultura tropical (National Academy of Sciences, 1972) e com exceção do suprimento de água e do fósforo, a escassez de N é o fator nutricional mais limitante e de ocorrência mais abrangente que afeta a produtividade dos ecossistemas terrestres (Franco e Dobereiner, 1994). O nitrogênio é um composto requerido em grande quantidade pelas plantas, indispensável para o crescimento e desenvolvimento vegetal, elemento estrutural de aminoácidos, componente integrante da clorofila, construtor do núcleo celular e do protoplasma e, portanto indispensável para a síntese de proteínas, entre outros (Marschner, 1990).

A deficiência de nitrogênio pode causar vários problemas às culturas (Malavolta *et al.* 1989). As plantas deficientes em N tendem a apresentar clorose e uma aparência atrofiada, com hastes finas e alongadas. As plantas deficientes em nitrogênio, muitas vezes, têm uma relação caule-raiz baixa e amadurecem mais rapidamente do que as plantas saudáveis.

Por outro lado, a pronta disponibilidade do elemento no solo resulta em crescimento rápido, age no metabolismo vegetal, influencia favoravelmente os processos de respiração celular, absorção de nutrientes, síntese protéica e a fotossíntese. Quando o N é fornecido em grande quantidade, ocorre crescimento vegetativo excessivo, provocando o tombamento das plantas mais altas (acamamento) e o retardamento da planta, bem como a possibilidade de elas se tornarem mais susceptíveis a pragas e doenças (Brady e Weil, 2013).

A fonte primária de N para as plantas é o gás N_2 , que constitui cerca de 79% dos estoques da atmosfera (Odum, 1983; Stumm e Morgan, 1996). No entanto, a forte ligação tripla entre os dois átomos da molécula de nitrogênio ($N\equiv N$) faz com que este gás seja extremamente inerte e não diretamente utilizável por plantas ou animais (Brady e Weil, 2013). Deste modo, pouco nitrogênio poderia ser encontrado em solos e pouca vegetação cresceria em ecossistemas terrestres ao redor do mundo se não fosse pela ação de certos processos

naturais que podem quebrar esta tripla ligação e formar nitrogênio reativo, tornando-o disponível para todas as formas de vida por intermédio do ciclo do nitrogênio (Barbosa, 2007).

A entrada de nitrogênio no solo pode ocorrer pela fixação relacionada a fatores físicos, através de descargas elétricas atmosféricas, radiação ultravioleta, chuvas, entre outros. Porém, as quantidades de N fixadas por estes processos estão aquém da demanda das espécies vegetais espontâneas ou cultivadas. Outra forma de fixação é a química/industrial, realizada com alto custo energético, onde o N_2 se liga ao hidrogênio por meio de energia não renovável fornecida por gás natural, petróleo, nafta ou álcool, sob condições de elevada temperatura e pressão, resultando na produção de fertilizantes amoniacais (Barbosa, 2007). É uma contribuição importante de entrada de N fixado no sistema solo-planta-animal, porém não é sustentável por queimar combustíveis fósseis.

A FBN realizada por alguns grupos filogenéticos de procariotos altamente diversos, que possuem a enzima da nitrogenase, capaz de reduzir N_2 a NH_3 , ou seja, transformá-lo em forma assimilável por vários organismos, é a forma mais relevante. Os organismos fixadores de N_2 , também são chamados de diazotróficos e podem viver livre no solo, em sistemas aquáticos, ou em relações íntimas com organismos de outros Reinos de Eucariotos, tais como Protista (Protozoa e Chromista), Fungi, Animalia e Plantae, vivendo na superfície das raízes, nas folhas das plantas, no intestino dos animais e ocupando espaço inter ou intracelulares, como tipicamente o fazem as bactérias endofíticas (Duhoux e Dommergues, 1985; Moreira, 2008)

Entre outros procariotos conhecidos como fixadores de N_2 , que estabelecem simbiose (cianobactérias e actinomicetos do gênero *Frankia*), os mais importantes são o grupo dos rizóbios que nodulam Fabaceae, não apenas pelo alto valor socioeconômico de muitas espécies desta família, mas também devido à eficiência do processo da FBN. As bactérias dos gêneros *Azobacter* (aeróbico) e *Clostridium* (anaeróbico), bactérias saprófitas comuns do solo, também são capazes de fixar N_2 de forma não simbiótica, pelo sistema conhecido como associações fixadoras de nitrogênio.

À classificação taxonômica de *Rhizobia* foi recentemente acrescentada de novos registros, favorecidos por novas técnicas de biologia molecular, que permitem a classificação dos rizóbios em várias famílias de bactérias: na Família Rhizobiaceae os gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Allorhizobium*; na família Bradyrhizobiaceae, os gêneros *Bradyrhizobium* e *Blastobacter*; na família Xanthobacteraceae o gênero *Azorhizobium*; na família Hyphomicrobiaceae o gênero *Devosia*; na família Phyllobacteriaceae os gêneros

Phyllobacterium e *Mezorhizobium*; na família Methylobacteriaceae o gênero *Methylobacterium*; na família Brucellaceae o gênero *Ochrobactrum* e, finalmente, na família Burkolderiaceae os gêneros *Burkholderia* e *Ralstonia* (Moreira, 2008). Desse modo, nas coleções brasileiras de germoplasma microbiano, 13 gêneros compõem as bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio.

2.2. Aspectos gerais da Família Botânica Fabaceae

A família Fabaceae representa um dos principais e mais importantes grupos de plantas entre as fanerógamas. Quantitativamente, classifica-se entre as três maiores famílias botânicas, juntamente com Orchidaceae e Asteraceae (Silva e Souza, 2002) e é a segunda em termos de importância econômica, depois de Poaceae (Judd *et al.*, 2009). A diversidade mundial das Fabaceae é estimada em 19.325 espécies, classificadas em 727 gêneros (Lewis *et al.* 2005). O Brasil é particularmente rico em espécies da família, onde se estima a ocorrência de aproximadamente 210 gêneros e 2.694 espécies, quase 1.500 delas endêmicas, e, considerando-se somente o bioma Amazônia o número de gêneros de Fabaceae chega a 160 (Lima, 2010).

Em Fabaceae são reconhecidas três subfamílias, Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae (antes Papilionoideae) (Souza e Aguiar 2009), abrangendo inúmeras espécies que apresentam variações quanto ao ambiente de ocorrência, hábito de crescimento, forma dos frutos, usos, entre outros. A propriedade da FBN em muitas leguminosas contribui para o incremento e mobilização deste elemento nos agroecossistemas (Allen e Allen, 1981), e destacam muitas espécies como de interesse na composição dos sistemas de produção agrossilviculturais sustentáveis na região tropical (Alfaia, 1997).

A simbiose rizóbios x leguminosas envolve um processo complexo químico-metabólico-enzimático, iniciado com uma intensa troca de sinais moleculares no ambiente da rizosfera, refletindo parâmetros evolutivos entre os hospedeiros, pela estratégia da promiscuidade ou da especificidade simbiótica (Souza *et al.*, 2007). Na etapa inicial desta comunicação molecular entre macro e micro simbiontes, as plantas hospedeiras exsudam substâncias quimioatraentes para a bactéria, incluindo-se carboidratos, aminoácidos e compostos fenólicos. Em contrapartida, as bactérias aderem-se aos pêlos radiculares, penetram na raiz do hospedeiro e inicia-se a formação do nódulo (Mercante e Franco, 2000). Os sinais produzidos pela bactéria são

responsáveis pelas alterações morfológicas nas raízes, como o encurvamento do pêlo radicular, a divisão das células corticais e a indução do meristema do nódulo.

No entanto, não são todas as Fabaceae que têm a habilidade de nodular e fixar o nitrogênio e sobre muitas espécies ainda não se tem informações em relação à capacidade de estabelecer simbiose com rizóbios, sobretudo às espécies florestais tropicais (Allen e Allen, 1981). Alguns levantamentos recentes da habilidade nodulífera de leguminosas arbóreas da Amazônia, têm efetuado os primeiros registros para espécies só agora reconhecidas como fixadoras de nitrogênio (Moreira *et al.*, 1992; Moreira *et al.*, 1994; Souza *et al.*, 1994). Algumas estimativas resultantes de estudos sobre a capacidade nodulífera de leguminosas da Amazônia estão apresentadas no Quadro 1, no qual verifica-se que entre as 1.294 espécies constatadas na região, apenas 426 espécies foram avaliadas quanto à capacidade nodulífera, e deste total, a habilidade em nodular e fixar nitrogênio foi confirmada para 67, 37% das espécies avaliadas.

Quadro 1. Informações obtidas a partir de levantamentos efetuados sobre a capacidade nodulífera de Fabaceae da Amazônia.

Subfamília	Nº de gêneros na Amazônia	Número de espécies		
		Constatadas	Avaliadas	Nodulíferas
Caesalpinioideae	50	497	139 (27,97%)	42 (30,21%)
Faboideae	76	499	190 (38,08%)	171 (90,0%)
Mimosoideae	22	298	97 (32,55%)	74 (76,29%)
Total	148	1.294	426 (32,92%)	287 (67,37%)

Fonte: Souza, *et al.* (1997).

Entre estirpes de rizóbios capazes de nodular leguminosas, existem variações na quantidade de nitrogênio fixado e na variação em efetividade, abrindo a possibilidade de selecionar estirpes mais eficientes. Uma das causas de variações são os fatores de estresse no solo, como os que ocorrem na região amazônica, capazes de modificar o processo de simbiose das leguminosas tropicais, desse modo, a inoculação com estirpes selecionadas é uma alternativa capaz de beneficiar satisfatoriamente o desenvolvimento de leguminosas nos solos onde elas se estabelecem.

De acordo com Halliday (1984), algumas características são consideradas essenciais para uma estirpe inoculante, como a capacidade em nodular as árvores fixadoras de nitrogênio nas condições de campo em que elas crescem, apresentar habilidade de fixação de N₂ o suficiente para sustentar os níveis produtividade da leguminosa, deve demonstrar desempenho

satisfatório na produção de inoculante em escala comercial e do mesmo modo, apresentar habilidade de sobrevivência e tolerância antecipada às temperaturas elevadas.

Halliday (1984) menciona os cinco estágios que envolvem o processo de seleção de estirpes de rizóbios. No estágio I, as estirpes são investigadas quanto à habilidade nodulífera, aplicando-se o sistema mais utilizado, no qual o crescimento e enraizamento das plantas são conduzidos em tubo contendo alíquotas de suspensão de estirpes em meio sólido com nutrientes, sob iluminação artificial e alto controle bacteriológico. Nesta fase, são requeridos os tratamentos com a testemunha inoculada com água estéril (controle não inoculado) e o tratamento com nitrogênio de NH_4NO_3 ou KNO_3 .

Na sequência, o estágio II objetiva selecionar o grupo de estirpes mais efetivas no parâmetro de fixação de N_2 . Nos testes realizados devem ser suprimidos quaisquer outros fatores limitantes ao crescimento da planta, com exceção para N_2 , de modo que, possa ser expressa a habilidade das estirpes em fixar nitrogênio. Dentre os parâmetros avaliados, que incluem o número de nódulos, peso de nódulos frescos e secos após secagem, cor e distribuição dos nódulos, peso da parte aérea fresca e após secagem, peso das raízes secas, peso total da planta e concentração do nitrogênio no tecido, a produção de nitrogênio total é considerada a melhor correlação com efetividade da simbiose.

As dez melhores estirpes são selecionadas para o estágio III, onde são efetuadas pesquisas para efetividade simbiótica sob estresse físico, químico ou biológico em solos locais. No terceiro estágio, são incluídas parcelas experimentais em que as estirpes são comparadas com a testemunha não inoculada e a testemunha nitrogenada, considerando-se principalmente o parâmetro de produção de biomassa seca por planta.

No quarto estágio são efetuadas avaliações locais isoladas de estirpes de rizóbio e metodologias de inoculação sob condição de campo com as estirpes emergentes do estágio III, cujas estratégias de avaliação como o estresse no solo, também podem ser combinadas ao estágio IV. Os tratamentos nesta fase incluem a testemunha não inoculada, testemunha não inoculada e com nitrogênio e a testemunha inoculada contendo a estirpe testada. Nesta fase, a principal medida de inoculação das leguminosas é o rendimento em grãos e no caso de forrageiras, a matéria seca.

A melhor combinação de estirpes e métodos de inoculação ainda está susceptível a novas pesquisas efetuadas no estágio V, quando são realizados testes de multi-locção para respostas a inoculação com estirpes de rizóbios selecionadas. Este estágio inclui três tratamentos bases: as plantas inoculadas com rizóbios, plantas não inoculadas e plantas não

inoculadas e adubadas com nitrogênio, os quais resultam em dados necessários para prever a resposta favorável ou não da leguminosa a inoculação.

Os ensaios experimentais de seleção de estirpes têm demonstrado que a inoculação pode ser realizada por métodos convencionais durante as fases de preparo das mudas: nas sementes antes da semeadura, nas plântulas recém germinadas nas sementeiras, em estacas de propagação vegetativa e mesmo em mudas formadas por semeadura direta, oriundas dos sacos de polietileno (Brito, 1997; Di Stefano e Fournier, 1996; Moreira, 1997; Róndon *et al.*, 1996).

Em leguminosas arbóreas, a sobrevivência e o desenvolvimento inicial das mudas após o plantio definitivo é favorecida significativamente pela inoculação com estirpes de rizóbio eficientes. A produção de mudas vigorosas e bem noduladas, permite após o plantio definitivo, melhores condições de competição com a flora invasora, além da rápida retomada de crescimento no campo, o que é importante para o reflorestamento com leguminosas (Dobereiner, 1984).

A inoculação com estirpes selecionadas apresenta vantagens, especialmente se comparadas com mudas não inoculadas ou adubadas com N mineral (Faria *et al.*, 1984 a). Quando o suprimento de nitrogênio é feito por fertilização mineral, registra-se um atraso considerável no estabelecimento e desenvolvimento dos nódulos, afetando o crescimento inicial das espécies após o plantio definitivo, além das perdas do adubo mineral por volatilização e/ou lixiviação (Ribeiro *et al.*, 2004; Silva e Faria, 1995; Souza e Scholles, 1996).

Em mudas não submetidas ao processo de inoculação, a formação dos nódulos pode ser adiada por meses, podendo inclusive não acontecer, caso o solo utilizado não apresente rizóbio específico para a espécie de interesse, fato que ocorre principalmente quando as espécies são introduzidas em áreas adversas à sua distribuição natural. Quando levadas ao campo, as mudas não inoculadas e sem nódulos estabelecidos, exigem do hospedeiro a necessidade de formá-los numa fase crítica de seu estabelecimento, provocando diferenças no crescimento inicial das plantas (Dobereiner, 1967). Conseqüentemente, nos primeiros meses de plantio definitivo, as mudas podem apresentar-se amarelas e fracas, além disso, por não terem sido submetidos a critérios de seleção, boa parte de nódulos observados em condições de campo, podem apresentar baixa eficiência fixadora de N₂ (Brito, 1997).

Para potencializar o aproveitamento dos ensaios de seleção de estirpes, é relevante a utilização de germoplasma microbiano da mesma subfamília, da mesma tribo ou do mesmo gênero do hospedeiro de interesse (Campêlo e Dobereiner, 1969), já que há indicativos de pesquisa que sugerem que dentro de cada subfamília há um grupo fechado de inoculação cruzada, como já foi comprovado para as Mimosoideae. No Quadro 2, está apresentada uma

síntese das informações sobre os principais gêneros pesquisados para seleção de estirpes nas últimas décadas.

Quadro 2. Informações sobre as pesquisas de seleção de estirpes para leguminosas de múltiplo uso conduzidas no Brasil.

Época de estudo	Gêneros pesquisados	Fonte
Anos 60	<i>Leucaena, Mimosa, Vigna</i>	Dobereiner (1966); Trinick (1965); Trinick (1968).
Anos 70	<i>Glycine</i>	Dobereiner (1971); Freire (1975).
Anos 80	<i>Albizia, Erythrina, Leucaena</i>	Faria (1984); Franco <i>et al.</i> (1986); Freitas <i>et al.</i> (1980); Ribeiro Jr. <i>et al.</i> (1987).
Anos 90	<i>Acacia, Albizia, Inga, Leucaena, Dalbergia, Mimosa</i>	Brito (1997); Diaz (1995); Faria <i>et al.</i> (1995); Gonçalves <i>et al.</i> (1996); Lopes <i>et al.</i> (1994); Souza e Scholles (1996); Stamford <i>et al.</i> (1997).
Anos 00	<i>Anadenanthera, Calliandra, Clitoria, Gliricidia, Leucaena, Mimosa, Sesbania, Swartzia</i>	Bala <i>et al.</i> (2003); Chaves <i>et al.</i> (2003); Farias (2004); Gross e Caetano (2004); Mergulhão <i>et al.</i> (2001); Souza (2006); Vieira e Souza (2011).

Nesta interação simbiótica, não há um comportamento homogêneo quanto à compatibilidade com rizóbios, havendo entre os hospedeiros o grupo promíscuo, cuja nodulação é induzida por um grande grupo de estirpes de rizóbios tropicais e o grupo específico, que requer estirpes de rizóbios específicas para nodular (Bala *et al.*, 2003). No entanto, espécies com especificidade em relação aos rizóbios têm maiores respostas à inoculação de estirpes selecionadas que espécies promíscuas (Souza, 2007).

2.3. Caracterização das espécies selecionadas

2.3.1. *Clitoria fairchildiana* R.A Howard (Fabaceae, Faboideae)

Conhecida como palheteira ou sombreiro, é uma árvore pequena de até 15 m de altura, natural do estuário do rio Amazonas, com distribuição no litoral do Amapá, Pará e Maranhão (Souza, 2006). Apresenta madeira moderadamente pesada, medianamente resistente, elástica, fácil de trabalhar e por isso tem sido usada na fabricação de móveis de madeira recurvada, na

construção civil, confecção de brinquedos e caixotaria, além de ser matéria prima para a indústria de celulose e papel, compensados, palitos de fósforo, carvão e produção de lenha (Souza, 2006). É uma planta rústica, de rápido crescimento, bastante utilizada na arborização urbana e rural, principalmente nas regiões sudoeste e norte do Brasil (Trevisan *et al.*, 2004) e indispensável nos reflorestamentos heterogêneos, destinados à reconstituição de áreas degradadas (Lorenzi, 2002).

Estudos de seleção de estirpes para palheteira foram conduzidos por Souza (2006), avaliando-se a resposta à inoculação com estirpes de rizóbios isoladas de nódulos da própria espécie, em seis solos coletados sob diferentes coberturas na Zona da Mata de Pernambuco. Entre àquelas identificadas com potencial para uso como inoculante, as estirpes 1P4, 1P5 e 3P3 destacaram-se pela eficiência em três de seis solos pesquisados. As estirpes 2P5, 3P8, 4P4, 7P9, 8P3, 8P6 e 10P7 promoveram nodulação eficiente para a palheteira em dois dos seis solos testados. E por fim, as estirpes 1P2, 3P10, 7P3, 7P5, 8P4, 2P8, 2P10 e 3P2 apresentaram eficiência em apenas um dos solos avaliados, demonstrando que embora em condições variáveis, a inoculação foi necessária a todos os solos.

2.3.2. *Inga edulis* Mart. (Fabaceae, Mimosoideae)

A ingá-cipó é uma espécie nativa da região amazônica, que por apresentar múltiplos usos, encontra-se amplamente distribuída. Apresenta madeira macia, medianamente pesada e de moderada resistência mecânica, empregada na construção civil leve interna, caixotaria, embalagens, lenha, carvão, bobinas, carretéis e pasta celulósica (Lorenzi, 2002; SUDAM/ IPT, 1981).

A espécie também vem sendo utilizada na flora apícola (National Academy Science, 1979), como forrageira e nos sistemas agroflorestais para o sombreamento de cultivos associados, especialmente em capoeiras e áreas secundárias ou degradadas, pela sua capacidade de melhorar as condições de manejo e fertilidade do solo, beneficiando cultivos associados (Brito, 1997). É uma árvore de copa ampla, com altura variando de 6 a 25 m, os frutos podem atingir até 2 m de comprimento e 5 cm de diâmetro, são comestíveis, muito apreciados, bastante cultivados e comercializados nas feiras da região. A polpa do fruto é usada regionalmente em xaropes contra bronquite e a casca possui tanino que pode ser aproveitado na indústria do couro (Prance e Silva, 1975).

Brito (1997), conduziu um ensaio avaliando a eficiência fixadora de N₂ de uma coleção com 30 estirpes de *Bradyrhizobium* spp., isoladas de matrizes de ingá-cipó, ocorrentes nos solos

latossolo amarelo, argissolo vermelho amarelo e gley pouco húmico. Nesse estudo destacaram-se as estirpes 529-B1B, 529-A4A e 529-D5A, todas relacionadas com médias superiores aos tratamentos controle e com uréia, em relação aos parâmetros de diâmetro do colo, N-total acumulado, biomassa total, número de nódulos e massa nodular. De acordo com Alfaia e Souza (2002), a inoculação de bactérias do grupo dos rizóbios em ingá-cipó pode proporcionar maior conteúdo em nitrogênio total na biomassa aérea da planta e na concentração de N foliar, além de melhorar a absorção de outros macro nutrientes, como P, K, Ca, Mg e S.

3. REFERÊNCIAS

- Alfaia, S.S.; Falcão, N.P. 1993. Estudo da dinâmica de nutrientes em solos de várzea da Ilha do Careiro no Estado do Amazonas. *Amazoniana* (Kiel), Alemanha, 12(3/4): 1-9.
- Alfaia, S.S. 1997. Mineralização do nitrogênio incorporado como material vegetal em três solos da Amazônia Central. *R. bras. Ci. Solo*, 21(3): 387-392.
- Alfaia, S.S.; Souza, L.A.G. de. 2002. Perspectivas do uso e manejo dos solos da Amazônia. In: Araújo, Q.R.de. (Org.). *500 anos de uso do solo no Brasil*. Editora da UESC. Ilhéus. p.311-327.
- Allen, O.N.; Allen, E.K. 1981. *The Leguminosae: a source book of characteristics, uses and nodulation*. The University of Wisconsin Press, 812 p.
- Bala, A.; Murphy, P.J.; Osunde, A.O.; Giller, K.E. 2003. Nodulation of tree legumes and the ecology of their native rhizobial populations in tropical soils. *Applied Soil Ecology*, 22(3): 211-223.
- Barbosa, V. 2007. *Ciclos biogeoquímicos como subsídio para a sustentabilidade do sistema agroindustrial da cana-de-açúcar*. Dissertação. Universidade Estadual Paulista/Faculdade de ciências agrárias e veterinárias. São Paulo. 128p.
- Bittencourt, J.V.M.; Santos, M.H.R. 2010. Inoculantes agrícolas. In: Martin, T.N.; Waclawovsky, A.J.; Kuss, F.; Mendes, A.S.; Brun, E.J. *Sistemas de Produção agropecuária* (Ciências Agrárias, Animais e Florestais). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos, 406p.
- Borges, A.C.M.R.; Kato, O.R.; Pinheiro, H.A.P; Shiomizu, M.K.; Vasconcelos, L.G.T.R.V.; Oliveira Júnior, M.C.M. de. 2011. Crescimento e produção de fitomassa de variedades de milho em diferentes manejos da capoeira. *Pesq. Agropec. Bras.*, 46(2): 143-151.

- Brady, N.C.; Weil, R.R. 2013. *Elementos da natureza e suas propriedades dos solos*. Tradução técnica: Igor Fernando Lepsch.- 3.ed. –Porto Alegre, 686p.
- Brito, V.M. de. 1997. *Formação, caracterização e eficiência fixadora de nitrogênio de uma coleção de rizóbio para Inga cipó (Inga edulis Mart., Leguminosae)*. Monografia. Universidade Federal do Amazonas/Faculdade de Ciências Agrárias. Manaus. 57p.
- Camara, Gil Miguel de Souza. 1998. *Soja: Tecnologia de produção*. Piracicaba.
- Campêlo, A.B.; Dobereiner, J. 1969. Estudo sobre inoculação cruzada de algumas leguminosas florestais. *Pesq. Agropec. Bras.*, Rio de Janeiro, 4: 67-72.
- Chaves, L.L.B.; Carneiro, J.G.A.; Barroso, D.G.; Leles, P.S.S. 2003. Efeitos da inoculação com rizóbios e da adubação nitrogenada na produção de mudas de sesbânia em substrato constituído de resíduos agroindustriais. *R. Árvore*, Viçosa, 27(4): 443-449.
- Di Stefano, G.T.F; Fournier, L.A. 1996. Desarrollo de raíces en estacas de *Gliricidia sepium* (Fabaceae) recién establecidas. *Revista de Biología Tropical*, 44(1): 81-86. (574.05 R454).
- Diaz, P.M. 1995. Efecto de la inoculacion de *Leucaena leucocephala* con *Rhizobium* sp. y hongos micorrizogenos vesiculo-arbusculares aislados de los suelos de la costa Norte Peruana. *Rev. Florestal del Peru*, 12(1-2): 47-58.
- Dobereiner, J. 1966. Inoculação de sementeiras de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*) com *Rhizobium*. CONGRESSO PANAMERICANO DE CONSERVAÇÃO DE SOLOS, 1., São Paulo, 413-417.
- Dobereiner, J. 1984. Nodulação e fixação de nitrogênio em leguminosas florestais. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 19 (s/Nº): 83-90.
- Dobereiner, J. 1997. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. *Soil Biol. Biochem.*, 29: 771-774.

- Dobereiner, J. (Ed.). 1971. *As leguminosas na agricultura tropical*. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura. p. 211-247.
- Duhoux, E.; Dommergues, Y. 1985. The use of nitrogen fixing trees in forest and soil restoration in the tropics. In: *Biological nitrogen fixation in Africa*. Eds. SSALI, H.; KEYA, S.O. Proceeding of the first conference of the African association for biological nitrogen fixation, Nairobi, p. 384-400.
- Faria, S.M.; Silva, G.G.; Franco, A.A. 1984. Seleção de estirpes de *Rhizobium* sp. para leguminosas arbóreas. *Reunião Latino-Americana sobre Rhizobium 17.*, Campinas, ALAR/IAC, Anais..., p. 103-112.
- Faria, M.P.; Siqueira, J. O.; Vale, F.R.; Curi, N. 1995. Crescimento de leguminosas arbóreas em resposta a fósforo, nitrogênio, fungo micorrízico e rizóbio. I. *Albizia lebbek* (L.) Benth. *R. Árvore*, Viçosa, 19(3): 293-307.
- Farias, S.G.G.; Freire, A.L.O.; Santos, D.R.; Miranda, J.R.P.; Alves, A.R.; Farias Júnior, J.A. 2004. *Avaliação da inoculação de estirpes de Bradyrhizobium sp. em leucena (Leucaena leucocephala (Lam.) De Vit.) submetida à salinidade*. FERTBIO 2004, Lages, SC, CD-ROM, 4p.
- Franco, A.A.; Faria, S.M.; Silva, G.G.; Ribeiro Júnior, W.Q.; Jesus, R.M. 1986. Obtenção de *Rhizobium* sp. para inoculantes de leguminosas arbóreas. CONGRESSO BRASILEIRO DE SILVICULTURA, 5., Olinda, SBA, Anais..., p. 23-28.
- Franco, A.A.; Dobereiner, J. 1994. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. *Summa Phytopathologica*, Jaguariúna, 20(1): 68-73.
- Franco, A.A.; Faria, S.M. 1997. The contribution of N₂ fixing tree legumes to land reclamation na sustainability in the tropics. *Soil Biol. Biochem.*, 29 (5/6): 897- 903.
- Freire, J.R.J.; Vidor, C.; Bremmer, H. 1975. Efeito de diferentes níveis de inoculação e da calagem na simbiose de *Rhizobium* e *Glycine max* (L.) Merrill, em oxisol ácido do Planalto

Riograndense. In: *Reunion Latino Americana sobre Rhizobium*, 7., 1975, Resistencia. Anais... Instituto Agrotecnico, Facultad de Ciencias Agrárias, p. 124-129.

Gonçalves, L.M.B.; Scotti, M.R.M.M.; Batista, D.F. 1996. *Crescimento de Dalbergia nigra (jacarandá da Bahia) sob diferentes tratamentos de inoculação em dois tipos de solo*. CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 3., Brasília, Depto. de Ecologia da UNB, Resumos, Cap. 1., p. 25.

Gross, E.; Cordeiro, L.; Caetano, F.H. 2004. Nodulação e micorrização em *Anadenanthera peregrina* var. *falcata* em solo de cerrado autoclavado e não autoclavado. *R. bras. Ci. Solo*, Viçosa, 28: 95-101.

Halliday, J. 1984. Integrated approach to nitrogen fixing tree germoplasm development. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 19 (s/nº): 91-117.

Hungria, M.; Araújo, R.S. 1994. *Manual de Métodos empregados em estudos de Microbiologia Agrícola*. Brasília: EMBRAPA-CNPAF, Documentos n.46, 542p.

Hungria, M.; Campo, R.J. 2006. Fixação biológica do nitrogênio em sistemas agrícolas. In: *Congresso Brasileiro de Ciências do Solo*, 30, Recife, Anais... Recife. 2005. Palestra. CD ROOM.

Judd, W.S. Campbell, C.S.; Kellong, E.A.; Stevens, P.F.; Donoghue, M.J. 2009. *Sistemática vegetal: um enfoque filogenético*. Tradução: André Olmos Simoes, Rodrigo Singer, Rosana Farias Singer e Tatiana Teixeira de Souza Chies -3.Ed. Porto Alegre: Artmed.

Kreibich, H.; Lehmann, J.; Scheufele, G.; Kern, J. 2003. Nitrogen availability and leaching during the terrestrial phase in a várzea forest of the central Amazon floodplain. *Biol. Fertil. Soils*, 39: 62-64.

Lewis, G. P.; Schrire, B.; Mackinder, B.; Lock, M. 2005. *Legumes of the world*. Kew Publishing. 592pp.

- Lima, H.C. 2010. Fabaceae. In: FORZZA, R.C. *et al.*, (Org.) *Catálogo de plantas e fungos do Brasil*. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2: 989-1102.
- Lopes, A.J.R.; Stanford, N.P.; Lucena, N.M. 1994. Seleção de estirpes de *Rhizobium loti* para leucena sob condições de acidez sob regime de temperatura elevada. REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 21., Petrolina, Anais... N^o. 104, SBCS, EMBRAPA/CPATSA, p. 197-199.
- Lorenzi, H. 2002. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil*. (4^aed.). Instituto Plantarum, Nova Odessa, v.1, 384p.
- Malavolta, E.; Vitti, G.C. ; Oliveira, S.A. 1989. *Avaliação do estado nutricional das plantas. Princípios e Aplicações*, Piracicaba, Potafós, 201p.
- Marschner, H. 1990. Functions of mineral nutrients: Macronutrients. In: MARSCHNER, H. 1990. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press, London, 4^a Ed., 8: 195-267.
- Mercante, F.M.; Franco, A.A. 2000. Expressão dos genes nod e *Rhizobium tropici*, *R. etli* e *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e estabelecimento da nodulação do feijoeiro na presença de exsudatos de sementes de *Mimosa flocculosa* e *Leucaena leucocephala*. *R. bras. Ci. Solo*, 24: 301-310.
- Mergulhão, A.C.E.S.; Silva, M.L.R.B.; Burity, H.A.; Stamford, N.P. 2001. Influência da dupla inoculação rizóbios e fungos micorrizas-arbusculares em plantas de sabiá sob solos de diferentes texturas. *Revista Ecosystema*, 26(1): 42-47.
- Moreira, F.M.S.; Silva, M.F.; Faria, S.M. 1992. Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region. *New Phytol.*, 121: 563-570.
- Moreira, F.M.S. 1994. Fixação Biológica do nitrogênio em espécies arbóreas. In: Araújo, R.S.; Hungria, M. (Eds.) *Microorganismos de Importância Agrícola*. EMBRAPA-CNPAF, Goiânia, Documentos 44: 121-149.

- Moreira, F.M.S. 1997. Nurse growth and nodulation of forty-nine woody legume species native from Amazonia. *R. bras. Ci. Solo*, 21: 581-590.
- Moreira, F.M.S. 2008. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam Leguminosae. In: *Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros*. Moreira, F.M.S.; Siqueira, J.O.; Brussaard, L. (Eds.), Lavras, UFLA. p. 621-680.
- National Academy of Sciences. 1972. *Soils of the Humid Tropics*. Washington, D.C., E.U.A. 219 p.
- National Academy of Sciences, 1979. *Tropical legumes resource for the future*. Livr. Congress. Catalogo, Washington, D.C., 332p.
- Neves, Maria Cristina Prata. Certificação na Produção Agrícola –Comunicação das novas dimensões da qualidade dos produtos. Embrapa Agrobiologia, 15 p. (Documentos 239), 2007.
- Odum, E.P. 1983. *Ecologia*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Prance, G.T.; Silva, M.F. 1975. *Árvores de Manaus*. Manaus, INPA, 312p.
- Ribeiro, J.R.A.; Rodrigues, L.C.B.; Torres, B.H.P.; Oliveira, J.P.; Figueiredo, M.V.B.; Burity, H.A. 2004. *Eficiência simbiótica de isolados de rizóbio de áreas degradadas e nativas da região de caatinga*. FERTBIO 2004, Lages-SC, CD-ROM, SBCS, 3p.
- Ribeiro Júnior, W.Q.; Franco, A.A.; Lopes, E.S. 1987. Eficiência e competitividade de estirpes de *Bradyrhizobium* spp para *Enterolobium contortisiliquum* em latossolo ácido. *R. bras. Ci. Solo.*, Campinas, 10: 219-225.
- Schuh, Carlos Alberto. 2005. Biopolímeros como suporte para inoculantes. *Dissertação* (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) –Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 92p.

- Róndon, M.A.; Asakawa, N.M.; Ocampo, G.I. ; Thomas, R. 1996. *Inoculación de leguminosas arbustivas com rhizobio en suelos ácidos de ladera del sur de Colômbia*. REUNIÓN LATINOAMERICANA DE RHIZOBIOLOGIA, 18., Santa Cruz de la Sierra, ALAR. PIJNENB ORG, J.; RUÍZ, D. ; SILA, W. (Eds.) Memorias, Bolívia, p. 111-113.
- Silva, M.G.; Faria, S.M. 1995. *Estirpes de alta eficiência na fixação de nitrogênio por leguminosas de múltiplo uso*. CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 25., Viçosa, SBCS/UFV, Resumos Expandidos, 1: 525-527.
- Silva, M.F.; Souza, L.A.G. 2002. Levantamento das leguminosas do arquipélago das Anavilhanas, Baixo Rio Negro, Amazonas. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série botânica*, 18(1): 3-35.
- Souza, L.A.G. de; Silva, M.F. da; Moreira, F.W. 1994. Capacidade de Nodulação de cem leguminosas da Amazonia. *Acta Amazonica*, 24(1/2): 9-18.
- Souza, L.A.G.; Scholles, D. 1996. *Efeito da inoculação de mudas de Acácia negra (Acacia mearnsii), com rizóbios em solo Podzólico Vermelho Escuro*. CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DO SOLO, 13., Águas de Lindóia, SLACS/SBCS/ESALQ/SBM, Resumos Expandidos, CD-ROM, 4p.
- Souza, L.A.G., Silva, M.F., Moreira, F.M.S. 1997. Associações rizóbio arbóreas na Amazônia. In: *Duas décadas de contribuições do INPA à pesquisa agrônômica no trópico úmido*. ed. Manaus, AM: INPA, 1:193-219.
- Souza, L.A.G. 2006. Biodiversidade de rizóbios e eficiência da fixação de nitrogênio em solos da mata Atlântica de Pernambuco, Tese de Doutorado da UFRPE, Recife, 128p.
- Souza, L.A.G.; Bezerra Neto, E.; Santos, C.E.R.S.; Stamford, N.P. 2007. Desenvolvimento e nodulação natural de leguminosas arbóreas em solos de Pernambuco. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 42(2): 207-217.
- Souza, L.A.G., Aguiar, A.M.C.S.P. 2009. *Contribuição para o check-list das Fabaceae de*

Pernambuco. Opção Gráfica, Natal. 172p.

- Stamford, N.P.; Cabral, C.D.G.; Almeida, B.G. 1997. Efeito da salinização em sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia*) inoculada e com N-mineral em solo do semi-árido. CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 26., Rio de Janeiro, SBCS, CD-ROM., Resumos Expandidos, 4p.
- Stumm, W.; Morgan, J.J. 1996. *Aquatic Chemistry: Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters*. 3rd ed., John Wiley e Sons, Inc., New York, 1022 p.
- Trevisan, H; Nadai, J.; Lunz, A. M.; Carvalho, A.G. 2004. Consumo foliar e aspectos biológicos de *Urbanus acawoios* (Lep.: HesperIIDae) alimentado com folíolos de *Clitoria fairchildiana* (Leguminosae: Faboideae) em três níveis de maturidade. *Ciência Rural*, Santa Maria, 34(1): 1-4.
- Trinick, M.J. 1965. Effectiveness of nodulation of *Vigna sinensis* and other tropical legumes with fast growing Rhizobia isolated from *Leucaena leucocephala*. *Rhiz. Newsl.* 10(2): 164-169.
- Trinick, M.J. 1968. Nodulation of tropical legumes. I. Specificity in the *Rhizobium* symbiosis of *Leucaena leucocephalla*. *Exp. Agric.*, London, 4: 243-253.
- Vessey, J. Kevin. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255: 571-586.
- Vieira, E.P; Souza, L.A.G. 2011. Inoculação com rizóbios em mudas de igapó e saboarana. *Rev. Ci. Agra.*, 54(1): 275-283.

Capítulo I

Seleção de estirpes de rizóbios para ingá-de-metro (*Inga edulis* Mart.) em duas classes de solos ácidos da Amazônia Central

Seleção de estirpes de rizóbios para ingá-de-metro (*Inga edulis* Mart.) em duas classes de solos ácidos da Amazônia Central

Naiana Marinho de Souza¹, Luiz Augusto Gomes de Souza²

¹ Pós-graduanda em Agricultura no Trópico Úmido, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, Av. André Araújo, 2936, Aleixo. 69060-001, Manaus, AM.
naiana.marinho@inpa.gov.br

²CSAS-INPA, Caixa Postal 478, Manaus, AM- Brasil. souzalag@inpa.gov.br

RESUMO- A ingá-de-metro (*Inga edulis*) é uma das mais importantes leguminosas arbóreas de múltiplo uso para cultivo em solo ácido e de baixa fertilidade da Amazônia em sistemas de produção agrícola sustentáveis em N₂. O objetivo desta pesquisa foi selecionar estirpes de rizóbios eficientes na fixação de N₂ para emprego como inoculante de ingá-de-metro em solo de terra firme da Amazônia Central. Os solos selecionados foram: Argissolo Vermelho Amarelo coletado em Sistemas Agroflorestais e Latossolo Amarelo de pastagem abandonada. Foram avaliadas as seguintes estirpes da coleção do INPA: 828, 831, 832, 833, 841, 842, 844, 847, 850 e 852. As sementes de ingá foram germinadas em areia e transplantadas para sacos com 2 kg de solo, mantidas em viveiro. As formas de suprimento de N para as mudas foram: à inoculação individual das estirpes, plantas sem inoculação e sem adubação nitrogenada e plantas fertilizadas com N-mineral (ureia, 0,11 g kg⁻¹ de solo). Foram fornecidos 5 mL de inoculante líquido aplicado na base do colo de mudas transplantadas. O crescimento, desenvolvimento, nodulação e absorção de N foram acompanhados no ensaio. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 2 x 12, (2 solos e 12 formas de suprimento de nitrogênio), com 10 repetições. Demonstrou-se que o ingá-de-metro responde eficientemente a inoculação com estirpes selecionadas, permitindo a formação de mudas bem noduladas e aptas ao plantio definitivo. Aos 91 dias, as plantas apresentavam médias de 23,6 cm de comprimento do caule, 4,7 mm de diâmetro do colo, 206 nódulos plantas⁻¹ e 3,13 % de N na biomassa foliar. A adubação com N-mineral inibiu a formação e desenvolvimento dos nódulos do ingá. A eficiência simbiótica foi demonstrada pela correlação linear significativa entre a biomassa foliar e dos nódulos. As estirpes 831 e 844 apresentaram potencial para uso como inoculante microbiano da espécie pela simbiose eficiente estabelecida nos dois solos pesquisados.

Palavras-chave: Microbiologia do Solo, Fixação de N₂, Leguminosas arbóreas.

Rhizobia strains selection for ingá-de-metro (*Inga edulis* Mart.) in two soils acid classes from Central Amazonian

ABSTRACT- Ingá-de-metro (*Inga edulis*) it is one of the most important legume tree of multiple uses for cultivation in acid soil and of low fertility of the Amazonian, in systems of agricultural production sustained in N₂. The objective of this research was to select strains of efficient Rhizobia in the fixation of N₂ for employment as ingá-de-metro inoculant in soil of “terra-firme” of the Amazonian Central. The selected soils were: one Ultisol collected in Agroforestry Systems and one Oxisoil from pasture degraded. They were appraised the following strains of the INPA collection: 828, 831, 832, 833, 841, 842, 844, 847, 850 and 852. The ingá seeds were germinated in sand and transplanted for bags with 2 soil kg, maintained in nursery. The forms of supply of N for the seedlings were: to the individual inoculation of the strains, plants without inoculation and without N-mineral and plants fertilized with N-mineral (ureia, 0,11 g kg⁻¹ de soil). Were applied 5 mL of liquid inoculant supplied in the stem base of transplanted seedlings. The growth, development, nodulation and N absorption were accompanied in the rehearsal. The experimental design was it entirely random, with factorial arrangement 2 x 12, (2 soils and 12 forms of nitrogen supply), with 10 repetitions. It was demonstrated that the ingá-de-metro answers the inoculation efficiently with selected strains, allowing the formation of seedlings well nodulated and capable to the definitive planting. To the 91 days, the plants presented averages of 23,6 cm of length of the stem, 4,7 mm of diameter of the stem base, 206 nodules plant⁻¹ and 3,13% of N in the leaves biomass. The fertilization with N-mineral inhibited the formation and development of the nodules of ingá. The symbiotic efficiency was demonstrated by the significant lineal correlation among the leave biomass and of the nodules. The strains 831 and 844 presented potential for use as microbial inoculant of the species for the efficient symbiosis established in the two researched soils.

Key-words: Soil Microbiology, N₂ fixation, legume tree.

1.1. INTRODUÇÃO

A fixação biológica de nitrogênio - FBN por leguminosas, baseada na simbiose entre a planta hospedeira e as bactérias do grupo dos rizóbios é a principal fonte biológica de N para a agricultura e considerada como a de maior expressão econômica (Burity *et al.*, 2000). A FBN decorrente da simbiose tem contribuições para a agricultura sustentável, fundamentada na redução dos custos da produção e na preservação do meio ambiente (Siqueira, 1983; Stamford, 1997). Assim, a tecnologia de inoculação de material selecionado de bactéria e planta já é adotada correntemente em cultivos econômicos agroindustriais como na lavoura da soja (*Glycine max*), e apresenta potencial para outros cultivos não convencionais.

As bactérias fixadoras de N₂ associadas a leguminosas (família botânica Fabaceae) apresentam diversidade biológica e funcional. Segundo Moreira (2008), nas coleções brasileiras de rizóbios as relações filogenéticas das bactérias fixadoras de N₂ que nodulam Fabaceae são: na Família Rhizobiaceae os gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Allorhizobium*; na família Bradyrhizobiaceae, os gêneros *Bradyrhizobium* e *Blastobacter*; na família Xanthobacteriaceae o gênero *Azorhizobium*; na família Hyphomicrobiaceae o gênero *Devosia*; na família Phyllobacteriaceae os gêneros *Phyllobacterium* e *Mezorhizobium*; na família Methylobacteriaceae, o gênero *Methylobacterium*; na família Brucellaceae o gênero *Ochrobactrum* e, finalmente, na família Burkholderiaceae os gêneros *Burkholderia* e *Ralstonia*.

A existência de 13 gêneros de bactérias fixadoras de N₂, reconhecida em anos recentes sugere que este número ainda está em elevação, o que será comprovado por novas descrições originais. Os instrumentos científicos atuais, baseados na biologia molecular tem permitido um aumento do conhecimento da taxonomia de microrganismos, reclassificando grupamentos antes definidos pela função que exerciam, por sua estrutura genética constituinte.

Na flora amazônica, várias espécies de leguminosas como a cedrorana (*Cedrelinga cateniformis*), o ingá-de-metro (*Inga edulis*), a sucupira (*Diploptropis purpurea*), o anjelim-da-mata (*Hymenolobium excelsum*), a faveira camuzé (*Stryphnodendron guianense*), o paracaxi (*Pentaclethra maculosa*), entre outras (Souza *et al.*, 1994), possuem a propriedade de fixar nitrogênio em simbiose com bactérias do grupo dos rizóbios. Um extenso levantamento da habilidade nodulífera de leguminosas da Amazônia foi apresentado por Moreira *et al.* (2002).

Por apresentar múltiplos usos, a ingá-de-metro encontra-se amplamente distribuída em todos os estados da região, onde é aproveitada principalmente como planta frutífera cujo arilo que envolve as sementes definido como sarcotesta esbranquiçada é produzido em abundância, ou como planta para sombreamento das casas e quintais. Os frutos são comercializados em

feixes nas feiras e mercados locais. Com comportamento subespontâneo, ocorre também em outros biomas do país, exceto nos estados mais ao sul, onde seu crescimento é comprometido pela existência de uma estação climática mais fria.

Esta espécie apresenta madeira macia, medianamente pesada e de moderada resistência mecânica, empregada na construção civil leve interna, caixotaria, embalagens, lenha, carvão, bobinas, carretéis e pasta celulósica (Lorenzi, 2002). Entre os outros usos desta espécie se incluem: suplemento alimentar das abelhas no manejo da meliponicultura (NAS, 1979), como planta forrageira especialmente para ruminantes, que consomem folhas e frutos, e na combinação de espécies em sistemas agroflorestais, especialmente nos solos ácidos da terra firme da Amazônia. A ingá-de-metro também é utilizada com sucesso para poda regular em sistemas de produção em aleias e no enriquecimento de capoeiras e áreas secundárias ou degradadas, pela sua capacidade de melhorar as condições de fertilidade do solo e controle de plantas pioneiras (Lojka *et al.*, 2012).

Para melhor aproveitamento do potencial da FBN de espécies nodulíferas, há necessidade das plantas estabelecerem associações eficientes com rizóbios específicos, pois, o grau de incompatibilidade entre leguminosas e rizóbios tem sido considerado uma das maiores limitações da simbiose. Em decorrência, quanto ao padrão de permissividade a diferentes grupos de rizóbios as leguminosas têm seu comportamento classificado como específico ou promíscuo. Deste modo, pesquisas sistemáticas devem ser direcionadas para a seleção de estirpes de rizóbios eficientes para cada espécie prioritária (Farias *et al.*, 2004), sobretudo para àquelas que prestarão serviços ao agroecossistema, relacionados com a melhoria da fertilidade do solo, com contribuições aos sistemas de produção sustentáveis em nitrogênio ou na recuperação de áreas degradadas. Além, naturalmente, de um produto específico que possam oferecer.

Recentemente, Vieira e Souza (2011) avaliaram o efeito da inoculação com rizóbios em acapu-do-igapó (*Swartzia argentea* Benth.) e saboarana (*S. laevicarpa* Amshoff) e constataram que a inoculação com rizóbios na fase viveiro substituiu a necessidade de N mineral, proporcionou elevada nodulação e contribuiu para a formação de mudas com boa qualidade para o plantio definitivo. Ao comparar a inoculação de rizóbios com a adubação química na cultura do feijoeiro, Ferreira *et al.* (2000) e Venturini *et al.* (2002) demonstraram que a prática da inoculação pode substituir com eficiência a adubação com nitrogênio mineral sem afetar a produção, com médias de produtividade de 2.040 a 4.330 kg.ha⁻¹.

Brito (1997), avaliou a eficiência fixadora de N₂ de 30 estirpes de *Bradyrhizobium* spp., isoladas de matrizes de ingá-de-metro, isoladas de solos amazônicos. Nesse estudo

destacaram-se as estirpes 529-B1B, 529-A4A e 529-D5A, substituindo eficientemente a adubação com ureia, e formando mudas noduladas com boa qualidade para o plantio. De acordo com Alfaia e Souza (2002), a inoculação de bactérias do grupo dos rizóbios em ingá-de-metro pode proporcionar maior concentração de N-foliar e nitrogênio total na biomassa aérea da planta, além de melhorar a absorção de outros macronutrientes.

Este estudo foi conduzido com o objetivo de selecionar estirpes de rizóbios eficientes na fixação de N₂ para uso como inoculante de ingá-de-metro (*Inga edulis*) em solo Argissolo Vermelho Amarelo e Latossolo Amarelo na Amazônia Central.

1.2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nas instalações da Coordenação de Sociedade, Ambiente e Saúde do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – CSAS/INPA, no Campus do V-8, em Manaus, AM, durante os meses de junho a dezembro de 2012. Os trabalhos foram desenvolvidos em sementeira e viveiro de produção de mudas do Laboratório de Microbiologia do Solo. A sementeira é constituída por um galpão aberto com cobertura de telhas de barro e o viveiro tem estrutura de ferro, chão cimentado e cobertura com tela de sombrite 50 % de luz incidente.

1.2.1. Caracterização fenotípica e fisiológica das estirpes

Para a escolha das estirpes de ingá-de-metro, foram consultados estudos prévios (Alfaia e Souza, 2002) para pré-seleção das estirpes na Coleção de Rizóbios do Laboratório de Microbiologia do Solo do INPA (Souza, 1996). As estirpes avaliadas neste estudo foram: 828, 831, 832, 833, 841, 842, 844, 847, 850 e 852. Na coleção, as estirpes são preservadas em tubos de vidro com tampa rosqueável em caixas de madeira compartimentadas e acondicionadas em armários de aço, à temperatura ambiente ($\pm 24^{\circ}\text{C}$). Para cada estirpe foram selecionados três tubos para incubação em placas de Petri contendo meio de cultura YMA, pH 6,0 sem a adição de corante, sendo posteriormente levadas à estufincubadora à temperatura ambiente do laboratório ($\pm 23^{\circ}\text{C}$).

Após o crescimento dos isolados, as observações foram feitas aos sete e 15 dias, quando foram aplicados os descritores propostos por Somasegaran e Hoben (1985). Foi registrado o número na coleção, tempo de crescimento, coloração das colônias, diâmetro máximo individual, forma, produção de muco, coalescência, elevação e consistência.

O diâmetro das colônias foi registrado como o maior diâmetro observado, em uma colônia individual. A forma pode variar entre circular ou puntiforme. O tipo de elevação foi definido como achatada, convexa ou pulvinada. Para a avaliação da consistência das colônias foi utilizada uma alça de platina. As variações encontradas são: gomosas, viscosas, butirosas, aquosas ou coriáceas. A produção de muco, que se refere aos exopolissacarídeos produzidos e a coalescência dos isolados foi definida em termos de pouca, média ou alta.

1.2.2. Coleta, preparo e análise do solo

Para este experimento foram selecionados dois solos ácidos da terra firme da Amazônia Central: Argissolo Vermelho Amarelo, obtido sob um sistema agroflorestal na Estação Experimental de Hortaliças do INPA, localizada no Km 14 da Rodovia AM-010, em Manaus, AM (02° 59' 71,5'' S e 60° 01' 38,2'' W) e Latossolo Amarelo, obtido em pastagem abandonada, na Estação Experimental da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), no Km 40 da BR 174, município de Manaus, AM (02° 39' 10,3'' S 60° 03' 32,5'' W). Esta área de coleta de Latossolo Amarelo tinha um histórico de adubação e correção do solo.

Para coleta dos solos removeu-se a vegetação de cobertura quando existente extraindo-se o horizonte A, com profundidade de 0-20 cm, com auxílio de uma enxada. Após o transporte, o solo foi destorroado, seco ao ar e passado em peneira com malha de 2 cm, sendo posteriormente distribuído em sacos pretos de polipropileno para mudas nas dimensões de 22 x 16 cm, com diâmetro de abertura de 11 cm, com capacidade para 2 kg de solo. Nas áreas de coleta dos solos, uma amostra foi separada para análise química que foi efetuada no Laboratório Temático de Solos e Plantas do INPA - LTSP, em Manaus, AM. Foram determinados o pH do solo, níveis de alumínio trocável e teores disponíveis de Ca, Mg, Al, K, P, Zn, Cu e Mn. O pH foi determinado em água (1:2,5). Para o cálcio, magnésio e alumínio a solução extratora foi o KCl 1N. O potássio foi determinado por fotometria de chama e o fósforo foi extraído e determinado por espectrofotometria (EMBRAPA, 1997). As determinações efetuadas estão apresentadas na Tabela 1.1.

Antecedendo a condução do ensaio de seleção de estirpes, para reduzir o nitrogênio naturalmente disponibilizado pela manipulação dos solos, após sua distribuição nos recipientes foi cultivado milho (*Zea mays* L.), variedade BR 5110, por 45 dias. Em seguida, o milho foi cortado rente à superfície do solo.

Tabela 1.1 Potencial hidrogeniônico, teores de bases trocáveis e outras propriedades químicas de um solo Argissolo Vermelho Amarelo sob sistema agroflorestal e um Latossolo Amarelo sob pastagem, no Município de Manaus, AM.*¹

Solos	Ph (H ₂ O)	Ca	Mg	K	Al	P	Fe	Zn	Mn
		-----c mol _c kg ⁻¹ -----					----- mg kg ⁻¹ -----		
Argissolo	4,21	0,83	0,08	0,08	0,84	3,9	137,0	2,1	1,7
Latossolo	6,04	3,05	1,24	0,19	0,04	1,5	127,0	1,9	11,7

Após a colheita do milho, os solos receberam uma adubação de correção (Halliday, 1984). O peso médio dos sacos para mudas preenchidos com o solo Argissolo Vermelho Amarelo foi de 2,0 kg e a adubação constituiu-se de 0,47 g kg⁻¹ de superfosfato triplo, 0,17g kg⁻¹ de cloreto de potássio e 0,50 g kg⁻¹ de calcário dolomítico. Os recipientes preenchidos com solo Latossolo Amarelo pesaram em média 1,7 kg sendo adubados com 0,47g kg⁻¹ de superfosfato triplo, 0,17g kg⁻¹ de cloreto de potássio e 0,50g kg⁻¹ de calcário dolomítico. A solução líquida de micronutrientes foi preparada com 3,95 g de sulfato de cobre; 2,23 g de sulfato de zinco; 0,25 g de ácido bórico; 0,50 g de molibdato de sódio; 5,00 g de sulfato de ferro e 5,00 g de ácido cítrico (Eira *et al.*, 1972), aplicando-se 1 mL kg⁻¹.

1.2.3. Obtenção de propágulos, germinação das sementes, preparo de inoculante e condução do experimento

Os frutos de ingá-de-metro foram coletados em matrizes cultivadas em quintais de uma propriedade agrícola na comunidade Vila Canaã, BR 174, Ramal ZF-1, no Município de Manaus, AM. Após a extração das sementes estas permaneceram 24 h em água antecedendo a semeadura. A semeadura foi efetuada em caixas plásticas drenadas de tamanho 40 x 60 cm, com 15 cm de profundidade, preenchidas com areia lavada. As sementes foram dispostas em linhas entre areia semeadas a 2 cm de profundidade. A irrigação da sementeira foi feita diariamente. Quando as plântulas apresentaram o segundo par de folhas definitivas, foi realizada a repicagem para os sacos.

O experimento foi conduzido simultaneamente nos dois solos selecionados sendo consideradas as seguintes formas de suprimento de nitrogênio: testemunha (sem inoculação e sem adubação nitrogenada), testemunha nitrogenada (sem inoculação e com suprimento de nitrogênio mineral) e a inoculação individual com as estirpes 828, 831, 832, 833, 841, 842, 844, 847, 850 e 852. O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial do tipo 2 x 12, constituído por dois solos (Argissolo Vermelho Amarelo e

Latossolo Amarelo) e 12 formas de suprimento de nitrogênio, com 24 tratamentos e 10 repetições.

A testemunha com nitrogênio mineral correspondeu à adição de ureia de forma parcelada e com incorporação ao solo, que foi efetuada com o auxílio de um bastão de vidro. O solo Argissolo Vermelho Amarelo recebeu $0,11 \text{ g kg}^{-1}$ de ureia e o solo Latossolo Amarelo recebeu $0,11 \text{ g kg}^{-1}$, com parcelamento aos 3 e 33 dias após o transplante, 50 % da dosagem a cada aplicação. O preparo do inoculante consistiu na incubação individual das estirpes em meio YMA pH 6,0, sem ágar, para obtenção de uma suspensão líquida de rizóbios (Hungria e Araújo, 1994), distribuído em erlenmeyers de 125mL e mantidos sob agitação permanente, em um agitador mecânico horizontal, por 10 dias. A inoculação foi efetuada com o auxílio de uma pipeta individual, aplicando-se 5 mL do inoculante na base do colo das plântulas transplantadas.

Durante a condução do ensaio, as plantas foram irrigadas em dias não chuvosos, sendo feita o deslocamento regular dos recipientes para evitar enraizamento e a remoção das plantas invasoras, por extração manual. No acompanhamento de crescimento das mudas foram tomadas medidas do diâmetro do colo e comprimento do caule, aos 1º, 30, 60 e 90 dias após a aplicação dos tratamentos. O diâmetro do colo foi tomado na superfície do solo, com paquímetro. Como comprimento do caule foi considerado a distância entre a superfície do solo e o meristema principal da planta, feito com régua. Para estimar a taxa de incremento mensal empregou-se a fórmula $(h_2 - h_1 / t_2 - t_1) \times 30$, de acordo com Benincasa (1988), onde h_2 e h_1 equivalem ao comprimento do caule no t_2 e t_1 , respectivamente. O mesmo procedimento foi efetuado para as medidas do diâmetro do colo.

Após 91 dias do transplante foi efetuada a colheita e avaliação das plantas, extraindo-se a planta inteira de cada saco, destorroando-se o solo contido nas raízes. As raízes das plantas foram lavadas cuidadosamente sobre uma peneira para evitar a perda de nódulos. Os nódulos presentes no sistema radicular das mudas foram destacados e contados. Com o auxílio de uma tesoura de poda, foi separada a parte aérea das raízes. Foram determinados a biomassa da parte aérea fresca e seca das raízes, caule, folhas e nódulos após secagem. A secagem foi realizada em estufa a 65°C por 72 h. A biomassa do caule foi determinada pela subtração da biomassa das folhas na biomassa da parte aérea seca. A relação raiz/parte aérea correspondeu à razão entre essas variáveis com base seca e o peso específico dos nódulos foi a razão entre a biomassa dos nódulos seco e o número de nódulos. As folhas secas foram moídas para determinações da concentração de nitrogênio efetuadas no Laboratório Temático de Solos e Plantas do INPA, nessa determinação foi considerada a biomassa das folhas secas para cada tratamento. Nas análises empregou-se a digestão sulfúrica adotando-se o método de Kjeldahl.

Para comparação das médias dos tratamentos, empregou-se a Anova. O processamento estatístico foi realizado no programa Estat (UNESP, 2002), versão, utilizando-se o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Os dados em porcentagem foram transformados em arco-seno $(x+0,01)^{0,5}$, de acordo com Centeno (1990). Para estimar a eficiência da simbiose nas mudas de ingá-de-metrofoi avaliada a significância da correlação entre variáveis de desenvolvimento e indicadores de nodulação das plantas.

1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As dez estirpes de rizóbios avaliadas neste experimento apresentaram características culturas e morfológicas típicas, com tempo de crescimento entre 13 e 16 dias e outras características fenotípicas comumente observadas em bactérias diazotróficas (Tabela 1.2). Em meio sem corante a maioria das estirpes apresentou coloração branca, variando entre as cores branco creme, branco gelo e branco pálido, com apenas uma estirpe com coloração creme.

No período de incubação, o tamanho das colônias variou entre < 0,5 a 2,0mm. As colônias com < 0,5 mm foram puntiformes e as demais foram circulares. A intensidade da produção de muco variou entre as estirpes. O tipo de elevação foi descrita como convexa para 80% das estirpes. A consistência butirosa ou amanteigada prevaleceu entre as estirpes, mas algumas foram viscosas, ou seja, quando tocadas com a alça de plantinha distendem-se de modo elástico. Uma ilustração geral de três das estirpes avaliadas como inoculante para o ingá-de-metro está apresentada na Figura 1.

Tabela 1.2. Características fenotípicas e fisiológicas das estirpes de rizóbios da coleção do INPA, isoladas de nódulos de ingá-de-metro (*Inga edulis*), incubadas em meio YMA, pH 6,0.^{*1}

Estirpes	Incuba- ção (dias)	Colo- ração	Tama- nho (mm)	Forma	Produção de muco	Coales- cência	Elevação	Consis- tência
828	16	BP	< 0,5	Puntiforme	Alta	Alta	Convexa	Butirosa
831	13	BC	1,0	Circular	Média	Média	Convexa	Viscosa
832	13	BG	2,0	Circular	Média	Pouca	Pulvinada	Viscosa
833	13	BG	1,0	Circular	Média	Média	Convexa	Butirosa
841	16	C	1,0	Circular	Média	Média	Convexa	Butirosa
842	16	BG	< 0,5	Puntiforme	Alta	Alta	Convexa	Butirosa
844	13	BG	2,0	Circular	Pouca	Média	Pulvinada	Butirosa
847	16	BP	1,0	Circular	Média	Média	Convexa	Butirosa
850	16	BG	< 0,5	Puntiforme	Média	Média	Convexa	Butirosa
852	16	BP	< 0,5	Puntiforme	Média	Média	Convexa	Butirosa

*1 – BC – Branco creme, BG – Branco gelo. BP – Branco pálido, C – Creme.



Figura 1.1. Características fenotípicas de estirpes de rizóbios 831, 841 e 844, da coleção de rizóbios do INPA, isoladas de ingá-de-metro (*Inga edulis*), avaliadas para uso como inoculante microbiano.

1.3.1. Seleção de estirpes de rizóbios para ingá-de-metro em argissolo vermelho amarelo e Latossolo Amarelo

Aos 91 dias de enviveiramento as plantas de ingá-de-metro apresentavam qualidade adequada para o plantio definitivo, com folhagem bem estabelecida, diâmetro do colo desenvolvido, altura adequada e aspectos fitossanitários saudáveis. Em ambos os solos as mudas apresentaram boa adaptação e a média geral de sobrevivência foi de 96%.

A formação de mudas de ingá-de-metro variou consideravelmente entre os dois tipos de solo pesquisados, exceto para o diâmetro do colo e a biomassa seca do caule das plantas, avaliadas após 3 meses de enviveiramento (Tabela 1.3). No solo Latossolo Amarelo, as mudas apresentaram crescimento no comprimento do caule e incremento mensal de crescimento do caule e diâmetro do colo superior as que se desenvolveram em solo Argissolo Vermelho Amarelo. Em solo Latossolo Amarelo a velocidade de crescimento do comprimento do caule do ingá-de-metro foi de quase 5 cm mês^{-1} e para o diâmetro do colo de quase 1 mm mês^{-1} . Por outro lado, as plantas conduzidas em solo Argissolo Vermelho Amarelo desenvolveram maior biomassa foliar e das raízes que em Latossolo Amarelo, com incremento estimado em 15,5 e 16,5 %, respectivamente. Mesmo tendo se observado diferenças significativas na relação raiz/parte aérea entre os dois solos, os valores observados estão dentro da faixa considerada para avaliar a qualidade de mudas florestais estimada entre 0,30-0,40 por Arcoverde e Moreira (1998).

Tabela 1.3. Efeito do tipo de solo nas medidas do crescimento, produção de biomassa e relação raiz/parte aérea de mudas de ingá-de-metro (*Inga edulis*), aos 91 dias após a repicagem.^{*1}

Solos	Comprimento do caule (cm)	IMCC ^{*2} (cm)	Diâmetro do colo (mm)	IMDC ^{*2} (mm)	Biomassa seca (g)			Relação raiz/parte aérea
					Folhas	Caule	Raízes	
Argissolo	22,8 b	3,6 b	4,7 a	0,8 b	2,78 a	0,74 a	1,03 a	0,37 a
Latossolo	24,3 a	4,8 a	4,7 a	0,9 a	2,35 b	0,77 a	0,86 b	0,33 b
Teste de F	6,15 [*]	29,72 ^{**}	0,20 ^{ns}	6,20 [*]	8,60 ^{**}	0,83 ^{ns}	13,49 ^{**}	6,18 [*]

^{*1} Valores seguidos da mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si no nível de 1 ou 5% de probabilidade; ^{ns} – não significativo.

^{*2} IMCC- Incremento mensal em comprimento do caule (cm mês⁻¹); IMDC- Incremento mensal do diâmetro do colo (mm mês⁻¹).

As formas de suprimento de nitrogênio também afetaram significativamente a formação de mudas de ingá-de-metro, exceto o diâmetro do colo e seu incremento diamétrico mensal e a biomassa das folhas secas (Tabela 1.4). Sabe-se que o nitrogênio é o nutriente mais relacionado à produção de biomassa vegetal e na planta está armazenado principalmente na parte verde, especialmente nas folhas, como componente estrutural da clorofila e de proteínas e as partes lenhosas geralmente respondem menos a variações na absorção deste elemento sendo afetadas somente pelo desenvolvimento geral da planta (Epstein e Bloom, 2006; Marschner *et al.*, 1990). O comprimento do caule das mudas de ingá-de-metro foi favorecido pela inoculação com a estirpe 847 que, assim como as plantas que receberam N-mineral foram significativamente superiores ($P < 0,05$) ao tratamento testemunha, crescendo em média mais 5,1 que estas. Entretanto, a velocidade de crescimento das plantas supridas com N-mineral superou significativamente a maioria das estirpes empregadas como inoculante, exceto a estirpe 833. Tal fato foi associado à pronta disponibilidade do adubo nitrogenado que é caracterizado por sua alta solubilidade (Malavolta *et al.*, 2000).

A necessidade de inoculação das plantas de ingá-de-metro considerando-se a resposta aos dois solos pesquisados foi evidenciada pelos resultados obtidos para a biomassa das plantas, exceto para a biomassa das folhas secas. Mesmo sem diferenças estatísticas, pode-se verificar que para a biomassa foliar a testemunha sem inoculação e sem nitrogênio mineral apresentou as maiores limitações de desenvolvimento da biomassa foliar. As plantas inoculadas com a estirpe 847 apresentaram biomassa foliar seca 23,8 % maior que aquelas que receberam ureia, indicando a eficiência do processo simbiótico considerando a influência já discutida do nitrogênio na biomassa foliar. Por outro lado, comparado as outras estirpes, a 828 foi a que resultou em menor contribuição para a biomassa foliar das plantas do ingá-de-

Tabela 1.4. Efeito da forma de suprimento de nitrogênio nas medidas do crescimento, produção de biomassa e relação raiz/parte aérea de mudas de ingá-de-metro (*Inga edulis*), aos 91 dias após a repicagem.*¹

Formas de suprimento de nitrogênio	Comprimento do caule (cm)	IMCC* ² (cm)	Diâmetro do colo (mm)	IMDC* ² (mm)	Biomassa seca (g)			Relação raiz/parte aérea
					Folhas	Caule	Raízes	
Testemunha	20,2 b	3,7 b	4,4 a	0,8 a	2,13 a	0,57 b	0,82 b	0,41 ab
Testemunha N	26,3 a	6,3 a	5,0 a	0,9 a	2,49 a	1,01 a	1,31 a	0,46 a
Estirpe 828	21,9 ab	3,7 b	4,6 a	0,8 a	2,19 a	0,69 b	0,80 b	0,34 ab
Estirpe 831	24,2 ab	3,9 b	4,6 a	0,8 a	2,68 a	0,75 ab	0,89 b	0,33 b
Estirpe 832	23,8 ab	4,4 b	4,5 a	0,9 a	2,42 a	0,69 b	0,83 b	0,32 b
Estirpe 833	23,8 ab	4,5 ab	4,4 a	0,9 a	2,86 a	0,71 b	0,84 b	0,32b
Estirpe 841	23,4 ab	3,8 b	4,9 a	0,9 a	2,42 a	0,79 ab	0,88 b	0,34 ab
Estirpe 842	24,6 ab	4,1 b	4,8 a	0,9 a	2,89 a	0,79 ab	1,04 ab	0,31 b
Estirpe 844	23,1 ab	3,9 b	4,5 a	0,7 a	2,47 a	0,67 b	0,83 b	0,32 b
Estirpe 847	25,5 a	4,4 b	4,8 a	0,9 a	3,27 a	0,82 ab	1,09 ab	0,34 ab
Estirpe 850	23,4 ab	3,8 b	4,9 a	1,0 a	2,58 a	0,82 ab	0,87 b	0,32 b
Estirpe 852	22,3 ab	3,8 b	4,7 a	0,9 a	2,42 a	0,77 ab	1,10 ab	0,41 ab
Teste de F	2,26*	3,35**	1,48 ^{ns}	1,6 ^{ns}	1,60 ^{ns}	3,42**	3,84**	3,25**

*¹Valores seguidos da mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si ao nível de 5 e 1% de probabilidade; ^{ns} – não significativo.

*²IMCC- Incremento mensal em comprimento do caule (cm mês⁻¹); IMDC- Incremento mensal do diâmetro do colo (mm mês⁻¹).

metro. A pronta disponibilidade do nitrogênio mineral influenciou significativamente o desenvolvimento de caule e raiz das mudas de ingá. Para o caule esse favorecimento observado pelas plantas que receberam ureia foi comparável à inoculação das estirpes 831, 841, 842, 847, 850 e 852, embora estas não diferissem significativamente do tratamento testemunha. Para o desenvolvimento radicular das plantas o suprimento de nitrogênio mineral foi comparável à inoculação com as estirpes 842, 847 e 852, que por sua vez não diferiram significativamente das plantas do tratamento testemunha. Tomando-se em conta a biomassa do caule e das raízes, as estirpes com melhores respostas, 842, 847 e 852, apresentaram desenvolvimento relativo de 78,2, 81,2 e 76,2 respectivamente para o caule e 79,3, 83,2 e 84,0 respectivamente para a raiz, comparado a plantas que receberam N-mineral.

Finalmente a relação raiz/parte aérea das mudas de ingá também foi comparada em relação à forma de suprimento de nitrogênio e revelou que a média mais destoante dos valores calculados foi a das plantas adubadas com N-mineral. Como a disponibilidade de nitrogênio prontamente solúvel fornecida pelo adubo favorece o desenvolvimento radicular das plantas, isto influencia a relação raiz/parte aérea do ingá alcançando deste modo seu maior valor. É preciso considerar que na fase de mudas às plantas crescem em um recipiente limitado, assim é esperado uma maior produção foliar representada por faixas de relação raiz/parte aérea entre

0,30-0,40 que favorecem processos fotossintéticos e o estabelecimento das mudas após sua introdução em condições de campo.

O tipo de solo também influenciou as características da nodulação e os teores de N-total, mas não a concentração de N por mudas de ingá (Tabela 1.5). O número de nódulos formados foi significativamente maior ($P<0,05$) em Latossolo Amarelo comparado ao Argissolo Vermelho Amarelo. Contrariamente a biomassa dos nódulos secos e o peso específico de nódulos foram significativamente maiores ($P<0,01$) em solo Argissolo Vermelho Amarelo, comparado ao Latossolo Amarelo. Em algumas situações o número elevado de nódulos formados não está completamente associado a processos eficientes de captação de N_2 , e a maioria destes nódulos alcança pequeno tamanho, o que parece ter sido o caso para os nódulos formados em Latossolo Amarelo, já que no Argissolo Vermelho Amarelo a biomassa e peso específico dos nódulos foi 23,7 % e 45,0 % maior, respectivamente, que no solo Latossolo.

Tabela 1.5. Efeito do tipo de solo no número de nódulos, biomassa dos nódulos secos, peso específico dos nódulos e concentração de nitrogênio foliar em mudas de ingá-de-metro (*Inga edulis*), aos 91 dias após o transplantio, sob enviveiramento. ^{*1}

Solos	Número de nódulos	Biomassa dos nódulos secos (mg)	Peso específico dos nódulos (mg nódulo ⁻¹)	N-foliar (%)	Teor de N (mg planta ⁻¹)
Argissolo	185 b	173,0 a	1,29 a	3,15 a	87,80 a
Latossolo	226 a	132,0 b	0,71 b	3,12 a	73,97 b
Teste F	4,89 [*]	14,40 ^{**}	23,30 ^{**}	0,21 ^{ns}	6,40 [*]

^{*1} Valores seguidos da mesma letra minúscula nas colunas, não diferem entre si ao nível de 1 ou 5% de probabilidade; ^{ns} – não significativo.

Esses indicadores de nodulação que refletem a média geral para os dois solos não influenciaram, entretanto as concentrações de nitrogênio foliar, cujas médias nos solos pesquisados entre 3,12-3,15 %, são similares as encontradas em outras pesquisas. Palm e Sanchez (1991) trabalhando com *Inga edulis* encontraram concentrações médias de 3,18 % de N na biomassa foliar das plantas. Por outro lado, o teor de N-total nas folhas do ingá-de-metro diferiu estatisticamente ($P<0,05$) entre os solos, de modo que o teor de N acumulado no solo Argissolo Vermelho Amarelo foi 15,7% mais elevado do que nas mudas crescidas no solo Latossolo Amarelo.

Na Tabela 1.6 são apresentados os resultados obtidos para as variáveis da nodulação e da absorção de nitrogênio pelas mudas de ingá-de-metro em resposta às formas de suprimento

Tabela 1.6. Efeito da forma de suprimento de nitrogênio no número de nódulos, biomassa dos nódulos secos, peso específico dos nódulos e concentração de nitrogênio foliar em mudas de ingá-de-metro (*Inga edulis*), aos 91 dias após o transplântio, sob enviveiramento.*¹

Formas de suprimento de N	Número de nódulos	Biomassa dos nódulos secos (mg)	Peso específico dos nódulos (mg nódulo ⁻¹)	N-foliar (%)	Teor de N (mg planta ⁻¹)
Testemunha	48 c	64,9 c	1,4 ab	3,16 a	69,53 a
Testemunha N	52 c	88,7 bc	2,3 a	2,77 a	67,51 a
Estirpe 828	167 bc	142,8 abc	0,8 b	3,08 a	68,36 a
Estirpe 831	171 bc	129,0 abc	0,7 b	3,24 a	86,11 a
Estirpe 832	300 ab	173,5 ab	0,9 b	3,09 a	75,33 a
Estirpe 833	203 b	167,4 ab	0,9 b	3,12 a	88,81 a
Estirpe 841	182 bc	149,1 abc	0,9 b	3,28 a	79,40 a
Estirpe 842	378 a	195,4 a	0,6 b	3,15 a	91,59 a
Estirpe 844	236 ab	147,7 abc	0,7 b	3,24 a	80,69 a
Estirpe 847	240 ab	213,9 a	1,0 b	3,11 a	102,89 a
Estirpe 850	301 ab	199,7 a	0,8 b	3,21 a	83,50 a
Estirpe 852	186 bc	157,9 ab	1,0 b	3,16 a	76,95 a
Teste F	2,82**	2,55**	4,50**	1,13 ^{ns}	1,23 ^{ns}

*¹ Valores seguidos da mesma letra minúscula nas colunas, não diferem entre si ao nível de 1 % de probabilidade; ^{ns} – não significativo.

de nitrogênio. A disponibilização de uma população elevada de rizóbios nos tratamentos inoculados influenciou significativamente todas as variáveis relacionadas com a nodulação. Observa-se que nos dois tratamentos testemunhas houve a menor taxa de formação de nódulos nas mudas, evidenciando a necessidade de inoculação. A inoculação com a estirpe 842 foi responsável pelo maior número de nódulos formados, embora o número de nódulos isoladamente não seja o melhor indicador da eficiência do processo simbiótico. Entretanto, esta estirpe 842 também contribuiu para o desenvolvimento nodular em níveis comparáveis aos das estirpes 847 e 850. Quanto ao número de nódulos formados, as estirpes 832, 844, 847 e 850 também favoreceram o estabelecimento nodular, superando significativamente os tratamentos testemunhas.

O menor desenvolvimento nodular dentre as diferentes formas de suprimento de nitrogênio foi o das mudas do tratamento controle não inoculado e não adubado com ureia, evidenciando uma limitação das características da nodulação nos solos de terra firme que foram pesquisados, seja pela baixa população de rizóbios compatíveis ou por sua ineficiência, o que reforça a necessidade de pesquisas para seleção de estirpes. Contrariamente ao número e biomassa nodular, o peso específico de nódulos foi maior nas plantas testemunhas, o que possivelmente pode ser atribuído a um maior investimento da planta em nódulos de baixa efetividade. Os dados do peso específico dos nódulos também refletem o alto número de

nódulos formados em plantas inoculadas, cuja resposta é mais intensiva em solos com baixos teores de matéria orgânica e baixa disponibilidade de nitrogênio. O maior número de nódulos formados em plantas inoculadas, também estabelece classes bem variadas de tamanho e de biomassa acumulada, predominando, na maioria das vezes, os nódulos em fase inicial de desenvolvimento. Ressalta-se que para o melhor aproveitamento dos benefícios da fixação biológica de nitrogênio é importante que antes do plantio definitivo as mudas apresentem nódulos estabelecidos na fase de viveiro, o que não ocorre satisfatoriamente com o uso da adubação nitrogenada.

Foi verificado que a absorção de N não foi influenciada significativamente pelos tratamentos aplicados, embora a menor concentração e o menor teor de N-total nas folhas do ingá-de-metro tenham sido verificados nas plantas testemunha que receberam ureia. Embora sem diferenças significativas, destaca-se a quantidade de N-total em resposta a inoculação com a estirpe 847 que atingiu a maior média entre os tratamentos aplicados. Essa maior resposta na absorção de nitrogênio à inoculação com a estirpe 847 foi 32,42% e 34,39% maior que no tratamento não inoculado e não fertilizado com N e no tratamento que recebeu N-mineral, respectivamente.

As relações entre tipo de solo e formas de suprimento de nitrogênio foram significativas estatisticamente para o comprimento do caule das plantas aos 3 meses de enviveiramento (Tabela 1.7).

Tabela 1.7. Efeito da interação entre solos e formas de suprimento de nitrogênio para o comprimento do caule de mudas de ingá-de-metro (*Inga edulis*), aos 90 dias após o transplântio, sob enviveiramento.^{*1*2}

Formas de suprimento de N	Solos		Média
	Argissolo	Latossolo	
Testemunha	20,7 A a	19,7 C a	20,2 B
Testemunha Nitrogenada	25,6 A a	27,0 AB a	26,3 A
Estirpe 828	23,0A a	20,8 B a	21,9 AB
Estirpe 831	23,6A a	24,9 ABC a	24,2 AB
Estirpe 832	23,4A a	24,3 ABC a	23,8 AB
Estirpe 833	25,3A a	22,3 ABC a	23,8 AB
Estirpe 841	23,9A a	22,9 ABC a	23,4 AB
Estirpe 842	23,7A a	25,5 ABC a	24,6 AB
Estirpe 844	21,8A a	24,4 ABC a	23,1 AB
Estirpe 847	22,3 A b	28,7A a	25,5 AB
Estirpe 850	20,2 A b	26,6 ABC a	23,4 AB
Estirpe 852	19,9 A b	24,8 ABC a	22,3 AB
Média	22,8 b	24,3 a	

^{*1}Valores seguidos da mesma letra minúscula nas linhas e da mesma letra maiúscula nas colunas, não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

^{*2}Teste F da interação solos x formas de suprimento de N = 2,11*.

Foi verificado que quando as plantas foram inoculadas com as estirpes 847, 850 e 852, as plantas que cresceram em solo Latossolo Amarelo apresentaram comprimento do caule significativamente maior que as que cresceram em Argissolo Vermelho Amarelo. Por outro lado, considerando-se as formas de suprimento de N, o comprimento do caule das plantas não variou significativamente no solo Argissolo Vermelho Amarelo. Entretanto, quando cresceram no Latossolo Amarelo a estirpe 847 favoreceu significativamente ($P < 0,05$) o crescimento em comprimento do caule das plantas, comparado ao tratamento testemunha não inoculado e não adubado com N-mineral, embora não diferisse dessa última. Mais uma vez a estirpe 828 teve pouca influência no crescimento em comprimento do caule das plantas de ingá, embora, nas condições experimentais apresentasse também superioridade comparada a plantas do tratamento testemunha.

Foi também identificada uma interação significativa entre os solos pesquisados e as formas de suprimento de nitrogênio no número de nódulos formado sem mudas de ingá (Tabela 1.8). Essa interação identificou que as plantas inoculadas com as estirpes 842 e 850 foram significativamente mais infectivas ($P < 0,01$) em solo Latossolo Amarelo comparado ao Argissolo Vermelho Amarelo.

Tabela 1.8. Efeito da interação entre solos e formas de suprimento de nitrogênio no número de nódulos de mudas de ingá-de-metro (*Inga edulis*), aos 90 dias após o transplântio, sob enviveiramento. ^{*1*2}

Formas de suprimento de N	Solos		Média
	Argissolo	Latossolo	
Testemunha	30 B a	66 E a	48 C
Testemunha Nitrogenada	31 B a	73 DE a	52 C
Estirpe 828	180 AB a	154 CDE a	167 BC
Estirpe 831	176 AB a	166 CDE a	171 BC
Estirpe 832	277 A a	323 ABC a	300 AB
Estirpe 833	263 A a	143 CDE a	203 B
Estirpe 841	216 AB a	149 CDE a	182 BC
Estirpe 842	253 A b	504 A a	378 A
Estirpe 844	249 A a	222 BCDE a	236 AB
Estirpe 847	202 AB a	277 BCD a	240 AB
Estirpe 850	194 AB b	409 AB a	301 AB
Estirpe 852	150 AB a	222 BCDE a	186 BC
Média	185 b	226 a	

^{*1}Valores seguidos da mesma letra minúscula nas linhas e da mesma letra maiúscula nas colunas, não diferem entre si ao nível de 1 % de probabilidade.

^{*2}Teste F da interação solos x formas de suprimento de N = 2,82**.

Quanto às formas de suprimento de nitrogênio, a inoculação das plantas influenciou diretamente a formação de nódulos em solo Argissolo Vermelho Amarelo com maior número

de nódulos formados pelas estirpes 832, 833, 842 e 844 comparado aos dois tratamentos testemunhas adotados no experimento. Para o solo Latossolo Amarelo o médio de número de nódulos formados pela inoculação com a estirpe 842 ultrapassou 500 nódulos e foi significativamente maior que em outras formas de suprimento de nitrogênio seja para algumas das estirpes inoculadas como para os tratamentos testemunha não inoculada e não adubada com N e testemunha que recebeu ureia. Em estudo sobre o efeito da seleção de estirpes de rizóbios para feijão-caupi, Lacerda *et al.* (2004) concluíram que a dose de 300 mg de $N-NH_4.NO_3.vaso^{-1}$, reduziu o número de nódulos em aproximadamente 34% em relação à testemunha sem N. Verificou-se que a plantas que receberam inoculação com a estirpe 842 apresentaram alto potencial de infectividade, com média de 378 nódulos, valor superior significativamente ao das testemunhas controle T e TN, e superior também às plantas inoculadas com as estirpes 828, 831, 833 e 852.

As análises realizadas também identificaram interações significativas para a biomassa dos nódulos secos e estas estão apresentadas na Tabela 1.9. Desse modo no solo Argissolo Vermelho Amarelo a inoculação das mudas de ingá-de-metro com as estirpes 833 e 841 resultaram em desenvolvimento nodular significativamente maior que em solo Latossolo Amarelo. Considerando-se o estágio dos testes de multilocação nas etapas indicadas para seleção de estirpes por Halyday (1984), as estirpes selecionadas para uso como inoculante devem ser eficientes em várias classes de solo, o que indica sua adaptabilidade a diferentes condições edáficas, o que afeta sua recomendação.

Considerando-se a forma de suprimento de nitrogênio em solo Argissolo Vermelho Amarelo, destacam-se os tratamentos de inoculação com as estirpes 833 e 847 que resultaram em maior biomassa nodular que a acumulada nos dois tratamentos controles. Neste solo, a biomassa de nódulos formados com a inoculação da estirpe 833 foi 77,3 % e 62,0 % maior que as plantas não inoculadas e que não receberam nitrogênio mineral e das plantas que receberam N-mineral, respectivamente.

No solo Latossolo Amarelo a maior massa média de nódulos formada ocorreu com a inoculação da estirpe 842 que superou significativamente ($P < 0,01$) os dois tratamentos controle, correspondendo respectivamente a um incremento de 65,4 % e 60,8 % da biomassa nodular comparado à testemunha não inoculada e não adubada com N e da testemunha que recebeu ureia sob um parcelamento. Nota-se que a inoculação com a estirpe 850 neste solo resultou em biomassa nodular significativamente superior a das plantas do tratamento testemunha sem inoculação e sem suprimento de N-mineral, o que é um bom indicador para esta estirpe.

Tabela 1.9. Efeito da interação entre solos e formas de suprimento de nitrogênio na biomassa dos nódulos secos (mg) de mudas de ingá-de-metro (*Inga edulis*), aos 90 dias após o transplântio, sob enviveiramento. *1*2

Formas de suprimento de N	Solos		Média
	Argissolo	Latossolo	
Testemunha	56,1C a	73,6 C a	64,9 C
Testemunha Nitrogenada	93,9 BC a	83,5 BC a	88,7 BC
Estirpe 828	159,1 ABC a	126,5 ABC a	142,8 ABC
Estirpe 831	165,4 ABC a	92,6 ABC a	129,0 ABC
Estirpe 832	206,5 AB a	140,5 ABC a	173,5 AB
Estirpe 833	246,9A a	87,9 BC b	167,4 AB
Estirpe 841	208,9 AB a	89,4 ABC b	149,1 ABC
Estirpe 842	177,8 ABC a	213,0A a	195,4 A
Estirpe 844	177,6 ABC a	117,8 ABC a	147,7 ABC
Estirpe 847	244,6A a	183,3 ABC a	213,9 A
Estirpe 850	194,6 AB a	204,8 AB a	197,7 A
Estirpe 852	145,6 AB a	170,1 ABC a	157,9 AB
Média	173,1 a	131,9 b	

*1*Valores seguidos da mesma letra minúscula nas linhas e da mesma letra maiúscula nas colunas, não diferem entre si ao nível de 1 % de probabilidade.

*2*Teste F da interação solos x formas de suprimento de N = 2,55**.

A Figura 1.2 representa as relações entre os teores de N-total e a biomassa dos nódulos secos do ingá-de-metro. Considerando os teores de N-total e a biomassa dos nódulos secos, os quadrantes inferiores foram definidos pelas mudas que receberam N- mineral e também aquelas inoculadas com a estirpe 828. No quadrante médio encontra-se a testemunha controle, sem inoculação e sem adição de ureia e, nos quadrantes superiores as estirpes de maior eficiência já que superou a interação N-total x biomassa de nódulos dos tratamentos controles. Destacam-se nos quadrantes superiores as estirpes 831, 841 e 844 que com biomassa de nódulos abaixo da média apresentaram as maiores concentrações de N-total neste experimento. Por outro lado a estirpe 847 também apresentou alta concentração de N-total, mas a biomassa nodular nas plantas deste tratamento estava acima da média da biomassa dos nódulos. Considera-se que um grupo de três estirpes as 833, 842 e 850 apresentaram potencial para novas pesquisas de inoculação por se posicionarem nos limites superiores dos quadrantes médios, entretanto todas necessitam de biomassa nodular acima da média para alcançar esses resultados, considerando-se os dois solos pesquisados.

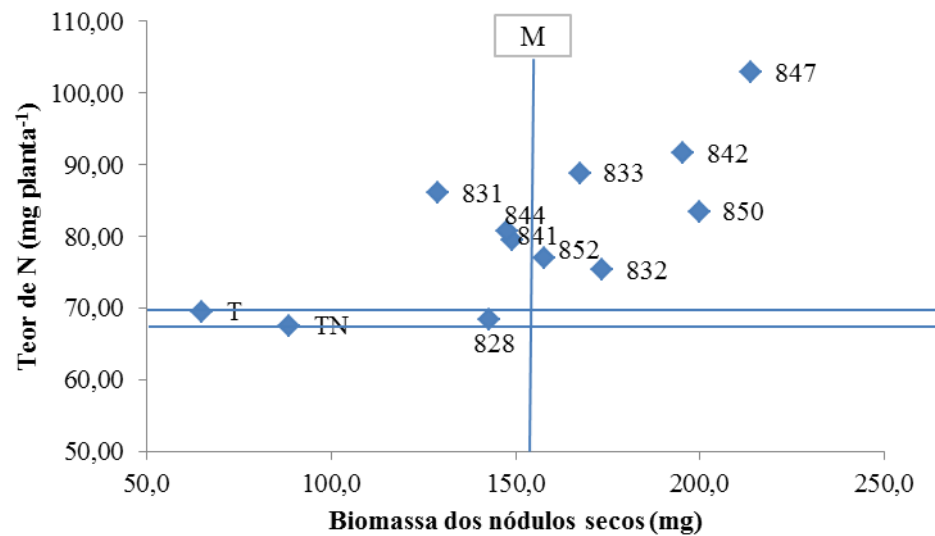
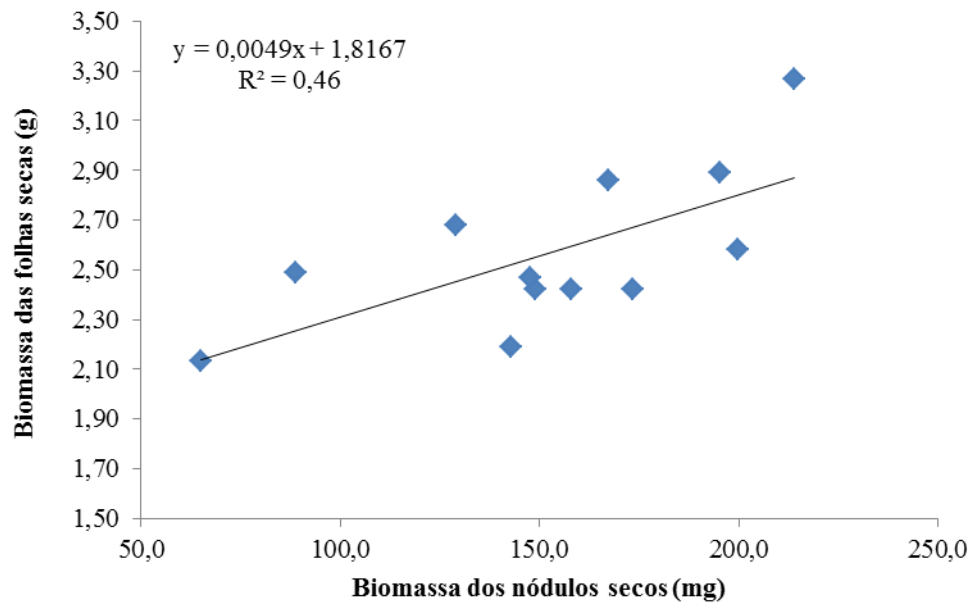


Figura 1.2. Relações entre a biomassa dos nódulos secos e os teores de N-total em resposta à inoculação com estirpes de rizóbios em ingá-de metro (*Inga edulis*) em dois solos da Amazônia Central, aos 91 dias de transplantio, sob enviveiramento.

*1 – M – média geral da biomassa dos nódulos secos (152 mg planta⁻¹), T – Tratamento testemunha sem inoculação e sem N-mineral, TN – Tratamento que recebeu N-mineral na forma de ureia.

A eficiência do processo simbiótico estabelecido nas mudas de ingá foi demonstrada pela correlação linear positiva ($P < 0,01$) entre a biomassa dos nódulos secos e a biomassa das folhas secas (Figura 1.3), demonstrando que o incremento da biomassa dos nódulos influenciou o desenvolvimento foliadas plantas. Para esta combinação de variáveis o valor de R^2 foi de 0,55 permitindo formulação da equação que foi apresentada. Vieira e Souza (2011) observaram correlações positivas ($P < 0,05$) entre as variáveis da biomassa seca dos nódulos e a matéria seca total em mudas de acapu do igapó (*Swartzia argentea*) inoculadas, sugerindo que quanto maior a biomassa seca dos nódulos, maior a matéria seca total das mudas.



Teste F 8,46*

Figura 1.3. Correlação entre a biomassa dos nódulos secos e a biomassa das folhas secas de mudas de ingá-de-metro (*Inga edulis*), crescendo em dois solos da terra firme, sob enviveiramento, aos 91 dias após o transplantio.

1.4. CONCLUSÕES

Demonstrou-se que o ingá-de-metro (*Inga edulis*), que é reconhecido como uma planta promíscua quanto a sua compatibilidade com rizóbios, responde eficientemente a inoculação com estirpes selecionadas, permitindo a formação de mudas bem noduladas e aptas ao plantio definitivo aos três meses de enviveiramento. Nos solos pesquisados, a adubação com N-mineral inibiu a formação e desenvolvimento nodular das plantas. As estirpes de rizóbios 831 e 844 destacaram-se no grupo avaliado por sua eficiência e apresentaram potencial para uso como inoculante microbiano de ingá-de-metro em solo Latossolo Amarelo e Argissolo Vermelho Amarelo da Amazônia Central. As estirpes 833, 842, 847 e 850 também se mostraram eficientes e podem ser avaliadas novamente em novas pesquisas.

1.5. REFERÊNCIAS

Alfaia, S.S.; Souza, L.A.G. de. 2002. Perspectivas do uso e manejo dos solos da Amazônia. In: Araújo, Q.R.de. (Org.). *500 anos de uso do solo no Brasil*. Editora da UESC. Ilhéus. p.311-327.

- Arco-Verde, M.; Moreira, M.A.B. Viveiros florestais. *Construção, custos, cuidados e atividades desenvolvidas para a produção de mudas*. Boa vista: EMBRAPA-CPAF, Documentos 3. 1998. 32p.
- Benincasa, M.M.P. Análise de crescimento das plantas (Noções básicas). Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, FUNEP, 1998, 42p.
- BRASIL. 1992. *Regras para Análise de Sementes*. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. SNDA/DNPV/ CLAV. Brasília. 365p.
- Brito, V.M. de. 1997. *Formação, caracterização e eficiência fixadora de nitrogênio de uma coleção de rizóbio para Ingá cipó (Inga edulis Mart., Leguminosae)*. Monografia. Universidade Federal do Amazonas/Faculdade de Ciências Agrárias. Manaus. 57p.
- Burity, H.A.; Lyra, M.C.C.P.; Souza, E.S.; Mergulhão, A.C.E.S.; Silva, M.L.R.B. 2000. Efetividade da inoculação com rizóbios e fungos micorrízicos arbusculares em mudas de sabiá submetidas a diferentes níveis de fósforo. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 35(4): 801-807.
- Centeno, A.J. *Curso de estatística aplicada à biologia*. Goiânia: UFG, Centro Editorial, 1990.188p. (Coleção Didática, 3).
- EMBRAPA, 1997. *Manual de Método de análise de solo*. RJ. 2. ed. Revisada e atualizada.212p.
- Epstein, E.; Bloom, A. J. 2006. Nutrição e crescimento. In: Epstein, E.; Bloom, A. J. *Nutrição Mineral de Plantas*. Londrina, Planta, 251 – 286p.
- Faria, S.M.; Silva, G.G.; Franco, A.A. 1984. Seleção de estirpes de *Rhizobium* sp. para leguminosas arbóreas. *Reunião Latino-Americana sobre Rhizobium17.*, Campinas, ALAR/IAC, Anais..., p. 103-112.
- Farias, S.G.G.; Freire, A.L.O.; Santos, D.R.; Miranda, J.R.P.; Alves, A.R.; Farias Júnior, J.A. 2004. *Avaliação da inoculação de estirpes de Bradyrhizobium sp. em leucena*

(*Leucaena leucocephala* (Lam.) De Vit.) submetida à salinidade. FERTBIO 2004, Lages, SC, CD-ROM, 4p.

Ferreira, A.N.; ARF, O.; Carvalho, M.A.C.; Araújo, R.S.; Sá, M.E. de.; Buzetti, S. 2000. Estirpes de *Rhizobiumtropicum* na inoculação do feijoeiro. *Scientia Agricola*, Piracicaba, 57(3): 507-512.

Halliday, J. 1984. Integrated approach to nitrogen fixing tree germoplasma development. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 19 (s/nº): 91-117.

Hungria, M.; Araújo, R.S. 1994. *Manual de Métodos empregados em estudos de Microbiologia Agrícola*. Brasília: EMBRAPA-CNPAP, Documentos n.46, 542p.

Lacerda, A.M; Moreira, F.M.S; Andrade M.J.B; Soares, A.L.L. 2004. Efeito de estirpes de rizóbios sobre a nodulação e produtividade do feijão-caupi. *Revista Ceres*. 51(293): 67-82.

Lorenzi, H. 2002. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil*. (4ªed.). Instituto Plantarum, Nova Odessa, v.1, 384p.

Moreira, F.M.S. 2008. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam Leguminosae. In: *Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros*. Moreira, F.M.S.; Siqueira, J.O; Brussaard, L. (Eds.), Lavras, UFLA. p. 621-680.

Malavolta, E.; Pimentel-Gomes; Alarde, J.C. 2000. Fertilizantes ou adubos. In: *Adubos e adubações*. Editora Nobel, São Paulo, p. 75-83.

Marschner, H. 1990. Functions of mineral nutrients: Macronutrients. In: MARSCHNER, H. 1990. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press, London, 4ª Ed., 8:195-267.

National Academy of Sciences, 1979. *Tropical legumes resource for the future*. Livr. Congress. Catalogo, Washington, D.C., 332p.

- Palm, C.A.; Sanchez, P.A. 1991. Nitrogen, release from the leaves of some tropical legumes as affected by their lignin and polyphenolic contents. *Soil Biol. Biochem*, 23 (1): 83-88.
- Siqueira, J.O. 1983. *Nutritional and edaphic factors affecting spores germination, germ tube and root colonization by vesicular-arbuscular-mycorrhizal fungi*. Gainesville: University of Florida. 159p. Ph.D. Thesis.
- Somasegaran, P.; Hoben, H.J. 1985. *Methods in legume-Rhizobium Technology*. Univ. do Hawaii, NifTAL, 367p, p. 33-35.
- Souza, L.A.G. 1996. A coleção de rizóbios do laboratório de Microbiologia do Solo do INPA/CPCA.. Boletim da ALAR. Campinas, SP, 13:4-8.
- Souza, L.A.G. de; Silva, M.F. da; Moreira, F.W. 1994. Capacidade de Nodulação de cem leguminosas da Amazônia. *Acta Amazonica*, 24(1/2): 9-18.
- Stamford, N.P.; Cabral, C.D.G.; Almeida, B.G. 1997. Efeito da salinização em sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia*) inoculada e com N-mineral em solo do semi-árido. CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 26., Rio de Janeiro, SBSCS, CD-ROM., Resumos Expandidos, 4p.
- Venturini. S. F.; Antonioli. Z. I.; Venturini. E. F.; Giracca. E. M. N. 2002. Efeito da inoculação com *Rhizobium* e aplicação de nitrogênio em cobertura na cultura do feijoeiro. UFSM, CCR, Departamento de Solos, Santa Maria-RS, 4p.
- Vieira, E.P; Souza, L.A.G. 2011. Inoculação com rizóbios em mudas de igapó e saboarana. *Rev. Ci. Agra.*, 54(1): 275-283.

Capítulo II

Seleção de estirpes de rizóbios para palheteira (*Clitoria fairchildiana* R.A Howard) em duas classes de solos ácidos da Amazônia Central

Seleção de estirpes de rizóbios para palheteira (*Clitoria fairchildiana*) em dois solos ácidos da terra firme da Amazônia Central

Naiana Marinho de Souza¹, Luiz Augusto Gomes de Souza²

¹ Pós-graduanda em Agricultura no Trópico Úmido, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, Av. André Araújo, 2936, Aleixo. 69060-001, Manaus, AM.
naiana.marinho@inpa.gov.br

² Pesquisador doutor INPA, Caixa Postal 478, Manaus, AM- Brasil. souzalag@inpa.gov.br

RESUMO – A palheteira (*Clitoria fairchildiana* Howard) é uma leguminosa arbórea que tem se destacado para cultivo em sistemas agroflorestais nos solos de terra firme da Amazônia, caracterizados por sua acidez elevada e baixa fertilidade natural. O objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito da inoculação de estirpes de rizóbios em mudas conduzidas em viveiro nos solos Argissolo Vermelho Amarelo e Latossolo Amarelo. Sementes de palheteira foram semeadas em areia e transplantadas para recipientes com capacidade de 2 kg de solo. Foram consideradas as seguintes formas de suprimento de nitrogênio: plantas sem inoculação e sem adubação nitrogenada, plantas fertilizadas com N-mineral (na forma de ureia) e a inoculação individual das estirpes da Coleção de rizóbios do INPA: 938, 941, 943, 944, 945, 949, 950 e 959. As estirpes foram inoculadas em suspensão líquida, 5 mL aplicados na base do colo de mudas transplantadas. As plantas foram acompanhadas mensalmente em crescimento e avaliadas aos três meses de enviveiramento. Foi determinada a biomassa de folhas, caule e raízes das plantas após a secagem em estufa a 65° por 72 h e também o número, biomassa e peso específico dos nódulos. Determinou-se a concentração de N-foliar pelo método de Kjeldhal e o N-total acumulado. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 2 x 10, (2 solos e 10 formas de suprimento de N), com 10 repetições. A palheteira mostrou adaptação às duas condições de solo da terra firme pesquisadas, entretanto, as medidas de crescimento e de desenvolvimento foram favorecidas em solo Latossolo Amarelo comparado ao Argissolo Vermelho Amarelo, e o número, biomassa de nódulos secos e concentração de N-foliar foram maiores em solo Argissolo que no Latossolo. O fornecimento de N na forma de N-mineral inibiu a formação de nódulos, desfavorecendo o processo simbiótico. Por outro lado, a inoculação da palheteira com as estirpes de rizóbios 943, 944, 945 e 949 favoreceram o desenvolvimento das plantas e proporcionaram elevados teores de N nas folhas, e foram identificadas como as de maior potencial para uso como inoculante desta espécie nos solos de terra firme pesquisados.

Palavras-chave: Biotecnologia, recuperação de áreas degradadas, simbiose Rhizobia-Fabaceae.

**Rhizobia strains selection for palheteira (*Clitoria fairchildiana*) in two acid soils from
Central Amazonia**

SUMMARY - The palheteira (*Clitoria fairchildiana* Howard) is a legume tree that has if outstanding for cultivation in agroforestry systems in the acid soils of the Amazonia, characterized by your high acidity and it lower fertility natural. The objective of this research was to evaluate the effect of the inoculation with Rhizobia strains in seedlings led in nursery in the soils Ultisol and Oxisol. Palheteira seeds were sowed in sand and transplanted for recipients with capacity of 2 soil kg. The following forms of supply of nitrogen were considered: plants without inoculation and without N-mineral, plants fertilized with N-mineral (urea form) and the individual inoculation of the strains of the INPA Collection of Rhizobia: 938, 941, 943, 944, 945, 949, 950 and 959. The strains were inoculated in liquid suspension, 5 mL applied in the stem base of transplanted seedlings. The plants were accompanied monthly in growth and appraised to the three months of nursery. It was determinate the dry biomass of leaves, stem and roots of the plants after incubation to 65°C for 72 h and also the number, biomass and specific weight of the nodules. Too was determined the N concentration of leaves with the Kjeldhal method and the N-total accumulated. The experimental design was it entirely random, with factorial arrangement 2 x 10,(2 soils and 10 forms of N supply), with 10 repetitions. The palheteira showed adaptation to the two conditions of soil of the firm earth researched, however, the growth measures and of development they were favored in soil Oxisol compared to Ultisol, and the number, biomass of dry nodules and N concentration in leaves they were larger in soil Ultisol that in Oxisol. The supply of N in the form of N-mineral inhibited the nodules formation and the symbiotic process. However, the palheteria inoculation with the Rhizobia strains 943, 944, 945 and 949 favored the development of the plants and they provided high content of N in the leaves, and they were identified as the one of inoculant potential for use of this species in the soils Ultisol and Oxisol researched.

Key-Word: Biotechnology, recovery of degraded areas, symbiosis Rhizobia-Fabaceae.

2.1. INTRODUÇÃO

A cobertura pedológica das áreas de terra firme do Estado do Amazonas apresenta em torno de 90% de solos Latossolos e Argissolos distróficos (Vieira e Santos, 1987). Estas classes de solo geralmente são pobres em nutrientes, profundos, bem drenados com boa capacidade de retenção de água, permeabilidade e baixa Capacidade de Troca de Cátions (Ferreira, 2006), especialmente pela predominância da caulinita que é uma argila de baixa atividade. Para o estabelecimento de sistemas de produção agrícola sustentáveis nestas condições, os conceitos agroecológicos sugerem como estratégia o consorciamento de espécies arbóreas e neste contexto as Fabaceae se destacam por abrigar árvores com capacidade de fixação simbiótica de N_2 . O plantio de leguminosas arbóreas nodulíferas em solos de baixa fertilidade natural é uma forma agroecológica de introdução do nitrogênio no sistema solo-planta-animal, o que potencializa o estabelecimento das plantas em ambientes pobres em nitrogênio (Graham e Vance, 2003).

A obtenção de nitrogênio ocorre concomitantemente com a associação dessas plantas com fungos micorrízicos, que são capazes de aumentar a área de absorção de nutrientes essenciais, destacando-se o também o fósforo (Falcão e Silva, 2004). A dupla inoculação de leguminosas arbóreas com rizóbios e micorrizas tem sido apontada como uma estratégia a ser adotada na recuperação de áreas degradadas (Franco e Faria, 1997). Para pleno sucesso do processo simbiótico fixador de N_2 , há necessidade de selecionar germoplasma de bactéria e plantas eficientes e compatíveis para a expansão do plantio de leguminosas arbóreas em maior escala.

A fixação simbiótica de N_2 pelas Fabaceae é um processo ecológica e economicamente vantajoso que pode substituir o suprimento de N nos sistemas de produção por meio de adubos químicos nitrogenados. No Brasil, o modelo mais bem sucedido de aproveitamento da simbiose rizóbios-leguminosas foi desenvolvido para a soja (*Glycine max*), desde as primeiras etapas de melhoramento genético desta cultura iniciada na década de 50. Entretanto, processos eficientes de fixação de N_2 em leguminosas estão amplamente distribuídos entre diferentes espécies que constituem as Fabaceae e no ambiente tropical as leguminosas arbóreas podem suprir essa demanda nutricional nas unidades de produção de base familiar em processo de transição tecnológica (Espindola *et al.*, 2004).

Tem sido demonstrado experimentalmente que várias leguminosas arbóreas podem ser consorciadas em sistemas de produção agrícola, incrementando a produção dos cultivos de

interesse. Dentre estas espécies destacam-se a gliricídia (*Gliricidia sepium*), a leucena (*Leucaena leucocephala*), o mulungu (*Erythrina fusca*), o sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia*), a bracinga (*Mimosa scabrella*), o ingá-de-metro (*Inga edulis*) e a palheteira (*Clitoria fairchildiana*). Se por um lado já existem alternativas de leguminosas arbóreas para o ambiente tropical, há ainda muita necessidade de pesquisa para selecionar material microbiano compatível e eficiente nos processos simbióticos com estas espécies.

A pesquisa de seleção de estirpes de leguminosas não convencionais geralmente é feita em coleções de trabalho que posteriormente se tornam de referência. Segundo Hallyday (1984) as etapas que envolvem a seleção de germoplasma microbiano com alto potencial fixador são: a) Investigação da compatibilidade genética; b) seleção para efetividade na fixação de N₂; c) pesquisa sobre a efetividade simbiótica sob estresses físicos, químicos ou biológicos em solos locais; d) avaliações locais e metodologia de inoculação sob condições de campo; e, e) testes de multi-locação para respostas à inoculação com estirpes de rizóbios selecionadas.

A palheteira é uma espécie nativa do Brasil que tem como centro de origem a região do delta do rio Amazonas, abrangendo as áreas dos Estados do Amapá, Acre, Maranhão e Pará (Ducke, 1949; Lorenzi 2002). Trata-se de uma leguminosa arbórea rústica, de rápido crescimento, bastante utilizada na arborização urbana e rural, principalmente nas regiões sudoeste e norte do Brasil (Trevisan *et al.*, 2004). Na composição de sistemas agrofloretais em solos não hidromórfico da Amazônia Central a palheteira está adaptada a consórcios heterogêneos, destinados à reconstituição de áreas degradadas (Lorenzi, 2002).

As árvores de palheteira apresentam madeira moderadamente pesada, medianamente resistente, elástica, fácil de trabalhar e por isso tem sido usada na fabricação de móveis de madeira recurvada, na construção civil, confecção de brinquedos e caixotaria, além de ser matéria prima para a indústria de celulose e papel, compensados, palitos de fósforo, carvão e produção de lenha (Souza, 2006). Este autor desenvolveu pesquisas de seleção de estirpes para palheteira obtendo isolados de solos da Zona da Mata de Pernambuco selecionado estirpes eficientes para a inoculação da espécie em trabalhos de recuperação de áreas degradadas da Mata Atlântica litorânea.

A seleção de novas estirpes, capazes de fixar maiores quantidades de N₂ quando em simbiose com palheteira, antecede a popularização e comercialização de inoculantes para esta espécie. O objetivo deste trabalho foi selecionar estirpes de rizóbios eficientes na fixação de N₂ para a palheteira (*Clitoria fairchildiana*) nas duas principais classes de solos agrícolas da Amazônia Central.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido durante os meses de abril a agosto de 2012 nas instalações da Coordenação de Sociedade, Ambiente e Saúde do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – CSAS/INPA, no Campus do V-8, em Manaus, AM. Os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia do Solo, em sementeira e no viveiro de produção de mudas. A sementeira é constituída por um galpão aberto com cobertura de telhas de barro e o viveiro tem estrutura de ferro, chão cimentado e cobertura com tela de sombrite 50 % de luz incidente.

2.2.1. Caracterização fenotípica e fisiológica das estirpes

As estirpes de palheteira foram pré-selecionadas considerando-se estudos de seleção de estirpes já realizados para esta espécie (Souza, 2006). Oito estirpes presentes na Coleção do Laboratório de Microbiologia do solo do INPA foram selecionadas, seguindo o código: 938, 941, 943, 944, 945, 949, 950 e 959. As estirpes da coleção do INPA são preservadas e estocadas em tubos de vidro com tampa rosqueável. Três tubos de cada estirpe foram preparados para incubação em placas de Petri contendo meio de cultura YMA, com pH 6,0 sem a adição de corante, em seguida foram levadas para estufas incubadoras à temperatura ambiente do laboratório ($\pm 24^{\circ}\text{C}$).

O crescimento dos isolados compreendeu de 4 a 10 dias de incubação, e durante este período foi feita a caracterização morfológica das estirpes (Somasegaran e Hoben, 1985), registrando-se o número na coleção, o tempo de crescimento que equivale ao período em dias entre o início da incubação. Foram obtidas informações sobre a coloração que melhor descreveu o crescimento da estirpe, sendo as mais comuns: branco, branco gelo, branco leitoso, branco pálido e creme. O registro do diâmetro das colônias foi registrado considerando-se o maior diâmetro de colônia individual. A classificação da forma da colônia pode variar entre circular ou puntiforme. A produção de muco pelas estirpes e o agrupamento dos isolados (coalescência), foram definidas em escala de pouca, média e alta intensidade. Quanto à textura das colônias, esta foi observada com o auxílio de alça de platina em câmara de fluxo laminar, as principais variações encontradas são: colônias gomosas, viscosas, butirosas, aquosa e coriácea.

2.2.2. Coleta, preparo e análise do solo

Dois solos da Amazônia Central com diferentes coberturas foram utilizados neste experimento: Argissolo Vermelho Amarelo, coletado sob um sistema agroflorestal na Estação Experimental de Hortaliças do INPA, localizada no Km 14 da Rodovia AM-010, em Manaus, AM (02° 59'71,5''S e 60° 01'38,2''W) e Latossolo Amarelo, coletado em uma pastagem abandonada, na Estação Experimental da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), no Km 40 da BR 174, município de Manaus, AM (02°39'10,3''S 60° 03'32,5''W).

Nos locais de coleta foram feitas escavações superficiais no horizonte A, com profundidade máxima de 20 cm. Após o transporte para o INPA, os solos foram destorroados, secos ao ar, peneirados (malha de 2 cm) e em seguida distribuídos para sacos pretos de polipropileno para mudas, com capacidade para 2 kg de solo, nas dimensões de 22 x 16 cm, com diâmetro de abertura de 11 cm. Uma amostra composta de cada solo foi separada para determinações químicas que foram realizadas no Laboratório Temático de Solos e Plantas do INPA - LTSP, em Manaus, AM. Foram determinados os valores do pH do solo, níveis de alumínio trocável e teores disponíveis de Ca, Mg, Al, K, P, Zn, Cu e Mn. Para o cálcio, magnésio e alumínio a solução extratora foi o KCl 1N. O potássio foi determinado por fotometria de chama e o fósforo foi extraído e determinado por espectrofotometria. Também foram determinados os níveis de alumínio trocável e teores disponíveis de Ca, Mg, Al, K, P, Zn, Cu e Mn (EMBRAPA, 1997).

A interpretação das análises dos solos foi feita de acordo com Malavolta *et al.* (2000). O solo Argissolo Vermelho Amarelo foi caracterizado como fortemente ácido, apresentando teores médios de alumínio. Este solo mostrou deficiência para os macronutrientes P, K, Ca e Mg. Para os micronutrientes F, Mn e Zn os teores foram classificados como alto, crítico e médio, respectivamente. O solo Latossolo Amarelo caracterizou-se como fracamente ácido e com baixo teor de alumínio. Os teores dos macronutrientes P e K foram classificados como baixos e Ca e Mg com médios. O micronutriente F apresentou alto teor no solo Latossolo Amarelo, enquanto o Zn e o Mn foram classificados com médios.

Para depleção do nitrogênio naturalmente disponível nos solos selecionados, 45 dias antes da instalação do experimento, semeou-se o milho (*Zea mays* L.), variedade BR 5110 nos sacos preenchidos com os dois solos. Após este período, o milho foi cortado à superfície do solo para evitar distúrbios. Com a colheita do milho, os solos receberam uma adubação básica de correção (Halliday, 1984). A adubação foi calculada a partir do peso médio dos sacos preenchidos para cada solo. O peso médio dos sacos preenchidos com o solo Argissolo

Vermelho Amarelo foi de 1,8 kg, sendo adubado com 0,47 g kg⁻¹ de superfosfato triplo, 0,17 g kg⁻¹ de cloreto de potássio e 0,50 g kg⁻¹ de calcário dolomítico. Para o solo Latossolo Amarelo, a média de sacos foi de 1,4 kg e a adubação constitui-se de 0,48g kg⁻¹ de superfosfato triplo, 0,17g kg⁻¹ de cloreto de potássio e 0,50g kg⁻¹ de calcário dolomítico. Aos solos foi acrescentada uma solução líquida de micronutrientes, aplicando-se 1 mL kg⁻¹ com uma pipeta. No preparo desta solução utilizou-se 3,95 g de sulfato de cobre; 2,23 g de sulfato de zinco; 0,25 g de ácido bórico; 0,50 g de molibdato de sódio; 5,00 g de sulfato de ferro e 5,00 g de ácido cítrico (Eira *et al.*, 1972).

2.2.3. Obtenção de propágulos, germinação das sementes, preparo de inoculante e condução do experimento

Sementes de palheteira provenientes de matrizes do entorno do Lago das Tartarugas, no Bosque da Ciência-INPA, foram postas para germinar em caixas plásticas drenadas de tamanho 40 x 60 cm, com 15 cm de profundidade, preenchidas com areia lavada. Antecedendo os procedimentos de germinação, as sementes foram mantidas em Becker com água durante 24 horas. A semeadura foi feita em linhas entre areia com dois cm de profundidade. Diariamente foi feita a irrigação da sementeira e a repicagem para os sacos foi feita quando as plântulas apresentaram o segundo par de folhas definitivas.

O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial, do tipo 2x10, constituído por dois solos e 10 formas de suprimento de nitrogênio, com 10 repetições. Foram selecionados os solos Argissolo Vermelho Amarelo e Latossolo Amarelo. As formas de suprimento de N empregadas foram: testemunha (sem inoculação e sem adubação nitrogenada), testemunha nitrogenada (sem inoculação e com nitrogênio mineral) e a inoculação individual de oito estirpes de rizóbios da Coleção do INPA.

A testemunha com nitrogênio mineral recebeu ureia, incorporada no solo com bastão de vidro. O solo Argissolo Vermelho Amarelo recebeu 0,9 g kg⁻¹ e ao solo Latossolo Amarelo foram adicionadas 0,17g kg⁻¹ de ureia, que correspondeu a 50% da dosagem aplicada no terceiro dia após o transplantio. A dosagem complementar foi efetuada aos 33 dias.

As oito estirpes avaliadas no experimento foram: 938, 941, 943, 944, 945, 949, 950 e 959. No preparo do inoculante foi utilizado o meio YMA, sem Agar, para obtenção de uma suspensão líquida de rizóbios. A solução foi distribuída em erlenmeyers de 125 mL e mantida em agitação permanente no agitador mecânico horizontal após incubação por oito dias, empregando-

se agitador mecânico horizontal (Hungria e Araújo, 1994). A inoculação foi efetuada com o auxílio de uma pipeta individual, aplicando-se cinco mL inóculo na base do colo de plântulas após a repicagem para os sacos.

Na condução do ensaio, a irrigação dos sacos foi realizada diariamente com remoção regular de plantas invasoras, por extração manual. Foram tomadas as medidas de crescimento das plantas em diâmetro do colo e comprimento do caule, aos 1º, 30, 60 e 90 dias após a aplicação dos tratamentos. O diâmetro do colo foi tomado como o maior diâmetro do caule na superfície do solo, com um paquímetro digital. Como comprimento do caule considerou-se a distância entre a superfície do solo e o meristema principal das plantas, medida com régua. Estimativas do incremento do crescimento mensal do comprimento do caule e diâmetro do colo foram obtidas com a fórmula $(h_2 - h_1 / t_2 - t_1) \times 30$, onde h_2 e h_1 equivalem as medidas efetuadas no t_2 e t_1 , respectivamente (Benincasa, 1988).

A colheita e avaliação das plantas foram efetuadas após 91 dias de enviveiramento, quando as mesmas já apresentavam qualidade para o plantio definitivo. As plantas foram extraídas inteiras dos sacos. O solo agregado às raízes foi destorroado e as raízes foram lavadas cuidadosamente sob uma peneira para evitar a perda de nódulos. Com uma tesoura de poda, foi separada a parte aérea das raízes, em seguida os nódulos foram extraídos do sistema radicular das mudas, sendo posteriormente contados e pesados.

Foram determinados a biomassa fresca e seca da parte aérea, raízes, caule, folhas e nódulos. A avaliação da biomassa seca foi realizada após secagem por 72 horas em estufa à 65° C. Após a secagem e pesagem, amostras de folhas foram moídas para determinações da concentração de N foliar, realizadas pelo método de Kjeldahl, no Laboratório Temático de Solos e Plantas do INPA.

Parâmetros adicionais também foram considerados para a interpretação dos resultados, como a biomassa do caule, que foi determinado pela subtração da biomassa das folhas na biomassa da parte aérea seca, o peso específico dos nódulos, calculado pelos valores da biomassa nodular seca dividido pelo número de nódulos e a relação raiz/parte aérea, obtida pela razão entre essas duas variáveis.

Para comparação das médias dos tratamentos, empregou-se a Anova. O processamento estatístico foi realizado através do programa Estat (UNESP, 2002), utilizando-se o teste de Tukey ao nível de 1 ou 5% de probabilidade. Os dados em porcentagem foram transformados em arco-seno $(x+0,01)^{0,5}$ e dados de contagem do número de nódulos, biomassa seca e peso específico dos nódulos foram transformados para $(x+0,01)^{0,5}$, de acordo com Centeno (1990). Foi avaliada a significância da correlação entre variáveis de desenvolvimento e indicadores de

modulação das plantas para estimar a eficiência da simbiose estabelecida pelas leguminosas e os rizóbios nos solos.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período experimental as plantas de palheteira cresceram satisfatoriamente e aos 91 dias apresentaram qualidade para o plantio definitivo, com taxa de sobrevivência de 100 %. Durante o período de enviveiramento não foi registrada a ocorrência de pragas ou doenças que afetassem o desenvolvimento das mudas.

Todas as estirpes de rizóbios da coleção do INPA avaliadas como inoculante de palheteira eram homólogas e apresentaram algumas variações em suas características fenotípicas e fisiológicas, e foram descritas entre quatro e dez dias de incubação, conforme apresentado na Tabela 2.1. Em meio de cultura YMA pH 6,0 sem a adição de corante, as colônias formadas eram brancas, variando de branco leitoso, opaco, gelo e translúcidas. O diâmetro de colônias isoladas foi sempre muito pequeno, sendo inferior a 1 mm de diâmetro. A produção de muco por 87,5 % das estirpes foi classificada como pouca e a colônia mais seca foi a 938, que não produziu muco. A tendência a agrupamento das colônias foi baixa, e, por fim, a consistência das colônias variou entre butirosa e coriácea.

Tabela 2.1. Características fenotípicas e fisiológicas das estirpes de rizóbios da coleção do INPA, isoladas de nódulos de palheteira (*Clitoria fairchildiana*), incubadas em meio YMA, pH 6,0.

Estirpes	Incubação (dias)	Coloração	Tamanho (mm)	Produção de muco	Coalescência	Consistência
938	4	Branco	< 1,0	Ausente	Ausente	Coriácea
941	9	Translúcido	< 1,0	Pouca	Alta	Coriácea
943	4	Branco-gelo	< 1,0	Pouca	Pouca	Butirosa
944	10	Branco-opaco	< 1,0	Pouca	Pouca	Butirosa
945	8	Branco-gelo	< 0,5	Pouca	Pouca	Butirosa
949	10	Branco	< 0,5	Pouca	Pouca	Butirosa
950	10	Branco-opaco	< 1,0	Pouca	Pouca	Butirosa
959	9	Branco-opaco	< 0,5	Pouca	Pouca	Coriácea

O tipo de solo influenciou o crescimento em comprimento do caule e seu incremento mensal e a biomassa do caule das mudas, que foi favorecido em solo Latossolo Amarelo comparado ao Argissolo Vermelho Amarelo, conforme apresentado na Tabela 2.2. O

diâmetro do colo e seu incremento mensal, a biomassa das folhas, raízes e a relação raiz/parte aérea das plantas não diferiram significativamente entre esses solos. Embora com diferenças significativas o comprimento do caule da palheteira em solo Latossolo Amarelo apresentou em média 2,5 cm acima das plantas conduzidas em solo Argissolo Vermelho Amarelo, mas para o incremento mensal de crescimento no comprimento do caule as mudas conduzidas em Latossolo apresentaram velocidade de quase 1,0 cm mês⁻¹ maior que as que cresceram em Argissolo. Para o diâmetro colo as diferenças entre solos foram mínimas e o incremento mensal de crescimento apresentou taxas iguais.

Tabela 2.2. Efeito do tipo de solo nas medidas e no incremento do crescimento, produção de biomassa e relação raiz/parte aérea de mudas de palheteira (*Clitoria fairchildiana*), aos 91 dias após a repicagem^{*1}.

Solos	Comprimento do caule (cm)	IMCC ^{*2} (cm)	Diâmetro do colo (mm)	IMDC ^{*2} (mm)	Biomassa seca (g)			Relação raiz/parte aérea
					Folhas	Caule	Raízes	
Argissolo	42,1 b	8,3 b	6,5 a	1,3 a	2,23 a	2,46 b	1,68 a	0,40 a
Latossolo	44,6 a	9,2 a	6,6 a	1,3 a	2,52 a	2,99 a	1,81 a	0,38 a
Teste de F	5,32 [*]	4,33 [*]	0,37 ^{ns}	0,58 ^{ns}	2,24 ^{ns}	15,17 ^{**}	2,43 ^{ns}	0,41 ^{ns}

^{*1} Valores seguidos da mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si no nível de 1 ou 5% de probabilidade; ^{ns} – não significativo.

^{*2} IMCC- Incremento mensal em comprimento do caule (cm mês⁻¹); IMDC- Incremento mensal do diâmetro do colo (mm mês⁻¹).

Foi verificado que a biomassa do caule das mudas de palheteira em solo Latossolo foi 17,7 % maior que em Argissolo e esta diferença foi estatisticamente significativa. As evidências são de que a palheteira se adapta muito bem as diferentes condições de solo em que cresceu. Esta razão justifica possivelmente a ausência de diferenças na biomassa radicular das plantas e também da relação raiz/parte aérea, que mostrou alta estabilidade e classificando-se na faixa de valores definidos por Arcoverde e Moreira (1998) como um indicador adequado para avaliar a qualidade das mudas formadas.

As diferentes formas de suprimento de N não afetaram as medidas de crescimento de palheteira bem como sua taxa de incremento mensal, a biomassa foliar, do caule e a relação raiz/parte aérea das mudas, mas influenciaram seu desenvolvimento radicular (Tabela 2.3). As medidas de comprimento do caule das plantas mostraram alta estabilidade, variando pouco entre 40,5 e 45,9 cm em resposta a forma de suprimento de N, com incremento mensal médio de 8,7 cm mês⁻¹. As medidas de diâmetro do colo das plantas também refletiram esta estabilidade, com média de incremento mensal de 1,3 mm mês⁻¹. Soares e Rodrigues (2008) concluíram que em mulungu-do-litorial (*Erythrina speciosa*) e coração-de-negro (*Poecilanthe*

Tabela 2.3. Efeito da forma de suprimento de nitrogênio nas medidas e no incremento do crescimento, produção de biomassa e relação raiz/parte aérea de mudas de palheteira (*Clitoria fairchildiana*) aos 91 dias após a repicagem.*¹

Formas de suprimento de nitrogênio	Comprimento do caule (cm)	IMCC* ² (cm)	Diâmetro do colo (mm)	IMDC* ² (mm)	Biomassa seca (g)			Relação raiz/parte aérea
					Folhas	Caule	Raízes	
Testemunha	42,1 a	8,3 a	6,3 a	1,1 a	2,24 a	2,22 a	1,56 bc	0,38 a
Testemunha N	43,8 a	8,8 a	6,8 a	1,3 a	2,05 a	2,89 a	1,94 abc	0,40 a
Estirpe 938	45,0 a	8,8 a	6,5 a	1,1 a	1,91 a	2,88 a	1,80 abc	0,41 a
Estirpe 941	42,4 a	8,4 a	7,0 a	1,4 a	1,94 a	2,71 a	1,90 abc	0,42 a
Estirpe 943	45,9 a	9,8 a	6,8 a	1,3 a	2,55 a	2,76 a	1,69 abc	0,37 a
Estirpe 944	40,5 a	7,9 a	7,0 a	1,5 a	3,08 a	3,18 a	2,19 a	0,39 a
Estirpe 945	44,2 a	8,8 a	6,8 a	1,3 a	3,03 a	3,09 a	2,03 ab	0,47 a
Estirpe 949	44,6 a	9,9 a	6,2 a	1,2 a	2,68 a	2,70 a	1,38 c	0,33 a
Estirpe 950	41,7 a	8,4 a	6,2 a	1,3 a	2,11 a	2,39 a	1,51 bc	0,35 a
Estirpe 959	43,2 a	8,4 a	6,2 a	1,3 a	2,15 a	2,43 a	1,43 bc	0,38 a
Teste de F	0,92 ^{ns}	1,04 ^{ns}	2,04 ^{ns}	1,26 ^{ns}	2,10 ^{ns}	1,99 ^{ns}	4,18 ^{**}	1,22 ^{ns}

*¹Valores seguidos da mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si ao nível de 1 % de probabilidade (P<0,01); ^{ns} – não significativo.

*²IMCC- Incremento mensal em comprimento do caule (cm mês⁻¹); IMDC- Incremento mensal do diâmetro do colo (mm mês⁻¹).

parviflora), a inoculação com rizóbio não influenciou significativamente o estabelecimento e o crescimento inicial das plantas. Porém, em outro estudo de seleção de estirpes para palheteira, Franco e Faria (1997), identificaram e recomendaram as estirpes de rizóbios BR 8803 e BR 8005, avaliadas como eficientes em vasos com solo da região sudeste.

Verificaram-se poucas variações na biomassa foliar e as mínimas variações na biomassa do caule seco indicam que esta estrutura da planta é menos afetada pelas formas de suprimento de N. As pequenas variações na relação raiz/parte aérea para as formas de suprimento de N apresentaram a média de 0,39 mais uma vez indicam a estabilidade genética da espécie. Além da identificação de espécies, é necessário selecionar para cada fabácea, estirpes de rizóbio com as melhores características de eficiência, competitividade, sobrevivência saprofítica, estabilidade genética, tolerância a estresses de altas temperaturas, acidez do solo e aos baixos níveis nutricionais encontrados em muitos solos tropicais, com isso podendo dispensar total ou parcialmente a adubação nitrogenada (Mendes *et al.*, 1994; Ferreira *et al.*, 2000).

Para o desenvolvimento radicular, a inoculação com a estirpe 944 superou significativamente (P<0,01) as mudas testemunhas não inoculadas e que não receberam N-mineral e também as plantas inoculadas com as estirpes 949, 950 e 959. Nota-se que a ausência de interações significativas entre os tipos de solo e as formas de suprimento de N sugere uma alta adaptação da palheteira a diferentes condições edáficas e de captação de N

que reforçam o seu potencial de estabelecimento nos solos de terra firme da Amazônia Central.

O tipo de solo influenciou o número e biomassa dos nódulos formados, bem como a concentração de N-foliar nas mudas de palheteira, mas não afetou o peso específico dos nódulos ou os teores de N absorvidos (Tabela 2.4). O número e biomassa dos nódulos foram significativamente maiores ($P < 0,01$) em solo Argissolo Vermelho Amarelo, comparado ao Latossolo Amarelo, possivelmente favorecido pela textura mais arenosa e, portanto, com maior aeração característica deste solo. Tais características somadas ao bom funcionamento deste sistema garantem a atividade biológica do solo e a interação entre o sistema radicular e a rizosfera (Kaiser, 2010), portanto, solos mais permeáveis e aerados favorecem o processo simbiótico entre leguminosas e rizóbios. Desse modo, no solo Argissolo as plantas de palheteira desenvolveram em média 20 nódulos a mais que as plantas no Latossolo. Nestas condições a biomassa dos nódulos secos foi 16,3 % maior. Entretanto, o tamanho dos nódulos formados, avaliado pelo peso específico dos nódulos não diferiu entre os solos sugerindo certo padrão no desenvolvimento dos nódulos desta espécie.

Tabela 2.4. Efeito do tipo de solo no número de nódulos, biomassa dos nódulos secos, peso específico dos nódulos e teores nitrogênio foliar em mudas de palheteira (*Clitoria fairchildiana*), aos 91 dias após o transplante, sob enviveiramento.*¹

Solos	Número de nódulos	Biomassa dos nódulos secos (mg)	Peso específico dos nódulos (mg nódulo ⁻¹)	N-foliar (%)	Teor de N (mg planta ⁻¹)
Argissolo	67 a	32,5 a	4,4 a	3,62 a	81,11 a
Latossolo	47 b	27,2 b	4,5 a	3,38 b	85,07 a
Teste F	51,41**	38,47**	0,96 ^{ns}	4,71*	0,33 ^{ns}

*¹ Valores seguidos da mesma letra minúscula nas colunas, não diferem entre si ao nível de 1 ou 5% de probabilidade ($P < 0,01$), ($P < 0,05$); ^{ns} – não significativo.

O maior número e biomassa dos nódulos formados em solo Argissolo Vermelho Amarelo também resultaram em uma maior porcentagem de N-foliar nas mudas de palheteira, comparado às plantas que cresceram em solo Latossolo Amarelo. Assim as plantas que cresceram em solo Argissolo acumularam 6,6 % a mais de nitrogênio nas folhas e ainda assim esse pequeno incremento foi significativamente superior determinado nas plantas que cresceram no Latossolo. Porém esta maior concentração de N entre solos não resultou em diferenças nos teores totais de N na planta.

As diferentes formas de suprimento de N afetaram significativamente a formação, o desenvolvimento nodular e os teores de N, mas não o peso específico de nódulos e a

Tabela 2.5. Efeito da forma de suprimento de nitrogênio no número de nódulos, biomassa dos nódulos secos, peso específico dos nódulos e teores concentração de nitrogênio foliar em mudas de palheteira (*Clitoria fairchildiana*), aos 91 dias após o transplantio, sob envolvimento^{*1}.

Formas de suprimento de N	Número de nódulos	Biomassa dos nódulos secos (mg)	Peso específico dos nódulos (mg nódulo ⁻¹)	N-foliar (%)	Teor de N (mg planta ⁻¹)
Testemunha	52 ab	27,3ab	4,9 a	3,39 a	76,08 a
Testemunha N	48 b	25,7ab	4,2 a	3,43 a	70,24 a
Estirpe 938	58 ab	31,9ab	4,7 a	3,59 a	67,69 a
Estirpe 941	53 ab	28,1ab	4,1 a	3,44 a	65,82 a
Estirpe 943	68 a	32,6ab	4,4 a	3,67 a	93,83 a
Estirpe 944	67 ab	33,6 a	4,6 a	3,54 a	109,03 a
Estirpe 945	59 ab	29,6ab	4,4 a	3,66 a	110,78 a
Estirpe 949	55 ab	28,7ab	4,6 a	3,41 a	90,88 a
Estirpe 950	57 ab	27,0ab	4,0 a	3,49 a	73,25 a
Estirpe 959	47 b	24,3 b	4,5 a	3,40 a	73,31 a
Teste F	2,61 ^{**}	2,69 ^{**}	1,14 ^{ns}	3,01 ^{ns}	2,38 [*]

^{*1}Valores seguidos da mesma letra minúscula nas colunas, não diferem entre si no nível de 1 e 5 % de probabilidade.; ^{ns} – não significativo.

concentração de N na biomassa foliar das mudas de palheteira (Tabela 2.5). As estirpes fornecidas pela inoculação e a população nativa de rizóbios do solo, contribuíram para o estabelecimento de nódulos, de modo que ao final do experimento, a taxa de nodulação da palheteira foi de 95 %. Uma amostra dos nódulos coletados de palheteira pode ser visualizada na Figura 2.1. Como o padrão de nodulação das espécies de *Clitoria* é considerado promiscuo, ou seja, compatível com várias espécies de rizóbios, as respostas à inoculação desta espécie devem sempre considerar a presença de populações nativas, embora isso não assegure que estas sejam eficientes.

O número de nódulos formados pela inoculação com a estirpe 943 superou significativamente ($P < 0,01$) o das plantas da testemunha nitrogenada e o das mudas inoculadas com a estirpe 959. O menor número de nódulos formados no tratamento testemunha fertilizada com N pode ser atribuído ao efeito inibidor que o fertilizante mineral nitrogenado prontamente solúvel exerce sobre o estabelecimento de nódulos em leguminosas hospedeiras. Sabe-se que elevadas doses de nitrogênio inibem a nodulação, pois a mesma ocorre em resposta às demandas nutricionais da planta (Waterer e Vessey, 1993). Deste modo, na presença de N-mineral tais demandas são reduzidas, não havendo o estímulo à nodulação (Moreira e Siqueira, 2006). Estudos demonstraram a inibição de nodulação com fornecimento de adubação nitrogenada às plantas. Vieira *et al.* (2010) constataram que a inoculação do



Figura 2.1. Nódulos de palheteira (*Clitoria fairchildiana*), obtidos em ensaio de seleção de estirpe para uso como inoculante.

feijoeiro foi significativamente superior à testemunha que recebeu N mineral quanto ao número de nódulos. Para a biomassa de nódulos, as diferenças verificadas foram somente entre duas estirpes inoculadas, de modo que as plantas que receberam a estirpe 944 apresentaram biomassa de nódulos superior às inoculadas com a estirpe 959.

O peso específico de nódulos não diferiu entre tratamentos e apresentou média de 4,4 mg nódulo⁻¹, o que significa que independente da forma de suprimento de N os nódulos desenvolvidos no sistema radicular da palheteira apresentam tamanho equitativo. O formato do nódulo adulto para esta espécie é o esférico, e considera-se que as espécies de Fabaceae que diferenciam essa forma de nódulos não ramificada apresentam o padrão de nodulação mais evoluído na relação simbiótica que se estabelece (Sprent 1994).

As formas de suprimento de N nos dois solos de terra firme pesquisados também não afetaram significativamente a concentração de N foliar, que apresentou média de 3,50 %. Independente da forma de fornecimento de N, as variações observadas na concentração de N-foliar entre 3,39 e 3,67 % revelam um alto grau de eficiência da palheteira na captação de N₂. Neste experimento não houve diferenças significativas para o N-foliar entre plantas inoculadas com rizóbios e as que receberam ureia, entretanto Santos (2008), concluiu que para desmódio (*Desmodium heterocarpon* subsp. *ovalifolium*), os tratamentos adubados com nitrogênio mineral apresentaram tendência à redução no teor de N, assim como no percentual de proteína bruta, da parte aérea. É possível que isso se deva ao fato de que a absorção de formas de N no solo é principalmente como NO₃. Na célula vegetal as plantas ainda investirão

energia para reduzir o NO_3 , processo que é efetuado pela enzima nitrato redutase, ao passo que o produto da fixação biológica é diretamente a forma reduzida (Hungria e Stacey, 1997). Para outras leguminosas arbóreas como a leucena (*Leucaena leucocephala*), a inoculação das mudas com estirpes de rizóbios mostrou-se eficiente, favorecendo o desenvolvimento de biomassa das mudas e proporcionando elevadas taxas de nitrogênio foliar, com média de $43,6 \text{ g kg}^{-1}$, com concentração média de N nas folhas de 4,4 % (Ramos e Souza, 2013).

O teor de N-total nas folhas da palheteira apresentou uma tendência de diferenciação entre as formas de fornecimento de N, identificada pelo Teste F ($P < 0,05$), evidenciando as maiores quantidades de N absorvidas em mudas inoculadas com as estirpes 944 e 945, ao passo que aquelas que receberam N-mineral apresentaram o menor valor acumulado deste nutriente. Isso evidencia uma maior eficiência do processo biológico comparado às formas tradicionais de nutrição mineral das plantas com fertilizantes industriais. Quando as mudas foram inoculadas com a 944 o nitrogênio acumulado foi maior 30,22 e 35,58 % que as sem inoculação e sem adição de ureia e as que receberam N-mineral. Por outro lado quando as mudas de palheteira foram inoculadas com a estirpe 945 acumularam 31,32 e 36,59 % mais N no material foliar comparado às plantas sem inoculação e sem adição de ureia e as que receberam N-mineral, respectivamente.

As relações entre os teores de N-foliar e a biomassa dos nódulos secos nas mudas de palheteira foram usadas para a seleção das melhores estirpes e estão apresentadas na Figura 2.2. Como podem ser verificadas, considerando-se a biomassa dos nódulos secos, quatro estirpes empregadas como inóculo posicionaram-se no terço médio da Figura 2.2, que foram delimitados pelo tratamento testemunha e testemunha nitrogenada que são elas: 943, 944, 945 e 949. A inoculação de mudas de palheteira com a estirpe 945 contribuiu para o mais elevado teor de nitrogênio nas folhas, evidenciando sua habilidade em promover a absorção de N com a média geral da biomassa de nódulos encontrada nas plantas. Destacou-se também a estirpe 944 pela contribuição em N e pelo registro da maior média de biomassa foliar para as diferentes formas de fornecimento N consideradas o que concordou também com sua alta biomassa de nódulos. A estirpe 949, com valores de nódulos secos abaixo da média foi eficiente na captação de N_2 , assim como a estirpe 943, no entanto, com valores acima da média para biomassa de nódulos. As estirpes 950 e 959 foram consideradas de eficiência mediana por seu posicionamento nos quadrantes médios da Figura 2.2. E por fim, as estirpes 938 e 941, posicionadas no quadrante inferior da Figura 2.2, foram consideradas as menos eficientes na fixação de N_2 .

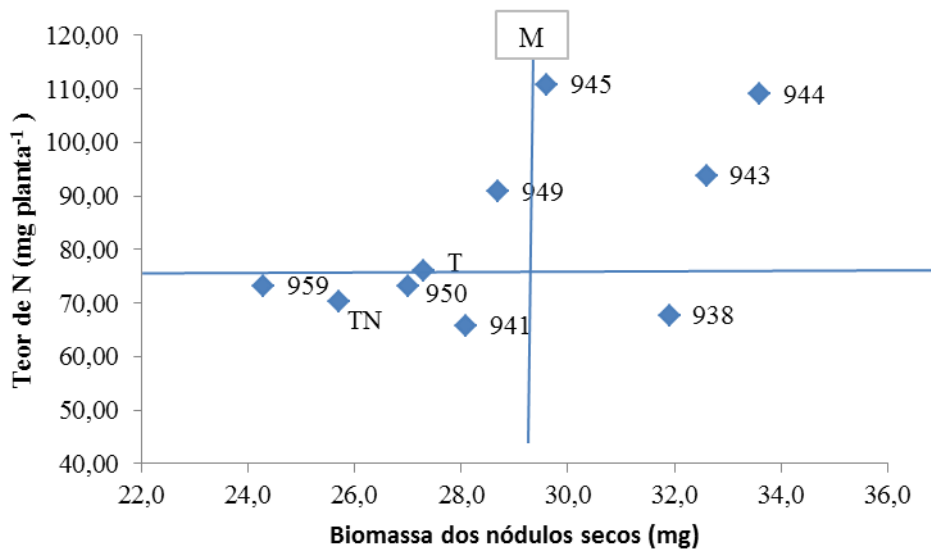


Figura 2.2. Relações entre os teores de nitrogênio foliar e a biomassa dos nódulos secos, com diferentes formas de suprimento de N em solo Argissolo Vermelho Amarelo e Latossolo Amarelo, aos 91 dias após o transplântio.*¹

*¹M – Média da biomassa dos nódulos secos (29,0 mg planta⁻¹); T – Plantas não inoculadas e sem fertilização com N-mineral; TN – Plantas supridas com N-mineral.

A eficiência do processo simbiótico estabelecido entre os rizóbios e a palheteira está demonstrada na Figura 2.3. Como pode ser observado, foram constatadas correlações significativas entre a concentração de nitrogênio foliar, o número e biomassa dos nódulos secos estabelecidos no sistema radicular das plantas. Para a relação entre a concentração de N-foliar e número de nódulos o R^2 foi de 0,61, e uma equação de regressão foi gerada e apresentada na Figura 2.3-A. A correlação linear significativa verificada demonstra que o incremento do número de nódulos formados também contribuiu para o aumento da concentração de N-foliar nas plantas. O desenvolvimento nodular também foi correlacionado com a concentração de N-foliar da palheteira e o R^2 foi de 0,53, estabelecendo-se uma relação significativa entre essas variáveis independentes e a equação de regressão gerada está apresentada na Figura 2.3-B. Valores mais elevados de correlação entre os teores de N-total e biomassa seca dos nódulos foram verificadas por Souza (2007) em solos da Mata Atlântica de Pernambuco aos 70 dias de transplântio, onde foi identificado um R^2 de 0,84, demonstrando um grau de afinidade mais avançado entre essas duas variáveis nas condições experimentais em que a pesquisa foi conduzida. Os valores de R^2 de 0,61 e 0,53 determinados para a palheteira nos solos da Amazônia sugerem outras formas de absorção de N complementares ao processo simbiótico, possivelmente devido à absorção do N mineralizado no solo.

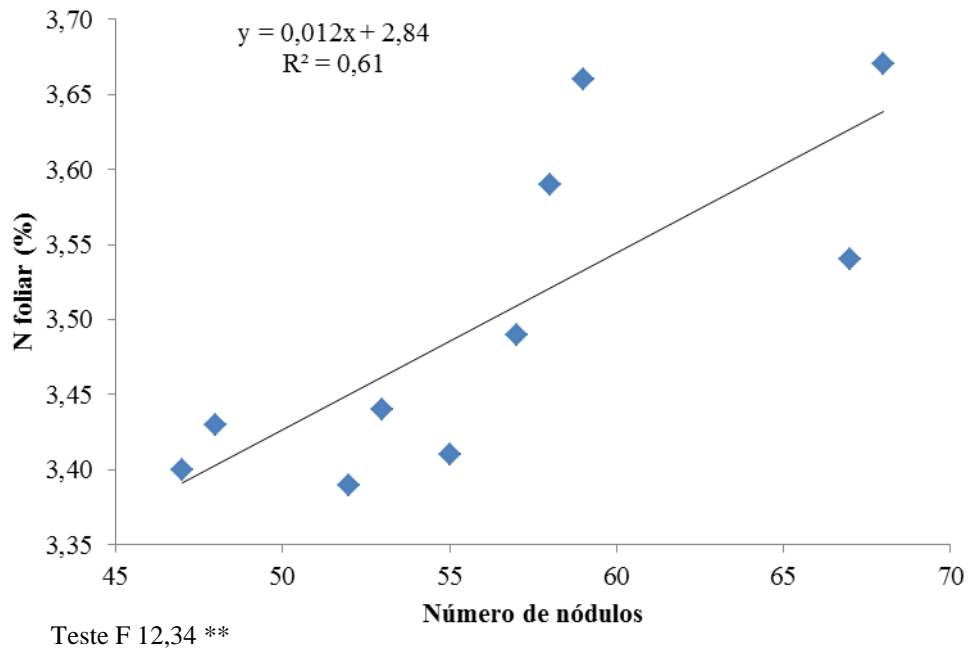
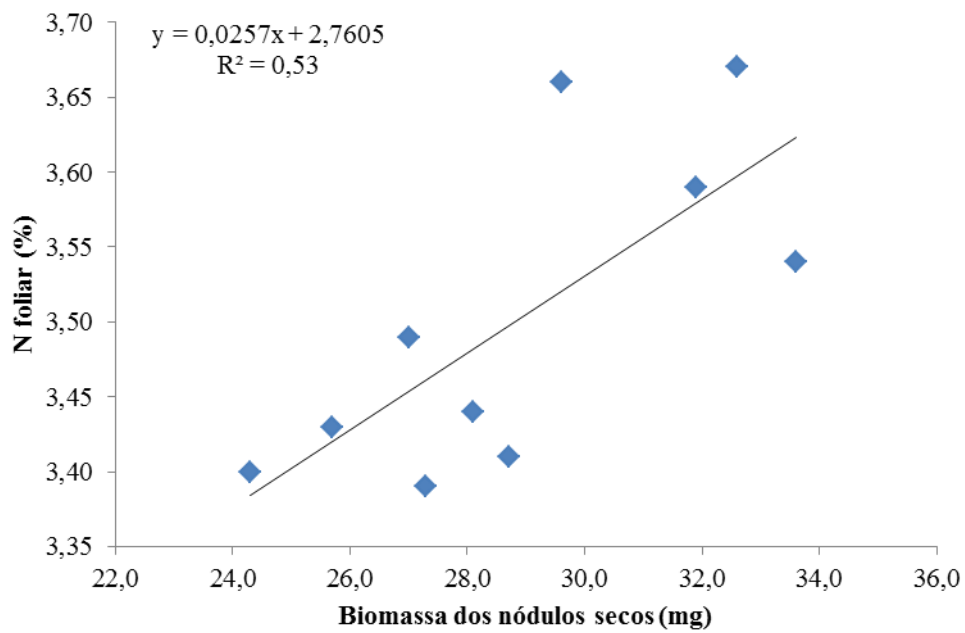
**A****B**

Figura 2.3. Correlações entre a concentração de nitrogênio foliar e o número de nódulos (A) e entre o nitrogênio foliar e a biomassa dos nódulos secos (B) com diferentes formas de suprimento de N em solo Argissolo Vermelho Amarelo e Latossolo Amarelo, aos 91 dias após o transplantio.

2.4. CONCLUSÕES

A palheteira (*Clitoria fairchildiana*) mostrou adaptação às duas condições de solo da terra firme pesquisadas, entretanto, as medidas de crescimento e de desenvolvimento foram favorecidas em solo Latossolo Amarelo comparado ao Argissolo Vermelho Amarelo, e o número, biomassa de nódulos secos e concentração de N-foliar foram maiores em solo Argissolo que no Latossolo. O fornecimento de N na forma de N-mineral inibiu a formação de nódulos, desfavorecendo o processo simbiótico. Por outro lado, a inoculação da palheteira com as estirpes de rizóbios 943, 944, 945 e 949 favoreceram o desenvolvimento das plantas e proporcionaram elevados teores de N nas folhas, e foram identificadas como as de maior potencial para uso como inoculante desta espécie nos solos de terra firme pesquisados.

2.5. REFERÊNCIAS

- Arco-Verde, M.; Moreira, M.A.B. Viveiros florestais. *Construção, custos, cuidados e atividades desenvolvidas para a produção de mudas*. Boa vista: EMBRAPA-CPAF, Documentos 3. 1998. 32p.
- Centeno, A.J. *Curso de estatística aplicada à biologia*. Goiânia: UFG, Centro Editorial, 1990. 188p. (Coleção Didática, 3).
- Benincasa, M.M.P. *Análise de crescimento das plantas (Noções básicas)*. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, FUNEP, 1998, 42p.
- EMBRAPA, 1997. *Manual de Método de análise de solo*. RJ. 2. ed. Revisada e atualizada. 212p.
- Espindola, J.A.A.; Almeida, D.L.; Guerra, J.G.M. 2004. Estratégias para utilização de leguminosas para adubação verde em unidades de produção agroecológica: Embrapa Agrobiologia, 24 p. (Embrapa Agrobiologia. Comunicado Técnico, 174).

- Epstein, E.; Bloom, A. J. 2006. Nutrição e crescimento. In: Epstein, E.; Bloom, A. J. *Nutrição Mineral de Plantas*. Londrina, Planta, 251-286p.
- Falcão, P. de S.; Silva, J. R. A. da. 2004. Características de adsorção de fósforo em alguns solos da Amazônia Central. *Acta Amazonica*, 34(3): 337-342.
- Ferreira, A.N.; Arf, O.; Carvalho, M.A.C; Araújo, R.S.; Sá, M.E. ; Buzetti, S. 2000. Estirpes de *Rhizobium tropici* na inoculação do feijoeiro. *Scientia Agricola*, 57: 507-512.
- Ferreira, S.J.F.; Luizão, F.J.; F. Miranda, S.A.; SILVA, M. S. R.; VITAL, A.R.T. 2006. Nutrientes na solução do solo em floresta de terra firme na Amazônia central submetida à extração seletiva de madeira. *Acta Amazonica*, 36: 59-68.
- Figueiredo, L.A. 2009. Nutrição nitrogenada (^{15}N) em soja convencional e transgênica sob aplicação do herbicida glifosato. Universidade de São Paulo/Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Dissertação. 82p.
- Franco, A.A.; Faria, S. M. de. 1997. The contribution of N_2 -fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. *Soil Biol. Biochem*, 29(516): 897-903.
- Graham, P.H.; Vance, C.P. 2003. Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiology*, 131: 872-877.
- Halliday, J. 1984. Integrated approach to nitrogen fixing tree germoplasm development. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 19 (s/nº): 91-117.
- Hungria, M.; Araújo, R.S. 1994. *Manual de Métodos empregados em estudos de Microbiologia Agrícola*. Brasília: EMBRAPA-CNPAP, Documentos n.46, 542p.
- Hungria, M.; Stacey, G. 1997. Molecular signals exchanged between host plants and Rhizobia: basic aspects and potential application in agriculture. *Soil Biol. Biochem.*, UK, 29 (5/6): 819-830.
- Kaiser, D.R. 2010. Estrutura e água em argissolo sob distintos preparos na cultura do milho. Santa Maria, Rio Grande do Sul. Tese. 150p.

- Lorenzi, H. 2002. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil*. (4ªed.). Instituto Plantarum, Nova Odessa, v.1, 384p.
- Malavolta, E.; Pimentel-Gomes, F.; Alcarde, J.C. 2000. *Adubos e Adubações*. São Paulo: Nobel. 200p.
- Melo, S.R. 2009. Desempenho da fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijão-caupi em Roraima. Universidade Federal de Roraima. Programa de Pós-graduação em Agronomia. *Dissertação*. 64p.
- Mendes, I.C. Suhet, A.R.; Peres, J.R.R.; Vargas, M.A.T. 1994. Eficiência fixadora de estirpes de rizóbio em duas cultivares de feijoeiro. *Rev. Bras. de Ciênc. do Sol.*, Campinas,18: 421-425.
- Moreira, F.M.S.; Siqueira, J.O. 2006. *Microbiologia e bioquímica do solo*. 2.ed. atual. eampl. Lavras: UFLA. 729 p.
- Ramos, D.B.P; Souza, L.A.G. 2013. Seleção de estirpes de rizóbios para formação de mudas de leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam) De Wit.) em Argissolo Vermelho Amarelo. *Rev. Bras. de Agroecologia*, 8(1): 28-39.
- Santos, L.C. 2008. Crescimento inicial de leguminosas forrageiras tropicais inoculadas com bactérias fixadoras de nitrogênio. Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus, Bahia. *Dissertação*. 52p.
- Somasegaran, P.; Hoben, H.J. 1985. *Methods in legume-Rhizobium Technology*. Univ. do Hawaii, NifTAL, 367p, p. 33-35.
- Soares, P.G.; Rodrigues, R.R. 2008. Semeadura direta de leguminosas florestais: efeito da inoculação com rizóbio na emergência de plântulas e crescimento inicial no campo. *Sci. For.*, Piracicaba, 36(78):115-121.

- Souza, L.A.G. 2006. Biodiversidade de rizóbios e eficiência da fixação de nitrogênio em solos da mata Atlântica de Pernambuco, Tese de Doutorado da UFRPE, Recife, 128p.
- Sprent, J.I. 1994. Evolution and diversity in the legume-Rhizobium symbiosis: Chaos theory? *Plant and Soil*, 161: 1-10.
- Trevisan, H; Nadai, J.; Lunz, A. M.; Carvalho, A.G. 2004. Consumo foliar e aspectos biológicos de *Urbanus acawoios* (Lep.: Hesperidae) alimentado com folíolos de *Clitoria fairchildiana* (Leguminosae: Faboideae) em três níveis de maturidade. *Ciência Rural*, Santa Maria, 34(1): 1-4.
- Vieira, L.S.; Santos, P.C.T.C. 1987. Amazônia: seus solos e outros recursos naturais. São Paulo: Ceres, p. 416.
- Vieira, C.L.; Freitas, A.D.; Silva, A.F.; Sampaio, E.V.; Araújo, M.S. 2010. Inoculação de variedades locais de feijão macassar com estirpes selecionadas de rizóbio. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 14(11): 1170–1175.
- Waterer, J.G.; Vessey, J.K. 1993. Effect of low static nitrate concentration on mineral nitrogen up take, nodulation, and nitrogen fixation in field pea. *Journal of Plant Nutrition*, 16: 1775-1789.