



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

**OBTENÇÃO DE ISOLADOS DE RIZÓBIOS COM CARACTERÍSTICAS  
AGRONÔMICAS DESEJÁVEIS PROVENIENTES DE SOLOS DA  
REGIÃO DO AMAZONAS**

**LUCIANA PINHEIRO NEGRO VAZ**

**MANAUS, AMAZONAS  
JANEIRO, 2014**

**LUCIANA PINHEIRO NEGRO VAZ**

**OBTENÇÃO DE ISOLADOS DE RIZÓBIOS COM CARACTERÍSTICAS  
AGRONÔMICAS DESEJÁVEIS PROVENIENTES DE SOLOS DA  
REGIÃO DO AMAZONAS**

Orientador: DR. LUIZ ANTONIO DE OLIVEIRA

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

**MANAUS, AMAZONAS  
JANEIRO, 2014**

V393 Vaz, Luciana Pinheiro Negro  
Obtenção de isolados de rizóbios com características  
agronômicas desejáveis provenientes de solos da região do  
Amazonas / Luciana Pinheiro Negro Vaz. --- Manaus: [s.n.], 2014.  
91 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2014.  
Orientador : Luiz Antonio de Oliveira.  
Área de concentração : Agricultura do Trópico Úmido.

1. Ecologia microbiana. 2. Solubilização de fosfato. I. Título.

CDD 631.41

**Sinopse:**

A utilização da simbiose leguminosa-rizóbia é uma alternativa para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável e de baixos insumos logo, faz-se necessário, desenvolver pesquisas para selecionar estirpes de rizóbios mais eficientes quanto às diversas características favoráveis para sua utilização pelas plantas. Então, foram avaliadas diversas estirpes de rizóbios em laboratório, quanto a tolerância à acidez e Al tóxico, a capacidade de solubilização de fosfato de cálcio (P-Ca) e alumínio (P-Al) e a produção de ácido indol-acético (AIA).

**Palavras-chave:** Solos Ácido, Tolerância à acidez e Al, Ácido indol-acético

À meus pais, Luiz Gustavo e Jamile  
e ao meu irmão Luiz Gustavo Júnior,

dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, pela oportunidade da realização e conclusão do curso.

Ao corpo docente do Curso de Agricultura no Trópico úmido - INPA, pela atenção e pelos ensinamentos recebidos.

Ao Dr. Luiz Antonio de Oliveira pela orientação que me auxiliaram na confecção deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia do Solo do INPA: Bianca Galúcio, Francisco Wesen, Karen Kelly, Luciana Brito, Lucinaia Nogueira e Michelle Isabelle.

Aos membros da Banca da Aula de Qualificação pelas sugestões.

A FAPEAM pela concessão da bolsa de estudo.

A todos que de uma forma ou de outra ajudaram na realização deste trabalho.

Agradeço.

# **OBTENÇÃO DE ISOLADOS DE RIZÓBIOS COM CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS DESEJÁVEIS PROVENIENTES DE SOLOS DA REGIÃO DO AMAZONAS**

## **RESUMO**

A maioria dos solos da Amazônia é ácida e com baixa concentração de nitrogênio e fósforo. A utilização da simbiose leguminosa-rizóbia é uma alternativa para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável e de baixos insumos. Pesquisas têm mostrado que alguns isolados de rizóbio, além de fixarem o N atmosférico, podem ainda solubilizar fosfatos pouco solúveis existentes no solo, disponibilizando mais P para as plantas, faz-se necessário, desenvolver pesquisas para selecionar estirpes de rizóbios mais eficientes quanto às diversas características favoráveis para sua utilização pelas plantas. Este trabalho teve como objetivos, avaliar em laboratório, a tolerância à acidez e Al tóxico, a capacidade de solubilização de fosfato de cálcio (P-Ca) e alumínio (P-Al) e a produção de ácido indol-acético (AIA). Para o teste de acidez e alumínio tóxico, entre os 100 isolados testados 91 e 82 apresentaram tolerância com crescimento acima de 3,06 aos 15 dias nos tratamentos com pH 6,5 e pH 4,5 + Al, respectivamente. O fator mais limitante para o crescimento dos isolados foi a acidez e o alumínio. Já para solubilização de fosfatos, dos 71 isolados, onde 46 solubilizaram P-Ca e 25 solubilizaram P-Al, sendo que 19 isolados solubilizaram tanto P-Ca quanto P-Al. Dentre os que solubilizaram fosfato de cálcio, 46 se comportaram como precoces e somente 1 como tardio já nos solubilizadores de alumínio, 24 se comportaram como precoces e 1 como tardio, os outros não se mostraram solubilizadores. Para a produção de AIA, 38 dos 71 isolados induziram taxas de crescimento radicular das plantas de pepino maiores do que nas plantas não inoculadas com os mesmos. Dentre os isolados avaliados, o que obteve melhor resultado foi o INPA R670 no tempo de 24h.

**Palavras-chave:** Solos Ácidos. Tolerância à acidez e Al. Solubilização de fosfato. Ácido indol-acético. Ecologia microbiana.

# **OBTAINING RHIZOBIAL ISOLATES WITH AGRONOMICAL DESIRABLE FEATURES OF SOILS FROM THE AMAZON REGION**

## **ABSTRACT**

The majority of the Amazonian soils is acid with low concentration of nitrogen and phosphorus. The use of leguminosae-rhizobia symbiosis is an alternative for the development of a sustainable agriculture of low input. Researches have showed that some isolates of rhizobia, besides fixing the atmospheric N, can still solubilize phosphate, availabilizing more P for the plants, then it is necessary to develop research to select strains of rhizobia more efficient in several favorable characteristics for use by plants. This research work had as objectives, to laboratory evaluations about the tolerance to acidity and toxic Al, the capacity to solubilize calcium (P-Ca) and aluminum (P-Al) phosphates and the indole-acetic acid production (AIA). To test acidity and aluminum toxicity, Among the 100 isolates tested, 91 and 82 presented tolerance with growth scale above 3,06 at 15th days in the treatment with pH 6,5 and pH 4,5 + Al, respectively. The most limiting factor the growth of the isolates ones was acidity and the aluminum. As for phosphate solubilization of the 71 isolates, where 46 isolated solubilized P-Ca and 25 solubilized P-Al, and 19 solubilized P-Ca as well as P-Al. Among the isolates able to solubilize calcium phosphate, 46 were considered as precocious and 1 as delayers and all the isolate evaluated presented capacity to solubilize aluminum phosphate, 24 were considered as precocious and 1 as delayers, the other not shown solubilizers. For the production of aia, 38 of the 71 isolates induced growth rate of root system of cucumber greater than in non-inoculated plants with them. Among the isolates, which had the best result was the INPA R670 in time of 24h.

**Key-Word:** Acid Soils, Acidity and Al tolerance, Phosphate solubilization, Indole-acetic acid, Microbial ecology.

## SUMÁRIO

<b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2 - OBJETIVO</b> .....	13
2.1 Objetivo Geral.....	13
2.2 Objetivos Específicos.....	13
<b>3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
3.1. Características dos solos da região, limitação de uso e alternativas de manejo.....	14
3.2. Grupo rizóbio.....	16
3.3. Fatores ambientais que afetam na interação entre rizóbio e leguminosa – pH e Alumínio.....	18
3.4. Capacidade de solubilização de fosfato por rizóbio.....	20
3.5. Produção de hormônio por rizóbio.....	22
<b>4 - CAPÍTULO I - TOLERÂNCIA À ACIDEZ E ALUMÍNIO TÓXICO POR RIZÓBIO ISOLADOS DE SOLOS DO AMAZONAS</b> .....	25
4.1 RESUMO.....	25
4.2 ABSTRACT.....	26
4.3 INTRODUÇÃO.....	27
4.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.4.1 Coleta de material.....	28
4.4.2 Isolamento dos nódulos.....	28
4.4.3 Teste de tolerância à acidez e ao alumínio tóxico.....	31
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.6 CONCLUSÕES.....	41
<b>5 - CAPÍTULO II - CAPACIDADE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS DE CÁLCIO E ALUMÍNIO DE RIZÓBIO ISOLADOS DE SOLOS DO AMAZONAS</b> .....	42
5.1 RESUMO.....	42
5.2 ABSTRACT.....	43
5.3 INTRODUÇÃO.....	44
5.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
5.4.1 Coleta de material.....	45
5.4.2 Isolamento dos nódulos.....	46
5.4.3 Solubilização de Fosfato de Cálcio e Alumínio.....	46
5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.6 CONCLUSÕES.....	56



<b>6 - CAPÍTULO III - PRODUÇÃO DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO POR RIZÓBIOS ISOLADOS DE SOLOS DO AMAZONAS NO SISTEMA RADICULAR DO PEPINO.....</b>	<b>57</b>
6.1 RESUMO.....	57
6.2 ABSTRACT.....	58
6.3 INTRODUÇÃO.....	59
6.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	60
6.4.1 Coleta de material.....	60
6.4.2 Isolamento dos nódulos.....	60
6.4.3 Produção de hormônio de crescimento através de isolados de rizóbios no sistema radicular do pepino.....	61
6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
6.6 CONCLUSÕES.....	66
<b>7 - REFERÊNCIAS.....</b>	<b>67</b>
<b>8 - APÊNDICE.....</b>	<b>90</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b> - Isolamento dos nódulos e seus respectivos locais de coleta.....	29
<b>Tabela 02</b> - Meio Mineral YMA.....	31
<b>Tabela 03</b> - Escala de valores para a avaliação do crescimento de rizóbio nos meios YMA (pH 6,5; pH 4,5+Al).....	32
<b>Tabela 04</b> - Médias do crescimento de rizóbio em meio YMA com pH 6,5 isolados de amostras de solos na Amazônia. Média de quatro repetições.....	36
<b>Tabela 05</b> - Médias do crescimento de rizóbio em meio YMA com pH 4,5 + Al isolados de amostras de solos na Amazônia. Média de quatro repetições.....	38
<b>Tabela 06</b> - Capacidade de solubilização de fosfato de cálcio dos isolados de rizóbio.....	49
<b>Tabela 07</b> - Capacidade de solubilização de fosfato de alumínio dos isolados de rizóbio...	53
<b>Tabela 08</b> - Crescimento radicular das plantas de pepino em resposta à inoculação por isolados de rizóbios e 3 doses de AIA comercial.....	64
<b>Tabela 09</b> - Quantidade das raízes crescidas em plantas de pepino em resposta à inoculação por isolados de rizóbios e 3 doses de AIA comercial.....	65

## LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

- Figura 1** – Ilustração do método de riscagem proposto por Oliveira e Magalhães (1999). A figura demonstra apenas uma repetição..... 32
- Figura 2** - Valores de crescimento para as estirpes de rizóbia nos respectivos tratamentos em placas de Petri com meio YMA (Oliveira e Magalhães 1999)..... 32
- Figura 3** - Crescimento de isolados de rizóbio durante de 15 dias de avaliação em meio YMA com pH 6,5..... 33
- Figura 4** - Crescimento de isolados de rizóbio durante de 15 dias de avaliação em meio YMA com pH 4,5 + Al..... 34
- Figura 5** - Distribuição das colônias nas placas de petri para verificação do halo de solubilização como indicativo de solubilização de fosfatos de cálcio e de alumínio..... 47
- Figura 6** - Índices de solubilização de alumínio dos isolados testados em 15 dias..... 49
- Figura 7** - Índices de solubilização de cálcio dos isolados testados em 15 dias..... 53

## 1 INTRODUÇÃO

A maioria dos solos da região amazônica é ácida, com alta concentração de alumínio e de baixa fertilidade, além de serem deficientes em N e P (Nicholaides *et al.*, 1983), dois elementos essenciais para as plantas e de difícil aplicação como fertilizantes pelos pequenos agricultores (Hara e Oliveira, 2005).

No entanto, alguns microrganismos do solo, que se associam às raízes das plantas, podem torná-las menos dependentes de adubos químicos, permitindo, assim, uma economia desses insumos e ao mesmo tempo, uma maior produtividade dos solos (Hara, 2003).

Portanto, cabem aos profissionais da área dar ao solo o melhor manejo possível, permitindo a manutenção da atividade microbiana e, conseqüentemente, os níveis de fertilidade do solo. A utilização de leguminosas na agricultura, por sua característica de apresentar simbiose com rizóbio e fungos micorrízicos e grande capacidade de exploração do solo, é de fundamental importância tanto para o equilíbrio biológico como para a reciclagem de nutrientes (Andreola e Fernandes, 2007). Com isso, há maior equilíbrio nutricional das plantas e maior resistência do sistema ao aparecimento de pragas e doenças (Holtz e Sá, 1995; Ambrosano *et al.*, 2000).

A fixação biológica do nitrogênio atmosférico (FBN) é um dos processos microbianos mais bem estudados e explorados tecnologicamente relacionados à agricultura e, a inoculação de sementes de leguminosas com bactérias diazotróficas é prática comum em vários países (Chagas Jr, 2007). No Brasil, a inoculação da soja (*Glycine max* L. (Meril.)) com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* propicia economia em fertilizantes nitrogenados (Dobereiner, 1997).

A inoculação das bactérias do grupo rizóbio, por exemplo, é uma prática com reconhecidos benefícios agrônômicos em áreas onde a espécie vegetal é cultivada pela primeira vez (Hume e Blair, 1992; Brockwell *et al.*, 1998) ou em solos nos quais o número de rizóbios é insuficiente para permitir uma nodulação eficiente da planta (Singleton *et al.*, 1992; Martins *et al.*, 2003).

A especificidade simbiótica e a competitividade das populações de rizóbios nativos influenciam as respostas da inoculação (Martins *et al.*, 2003; Xavier *et al.*, 2006); além disso, a população de rizóbios no solo também depende das condições bióticas e abióticas deste ambiente e das espécies de leguminosas silvestres ou cultivadas, tanto em tamanho quanto em

variabilidade (Simon *et al.*, 1996; Castro *et al.*, 1999). As leguminosas têm influência específica no processo de reconhecimento entre a planta e as bactérias. Através da seleção de estirpes eficientes de rizóbios é possível produzir mudas noduladas, com mais rápido crescimento e com resistência às condições de campo (Chagas Jr *et al.*, 2012).

A diversidade, inclusive de leguminosas, encontradas nos vários sistemas de uso da terra (capoeiras, pastagem tradicional, sistema agroflorestral, floresta e monocultura), na Amazônia, pode abrigar uma grande variabilidade de rizóbios (Pereira, 2000; Hara e Oliveira, 2005; Lima *et al.*, 2005), adaptados às condições de elevado pHs, acidez e temperaturas, predominantes nos solos da região, cujo imenso potencial ainda é pouco conhecido (Chagas Jr, 2007).

O estudo da diversidade das bactérias baseado em características culturais (morfológicas e fisiológicas), envolve a avaliação de parâmetros, como o tempo que as bactérias levam para formar colônias individuais em meio de cultura, o diâmetro das colônias, a forma, a cor, a produção de ácido, alteração do pH do meio de cultura com azul de bromotimol (Martins *et al.*, 1997b). Esses métodos fenotípicos de análise de características culturais de microrganismos possuem a vantagem de serem rápidos, permitindo uma análise prévia da diversidade (Rahmeier, 2009). Além destas, outras características utilizadas é a produção de exopolissacarídeos, tolerância à acidez e alumínio tóxico (Mukherjee e Asanuma, 1998; Oliveira e Magalhães, 1999; Campo e Wood, 2001; Andrade *et al.*, 2002), bem como, capacidade de solubilizar fosfatos (Igual *et al.*, 2001; Gynaneshwar *et al.*, 2002; Nahas, 2002; Vessey, 2003) e sintetizar ácido indol-acético (Hameed *et al.*, 2004; Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004). Estas características foram utilizadas com sucesso no estudo da ecologia de rizóbios (Martins *et al.*, 1997; Hara e Oliveira, 2004, 2005, Chagas Jr *et al.*, 2009; Chagas Jr *et al.*, 2010c), permitindo acessar a diversidade de rizóbio presentes em diferentes ecossistemas e usos da terra (Jesus *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2005).

Devido à diversidade de espécies de plantas, microrganismos e condições regionais, este tipo de estudo deve ser intensificado, para que se compreendam melhor essas associações, permitindo que sejam eficazes e auxiliem na viabilidade ecológica e econômica de sistemas agrícolas e agroflorestrais implantados na Amazônia (Hara e Oliveira, 2004). Esta região apresenta, ainda, um grande potencial para a seleção de estirpes mais eficientes e competitivas, visto que, nos poucos estudos realizados até o momento (Hara e Oliveira, 2004,

2005; Jesus *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2005), já foi identificado um alto grau de diversidade entre as mesmas.

Sendo assim, o trabalho pretende selecionar isolados de rizóbios de solos amazônicos quanto às características agronômicas desejáveis, com a finalidade de contribuir com informações científicas capazes de ajudar em um aumento no potencial da fixação biológica do nitrogênio atmosférico (FBN) em leguminosas e também no crescimento vegetal para o uso nesses solos.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1. Objetivo Geral**

Obter isolados de rizóbios quanto a várias características agronômicas desejáveis.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Estudar a influência de condições estressantes (teste de tolerância à acidez e Al tóxico) no crescimento de isolados em meio de cultura;
- Avaliar a capacidade dos rizóbios em solubilizar fosfatos de cálcio e alumínio;
- Avaliar a produção de hormônio de crescimento por estirpes de rizóbios no sistema radicular do pepino.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Características dos solos da região, limitação de uso e alternativas de manejo

Na Amazônia predominam duas classes de solo, os Latossolos e os Argissolos, que, juntos, representam cerca de 70% da região (Rodrigues, 1996).

Esses solos são profundos, bem drenados e apresentam, em geral, boas propriedades físicas. Do ponto de vista químico, esses solos são fortemente ácidos, com baixa fertilidade natural, elevada acidez e alta saturação com alumínio (Cochrane *et al.*, 1985; Alfaia e Oliveira, 1997; Oliveira *et al.*, 2003). Em geral, em solos ligeiramente ácidos, o suprimento de P, Mg, K, Ca às plantas é freqüentemente marginal ou mesmo deficiente (Goedert *et al.*, 1997; Keltjens, 1997). Já em solos com toxidez de alumínio e acidez extremamente alta, é o alumínio o principal fator dominante que limita o crescimento das plantas (Oliveira, 1994; Chagas Jr, 2000). Essas características dificultam o bom desenvolvimento das plantas e, por consequência, limitam os seus usos na agricultura regional (Cochrane *et al.*, 1985; Alfaia e Oliveira, 1997; Oliveira *et al.*, 2003).

Condições de baixa fertilidade e níveis tóxicos de alumínio afetam marcadamente o desenvolvimento das plantas, em especial, a raiz, nodulação e relações hídricas, redução da produção/produktividade e certamente a sustentabilidade (Chagas Jr, 2007). Convencionalmente, estes estresses são facilmente “neutralizados” pela calagem e adubação que atuam diretamente sobre o solo (Buckman e Brady, 1976; Malavolta, 1989; Raij, 1991; Tucci, 1991). Segundo esses autores, o suprimento de fertilizantes pode melhorar os efeitos adversos ao crescimento, aliviando o impacto negativo da baixa fertilidade sobre as plantas. Um segundo meio de prática agrícola para reduzir os efeitos negativos da acidez do solo no crescimento de culturas diz respeito à seleção de espécies ou cultivares mais tolerantes (Oliveira, 1991a; Keltjens, 1997). Porém, o cultivo nos solos de baixa fertilidade que predominam na Amazônia é dificultado por problemas financeiros e tecnológicos para a aquisição dos insumos agrícolas (Chagas Jr, 2007).

Uma alternativa para a eficiência do uso dos solos da região é a utilização de práticas com baixos insumos agrícolas, como o uso de microrganismos do solo (Oliveira, 1991b) voltado para um melhor aproveitamento dos nutrientes pelas plantas. Existem evidências suficientes dos efeitos benéficos dos microrganismos do solo e seus processos na nutrição e



crescimento das plantas, podendo os microrganismos serem considerados como modificadores da fertilidade do solo, já que a mesma está estreitamente relacionada com a matéria orgânica e a biomassa microbiana do solo (Fernandes, 1995; Scholles e Vargas, 2000).

No contexto da fertilidade do solo e nutrição vegetal, os microrganismos podem atuar como “facilitadores” da nutrição, interferindo na disponibilidade, contribuindo assim, para reduzir a necessidade ou maximizar o uso de fertilizantes manufaturados (Siqueira e Moreira, 1996). Estes efeitos resultam de suas atividades na rizosfera e do estabelecimento de relações simbióticas, como a fixação biológica do nitrogênio, que é importante na substituição da adubação nitrogenada em diversas partes do mundo (Bothe *et al.*, 1994), bem como na Amazônia (Oliveira *et al.*, 1979, 1992).

A disponibilização de nitrogênio para as culturas pode ocorrer de formas diferenciadas de acordo com a espécie vegetal. Este nutriente pode ser absorvido do solo na forma de  $\text{NH}_4^+$  ou de  $\text{NO}_3^-$  ou através do  $\text{N}_2$  atmosférico pela fixação biológica. Nas leguminosas, por exemplo, o N é absorvido na forma de  $\text{N}_2$  e transformado em  $\text{NH}_4$  através do processo simbiótico com as bactérias (Gerahty *et al.*, 1992; Taiz e Zieger, 2004).

Dentre as bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico estão as nodulíferas dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* (Hungria e Campo, 2005) genericamente designados por rizóbio, que tornam o nitrogênio atmosférico disponível para as plantas e para os ecossistemas. Desse modo, grande parte do nitrogênio necessário para a nutrição das plantas pode ser obtida através da fixação biológica (Araújo e Hungria, 1994; Hungria *et al.*, 1997; Moreira e Siqueira, 2002; Hungria e Campo, 2005).

Desse modo, pode haver um aumento do potencial produtivo das plantas nestes sistemas de produção com baixos insumos, tornando-as bem sucedidas na região, demonstrando a importância destes microrganismos (Hara, 2003). Diversas espécies amazônicas têm apresentado potencial fixador do nitrogênio (Moreira *et al.*, 1991), mas a eficiência da associação dessas espécies com rizóbios deve ser aumentada para que as plantas se beneficiem adequadamente dessa simbiose (Chagas Jr, 2007).

### 3.2. Grupo rizóbio

As plantas da família Leguminosae, composta por aproximadamente 19.325 espécies distribuídos em 727 gêneros (Lewis *et al.*, 2005), destes 250 cultiváveis (Freire, 1992), possuem uma interação simbiótica com bactérias da ordem Rhizobiales. Quando a bactéria está presente na rizosfera de plantas leguminosas, observa-se a interação com as raízes dessas plantas, promovendo a geração de estruturas altamente diferenciadas, denominadas nódulos radiculares (Moreira e Siqueira, 2006; Santos *et al.*, 2007). A capacidade de fixação de nitrogênio destes microrganismos ocorre devido ao complexo enzimático nitrogenase, que converte o nitrogênio atmosférico em amônia e assim disponibiliza nitrogênio para as plantas (Moreira e Siqueira, 2006). Estes microrganismos são bactérias Gram negativas, aeróbicas não esporulantes, pertencentes ao filo alpha-Proteobacteria, os quais são genericamente identificados como rizóbio (Zakhia e Laujudie, 2001). A lista de espécies de rizóbio cresce a cada dia e muitas espécies poderão vir a ser descritas, na medida em que aumenta o conhecimento sobre as leguminosas tropicais e dos respectivos rizóbios (Weir, 2006).

Dentre as técnicas mais utilizadas para estudos de diversidade de rizóbios destacam-se a caracterização fenotípica, baseada em características culturais ou a genotípica, baseada em técnicas moleculares. Quanto à caracterização fenotípica, destaca-se a avaliação da mudança de pH do meio de cultivo, velocidade de crescimento e cor das colônias, podendo haver interesse em tolerância a antibióticos, salinidade ou outras características culturais (Odee *et al.*, 1997; Mohamed *et al.*, 2000; Melloni *et al.*, 2006). Quanto à caracterização genética, existe uma grande variabilidade de técnicas, sendo que a maioria envolve o uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Odee *et al.*, 2002; Chem *et al.*, 2003).

O agrupamento dos rizóbios foi, inicialmente, baseado em características fenotípicas, principalmente na habilidade de nodular algumas leguminosas. Posteriormente, a taxonomia do rizóbio baseada na especificidade hospedeira foi sendo substituída pela taxonomia numérica, que se apoia nas características bioquímicas, fisiológicas, sorológicas e moleculares (Hungria *et al.*, 1997).

Primeiramente, a família Rhizobiaceae era representada apenas pelo gênero *Rhizobium*, o qual era constituído por bactérias capazes de nodular e fixar nitrogênio em relações simbióticas com plantas da família Leguminosae. A classificação das espécies tinha

como base principalmente a leguminosa hospedeira com as quais fossem capazes de formar nódulos e fixar nitrogênio. Desse modo, *Rhizobium phaseoli* nodula feijoeiro; *R. japonicum*, a soja; *R. meliloti*, a alfafa; *R. lupini*, *Lupinus spp.* e *R. trifolii*, o trevo (Coutinho, 2003).

O conceito de planta hospedeira, porém, foi modificado após a observação de muitas reações cruzadas entre as plantas hospedeiras e as bactérias simbióticas, pois uma única leguminosa, por exemplo, *Acacia*, *Glycine max* ou *Leucaena* poderia abrigar diferentes simbiontes (Terefework *et al.*, 2000). A *Acacia*, por exemplo, é nodulada por *Bradyrhizobium spp.* (Dupuy e Dreyfus, 1992), *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* (Lajudie *et al.*, 1992) e *R. huakuii* (Martínez-Romero, 1994). Já o feijoeiro forma nódulo uma grande diversidade de rizóbios e, em adição a *R. tropici*, *R. etli*, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. giardinii* e *R. gallicum*; provavelmente há novas espécies ainda não descritas (Mostasso *et al.*, 2002; Grange e Hungria, 2004).

Substituindo o conceito de inoculação cruzada, os rizóbios foram agrupados em dois grandes grupos: Rizóbios de crescimento rápido e lento, dando origem a dois grandes gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, respectivamente (Jordan, 1984) e posteriormente, mais quatro novos gêneros foram incluídos: *Sinorhizobium* (Chen *et al.*, 1998; Lajudie *et al.*, 1994), *Azorhizobium* (Dreyfus *et al.*, 1998), *Mesorhizobium* (Jordan, 1984; Nour *et al.*, 1994; Lindström *et al.*, 1995) e *Allorhizobium* (Lajudie *et al.*, 1998).

As análises da diversidade desses microrganismos têm revelado estreita relação filogenética entre bactérias que, aparentemente, não estariam relacionadas. Além disso, esses novos estudos estão permitindo uma melhor compreensão dos mecanismos que atuam na evolução das bactérias simbióticas (Antunes, 2010). De acordo com essa ampla diversidade de estirpes, vários grupos de pesquisa têm se empenhado na descoberta e tentativa de classificar tais microrganismos (Martínez-Romero, 1994).

É fundamental, portanto, estar atualizado com as novas correntes taxonômicas e atentar para o fato de que, certamente, a cada ano, novos gêneros e espécies são descritos e/ou reclassificados, seguindo uma tendência lógica, desde que se calcula que somente 12% das espécies de bactérias são conhecidas (Antunes, 2010). Atualmente, na definição de novas espécies, recomenda-se o uso da “taxonomia polifásica”, a qual procura integrar diferentes tipos de informações fenotípicas, genotípicas e filogenéticas. Essas características podem indicar diferenças morfológicas e fisiológicas importantes entre microrganismos, que podem

ser detectadas posteriormente mediante estudos mais avançados. (Lajudie *et al.*, 1994; Vandamme *et al.*, 1996; Chagas Jr *et al.*, 2010a).

### **3.3. Fatores ambientais que afetam na interação entre rizóbio e leguminosa – pH e Alumínio.**

A inoculação de leguminosas com estirpes eficientes, para promover a fixação simbiótica de nitrogênio e aumentar a produção, é uma prática agrícola muito utilizada, porém, a resposta da planta à inoculação é determinada por uma variedade de fatores. Em condições de clima tropical, os principais fatores abióticos que afetam o potencial da fixação biológica de nitrogênio são: acidez e toxidez de alumínio, salinidade e baixa fertilidade do solo (Thies *et al.*, 1991a).

Neste contexto estudos de seleção de inoculantes que privilegiem testes com rizóbios nativos ou naturalizados no local de seleção, têm sido considerados capazes de apresentar melhores resultados, à medida que estirpes já estabelecidas no solo, normalmente são mais competitivas que estirpes introduzidas de outros locais (Thies *et al.*, 1991b).

Solos ácidos e com baixa fertilidade são comuns nas áreas de produção e, freqüentemente, apresentam concentrações tóxicas de alumínio e, em alguns casos, de manganês (Lal, 1993). Tais condições de solos ácidos podem determinar problemas para a planta, bactéria e simbiose (Giller e Wilson, 1993; Kahindi *et al.*, 1997; Zahran, 1999) afetando todos os aspectos da nodulação e fixação biológica de nitrogênio, desde a sobrevivência e multiplicação do rizóbio no solo, até o processo de infecção e desenvolvimento do nódulo e finalmente a atividade de fixação biológica do nitrogênio (Graham, 1992).

O pH apresenta um fator limitante à sobrevivência e ao estabelecimento do rizóbio no solo. A faixa de pH para a sobrevivência do rizóbio e a efetivação da nodulação parece não ser uma regra (Wani *et al.*, 1995), são capazes de nodular em pH entre 4,9 a 8,1. No entanto, pH neutro favorece a exsudação de carbono pelas raízes, o que interfere na sobrevivência e a competição do rizóbio no solo, pois compostos de carbono são substratos para is microrganismos que vivem na rizosfera (Moreira e Siqueira, 2002).

Porém, há variação entre espécies e entre estirpes quanto a tolerância à acidez (Vargas e Graham, 1988; Hungria *et al.*, 1997; Hungria e Vargas, 2000). Estirpes ou isolados nativos

tolerantes à acidez são mais facilmente obtidas de populações adaptadas a este ambiente, sendo inclusive já encontrados genes para tolerância à acidez (Chen *et al.*, 1993; Siqueira *et al.*, 1994). Como por exemplo, a tolerância à acidez de estirpes isoladas e selecionadas de solos e plantas (Correa e Barneix, 1997; Mukherjee e Asanuma, 1998; Oliveira e Magalhães, 1999; Campo e Wood, 2001; Andrade *et al.*, 2002; Watkin *et al.*, 2003; Barberi *et al.*, 2004; Hara e Oliveira 2004, 2005). Também foi constatado que a FBN em solos ácidos com estirpes tolerantes pode ser equivalente à fixação com estirpes insensíveis após a calagem (Thornton e Davey, 1983). Assim, o desenvolvimento de plantas ou de rizóbio e práticas capazes de aumentar a FBN em solos ácidos podem reduzir aplicações de nitrogênio e calagem, em conformidade com os princípios da agricultura sustentada (Cline, 1991; Wani *et al.*, 1995).

A toxicidade de alumínio é outro importante fator limitante ao crescimento de plantas em solos ácidos, além de afetar também vários microrganismos fixadores de nitrogênio em simbiose (Wood, 1995; Igual *et al.*, 1997). O alumínio reduz a atividade das células de rizóbio, próximo à divisão celular, aumentando o tempo de geração de células, causando uma queda na população de rizóbios, uma vez que a taxa de mortalidade se torna mais alta que a multiplicação celular (Hungria e Vargas, 2000; Watkin *et al.*, 2003).

O grau de tolerância ao alumínio parece ser um caráter genético estável, que implica diferenças bioquímicas e fisiológicas (Flis *et al.*, 1993). Geralmente *Bradyrhizobium* spp. são mais tolerantes à acidez e ao Al do que *Rhizobium* spp.. Mukherjee e Asanuma (1998), Campo e Wood (2001), Andrade *et al.* (2002) e Hara e Oliveira (2004) também estudaram tolerância ao alumínio de estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, evidenciando a tolerância à acidez dos isolados estudados. Nem sempre, porém, a tolerância à acidez resulta em tolerância ao Al. Hara e Oliveira (2004) estudaram 88 isolados de rizóbio oriundos de solos ácidos da Amazônia e concluíram que o alumínio foi mais limitante que a acidez para o crescimento, apresentando diferenças metabólicas de adaptação à acidez mais o alumínio.

Na complexa interação entre rizóbios e leguminosas, a competição por sítios de infecção envolve várias características inerentes à leguminosa e ao rizóbio, tais como: a influência do hospedeiro no processo de infecção; a concentração de células de rizóbio presentes no inóculo ou próximas à semente; a taxa relativa de crescimento das estirpes competitivas; o estado fisiológico do rizóbio na hora da inoculação; variáveis ambientais (temperatura, umidade, pressão de oxigênio) e nível nutricional da planta hospedeira (Trinick, 1982; Vargas *et al.*, 1994). Embora alguns destes fatores possam afetar diretamente a

competitividade, em sua maioria o efeito é direcionado sobre a persistência e sobrevivência das estirpes inoculadas no solo, influenciando indiretamente as interações competitivas (Sadowsky, 2000).

Os estudos relativos à acidez e toxicidade de alumínio são limitados pela dificuldade em determinar se os efeitos nocivos afetam a multiplicação do microssimbionte, o desenvolvimento da planta ou alguma etapa específica no estabelecimento e funcionamento da simbiose (Chagas Jr, 2007). Porém, os resultados obtidos até o momento sugerem que a sobrevivência do microssimbionte não se constitui na etapa mais sensível ao alumínio, uma vez que ele se mantém em número adequado para proporcionar boa nodulação primária após sua inoculação no solo (Vidor *et al.*, 1986). Portanto, é de se esperar que o alumínio apresente um maior efeito inibidor sobre a iniciação do nódulo, por afetar a divisão celular e diminuir o número de sítios de infecção da raiz (Vidor *et al.*, 1986). No entanto, a possibilidade de obtenção de estirpes tolerantes à acidez do solo, especialmente ao alumínio, pode proporcionar uma contribuição efetiva no balanço de nitrogênio tanto no solo como nas plantas, desde que a planta também esteja adaptada a essas condições de solo (Oliveira, 1991b; Chagas Jr *et al.*, 2010a).

### **3.4. Capacidade de solubilização de fosfato por rizóbio**

Apesar da ampla distribuição de P na natureza, a sua deficiência é comum por causa da forma altamente insolúvel encontrada, principalmente, em solos ácidos de regiões tropicais e subtropicais com alta potencialidade de produção, o que resulta em baixa disponibilidade para as plantas (Zapata e Axmann, 1995). A reduzida disponibilidade de fósforo nos solos tropicais decorre da reatividade das formas solúveis de P com cálcio (Ca), ferro (Fe), magnésio (Mg) e alumínio (Al), formando compostos de baixa solubilidade (Chagas Jr *et al.*, 2010b).

Em solos brasileiros, o P é encontrado em maior quantidade como fosfatos de alumínio e ferro (Nahas, 2002). A disponibilidade do P depende de sua solubilidade, que pode ser influenciada pela atividade das raízes das plantas e microrganismos do solo. Assim, no solo, o P é sujeito a inúmeros processos biogeoquímicos que alteram sua disponibilidade. Entre esses processos, destaca-se a dissolução de fosfatos, que os torna disponíveis para as plantas (Rodríguez e Fraga, 1999; Whitelaw, 2000).

Microrganismos do solo, como bactérias e fungos, solubilizam formas inorgânicas não disponíveis de P (Xin *et al.*, 2002; Son *et al.*, 2006; Barroso e Nahas, 2008; Chai *et al.*, 2011). Segundo Illmer *et al.* (1995) e Rodríguez e Fraga (1999), esses microrganismos utilizam estratégias bioquímicas, como a produção de ácidos orgânicos, ou outros mecanismos que envolvem o crescimento microbiano e que favorece a secreção de prótons. Vários trabalhos têm verificado a habilidade de diferentes microrganismos solubilizar fosfatos de cálcio (P-Ca) (Goldstein, 1896; Chagas Jr *et al.*, 2010b) e de alumínio (P -Al) (Silva Filho e Vidor, 2000; Chagas Jr *et al.*, 2010b). Entre esse grupo, o rizóbio destaca-se como um dos mais eficientes (Rodríguez e Fraga, 1999).

A detecção visual e a estimativa quantitativa da capacidade de estirpes de rizóbio em solubilizar fosfatos pouco solúveis têm sido possível usando métodos em placas de Petri com meio de cultura para solubilizadores, no qual mostra uma zona translúcida ao redor da colônia em meio contendo fosfato mineral insolúvel (principalmente fosfato de cálcio ou fosfato de alumínio) como única fonte de fósforo (Sylvester-Bradley *et al.*, 1982; Peix *et al.*, 2001; Hameed *et al.*, 2004; Hara e Oliveira, 2004).

Estirpes de *Bradyrhizobium* solubilizaram diferentes quantidades de fosfato (hydroxiapatita e fosfato tricálcio) em meio de cultura líquido (Mikanová *et al.*, 1995; Chabot *et al.*, 1998; Mikanová e Kubát, 1999; Mikanová e Nováková, 2002; Silva Filho *et al.*, 2002). O mesmo foi evidenciado por Ab-dalla (1994) testando a capacidade de estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* em solubilizar fosfato de rocha, onde, em solos não esterilizados, a estirpe testada (*R. meliloti* TAL 1236) foi muito eficiente na solubilização desse fosfato. Segundo Mikanová e Kubát (1999), estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* mostraram atividade de solubilização de fosfato em meio de cultura e, quando inoculadas em soja em solo, houve um aumento da produtividade da cultura e no conteúdo de fósforo lábil no solo. Chagas Jr *et al.* (2010b) testaram 205 rizóbios isolados de solos da Amazônia, dos quais 56% apresentaram capacidade para solubilização de fosfatos em meio de cultura.

Segundo Halder e Chakrabarty (1993), a capacidade para solubilização de fosfatos inorgânicos varia entre as estirpes de *Rhizobium-Bradyrhizobium* em meio líquido, sugerindo diferentes mecanismos para a solubilização, corroborando com vários trabalhos utilizando meios líquidos e sólidos (Igual *et al.* 2001; Gyaneshwar *et al.*, 2002; Hameed *et al.*, 2004; Hara e Oliveira, 2004, 2005; Chagas Jr *et al.*, 2010b).

Nesse contexto, a utilização de rizóbio é um processo chave para o manejo agrícola sustentável na Amazônia, a fim de proporcionar às plantas, menor dependência da aplicação de fertilizantes químicos, pois além da capacidade de fixar nitrogênio, algumas estirpes são capazes de solubilizar fosfatos pouco solúveis do solo, e disponibilizam o fósforo tanto para si como para a planta hospedeira, promovendo o crescimento das mesmas (Starkanova *et al.*, 1999).

Embora a pesquisa tenha mostrado que os rizóbios podem tornar as plantas menos dependentes da aplicação de fertilizantes nitrogenados e fosfatados, fatores do solo, predominantes na Amazônia, como a acidez (Bonetti *et al.*, 1984), e alta concentração de alumínio (Johnson e Wood, 1990; Oclave *et al.*, 1994) podem diminuir a população desses microrganismos no solo. Apesar disso, alguns isolados podem desenvolver mecanismos de tolerância a estes fatores (Kawai *et al.*, 2000; Watkin *et al.*, 2000).

### **3.5. Produção de hormônio por rizóbio**

O crescimento e o desenvolvimento das plantas estão diretamente associados com o acesso das mesmas com minerais essenciais, tais como fósforo (Santos *et al.*, 2010) e da biossíntese de hormônios vegetais como as auxinas (Multani *et al.*, 2003.; Reinhardt *et al.*, 2003; Kieffer *et al.*, 2010).

Os hormônios vegetais são reguladores naturais de crescimento das plantas e influenciam os processos fisiológicos. Constituem-se de moléculas pequenas; possui efeito(s) específico(s); integram crescimento, desenvolvimento e todo o metabolismo e, atuam em baixíssimas concentrações. Os hormônios vegetais podem ser classificados como auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico. Outros autores incluem também brassinoesteróides, ácido jasmônico, ácido acetilsalicílico e poliaminas (Taiz e Zeiger, 2004; Kerbauy, 2008).

Entre os hormônios vegetais, o AIA é a auxina natural mais comum encontrada em plantas. Sua função está relacionada ao alongamento de células, estimulando a síntese ou desinibindo a ação de enzimas que atuam sobre as microfibrilas da parede celular, o que resulta em aumento da plasticidade da membrana, ao passo que é responsável pela formação de raízes adventícias no caule e aumento da extensão nas raízes (Taiz e Zeiger, 2004).



Acredita-se que seu efeito benéfico via crescimento e morfologia da raiz seja pelo maior acesso à água e nutrientes do solo (Vessey, 2003).

Existe ampla evidência que numerosos microrganismos do solo estão ativamente envolvidos na síntese de auxinas em meio de cultura e no solo (Antoun *et al.*, 1998; Vega-Hernández *et al.*, 2002; Hameed *et al.*, 2004; Thakuria *et al.*, 2004).

Zaharova *et al.* (1999) verificaram que 80% das bactérias isoladas de rizosfera são capazes de produzir AIA. Apesar disso, existem poucos trabalhos sobre a síntese de auxinas por microrganismos no solo, mas sabe-se que o aminoácido L-triptofano (LTrp) é um precursor fisiológico para a produção de auxinas em diversas plantas e microrganismos (Contreras *et al.*, 2010), e que a enzima chamada ipdC (indole-3-pyruvate decarboxylase) é a enzima-chave para a biossíntese destes fitormônios (Kochar e Srivastava, 2011). Os exsudatos radiculares são fontes naturais de L-triptofano (Lum e Hirsch, 2003) para a microbiota do solo, contribuindo com o aumento da biosíntese de auxina na rizosfera.

A produção e a concentração de triptofano nos exsudatos das raízes variam com as espécies de plantas (Patten e Glick, 1996). O milho, por exemplo, possui duas rotas de síntese de AIA, uma com triptofano (Glawischnig *et al.*, 2000) e outra sem triptofano (Michalczuk *et al.*, 1992; Ostin *et al.*, 1999).

Adicionalmente à síntese de auxinas, microrganismos são também capazes de degradá-las. A capacidade de oxidação enzimática de AIA (com a formação de anthralinato) é exemplificada em *Bradyrhizobium japonicum* (Jensen *et al.*, 1995; Tsavkelova *et al.*, 2006). Os tecidos radiculares são especialmente sensíveis a flutuações da concentração de AIA e o desenvolvimento do sistema radicular pode ser profundamente afetado por fontes exógenas deste hormônio vegetal, inclusive a microbiana (Tanimoto, 2005). Neste contexto, microrganismos rizosféricos degradadores de AIA podem também ter um efeito positivo no crescimento de plantas (Gravel *et al.*, 2007).

Vários autores têm mostrado que a produção de AIA e a fixação biológica do nitrogênio por rizóbios contribuem significativamente com o crescimento de plantas leguminosas e não-leguminosas (Prinsen, 1991; Biswas *et al.*, 2000b; Hafeez *et al.*, 2004; Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004; Thakuria *et al.*, 2004; Chagas Jr *et al.*, 2009; Stroschein *et al.*, 2011). Biswas *et al.* (2000a), além de constatarem a produção de AIA por rizóbio em meio de cultura, sugerem um mecanismo potencial pelo qual essas bactérias podem regular o crescimento das plantas. Resultados semelhantes foram reportados em vários trabalhos,

evidenciando a produção de AIA por estirpes de rizóbio usando como precursor do AIA o triptofano (Vega-Hernández *et al.*, 2002; Hameed *et al.*, 2004; Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004; Chagas Jr *et al.*, 2009; Coatti *et al.*, 2010).

Existem também trabalhos que relatam a utilização de rizóbios como biofertilizante, que ajudam a suplementar a ausência do fertilizante nitrogenado através da promoção do crescimento (Chouddhury e Kennedy, 2004). Dada a importância das bactérias sintetizadoras de AIA, tem-se buscado isolados capazes de produzir este hormônio, tornando-se este mais um critério a ser utilizado na seleção de estirpes, visando uma possível aplicação das bactérias em diversas culturas (Chagas Jr *et al.*, 2009).

**TOLERÂNCIA À ACIDEZ E ALUMÍNIO TÓXICO POR RIZÓBIOS ISOLADOS DE SOLOS DO AMAZONAS****4.1 RESUMO**

Alguns fatores como o Al tóxico e acidez dos solos podem diminuir a população de rizóbios presentes no solo, porém, a seleção de estirpes existentes capazes de tolerar à acidez do solo bem como o alumínio é de extrema importância para o crescimento vegetal. Por tanto, o presente trabalho objetivou avaliar a tolerância à acidez e alumínio tóxico, de isolados de rizóbio oriundos de solos de diferentes regiões do Estado do Amazonas. Foi avaliado isolados de rizóbio em placa de Petri com meio YMA com pH 6,5 (controle) e pH 4,5 + Al, usando escala de crescimento 1,0 (sensível) a 4,0 (tolerante, máximo crescimento), durante 15 dias de avaliação. Entre os 100 isolados testados 91 e 82 apresentaram tolerância com crescimento acima de 3,06 aos 15 dias nos tratamento com pH 6,5 e pH 4,5 + Al, respectivamente. O fator mais limitante para o crescimento dos isolados foi a acidez e o alumínio.

**PALAVRAS-CHAVES:** Acidez, Alumínio Tóxico, Amazonas.

## **TOLERANCE THE ACIDITY AND TOXIC ALUMINUM FOR RHIZOBIA ISOLATED FROM AMAZONAS SOILS**

### **4.2 ABSTRACT**

Some soil factors as the toxic Al and acidity may decrease the population of rhizobia in the soil however, the selection of existing strains able to tolerate soil acidity and aluminum is extremely important for the growth of vegetation. Thus, the objective of this study was to evaluate tolerant to the acidity and toxic aluminum, of isolated of rhizobia deriving of from soils of different regions of Amazonas State. The present method evaluated rhizobia isolates in Petri dishes with YMA medium with pH 6,5 (control), pH 4,5 + Al, using growth scale from 1,0 (sensible) to 4,0 (tolerant, maximum growth), during 15 days of evaluation. Among the 100 isolates tested, 91 and 82 presented tolerance with growth scale above 3,06 at 15th days in the treatment with pH 6,5 and pH 4,5 + Al, respectively. The most limiting factor the growth of the isolates ones was acidity and the aluminum.

**KEY WORDS:** Acidity, Aluminum, Amazonas.

### 4.3 INTRODUÇÃO

Mais de um quarto dos solos cultiváveis do mundo são ácidos, o que torna o estudo dos mecanismos implicados na sobrevivência ao estresse ácido de grande importância para a agricultura (Muglia, 2007). Fatores da acidez do solo, como pH baixo e concentrações elevadas de alumínio tóxico, frequentemente limitam todas as etapas do processo de infecção das raízes, formação de nódulos e assimilação do N pela planta (Pelegrin *et al.*, 2009). Sendo assim, a capacidade dos rizóbios de se adaptarem a estas condições adversas é fundamental para o estabelecimento de uma simbiose eficiente.

O pH do solo constitui um dos principais fatores limitantes na fixação de nitrogênio pelas leguminosas, devido ao retardamento ou supressão da formação de nódulos. Seus efeitos podem ser diretos, através da influência sobre a sobrevivência da bactéria, ou indiretamente pela maior ou menor disponibilidade de nutrientes e presença de elementos tóxicos. A acidez do solo vem normalmente associada com toxidez de alumínio e manganês, baixa disponibilidade de nutrientes como cálcio, magnésio e molibdênio, essenciais para a simbiose (Vidor *et al.*, 1983; Tsai *et al.*, 1992).

A exposição de isolados de rizóbio à acidez diminui o crescimento, sugerindo que alguns processos citoplasmáticos da bactéria são sensíveis a esse fator. Em meio ácido ocorre uma diminuição da síntese de proteínas pelas bactérias, o que também pode afetar o crescimento bacteriano (Hara e Oliveira, 2004). O número de rizóbios em solos corrigidos chega a  $10^5$  unidades formadoras de colônia (UFC).g<sup>-1</sup>, enquanto que em solos ácidos esse valor não ultrapassa  $10^2$  UFC.g<sup>-1</sup> (Brockwell *et al.*, 1991).

Em solos muito ácidos ocorre dissolução de alumínio, que passa a ser um componente de acidez potencial. O alumínio é, assim, causa da acidez excessiva de solos (Bohnen, 1995; Silva *et al.*, 2006). Na maioria dos solos brasileiros, o teor de alumínio livre frequentemente atinge níveis tóxicos para as plantas, sendo muitas vezes, fator limitante ao aumento da produtividade das culturas (Bertan *et al.*, 2005). Nesses solos, ocorre a diminuição na disponibilidade de alguns nutrientes, como o fósforo, e aumento da disponibilidade do manganês e alumínio, os quais, dependendo do manejo do solo e da adubação utilizada, podem atingir níveis tóxicos às plantas. O alumínio resulta em pequeno crescimento de raízes, menor volume de solo explorado e prejuízos na absorção de água e nutrientes, o que pode limitar o tamanho de folhas e a matéria seca acumulada na parte aérea (Sangoi *et al.*, 2008).

Os efeitos do excesso de alumínio no solo sobre a disponibilidade do nitrogênio simbiótico para as leguminosas, podem ser divididos em: efeito inibitório sobre a formação de nódulos devido aos prejuízos físicos sobre o sistema radicular; efeito inibitório sobre a formação e funcionamento dos nódulos, devido à restrição na absorção e/ou translocação de nutrientes (Vidor *et al.*, 1983). A tolerância de rizóbios ao pH baixo depende da habilidade em manter o pH intracelular entre 7,2 e 7,5 quando o pH externo é ácido. E em relação à tolerância ao alumínio, os mecanismos encontrados em isolados de rizóbios são: diminuição da quantidade de cargas negativas na superfície celular diminuindo a ligação com o alumínio (Bushby, 1990); elevação do pH interno da célula (O'hara *et al.*, 1989); complexação do alumínio por polissacarídeos (Flis *et al.*, 1993); acumulação de fosfato inorgânico no interior da célula (Mukherjee e Asanuma, 1998), neutralizando o efeito do alumínio pela formação de complexo insolúvel biologicamente não tóxico (Blamey *et al.*, 1983).

Com respeito à seleção de estirpes de rizóbio adaptáveis a solos ácidos, com os e fatores ligados à acidez existe necessidade da identificação de estirpes de rizóbio tolerantes à acidez e alumínio tóxico capazes de aumentar a produtividade de leguminosas.

Então, este trabalho teve como objetivo avaliar a tolerância à acidez e alumínio tóxico, de isolados de rizóbio oriundos de solos de diferentes regiões do Estado do Amazonas.

## **4.4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.4.1. Coleta de material**

Inicialmente foram obtidos nódulos coletados dos sistemas radiculares de leguminosas em solos de várzea e terra firme da região. Para a coleta dos nódulos foi usada a metodologia descrita por Hungria (1994) conforme locais descritos (Tabela 1).

### **4.4.2. Isolamento dos nódulos**

Após a obtenção dos nódulos, foram isoladas as estirpes de rizóbios usando a metodologia descrita por Vincent (1970) e Somasegaran e Hoben (1985). Os nódulos foram

lavados com etanol (90%; três minutos), seguindo uma desinfecção superficial com hipoclorito de sódio (cinco minutos) e dez lavagens com água estéril.

Em seguida os nódulos foram pressionados com uma pinça e feitas as riscagens em placas de Petri contendo meio YMA (*yeast manitol agar*) (Vincent, 1970) (Tabela 2). Após o isolamento, as placas foram incubadas a 28°C até o crescimento de colônias de bactérias e então foram repicadas para novas placas contendo o mesmo meio e novamente incubadas até o novo crescimento bacteriano. Os isolados obtidos por último foram mantidos em tubos de ensaios contendo o meio YMA inclinado, segundo descrito por Vincent (1970) e Somasegaran e Hoben (1985). Dos isolados mantidos em tubos de ensaio, foram utilizados 100 para o teste descrito abaixo.

**Tabela 1** – Isolamento dos nódulos e seus respectivos locais de coleta.

<b>Rizóbio</b>	<b>Local (L)</b>	<b>Planta</b>
INPA R546, INPA R547, INPA R548, INPA R549, INPA R550, INPA R551, INPA R552, INPA R553, INPA R554, INPA R555, INPA R556, INPA R557, INPA R558, INPA R559	Ramal do Caldeirão, Terra firme, km 3 S 3 <sup>0</sup> 12' 26" W 60 <sup>0</sup> 12' 2,5"	<i>Pueraria phaseoloides</i> (Feijão Bravo)
INPA R560, INPA R561, INPA R562, INPA R563, INPA R564, INPA R565, INPA R566, INPA R567, INPA R568, INPA R569, INPA R588, INPA R571, INPA R572, INPA R573, INPA R574, INPA R575, INPA R576, INPA R577, INPA R578, INPA R579, INPA R580, INPA R581, INPA R582, INPA R583, INPA R584, INPA R585, INPA R586, INPA R587, INPA R588, INPA R589	Ramal do Caldeirão km3 S 3 <sup>0</sup> 13' 41,9" W 60 <sup>0</sup> 13' 27,8"	<i>Pueraria phaseoloides</i> (Feijão Bravo)
		(continua) (continuação)
INPA R590, INPA R591, INPA R592, INPA R593, INPA R594, INPA R595, INPA R596, INPA R598,	Estrada de terra para Jandira; Beira do Rio Solimões, Várzea S 03 <sup>0</sup> 15' 21,3" W 060 <sup>0</sup> 15' 17,2"	<i>Inga edulis</i> (Ingá)

Rizóbio	Local (L)	Planta
<p>INPA R600, INPA R602,  INPA R603, INPA R604,  INPA R605, INPA R606  INPA R607, INPA R610,  INPA R611, INPA R612,  INPA R613, INPA R614,  INPA R615, INPA R616,  INPA R617, INPA R618,  INPA R619</p>		
<p>INPA R620, INPA R621,  INPA R622, INPA R623,  INPA R624, INPA R625,  INPA R626, INPA R627,  INPA R628, INPA R629,  INPA R630, INPA R631,  INPA R632, INPA R633,  INPA R634, INPA R635,  INPA R636</p>	<p>Jandira, propriedade São João  S 03<sup>0</sup> 15' 20,0"  W 060<sup>0</sup> 15' 33,1"</p>	<p><i>Vignia unguiculata</i>  (Feijão Caupi)</p>
<p>INPA R637, INPA-R639,  INPA R640, INPA R642,  INPA R643, INPA R644,  INPA R645, INPA R646,  INPA R647, INPA R648,  INPA R649, INPA R650,  INPA R651, INPA R652,  INPA R653, INPA R654,  INPA R655, INPA R656,  INPA R657, INPA R659,  INPA R660, INPA R661,  INPA R662, INPA R663,  INPA R664</p>	<p>Ramal do Caldeirão  S 03<sup>0</sup> 14' 37"  W 60<sup>0</sup> 14' 37,6"</p>	<p><i>Pueraria phaseoloides</i>  (Feijão Bravo)</p>
<p>INPA R665, INPA R666</p>	<p>INPA, campus v8  S 03<sup>0</sup> 05' 28,6"  W 059<sup>0</sup> 59' 36,7"</p>	<p><i>Swartzia polyphylla</i>  (Arabá)</p>
<p>INPA R667, INPA R668,  INPA R669, INPA R672,  INPA R674, INPA R675,  INPA R676, INPA R677</p>	<p>Viveiro de Urucu  S 04<sup>0</sup> 53' 15.1"  W 065<sup>0</sup> 13' 31.5"</p>	<p><i>Cedrelinga catenaeformis</i>  (Cedrorana)</p>



**Tabela 2 - Meio YMA**

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
Mannitol	10,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Ext. Levedura	0,5 g
Ágar	15,0 g
H <sub>2</sub> O Destilada	1000 mL

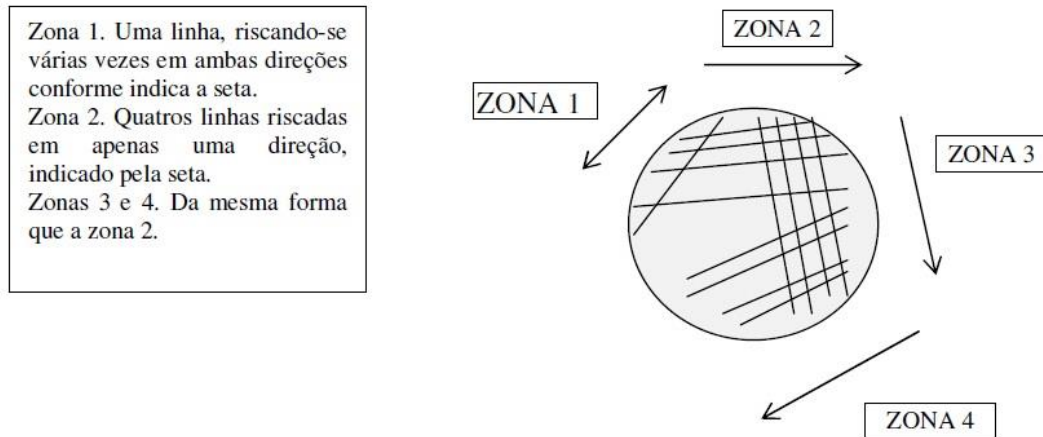
Fonte: Vicente (1970)

#### **4.4.3 Teste de tolerância à acidez e ao alumínio tóxico**

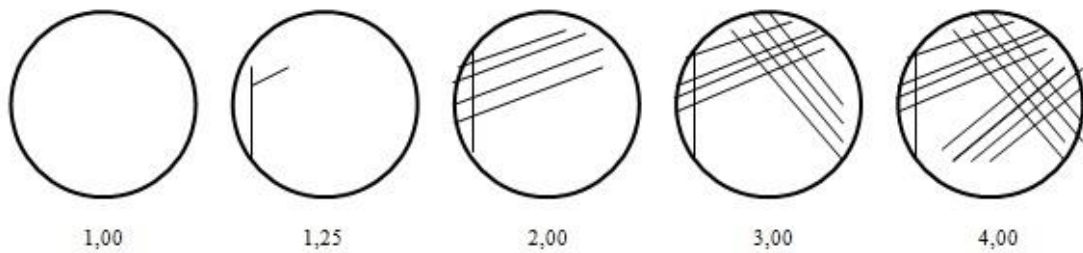
Os tratamentos utilizados foram meios YMA com pH 4,5 + 2,0 cmolc (+) Al/L e, pH 6,5, com quatro repetições cada. Foi acrescentado o corante bromocresol verde nos meios com pH 4,5 + Al, e no meio com pH 6,5 foi acrescentado o azul de bromotimol, com o objetivo de visualizar a alteração do pH do meio pelas bactérias, em função da alteração da cor.

Para a avaliação foi utilizado o método de riscagem proposto por Oliveira e Magalhães (1999). Nesse método, as avaliações foram feitas a cada três dias durante um período de 15 dias, em condições de laboratório a uma temperatura média de 28° C. De acordo com o crescimento celular nas respectivas zonas (Figura 1), foram dados valores de crescimento para cada isolado variando de 1 (sem crescimento visível após riscagem na zona 1) a 4 (máximo crescimento na zona 4) (Figura 2), podendo ter valores intermediários entre esses extremos. Esse método leva a um processo de diluição do microrganismo, onde a zona 1 é a de maior concentração bacteriana e a zona 4 a mais diluída. Este método permitiu ainda selecionar isolados a partir da escala determinada na Tabela 1 e classificá-los de acordo com o grau de tolerância.

**Figura 1.** Ilustração do método de riscagem proposto por Oliveira e Magalhães (1999). A figura demonstra apenas uma repetição.



**Figura 2.** Valores de crescimento para as estirpes de rizóbia nos respectivos tratamentos em placas de Petri com meio YMA (Oliveira e Magalhães 1999).



**Tabela 3.** Escala de valores para a avaliação do crescimento de rizóbio nos meios YMA (pH 6,5; pH 4,5+Al).

Graus de tolerância	Intervalos de pontuação
Sensível	1,00 - 2,00
Mediano	2,06 * - 3,00
Tolerante	3,06 * - 4,00

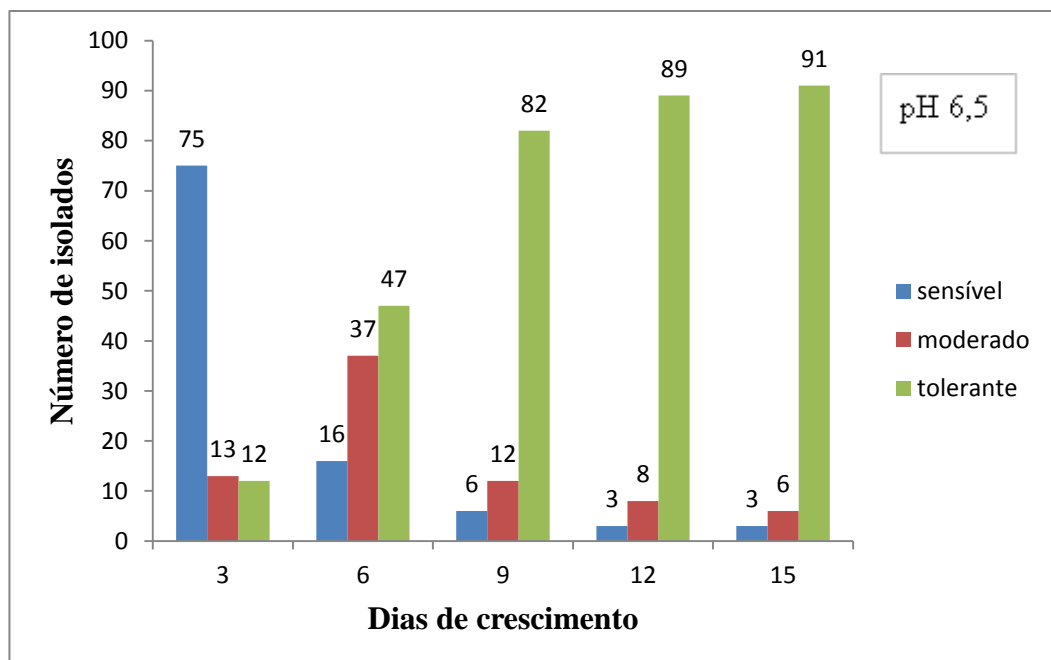
\* Três repetições com nota 2,0 e uma com 2,25.

\*\* Três repetições com nota 3,0 e uma com 3,25.

#### 4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 100 isolados testados, 47 apresentaram escores de crescimento tolerante (superior a 3,06) logo aos seis dias de crescimento (Figura 3). Entre os 100 isolados estudados com base na escala de valores para a avaliação do crescimento (Tabela 3), 91 apresentaram alto crescimento, 3 baixo e 6 crescimento médio, no meio com pH 6,5 aos 15 dias de avaliação (Figura 3). O crescimento baixo verificado por alguns isolados nesse meio, é um indicativo de dificuldade de crescimento nesse meio de cultura, característica indesejável para indicá-los como inoculantes mesmo em solos com pH próximos à alcalinidade (6,5). Entre os isolados que apresentaram alto crescimento no pH 6,5, aos 15 dias de avaliação, cinco (INPA R591, INPA R656, INPA R672, INPA R656, INPA R657) apresentaram o crescimento máximo (escore 4,00) estabilizado já no terceiro dia (Tabela 4). Resultados semelhantes foram observados por Oliveira e Magalhães (1999) e Hara e Oliveira (2004; 2005).

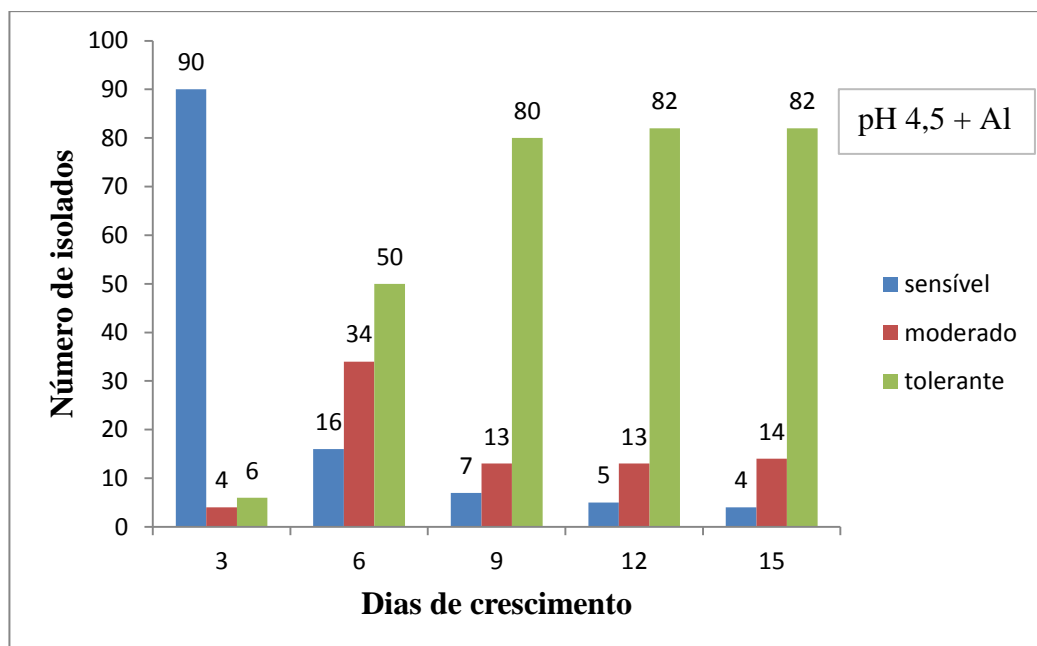
**Figura 3:** Crescimento de isolados de rizóbio durante de 15 dias de avaliação em meio YMA com pH 6,5.



Quanto à tolerância à acidez e ao alumínio tóxico no meio de cultura, foi verificado que 82 isolados apresentaram escore de crescimento acima de 3,06 (Figura 4), o que permite dizer que são tolerantes à acidez e ao alumínio, com base na escala de valores da Tabela 3.

Entre estes isolados tolerantes à acidez e ao alumínio 45 apresentaram escore acima de 3,06 a partir do sexto dia (Figura 4), sendo que desses, 5 (INPA R656, INPA R672, INPA R674, INPA R656, INPA R657) apresentaram escore 4,00 a partir do terceiro e sexto dia após a riscagem em placas (Tabela 5). De acordo com Graham *et al.* (1994), a tolerância ao pH ácido em rizóbio depende da habilidade em manter o pH intracelular entre 7,2 e 7,5 quando o pH externo é ácido. O tempo de crescimento também pode ser usado para a seleção, pois os isolados que apresentaram escores superiores a 3,06 em menor período de tempo podem ser mais tolerantes a baixos pHs. A acidez e o alumínio do meio também afetou o crescimento de isolados de rizóbio, como foi observado por Oliveira e Magalhães (1999) e Hara e Oliveira (2004; 2005) analisando isolados de rizobia de amostras de solos procedentes de diferentes regiões na Amazônia. Para Hungria *et al.* (2001a) e Hara e Oliveira (2004), a proporção de isolados oriundos de solos ácidos, tolerantes á acidez e ao alumínio foi baixa, em torno de 25%.

**Figura 4:** Crescimento de isolados de rizóbio durante de 15 dias de avaliação em meio YMA com pH 4,5 + Al.



No terceiro dia de avaliação, foi observado máximo crescimento (escore 4,00) no meio com pH 4,5 + Al, para o isolado INPA R656, INPA R672, INPA R674, INPA R656 e INPA R657 e no sexto dia para os mesmos isolados (Tabela 5). Apesar disso, o tempo de crescimento pode também ser usado para a seleção quanto à tolerância a acidez e ao Al. Houve inibição do crescimento de 4 isolados pelo efeito tóxico do alumínio quanto a acidez

(sensíveis, com baixo crescimento); 14 apresentaram crescimento moderado (Figura 4), porém o crescimento dos isolados nos meios aumentou com o tempo de exposição. Ao longo das avaliações, a cada três dias, houve aumento do número de isolados tolerantes ao meio pH 4,5 + Al, mostrando a ocorrência de adaptação às condições iniciais do meio (Figura 4). Em alguns trabalhos tem sido demonstrada melhor adaptação de bactérias à acidez quando previamente crescidas em meios de cultura levemente ácidos, fenômeno conhecido como “acid habituation” (Goodson e Rowbury, 1989) ou “adaptive tolerance response” (Dilworth *et al.*, 1999). Entretanto, vários trabalhos reportam a baixa correlação entre estirpes tolerantes a pH ácido em meio de cultura e tolerantes à acidez do solo (Howieson *et al.*, 1992; Gemell e Roughley, 1993).

Alguns autores relatam a ocorrência de diferentes mecanismos de tolerância à acidez e ao alumínio encontrado em isolados de rizóbio, como diminuição da quantidade de carga negativa na superfície celular, diminuindo a ligação com o alumínio (Bushby, 1990); acumulação de fosfato inorgânico no interior da célula, neutralizando o efeito do alumínio pela formação de complexos insolúveis biologicamente não tóxicos (Mukherjee e Asanuma, 1998); aumento dos níveis de potássio e fósforo ligados à manutenção do pH interno (Mukherjee e Asanuma, 1998; Watkin *et al.*, 2003) e maior produção de exopolissacarídeos (Barberi *et al.*, 2004). Para Correa e Barneix (1997), a tolerância à acidez por estirpes de *Rhizobium loti* é um fenômeno complexo, envolvendo mecanismos constitutivos tal como permeabilidade da membrana externa como resposta adaptativa ao pH do meio, incluindo o estágio de crescimento da bactéria e mudanças na expressão de proteínas. Peick *et al.* (1999) mostraram que a redução do pH afeta a síntese de diferentes proteínas em estirpes de *Rhizobium tropici* e *R. etli*.

Os trabalhos envolvendo a solubilização de PAI escassos, e nenhum até o momento, foi realizado para investigar o papel da população de rizóbio neste processo, embora, nas condições tropicais e subtropicais, sejam as formas predominantes de fosfato (Rau, 1991).

Há a necessidade de se desenvolver mais pesquisa enfocando este mecanismo de sobrevivência dos rizóbios em solos da região, para que possa selecionar isolados não só capazes de tolerar a acidez e ao alumínio tóxico, mas que também possam solubilizar o P para ser utilizado futuramente como inoculante em leguminosas de interesse agrícola (Hara e Oliveira, 2007).

**Tabela 4:** Médias do crescimento de rizóbio em meio YMA com pH 6,5 isolados de amostras de solos na Amazônia. Média de quatro repetições.

Isolados	Pontuação <sup>1</sup> / dias de crescimento				
	3 dias	6 dias	9 dias	12 dias	15 dias
INPA R546	1,06	2,69	3,50	3,50	3,81
INPA R547	1,19	2,63	3,25	3,31	3,31
INPA R548	1,06	3,06	3,56	3,63	3,63
INPA R549	1,19	2,69	3,50	3,56	3,56
INPA R550	1,06	2,56	3,63	3,63	3,63
INPA R551	1,19	2,31	3,00	3,38	3,38
INPA R552	1,13	3,19	3,69	3,69	3,69
INPA R553	1,25	3,63	3,94	4,00	4,00
INPA R554	1,31	3,56	3,88	4,00	4,00
INPA R555	1,38	3,50	3,81	3,88	3,88
INPA R556	1,00	1,31	1,81	2,69	3,31
INPA R557	3,19	3,38	3,38	3,63	3,63
INPA R558	2,75	3,81	4,00	4,00	4,00
INPA R559	2,13	3,38	3,88	3,88	4,00
INPA R560	0,69	2,81	3,50	3,56	3,56
INPA R561	1,13	1,19	2,69	2,81	3,44
INPA R562	1,06	1,19	2,38	2,63	2,69
INPA R563	1,06	3,31	3,81	3,88	3,88
INPA R564	1,13	3,13	4,00	4,00	4,00
INPA R565	1,06	3,75	4,00	4,00	4,00
INPA R566	1,06	3,38	4,00	4,00	4,00
INPA R567	2,44	3,63	3,94	4,00	4,00
INPA R568	1,00	3,50	3,94	4,00	4,00
INPA R569	1,00	3,38	3,81	3,94	4,00
INPA R588	0,44	2,50	3,38	3,38	3,38
INPA R571	1,06	3,38	3,88	4,00	4,00
INPA R572	1,06	3,25	3,94	4,00	4,00
INPA R573	1,06	3,00	4,00	4,00	4,00
INPA R574	1,06	3,13	4,00	4,00	4,00
INPA R575	1,38	2,31	3,44	4,00	4,00
INPA R576	1,94	2,88	3,88	4,00	4,00
INPA R577	3,31	2,81	3,75	4,00	4,00
INPA R578	2,25	3,50	4,00	4,00	4,00
INPA R579	2,06	3,06	4,00	4,00	4,00
INPA R581	2,44	3,50	4,00	4,00	4,00
INPA R582	1,63	3,06	3,88	4,00	4,00
INPA R583	2,13	3,75	3,94	4,00	4,00
INPA R587	1,25	1,31	2,31	3,06	3,38

---

<b>INPA R588</b>	1,63	2,94	3,75	4,00	4,00
<b>INPA R589</b>	2,38	3,75	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R591</b>	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R592</b>	1,19	1,44	1,88	2,38	2,38
<b>INPA R593</b>	1,00	1,13	1,44	2,00	2,00
<b>INPA R595</b>	1,00	1,00	1,25	2,00	2,00
<b>INPA R596</b>	1,06	1,19	2,19	3,50	4,00
<b>INPA R597</b>	1,00	3,00	3,88	4,00	4,00
<b>INPA R599</b>	1,00	2,63	3,38	4,00	4,00
<b>INPA R600</b>	1,19	2,25	2,94	4,00	4,00
<b>INPA R601</b>	1,19	1,94	3,44	4,00	4,00
<b>INPA R604</b>	1,81	2,44	2,75	3,25	3,25
<b>INPA R606</b>	1,19	2,63	3,75	4,00	4,00
<b>INPA R607</b>	1,31	2,19	3,81	4,00	4,00
<b>INPA R608</b>	1,13	2,13	3,25	4,00	4,00
<b>INPA R609</b>	1,00	1,00	1,00	1,13	1,56
<b>INPA R610</b>	1,00	1,88	2,81	4,00	4,00
<b>INPA R611</b>	1,00	2,19	3,88	4,00	4,00
<b>INPA R612</b>	1,00	2,19	3,50	4,00	4,00
<b>INPA R613</b>	1,38	2,31	3,75	4,00	4,00
<b>INPA R614</b>	2,00	2,38	3,31	4,00	4,00
<b>INPA R615</b>	1,00	1,00	1,69	3,38	4,00
<b>INPA R616</b>	1,25	1,63	3,56	4,00	4,00
<b>INPA R618</b>	2,50	3,44	3,63	4,00	4,00
<b>INPA R619</b>	1,00	2,69	3,81	4,00	4,00
<b>INPA R620</b>	1,31	2,13	3,75	4,00	4,00
<b>INPA R621</b>	2,31	2,94	3,50	4,00	4,00
<b>INPA R622</b>	1,25	2,19	3,56	3,88	4,00
<b>INPA R623</b>	1,00	2,13	3,69	4,00	4,00
<b>INPA R624</b>	1,69	2,38	3,50	4,00	4,00
<b>INPA R626</b>	2,13	2,56	3,81	4,00	4,00
<b>INPA R627</b>	1,63	2,63	3,94	4,00	4,00
<b>INPA R628</b>	1,44	2,25	3,75	4,00	4,00
<b>INPA R629</b>	3,75	3,88	3,94	4,00	4,00
<b>INPA R630</b>	1,44	2,31	3,56	4,00	4,00
<b>INPA R631</b>	1,50	2,00	3,50	4,00	4,00
<b>INPA R632</b>	1,13	2,00	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R633</b>	1,19	2,00	3,31	4,00	4,00
<b>INPA R634</b>	1,13	3,25	3,88	4,00	4,00
<b>INPA R635</b>	1,38	2,00	2,25	2,56	2,56
<b>INPA R636</b>	1,38	2,88	3,81	4,00	4,00
<b>INPA R640</b>	1,69	3,25	3,38	3,38	3,38

---

<b>INPA R642</b>	1,25	3,25	3,94	4,00	4,00
<b>INPA R644</b>	1,00	2,31	2,88	2,88	2,88
<b>INPA R645</b>	1,25	3,56	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R647</b>	1,50	3,63	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R651</b>	2,00	4,00	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R652</b>	1,00	2,31	3,13	3,13	3,13
<b>INPA R653</b>	1,81	3,56	3,94	4,00	4,00
<b>INPA R654</b>	1,00	1,75	2,88	2,88	2,88
<b>INPA R655</b>	1,00	2,00	3,19	3,19	3,19
<b>INPA R656</b>	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R660</b>	2,38	3,50	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R664</b>	1,00	1,00	2,63	2,63	2,63
<b>INPA R666</b>	3,69	3,81	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R668</b>	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R670</b>	3,56	3,94	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R672</b>	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R673</b>	1,00	1,25	2,06	2,06	3,00
<b>INPA R674</b>	3,88	4,00	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R656</b>	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R657</b>	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00

1-Pontuação: 1,00 crescimento não visível; 4,00 máximo crescimento (Oliveira e Magalhães, 1991).

**Tabela 5:** Médias do crescimento de rizóbio em meio YMA com pH 4,5 + Al isolados de amostras de solos na Amazônia. Média de quatro repetições.

Isolados	Pontuação <sup>1</sup> / dias de crescimento				
	3 dias	6 dias	9 dias	12 dias	15 dias
<b>INPA R546</b>	1,13	2,00	3,31	3,75	4,00
<b>INPA R547</b>	1,25	2,25	3,00	4,00	4,00
<b>INPA R548</b>	1,13	2,19	3,75	4,00	4,00
<b>INPA R549</b>	1,00	2,63	3,81	4,00	4,00
<b>INPA R550</b>	1,00	2,25	3,50	4,00	4,00
<b>INPA R551</b>	1,06	2,00	3,81	4,00	4,00
<b>INPA R552</b>	1,13	2,25	3,88	4,00	4,00
<b>INPA R553</b>	1,00	2,06	3,50	4,00	4,00
<b>INPA R554</b>	1,25	2,13	3,56	4,00	4,00
<b>INPA R555</b>	1,06	2,13	3,69	4,00	4,00
<b>INPA R556</b>	1,00	1,06	1,06	1,06	1,06
<b>INPA R557</b>	1,13	1,13	1,13	1,13	1,13
<b>INPA R558</b>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00



<b>INPA R559</b>	1,38	3,31	3,88	4,00	4,00
<b>INPA R560</b>	1,06	2,06	3,56	4,00	4,00
<b>INPA R561</b>	1,00	1,00	2,00	2,00	2,81
<b>INPA R562</b>	1,00	1,00	1,31	2,13	2,69
<b>INPA R563</b>	1,00	2,25	3,88	4,00	4,00
<b>INPA R564</b>	1,13	3,38	3,63	4,00	4,00
<b>INPA R565</b>	1,13	2,75	3,75	4,00	4,00
<b>INPA R566</b>	1,13	3,00	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R567</b>	1,13	2,00	3,69	4,00	4,00
<b>INPA R568</b>	1,00	1,81	3,88	4,00	4,00
<b>INPA R569</b>	1,13	2,81	3,19	3,19	3,19
<b>INPA R588</b>	2,19	2,44	2,44	2,44	2,44
<b>INPA R571</b>	1,00	2,69	3,75	4,00	4,00
<b>INPA R572</b>	1,06	2,69	3,75	4,00	4,00
<b>INPA R573</b>	1,13	2,81	3,81	4,00	4,00
<b>INPA R574</b>	1,19	2,94	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R575</b>	1,25	3,25	3,94	4,00	4,00
<b>INPA R576</b>	1,50	3,31	3,94	4,00	4,00
<b>INPA R577</b>	1,19	2,13	2,88	2,88	2,88
<b>INPA R578</b>	1,50	3,50	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R579</b>	1,50	3,63	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R581</b>	1,94	3,50	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R582</b>	1,81	3,63	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R583</b>	2,00	3,63	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R587</b>	1,00	2,06	2,44	2,44	2,44
<b>INPA R588</b>	2,00	3,81	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R589</b>	2,00	3,50	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R591</b>	3,81	3,94	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R592</b>	1,13	1,56	3,00	3,00	3,00
<b>INPA R593</b>	1,88	2,63	3,94	4,00	4,00
<b>INPA R595</b>	1,06	2,13	2,25	3,00	3,00
<b>INPA R596</b>	1,00	2,13	2,50	3,00	3,00
<b>INPA R597</b>	1,88	2,88	3,94	4,00	4,00
<b>INPA R599</b>	1,56	2,81	3,94	4,00	4,00
<b>INPA R600</b>	1,44	3,69	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R601</b>	1,75	2,75	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R604</b>	1,13	2,00	2,50	3,00	3,00
<b>INPA R606</b>	1,38	2,88	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R607</b>	1,56	3,19	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R608</b>	1,94	3,75	3,94	4,00	4,00
<b>INPA R609</b>	1,00	1,38	2,44	3,06	3,06
<b>INPA R610</b>	1,88	2,94	3,94	4,00	4,00

<b>INPA R611</b>	1,50	2,31	3,88	4,00	4,00
<b>INPA R612</b>	1,13	3,44	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R613</b>	1,19	2,31	3,31	3,31	3,31
<b>INPA R614</b>	1,38	3,25	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R615</b>	1,19	3,13	3,38	3,38	3,38
<b>INPA R616</b>	1,19	3,31	3,94	4,00	4,00
<b>INPA R618</b>	2,50	3,06	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R619</b>	1,75	2,94	3,81	4,00	4,00
<b>INPA R620</b>	1,13	3,00	3,88	4,00	4,00
<b>INPA R621</b>	1,13	3,56	3,94	4,00	4,00
<b>INPA R622</b>	1,13	3,81	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R623</b>	1,63	3,44	3,75	4,00	4,00
<b>INPA R624</b>	1,25	3,19	3,94	4,00	4,00
<b>INPA R626</b>	1,38	3,44	3,81	4,00	4,00
<b>INPA R627</b>	1,00	2,56	2,81	2,81	2,81
<b>INPA R628</b>	1,81	3,63	3,94	4,00	4,00
<b>INPA R629</b>	2,25	3,50	3,88	4,00	4,00
<b>INPA R630</b>	1,69	3,81	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R631</b>	1,75	3,88	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R632</b>	1,63	3,63	3,94	4,00	4,00
<b>INPA R633</b>	1,06	3,75	3,94	4,00	4,00
<b>INPA R634</b>	1,63	3,56	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R635</b>	1,00	2,38	2,81	2,81	2,81
<b>INPA R636</b>	1,69	3,44	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R640</b>	1,00	2,00	2,63	2,94	2,94
<b>INPA R642</b>	1,75	3,13	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R644</b>	1,00	1,88	2,88	3,19	3,19
<b>INPA R645</b>	1,75	3,69	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R647</b>	1,88	3,69	3,94	4,00	4,00
<b>INPA R651</b>	1,81	3,50	3,88	4,00	4,00
<b>INPA R652</b>	1,00	2,25	3,19	3,19	3,19
<b>INPA R653</b>	1,94	3,50	3,88	4,00	4,00
<b>INPA R654</b>	1,00	1,19	1,88	2,88	3,63
<b>INPA R655</b>	1,13	2,25	3,00	3,31	3,31
<b>INPA R656</b>	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R660</b>	1,88	3,56	3,94	4,00	4,00
<b>INPA R664</b>	1,13	1,19	2,00	2,50	2,50
<b>INPA R666</b>	1,88	2,88	3,88	4,00	4,00
<b>INPA R668</b>	1,81	2,81	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R670</b>	2,44	3,25	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R672</b>	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R673</b>	1,00	1,81	2,44	2,69	2,69

<b>INPA R674</b>	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R656</b>	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
<b>INPA R657</b>	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00

1-Pontuação: 1,00 crescimento não visível; 4,00 máximo crescimento (Oliveira e Magalhães, 1991).

#### 4.6 CONCLUSÕES

1) No 6° dia de avaliação, 47 dos 100 isolados testados apresentaram alto valor para o crescimento em meio pH 6,5. Os isolados INPA R591, INPA R656, INPA R672, INPA R656, INPA R657 já possuíam o escore máximo (4,00) no 3° dia;

2) Para o meio 4,5 + Al, a partir do 6° dia foi verificado que 40 isolados dos 100 apresentavam valor alto (acima de 3,06). Os isolados INPA R656, INPA R672, INPA R674, INPA R656 e INPA R657 já obtiveram máximo crescimento (4,00) no 3° dia;

3) O aumento nos níveis de tolerância foi observado com o tempo de crescimento.

**CAPACIDADE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS DE CÁLCIO E ALUMÍNIO DE RIZÓBIO ISOLADOS DE SOLOS DO AMAZONAS****5.1 RESUMO**

Em solos com baixa disponibilidade de fósforo, como os de solos de terra firme da Amazônia, a capacidade de estirpes de rizóbio de solubilizar compostos de fosfato inorgânico é extremamente importante. Assim o objetivo desse trabalho foi determinar a capacidade de solubilização de fosfato de cálcio e fosfato de alumínio de rizóbio isolados de solos ácidos e de baixa fertilidade na Amazônia. Os isolados de rizóbio foram repicados para meios específicos para solubilização de fosfatos de cálcio (PCa) e Alumínio (P-Al), onde os isolados foram avaliados por um período de 15 dias, obtendo-se os índices de solubilização. Foram avaliados 71 isolados, onde 46 solubilizaram P-Ca e 25 solubilizaram P-Al, sendo que 19 isolados solubilizaram tanto P-Ca quanto P-Al. Dentre os que solubilizaram fosfato de cálcio, 46 se comportaram como precoces e somente 1 como tardio já nos solubilizadores de alumínio, 24 se comportaram como precoces e 1 como tardio, os outros não se mostraram solubilizadores. Esses resultados de laboratório indicam possibilidade de se utilizar isolados de rizóbio capazes de solubilizar fosfatos, visando incrementar a concentração de fósforo solúvel na rizosfera e promover a nutrição de plantas com esse elemento.

**PALAVRAS CHAVES:** Amazônia, Ecologia microbiana, Metabolismo microbiano.

## **CALCIUM AND ALUMINUM PHOSPHATE SOLUBILIZING ABILITY OF RHIZOBIA ISOLATED FROM AMAZONAS SOILS**

### **5.2 ABSTRACT**

On low available phosphorus soils, such as the Amazonian upland the ability of strains of rhizobia to solubilize composed inorganic phosphates is of extreme importance. The objective of this work was to determine the capacity of soil Amazonian rhizobia isolates to solubilize calcium and aluminum phosphate. The rhizobia isolates were evaluated on specific growth media containing phosphate of calcium (P-Ca) and aluminum (P-Al), where the isolated ones were appraised for a period of 15 days, when solubilizing indexes were obtained. They were appraised 71 isolates, where 46 isolated solubilized P-Ca and 25 solubilized P-Al, and 19 solubilized P-Ca as well as P-Al. Among the isolates able to solubilize calcium phosphate, 46 were considered as precocious and 1 as delayers and all the isolate evaluated presented capacity to solubilize aluminum phosphate, 24 were considered as precocious and 1 as delayers, the other not shown solubilizers. These laboratory results indicate the possibility to use isolates of rhizobia able to solubilize phosphates, in order to increase the concentration of soluble phosphorus in the rhizosphere and to promote the nutrition of plants with this element.

**KEY WORDS:** Amazon, Microbial ecology, Microbial metabolism.

### 5.3 INTRODUÇÃO

O fósforo (P) é, após o nitrogênio, o segundo macronutriente limitante para o crescimento e a produção de culturas agrícolas (Vance, 2000). Ele está envolvido em funções biológicas básicas como a formação de ácidos nucleicos, fosfolipídios, metabolismo energético, ativação de metabolismo intermediário e regulação enzimática através das cascatas de tradução de sinais (Rausch e Bucher, 2002; Schünmann *et al.*, 2004). Na verdade, o fosforo é um dos nutrientes menos solúveis no ambiente, com menos do que 5% do fosfato total do solo estando disponível para as plantas (Dobbelaere *et al.*, 2003).

Sendo o fosforo um elemento nutricional essencial para o crescimento das plantas, a adição de fertilizantes fosfatados é uma prática comum na agricultura moderna. Entretanto, uma grande porção do fosfato inorgânico solúvel aplicado ao solo como fertilizante é rapidamente imobilizada pelo ferro e pelo alumínio, em solos ácidos, e por cálcio, em solos calcários, logo depois da aplicação, tornando-se, assim, indisponível para as plantas (Holford, 1997).

Os recursos globais de fertilizantes fosfatados economicamente acessíveis vão se esgotar num futuro próximo, resultando em aumento de custos dos fertilizantes fosfatados, bem como na sua escassez (Isherwood, 2000). Para evitar uma possível escassez de P, especialmente em economias menos competitivas, estratégias de melhoria da produtividade de diversas culturas devem ser desenvolvidas com abordagens sustentáveis de adaptação de cultivares a ambientes de baixa fertilidade, melhorando, para tanto, sua capacidade de aquisição de nutrientes (Lynch, 2007; Beddington, 2010).

O fornecimento de P para as plantas por meio de insumos biológicos é uma alternativa sustentável e viável, já que o P solúvel é liberado a partir de reações de solubilização de fosfatos insolúveis envolvendo diversos microrganismos (Marschner e Dell, 1994). Esses microrganismos presentes no solo são capazes de solubilizar fosfato mineral insolúvel pela produção de vários ácidos orgânicos que acidificam o solo, liberando íons ortofosfato solúveis, que podem ser captados pelas plantas (Jones, 1998). Adicionalmente, tais microrganismos são capazes de mineralizar compostos orgânicos fosfatados pela liberação de enzimas fosfatases (Garcia *et al.*, 1992). A presença de quantidades significativas de atividade de fosfatases tem sido reportada e a maior fonte dessa atividade no solo é considerada como

sendo de origem microbiana. Esta atividade é substancialmente aumentada na rizosfera (Rodríguez e Fraga, 1999).

Um grande número de bactérias solubilizadoras de fosfato tem sido isolado da rizosfera de varias lavouras. Foi estimado que esses microrganismos possam constituir de 20 a 40% da população de microrganismos cultiváveis do solo e que uma proporção significativa deles possa ser isolada do solo da rizosfera (Chabot *et al.*, 1993). Embora haja uma boa evidência para a solubilização de fosfato por estes microrganismos em culturas puras, é difícil demonstrar a solubilização de fosfato nos sistemas planta-micro-organismo. A produção por estas linhagens bacterianas de outros metabólitos benéficos para as plantas tais como fito-hormônios, antibióticos ou sideroforos, entre outros, tem criado confusão sobre o papel específico da solubilização de fosfato no crescimento vegetal e na estimulação da produção vegetal (Kloepper *et al.*, 1989).

Tais microrganismos solubilizadores de fosfato têm atraído a atenção dos pesquisadores que objetivam melhorar o crescimento e o rendimento das plantas. Bactérias solubilizadoras de fosfato (BSP) têm sido identificadas entre os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* e *Erwinia* (Rodríguez e Fraga, 1999).

Assim, os estudos de rizóbio a partir da avaliação “*in vitro*” da capacidade de solubilização de fosfatos pode proporcionar uma base segura para selecionar isolados de rizóbio efetivos com essa característica. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi a avaliação “*in vitro*” da capacidade de solubilização de fosfatos de cálcio e alumínio de rizóbio isolados de solos na Amazônia.

## **5.4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.4.1 Coleta de material**

Inicialmente foram obtidos nódulos coletados dos sistemas radiculares de leguminosas em solos de várzea e terra firme da região. Para a coleta dos nódulos foi usado a metodologia descrita por Hungria (1994) conforme locais descritos (Tabela 1, pág 29).

### 5.4.2 Isolamento dos nódulos

Após a obtenção dos nódulos, foram isoladas as estirpes de rizóbios usando a metodologia descrita por Vincent (1970) e Somasegaran e Hoben (1985). Os nódulos foram lavados com etanol (90%; três minutos), seguindo uma desinfecção superficial com hipoclorito de sódio (cinco minutos) e dez lavagens com água estéril. Em seguida os nódulos foram pressionados com uma pinça e feita as riscagens em placas de Petri contendo meio YMA (*yeast manitol agar*) (Vincent 1970) (Tabela 2, pág 31). Após o isolamento, as placas foram incubadas a 28°C até o crescimento de colônias de bactérias e então foram repicadas para novas placas contendo o mesmo meio e novamente incubadas até o novo crescimento bacteriano. Os isolados obtidos por último foram mantidos em tubos de ensaios contendo o meio YMA inclinado, segundo descrito por Vincent (1970) e Somasegaran e Hoben (1985). Dos isolados mantidos em tubos de ensaio, foram utilizados os 71 melhores provenientes do primeiro teste de acidez e alumínio tóxico para então ser feito o teste descrito abaixo.

### 5.4.3 Solubilização de Fosfato de Cálcio e Alumínio

Foram utilizados dois meios específicos para bactérias solubilizadoras, sendo um para solubilizadoras de fosfato de cálcio (P-Ca), contendo 10 g de glucose, 2 g de extrato de levedura e 15 g de ágar. Neste meio acrescentou-se uma solução A contendo 5 g de  $K_2HPO_4$  (50 mL de água) e uma solução B contendo 10 g de  $CaCl_2$  (100 mL de água), para a formação do fosfato de cálcio precipitado (Hara e Oliveira, 2004), ajustando-se o pH para 6,5. Um segundo meio para verificar a solubilização de fosfato de alumínio (P-Al) continha 10 g de manitol, 2 g de extrato de levedura, 6 g de  $K_2HPO_4$  e 18g de ágar. Neste meio foi acrescentada, também, uma solução contendo 5,34 g de  $AlCl_3$ , para formar o precipitado de fosfato de alumínio (Hara e Oliveira, 2004), e o pH ajustado para 4,5.

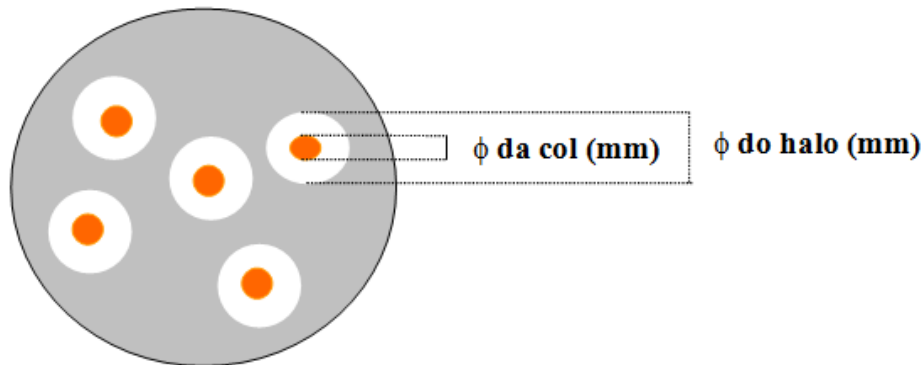
Foi acrescentado o corante bromocresol verde no meio P-Al e azul de bromotimol no meio P-Ca, com o objetivo de visualizar a alteração do pH do meio pelas bactérias, em função da alteração da cor do meio.



Os isolados de rizóbio crescidos em meio YMA (pH 5,5), foram repicados para cada meio de solubilização de fosfatos com auxílio de uma alça de platina, estabelecendo-se cinco colônias por placa (Figura 5) com duas placas por isolado.

Os isolados foram avaliados por um período de 15 dias, cujas medidas do diâmetro ( $f$ ) dos halos de solubilização, percebido como uma área translúcida ao redor da colônia, e  $f$  das colônias foi mensurada a cada três dias, utilizando-se um paquímetro digital. A partir dessas medidas foram obtidos os índices de solubilização de cada isolado através da fórmula:  $IS = f \text{ Halo (mm)} / f \text{ Colônia (mm)}$  (Berraquero *et al.*, 1976).

**Figura 5.** Distribuição das colônias nas placas de petri para verificação do halo de solubilização como indicativo de solubilização de fosfatos de cálcio e de alumínio.



Com base nos índices de solubilização, as bactérias foram classificadas como isolados com baixa ( $IS < 2$ ), média ( $2 \leq IS < 4$ ) e alta solubilização ( $IS > 4$ ). De acordo com o início da solubilização, as bactérias foram classificadas ainda como precoces, cujo início da solubilização se deu até o terceiro dia, tardias, com início da solubilização depois do terceiro dia e “não solubilizadoras aparentes”, aquelas que não apresentaram solubilização visível até o décimo quinto dia de avaliação.

## 5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 6 mostra os 46 isolados, dos 71 estudados, que solubilizaram o fosfato de cálcio, sendo que apenas 6 isolados (L4N18, L5N18, L5N21, L7N9, L7N14 E L7N15) apresentaram alto índice de solubilização final, dentre esses, o que teve maior índice de solubilização final foi o L4N18 com o  $IS = 4,29$  e 40 apresentaram índice de solubilização

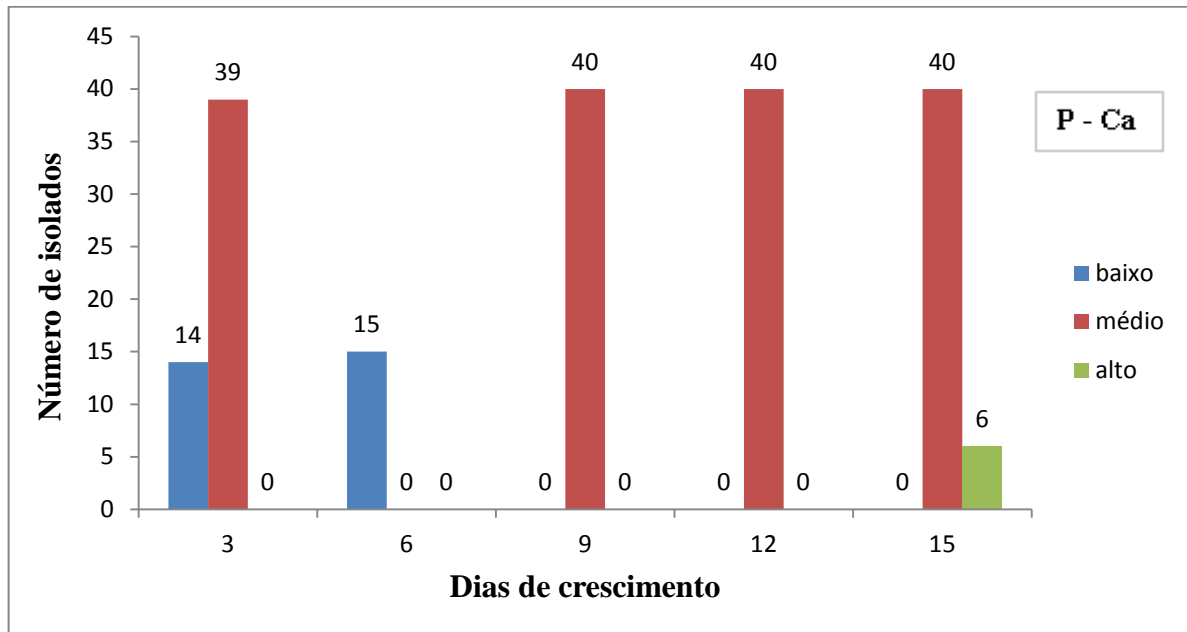
médio, variando de 2,11 a 3,80 (Tabela 6). Dentre os isolados capazes de solubilizar o fosfato de cálcio, 46 se comportaram como precoces e 1 como tardios. Os outros isolados não apresentaram solubilização aparente no período de 15 dias de avaliação.

Segundo Piex *et al.* (2001), isolados de rizóbia foram efetivos quanto à solubilização de fosfato de cálcio em laboratório, mas a eficiência de solubilização variou entre as estirpes.

Vários estudos (Mikanova e Kubat, 1999; Rodríguez e Fraga, 1999; Hara e Oliveira, 2004, 2005) evidenciam que a capacidade dos isolados de rizóbio solubilizarem o P-Ca está correlacionada com a diminuição do pH do meio pelos ácidos orgânicos ou prótons. Os ácidos orgânicos secretados podem diretamente dissolver o fosfato mineral como resultado da troca de ânion de  $PO_4^{2-}$  por ânion ácido ou podem quelatar íons de Fe e Al associados com fosfatos. As bactérias solubilizadoras de fosfatos produzem ácidos orgânicos, tais como, acetato, lactato, oxalato, tartarato, succinato, citrato, gluconato, ketogluconato, glicolato, etc. (Cunningham e Kuyack, 1992; Gyaneshwar *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998,1999). Para estirpes de rizóbio, o ácido orgânico identificado em estirpes com capacidade de solubilização de fosfato foi o ácido 2- ketogluconico, presente em *Rhizobium leguminosarum* (Halder *et al.*, 1990) e *Rhizobium meliloti* (Halder e Chakrabartty, 1993).

Alguns trabalhos têm mostrado o efeito positivo da inoculação com bactérias solubilizadoras de fosfato também sobre cultivos agrícolas. Chabot *et al.* (1998) observaram um incremento no rendimento da matéria seca do milho, assim como Mikanova *et al.* (2000), Mikanova e Kubát (1999) e Piex *et al.* (2001) detectaram aumento na produtividade de ervilha, soja e feijão, respectivamente, quando inoculados com bactérias solubilizadoras de fosfato.

Em um outro trabalho, embora cepas de *Burkholderia* sejam relatadas na literatura quanto à capacidade de solubilizar P, essa capacidade foi demonstrada pela primeira vez em diversas condições como alta concentração de sal, pH extremo e baixa temperatura para *Burkholderia vietnamiensis*. Em tal trabalho, realizado por Park *et al.* (2010), tal bactéria foi sugerida como um ótimo bioinoculante, não somente pela característica de solubilizar P, mas sobretudo pela sua capacidade de se adaptar bem sob diversas condições de estresse.

**Figura 6:** Índices de solubilização de cálcio dos isolados testados em 15 dias.**Tabela 6:** Capacidade de solubilização de fosfato de cálcio dos isolados de rizóbio.

Isolados	Início de Solubilização (dia)	I.S. <sup>1</sup>		Solubilização
		Inicial (mm)	Final (mm)	
<b>INPA R546</b>	3	2,17 (médio)	2,51 (médio)	Precoce
<b>INPA R548</b>	3	2,12 (médio)	2,23 (médio)	Precoce
<b>INPA R549</b>	3	1,64 (baixo)	2,11 (médio)	Precoce
<b>INPA R553</b>	3	1,67 (baixo)	2,16 (médio)	Precoce
<b>INPA R555</b>	6	0 (baixo)	2,35 (médio)	Normal
<b>INPA R559</b>	3	2,15 (médio)	2,60 (médio)	Precoce
<b>INPA R560</b>	3	1,72 (baixo)	2,27 (médio)	Precoce
<b>INPA R563</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R564</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R565</b>	3	2,17 (médio)	3,13 (médio)	Precoce
<b>INPA R566</b>	3	2,15 (médio)	3,11 (médio)	Precoce
<b>INPA R567</b>	3	1,75 (baixo)	2,43 (médio)	Precoce
<b>INPA R568</b>	3	2,15 (médio)	3,16 (médio)	Precoce
<b>INPA R571</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R572</b>	3	1,52 (baixo)	2,39 (médio)	Precoce
<b>INPA R573</b>	3	1,62 (baixo)	2,29 (médio)	Precoce
<b>INPA R574</b>	3	2,92 (médio)	3,20 (médio)	Precoce
<b>INPA R575</b>	3	2,25 (médio)	2,39 (médio)	Precoce

<b>INPA R576</b>	3	1,83 (baixo)	3,10 (médio)	Precoce
<b>INPA R577</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R579</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R580</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R581</b>	3	1,44 (baixo)	2,67 (médio)	Precoce
<b>INPA R582</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R583</b>	3	1,94 (baixo)	2,34 (médio)	Precoce
<b>INPA R588</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R589</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R591</b>	3	2,48 (médio)	3,12 (médio)	Precoce
<b>INPA R593</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R597</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R599</b>	3	2,12 (médio)	2,82 (médio)	Precoce
<b>INPA R600</b>	3	2,18 (médio)	3,12 (médio)	Precoce
<b>INPA R601</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R606</b>	3	1,84 (baixo)	3,40 (médio)	Precoce
<b>INPA R607</b>	3	2,50 (médio)	3,55 (médio)	Precoce
<b>INPA R608</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R610</b>	3	1,88 (baixo)	2,49 (médio)	Precoce
<b>INPA R611</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R612</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R614</b>	3	2,39 (médio)	3,31 (médio)	Precoce
<b>INPA R616</b>	3	2,14 (médio)	2,87 (médio)	Precoce
<b>INPA R618</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R619</b>	3	2,42 (médio)	2,71 (médio)	Precoce
<b>INPA R620</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R621</b>	3	2,02 (médio)	3,09 (médio)	Precoce
<b>INPA R622</b>	3	2,12 (médio)	3,09 (médio)	Precoce
<b>INPA R623</b>	3	2,25 (médio)	2,42 (médio)	Precoce
<b>INPA R624</b>	3	2,05 (médio)	2,87 (médio)	Precoce
<b>INPA R626</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R628</b>	3	1,84 (baixo)	2,70 (médio)	Precoce
<b>INPA R629</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R630</b>	3	2,33 (médio)	3,65 (médio)	Precoce
<b>INPA R631</b>	3	2,09 (médio)	3,5 (médio)	Precoce
<b>INPA R632</b>	3	2,47 (médio)	3,49 (médio)	Precoce
<b>INPA R633</b>	3	2,37 (médio)	3,33 (médio)	Precoce
<b>INPA R634</b>	3	2,57 (médio)	4,29 (alto)	Precoce
<b>INPA R636</b>	3	3,34 (médio)	3,65 (médio)	Precoce
<b>INPA R642</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R645</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R647</b>	3	2,26 (médio)	3,23 (médio)	Precoce

<b>INPA R651</b>	3	2,16 (médio)	3,13 (médio)	Precoce
<b>INPA R653</b>	3	2,31 (médio)	4,10 (alto)	Precoce
<b>INPA R656</b>	3	2,01 (médio)	4,28 (alto)	Precoce
<b>INPA R660</b>	3	1,48 (baixo)	3,80 (médio)	Precoce
<b>INPA R666</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R668</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R670</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R672</b>	3	2,01 (médio)	4,15 (alto)	Precoce
<b>INPA R674</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R676</b>	3	2,70 (médio)	4,22 (alto)	Precoce
<b>INPA R677</b>	3	2,02 (médio)	4,18 (alto)	Precoce

<sup>1</sup> IS = Índice de solubilização.

Quanto à solubilização de P-Al, dos 71 isolados estudados, 25 apresentaram a capacidade de solubilização (Figura 7). 12 destes isolados apresentaram índice de solubilização alto (INPA R563, INPA R582, INPA R621, INPA R623, INPA R628, INPA R630, INPA R632, INPA R634, INPA R651, INPA R666, INPA R672, INPA R676 e INPA R677) sendo que dentre eles, o que teve maior índice de solubilização foi o INPA R623 com o IS = 4,31 e 12 apresentaram índice de solubilização médio, variando de 2,12 a 3,04 (Tabela 7). Entre os isolados solubilizadores, 24 comportaram-se como precoces e 1 como normal, solubilizando o fosfato depois do 6º, dia. Os outros isolados não apresentaram solubilização aparente em meio com P-Al. Segundo Hara e Oliveira (2005), esta capacidade de solubilização de P-Al pode estar relacionada ao fato de que o alumínio e o fosfato ligado a ele predominam nos solos da região (Raij, 1991). Resultados de Hara e Oliveira (2004) mostraram a capacidade de solubilização de P-Al em 67% dos isolados.

Estudos apontam que a baixa incidência de solubilização de P-Al está mais relacionada ao estado físico do meio (sólido) e à sua composição do que à capacidade dos isolados de solubilizar este fosfato (Souchie *et al.*, 2005a). Resultados semelhantes da estirpe INPA 03-11B são observados em estudos anteriores (Marra *et al.*, 2012).

Assim, vários fatores podem ter afetado esta relação, entre eles, as quantidades de P imobilizadas pelos microrganismos durante o crescimento (Silva Filho *et al.*, 2002).

Os dados das Figuras 6 e 7 evidenciam que 19 dos isolados que solubilizaram o P-Ca também solubilizaram o P-Al. Resultados reportados por Hara e Oliveira (2004), estudando 88 isolados de rizóbio de solos agrícolas amazônicos, mostram que o P-Ca foi solubilizado

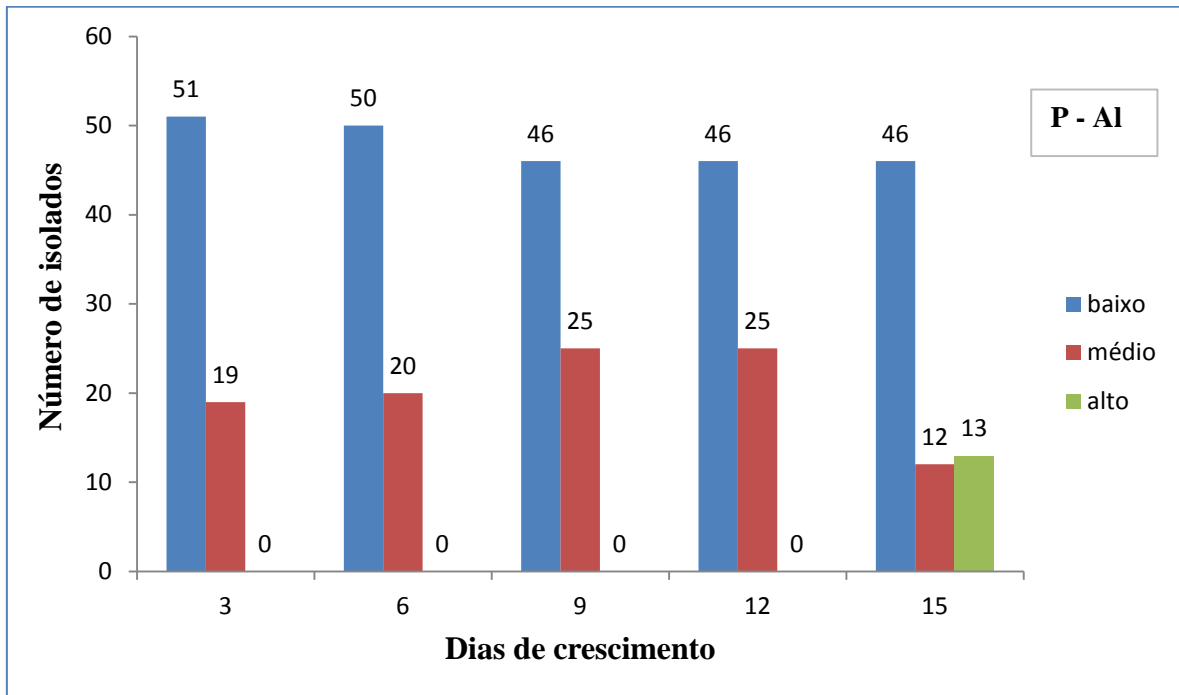
por 39% dos isolados e a maioria dos isolados de rizóbio que solubilizou P-Ca (76,5% dos isolados) também solubilizou o P-Al. Porém, Silva Filho e Vidor (2000) identificaram uma baixa ocorrência de isolados que solubilizaram ambos os fosfatos. Silva Filho e Vidor (2000) citam que a baixa frequência de solubilizadores de P-Al se deve ao fato de inicialmente os isolados serem obtidos em meios contendo o P-Ca para, depois, serem avaliados na presença de P-Al.

Têm sido reportado, também, que estirpes de *Bradyrhizobium* solubilizaram diferentes quantidades de fosfato (hydroxiapatita e fosfato tricálcio) em meio de cultura líquido (Chabot *et al.*, 1998; Mikanová e Kubát, 1999; Mikanová e Nováková, 2002; Bano e Musarrat, 2003).

Segundo Mikanová e Kubát (1999), estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* mostraram atividade de solubilização de fosfato em meio de cultura e, quando inoculadas em plantas de soja, observou-se um aumento da produtividade da cultura e o conteúdo de fósforo lábil no solo.

Outros trabalhos têm mostrado o efeito positivo da inoculação de plantas com bactérias solubilizadoras de fosfatos sobre cultivos agrícolas. Piex *et al.* (2001) observaram aumento na produção de culturas como soja, feijão e ervilha quando inoculadas com rizóbios capazes de solubilizarem fosfatos de cálcio.

É muito provável que o efeito microbiano na rizosfera de plantas pode proporcionar uma resposta fisiológica positiva nas plantas hospedeiras, como a capacidade de solubilizar fosfatos inorgânicos, disponibilizando-os para as plantas (Silva Filho *et al.*, 2002; Vessey, 2003). Assim, a avaliação de bactérias do solo a partir da avaliação “*in vitro*” da capacidade de solubilização de fosfatos pode proporcionar uma base segura para selecionar isolados de bactérias solubilizadoras de fosfatos efetivos. Porém, há a necessidade de se estudar o uso dessas bactérias como inoculantes, enfocando os mecanismos de sobrevivência em solos da região amazônica, para que se possa selecionar isolados que possam solubilizar o fósforo insolúvel (Silva *et al.*, 2011).

**Figura 7:** Índices de solubilização de alumínio dos isolados testados em 15 dias.**Tabela 7:** Capacidade de solubilização de fosfato de alumínio dos isolados de rizóbio.

Isolados	Início de Solubilização (dia)	I.S. <sup>1</sup>		Solubilização
		Inicial (mm)	Final (mm)	
<b>INPA R546</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R548</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R549</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R553</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R555</b>	3	2,07 (médio)	2,15 (médio)	Precoce
<b>INPA R559</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R560</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R563</b>	3	2,65 (médio)	4,2 (alto)	Precoce
<b>INPA R564</b>	3	1,89 (baixo)	3 (médio)	Precoce
<b>INPA R565</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R566</b>	3	2,15 (médio)	2,34 (médio)	Precoce
<b>INPA R567</b>	3	2,47 (médio)	3,01 (médio)	Precoce
<b>INPA R568</b>	3	1,69 (baixo)	2,25 (médio)	Precoce
<b>INPA R571</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R572</b>	3	2,13 (médio)	2,35 (médio)	Precoce
<b>INPA R573</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R574</b>	6	0 (baixo)	2,20 (médio)	Normal
<b>INPA R575</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R576</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador

<b>INPA R577</b>	3	1,65 (baixo)	2,12 (médio)	Precoce
<b>INPA R579</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R580</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R581</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R582</b>	3	2,82 (médio)	4,31 (alto)	Precoce
<b>INPA R583</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R588</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R589</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R591</b>	3	2,56 (médio)	3,04 (médio)	Precoce
<b>INPA R593</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R597</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R599</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R600</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R601</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R606</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R607</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R608</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R610</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R611</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R612</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R614</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R616</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R618</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R619</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R620</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R621</b>	3	2,19 (médio)	4,10 (alto)	Precoce
<b>INPA R622</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R623</b>	3	2,16 (médio)	4,31 (alto)	Precoce
<b>INPA R624</b>	3	1,88 (baixo)	2,51 (médio)	Precoce
<b>INPA R626</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R628</b>	3	1,92 (baixo)	4,22 (alto)	Precoce
<b>INPA R629</b>	3	2,10 (médio)	2,73 (médio)	Precoce
<b>INPA R630</b>	3	2,18 (médio)	4,17 (alto)	Precoce
<b>INPA R631</b>	3	2,12 (médio)	3,02 (médio)	Precoce
<b>INPA R632</b>	3	2,18 (médio)	4,12 (alto)	Precoce
<b>INPA R633</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R634</b>	3	2,17 (médio)	4,23 (alto)	Precoce
<b>INPA R636</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R642</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R645</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R647</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R651</b>	3	2,15 (médio)	4,18 (alto)	Precoce
<b>INPA R653</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador



<b>INPA R656</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R660</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R666</b>	3	2,40 (médio)	4,15 (alto)	Precoce
<b>INPA R668</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R670</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R672</b>	3	2,14 médio)	4,11 (alto)	Precoce
<b>INPA R674</b>	0	0 (baixo)	0 (baixo)	Não solubilizador
<b>INPA R676</b>	3	2,62 (médio)	4,28 (alto)	Precoce
<b>INPA R677</b>	3	2,10 (médio)	4,26 (alto)	Precoce

<sup>1</sup> IS = Índice de solubilização

## 5.6 CONCLUSÕES

- 1) O fosfato de cálcio foi solubilizado por 46 dos 71 isolados de rizóbio estudados;
- 2) Somente os isolados INPA R634, INPA R653, INPA R656, INPA R672, INPA R676 e INPA R677 apresentaram alto índice de solubilização;
- 3) Somente 25 dos 71 isolados solubilizaram fosfato de alumínio;
- 4) 12 desses isolados apresentaram índice de solubilização alto (INPA R563, INPA R582, INPA R621, INPA R623, INPA R628, INPA R630, INPA R632, INPA R634, INPA R651, INPA R666, INPA R672, INPA R676 e INPA R677)
- 5) Do total de 71 isolados de rizóbio, 19 solubilizaram ambos os fosfatos de cálcio e de alumínio.
- 6) Os isolados que solubilizaram tanto os fosfatos de cálcio e de alumínio foram: INPA R555, INPA R566, INPA R567, INPA R568, INPA R572, INPA R574, INPA R591, INPA R621, INPA R623, INPA R624, INPA R628, INPA R630, INPA R631, INPA R633, INPA R634, INPA R651, INPA R672, INPA R676, INPA R677.

**PRODUÇÃO DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO POR RIZÓBIOS ISOLADOS DE SOLOS DO AMAZONAS NO SISTEMA RADICULAR DO PEPINO****6.1 RESUMO**

Os rizóbios existentes nos solos sintetizam naturalmente o ácido indol-acético (AIA), sendo a auxina de ocorrência natural mais abundante. O presente estudo teve como objetivo avaliar a produção de hormônio de crescimento por isolados de rizóbios em sistema radicular de pepino. Para tanto, foram utilizados 70 isolados de rizóbios nativos do Amazonas. A avaliação do crescimento radicular através da produção de AIA foram utilizados sacos plásticos de 1L contendo papel filtro, solução nutritiva e duas sementes de pepino. Os tratamentos utilizados foram 70 isolados de rizóbios e 3 doses diferentes de AIA comercial: 10, 25, 50 mg além da testemunha não contendo estirpe nem AIA. Dentre os 71 isolados estudados, 38 induziram taxas de crescimento radicular das plantas de pepino maiores do que nas plantas não inoculadas com os mesmos. Dentre os isolados avaliados, o que obteve melhor resultado foi o INPA R670 no tempo de 24h.

**PALAVRAS-CHAVES:** AIA. Rizóbio. Amazonas.

## **INDOLE ACETIC ACID PRODUCTION BY RHIZOBIA ISOLATED FROM AMAZONAS SOILS OF ROOT SYSTEM CUCUMBER**

### **6.2 ABSTRACT**

The existing rhizobia in soils naturally synthesize indole-acetic acid (IAA) and the most abundant naturally occurring auxin. The present study has as objective to evaluate the production of IAA by 70 strains of rhizobia Amazon. For evaluation of root growth by producing IAA were used 1L plastic bags containing filter paper, nutrient solution and two cucumber seeds. The treatments were 70 strains of rhizobia and 3 different doses of commercial IAA: 10, 25, 50 mg and the control strain containing no or IAA. Of the 71 isolates tested, 38 induced growth rate of root system of cucumber greater than in non-inoculated plants with them. Among the isolates, which had the best result was the INPA R670 in time of 24h.

**KEY WORDS:** IAA. Rhizobia. Amazonas.

### 6.3 INTRODUÇÃO

Os rizóbios são classificados como organismos promotores de crescimento vegetal, devido à sua capacidade de exercer algum efeito benéfico no crescimento e/ou desenvolvimento das plantas, por meio de mecanismos diretos e indiretos (Santillana *et al.*, 2005). Os mecanismos gerais de promoção indireta de crescimento são basicamente relacionados com biocontrole, incluindo a produção de antibióticos, a quelação de Fe disponível na rizosfera, síntese de enzimas extracelulares para hidrolisar a parede celular fúngica e da competição com patógenos por nichos dentro da rizosfera (Van Loon, 2006) e os mecanismos gerais de promoção de crescimento diretos, de acordo com Castro *et al.* (2009), incluem a fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônios como auxinas, citocininas e giberelinas, solubilização de minerais como fósforo e ferro, a produção de sideróforos e a indução de resistência sistêmica.

Os rizóbios são reconhecidamente capazes de produzir substâncias fitoestimuladoras influenciando o crescimento e o desenvolvimento vegetal de não leguminosas (Biswas *et al.*, 2000; Belimov *et al.*, 2001; Yanni *et al.*, 2001; Kravchenko *et al.*, 2004). As principais substâncias fitoestimuladoras produzidas por rizóbios são os hormônios pertencentes ao grupo das auxinas (Biswas *et al.*, 2000; Erum e Bano, 2008), citocininas (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003) e giberelinas (Yanni *et al.*, 2001; Erum e Bano, 2008).

Entre as auxinas o ácido indol-acético (AIA) é o mais estudado e o mais produzido por bactérias (Radwan *et al.* 2005). O AIA atua principalmente na formação de raízes laterais e de pêlos radiculares que aumentam a absorção de nutrientes pela planta (Biswas *et al.*, 2000). Diferentes rotas metabólicas de biossíntese de AIA já foram identificadas em bactérias (Spaepen *et al.*, 2007), sendo que duas das principais rotas metabólicas já descritas para a produção de AIA dependem de triptofano. São elas a rota da indole-3-acetamida (IAM) e indole-3-piruvato (IpyA) (Lambrecht *et al.*, 2000). Osorio Filho (2009) inferiu que provavelmente a rota de biossíntese de AIA em rizóbios seja a rota do indole-3-acetonitrilo (IAN). No mesmo estudo, o autor inseriu o gene Gus nos rizóbios, e com a utilização destas bactérias marcadas, observou a sua capacidade de colonização de plantas de arroz, tanto no tecido radicular quanto nas folhas.

Teores de triptofano têm sido encontrados em exudados radiculares. Kravchenko *et al.* (2004) quantificaram a exudação de triptofano por raízes assépticas de tomate e rabanete.

Plântulas de tomate liberaram diariamente de 2,8 a 5,3 ng de triptofano por planta, enquanto que em rabanete a liberação diária de triptofano variou de 190 a 390 ng por planta.

Em experimento conduzido em câmara de crescimento, Silveira (2008) estudou o efeito da inoculação de cinco estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* quanto à capacidade de promover o crescimento de arroz, cultivar IAC103, em solução nutritiva. Quanto ao acúmulo de massa seca, as plantas inoculadas com as estirpes SEMIA235 e SEMIA250 foram superiores ao tratamento controle em mais de 100%.

Portanto, a avaliação da produção de AIA por rizóbio pode proporcionar uma base para selecionar isolados efetivos de solos da região.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de AIA por rizóbio nativos da Amazônia através de testes em sacos plásticos e papel filtro.

## **6.4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **6.4.1 Coleta de material**

Inicialmente foram obtidos nódulos coletados dos sistemas radiculares de leguminosas em solos de várzea e terra firme da região. Para a coleta dos nódulos foi usado a metodologia descrita por Hungria (1994) conforme locais descritos (Tabela 1, pág 29).

### **6.4.2 Isolamento dos nódulos**

Após a obtenção dos nódulos, foram isoladas as estirpes de rizóbios usando a metodologia descrita por Vincent (1970) e Somasegaran e Hoben (1985). Os nódulos foram lavados com etanol (90%; três minutos), seguindo uma desinfecção superficial com hipoclorito de sódio (cinco minutos) e dez lavagens com água estéril.

Em seguida os nódulos foram pressionados com uma pinça e feita as riscagens em placas de Petri contendo meio YMA (*yeast manitol agar*) (Vincent 1970) (Tabela 2, pág 31). Após o isolamento, as placas foram incubadas a 28°C até o crescimento de colônias de bactérias e então repicadas para novas placas contendo o mesmo meio e novamente incubadas até o novo crescimento bacteriano. Os isolados obtidos por último foram mantidos em tubos

de ensaios contendo o meio YMA inclinado, segundo descrito por Vincent (1970) e Somasegaran e Hoben (1985). Dos isolados mantidos em tubos de ensaio, foram utilizados os 70 melhores rizóbios selecionados em testes anteriores para os testes descritos abaixo.

#### **6.4.3 Produção de hormônio de crescimento através de isolados de rizóbios no sistema radicular do pepino**

A produção foi determinada através do crescimento das raízes em plantas de pepino (*Cucumis sativus*) através da metodologia descrita por Oliveira e Graham (1990). Para isso, as sementes foram previamente esterilizadas com álcool, hipoclorito de sódio e 10 lavagem com água esterelizada (Vincent, 1970), pré-germinadas em placa de Petri com algodão e foram assepticamente transplantadas para sacos de plástico de 1L contendo papel de filtro esterilizado e solução nutritiva. Cada saco plástico de 1 L continha 50 ml de solução nutritiva possuindo todos nutrientes com exceção do nitrogênio (modificada de Specht *et al.* 1956 e Smith *et al.* 1983, segundo Oliveira e Graham 1990) e 2 sementes pré-germinadas de pepino. Foi tomado cuidado para que as radículas estivessem em contato com o papel de filtro e, conseqüentemente, com a solução nutritiva. As inoculações com as estirpes de rizóbios foram realizadas 24 horas após o transplante das sementes pré-germinadas de pepino. A solução bacteriana foi preparada através de suspensões de células contendo  $10^7$  UFC/mL, inoculando-se 10 mL por saco plástico, sendo a padronização das concentrações de células foram feita através da contagem em câmara de Neubauer.

Após a inoculação com as estirpes foram feitas avaliações para a determinação do crescimento radicular através de medições do comprimento radicular utilizando-se paquímetro digital. Para isso foram feitas marcações (externamente, no saco plástico com pincel atômico) nos segmentos de raiz no momento da inoculação, usando a metodologia descrita por Bhuvanewari *et al.* (1980).

A avaliação do crescimento foi feita 24, 48 e 72 horas após a inoculação das estirpes nos saquinhos contendo as plantas da espécie citada.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 43 x 3 x 4 sendo cada tratamento representado pelas estirpes eficientes utilizadas e mais três tratamentos sendo representados por três doses diferentes do AIA comercial: 10, 25 e 50 mg, em três tempos diferentes bem como 24, 48 e 72h com quatro repetições cada, contendo duas

plantas de pepino por saco, totalizando 8 plantas por tratamento. O tratamento controle foi realizado sem a inoculação da estirpe. Foi aplicado o teste Scott-Knott a 5% de probabilidade usando o programa ASSISTAT.

## 6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os 71 isolados de rizóbios testados, apenas 38 (além das 3 doses de AIA comercial) apresentaram crescimento das raízes (Tabela 8), as outras tiveram valores zero e por isso não foram apresentadas. Dentre os 43 isolados, pôde-se observar que essas bactérias influenciaram no crescimento radicular das plantas de pepino por contribuírem com a produção de hormônios. Tais efeitos estão associados à capacidade destes e muitos outros microrganismos rizosféricos liberarem substâncias reguladoras do crescimento. Têm sido observadas alterações na densidade e no comprimento dos pelos radiculares, resultando no aumento da superfície do sistema radicular e permitindo melhor exploração dos nutrientes e água do solo (Gutiérrez Manero *et al.*, 1996; Solano *et al.*, 2008).

Comparando com o tratamento controle, onde as plantas não foram inoculadas com rizóbio, percebeu-se uma notável diferença no valor das médias de crescimento das raízes, visto que as maiores médias encontraram-se nos saquinhos plásticos que continham a inoculação da bactéria. Em relação ao tratamento controle com o tempo, o controle foi bom para todos os tempos, porém, em comparação com os outros isolados de rizóbios, eles se apresentaram com um rendimento muito baixo, ficando em último lugar na escala de crescimento. Mesmo com a inoculação do AIA comercial, foi possível verificar que na dosagem de 10 e 50 mg mesmo sendo bom nos 3 tempos (24h, 48h e 72h) não diferiram entre si nem entre o tratamento controle. Somente a dosagem de 25 mg de AIA no tempo de 24h demonstrou diferença entre as médias mas mesmo assim, muito inferior aquelas inoculadas com os isolados de rizóbios (Tabela 8). Isso pode estar ligado ao fato de que esse estímulo é dependente da dosagem do hormônio, pois o excesso dele pode retardar ou até inibir o crescimento do vegetal (Ahmad *et al.*, 2005).

O isolado de rizóbio com o maior destaque foi INPA R670, pois foi o que melhor se apresentou dentre os outros isolados no tempo de 24h, porém, no tempo de 48h e 72h ele já teve um decréscimo e suas raízes já obtiveram pouco crescimento, demonstrando que o tempo influencia no crescimento das raízes e não somente os isolados de rizóbios. É notável e foi



demonstrado que com o passar das horas, as raízes cresciam cada vez mais lentamente (Tabela 8).

Mesmo assim, no tempo de 48h e 72h os melhores isolados de rizóbios continuaram sendo aqueles apresentados como bons no tempo de 24h. Outros isolados que tiveram bom crescimento depois do INPA 670 foram: INPA R674, INPA R676, INPA R677 (Tabela 8). Resultados semelhantes foram encontrados por Araujo et al. (2010) ao estudarem as respostas de inóculos de rizóbios em mudas de *Leucena* e feijão-cupi onde a matéria seca das raízes de ambas as espécies aumentou com a inoculação.

Os rizóbios da espécie *Bradyrhizobium japonicum* isolados de raízes de soja, *Azorhizobium caulinodans*, isolados de *Sesbania rostrata*, *Rhizobium* NGR234 de *Lablab purpureus*, *Sinorhizobium meliloti* de *Medicago sativa*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* Cn6, e *R. leguminosarum* bv. *Viceae* estirpe 30 de *Vicia faba* foram capazes de infectar e colonizar raízes de sorgo e/ou sectária (Matiru e Dakora, 2004). Baseados no fato deste diverso grupo de rizóbios isolados de diferentes gêneros de leguminosas serem capazes de colonizar estas duas gramíneas, os autores sugerem que a infecção de não leguminosas por rizóbios é provavelmente mais ocorrente na natureza do que se imagina.

Em relação a quantidade de raízes produzidas em cada planta de pepino, o isolado que teve a maior quantidade foi o INPA R670 (24), justamente o mesmo que apresentou maior número de crescimento radicular, seguido por INPA R676, INPA R628 e INPA R629 (22). Os únicos isolados que produziram raízes terciárias foram o INPA R670 e INPA R674 (Tabela 9). Isso pode sugerir que quanto maior a quantidade de raízes, melhor será a absorção dos nutrientes provenientes do solo, como relata Gutiérrez-Manero *et al.*, (1996) e Solano *et al.*, (2008) onde mostram que os efeitos da colonização dos rizóbios sobre a morfologia e fisiologia das raízes das plantas com as quais se associam são marcantes. Tem sido observadas alterações na densidade e no comprimento dos pelos radiculares, resultando no aumento da superfície do sistema radicular e permitindo melhor exploração dos nutrientes e água do solo.

A produção relativamente alta de AIA pelos isolados avaliados sugere o uso potencial desses rizóbios como promotores de crescimento radicular de espécies leguminosas e não leguminosas, conforme documentado por Ahmad et al. (2005) e Sottero et al. (2006).

**Tabela 8.** Crescimento radicular das plantas (mm/planta) de pepino em resposta à inoculação por isolados de rizóbios e 3 doses de AIA comercial<sup>1</sup>.

<b>Isolados</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>
controle	37,00 iA	22,75 cA	11,00 aA
10 mg AIA	27,00 iA	17,75 cA	9,50 aA
25 mg AIA	48,50 hA	25,00 cB	12,75 aB
50mg AIA	19,50 iA	11,25 cA	4,75 aA
INPA R565	118,25 fA	29,00 cB	11,00 aB
INPA R567	129,00 fA	46,25 cB	16,00 aC
INPA R568	115,00 fA	16,50 cB	6,25 aB
INPA R572	81,25 gA	0,00 cB	0,00 aB
INPA R573	171,00 eA	31,00 cB	12,75 aB
INPA R577	64,75 hA	23,50 cB	9,25 aB
INPA R579	107,75 fA	28,25 cB	10,50 aB
INPA R583	119,75 fA	18,00 cB	8,75 aB
INPA R589	197,25 eA	64,75 bB	24,75 aC
INPA R593	149,25 fA	31,50 cB	12,75 aB
INPA R597	114,75 fA	25,75 cB	8,00 aB
INPA R606	241,75 dA	57,50 bB	19,50 aC
INPA R607	171,25 eA	55,00 bB	16,75 aC
INPA R610	172,00 eA	63,75 bB	20,00 aC
INPA R611	203,75 eA	87,00 aB	26,50 aC
INPA R612	237,00 dA	83,00 aB	30,00 aC
INPA R614	235,25 dA	60,00 bB	25,00 aC
INPA R616	190,50 eA	65,00 bB	13,75 aC
INPA R622	240,75 dA	80,25 aB	25,25 aC
INPA R623	200,25 eA	59,25 bB	19,25 aC
INPA R626	243,25 dA	76,75 aB	34,00 aC
INPA R628	262,75 cA	73,75 bB	30,75 aC
INPA R629	245,50 dA	78,50 aB	41,50 aC
INPA R630	279,75 cA	61,25 bB	20,75 aC
INPA R631	222,75 dA	62,75 bB	26,50 aC
INPA R632	182,50 eA	83,00 aB	31,75 aC
INPA R633	257,00 dA	54,00 bB	26,00 aB
INPA R634	220,25 dA	82,50 aB	17,75 aC
INPA R636	223,00 dA	73,75 bB	22,50 aC
INPA R642	190,00 eA	88,25 aB	30,50 aC
INPA R653	272,25 cA	69,00 bB	27,00 aC
INPA R656	271,50 cA	81,50 aB	24,50 aC
INPA R660	238,50 dA	65,25 bB	20,75 aC
INPA R666	229,50 dA	50,25 bB	10,50 aC
INPA R670	366,25 aA	103,00 aB	37,00 aC
INPA R674	325,75 bA	103,50 aB	46,50 aC
INPA R676	332,00 bA	76,00 aB	30,50 aC
INPA R677	340,25 bA	109,50 aB	54,00 aC

1 - As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade).

**Tabela 9.** Quantidade das raízes crescidas em plantas de pepino em resposta à inoculação por isolados de rizóbios e 3 doses de AIA comercial.

<b>Isolados</b>	<b>raízes primárias</b>	<b>raízes secundárias</b>	<b>raízes terciárias</b>	<b>Total</b>
Controle	4	3	0	7
10 mg AIA	5	4	0	10
25 mg AIA	5	7	0	13
50mg AIA	5	9	0	15
INPA R565	4	8	0	12
INPA R567	0	0	0	0
INPA R568	4	9	0	13
INPA R572	4	10	0	14
INPA R573	4	11	0	15
INPA R577	4	9	0	13
INPA R579	4	10	0	14
INPA R583	5	9	0	14
INPA R589	4	10	0	14
INPA R593	0	0	0	0
INPA R597	2	4	0	6
INPA R606	3	6	0	9
INPA R607	3	5	0	8
INPA R610	3	7	0	10
INPA R611	4	4	0	8
INPA R612	4	6	0	10
INPA R614	0	0	0	0
INPA R616	3	5	0	8
INPA R622	0	0	0	0
INPA R623	5	16	0	21
INPA R626	7	10	0	17
INPA R628	0	0	0	0
INPA R629	8	14	0	22
INPA R630	7	15	0	22
INPA R631	0	0	0	0
INPA R632	6	13	0	19
INPA R633	5	15	0	20
INPA R634	4	12	0	16
INPA R636	0	0	0	0
INPA R642	4	7	0	11
INPA R653	0	0	0	0
INPA R656	0	0	0	0
INPA R660	5	5	0	10
INPA R666	2	4	0	6

INPA R670	7	16	1	24
INPA R674	6	14	1	21
INPA R676	7	15	0	22
INPA R677	6	14	0	20

## 6.6 CONCLUSÕES

- 1) De 71 isolados de rizóbios avaliados, 38 induziram taxas de crescimento radicular das plantas de pepino maiores do que nas plantas não inoculadas com os mesmos, indicando o efeito positivo da produção de AIA nas plantas;
- 2) O tempo pode afetar no crescimento das raízes inoculadas com rizóbios;
- 3) O melhor isolado de rizóbio dentre os 43 foi o INPA R670 no tempo de 24h de inoculação;
- 4) A produção do AIA pelos isolados avaliados sugere o uso potencial desses rizóbios como promotores de crescimento radicular de espécies de plantas.

## 7. REFERÊNCIAS

- Ab-dalla, M.H., 1994. Solubilization of rock phosphates by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *Folia Microbiologica*, 39: 53-56.
- Alfaia, S. S.; Oliveira, L.A., 1997. Pedologia e fertilidade dos solos da Amazônia, p. 179-191. In: *Dois décadas de contribuições do INPA à Pesquisa Agrônoma no trópico úmido*. Manaus: INPA.
- Ahmad F, Ahmad I, Khan M.S., 2005. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turk J Biol* 29: 29–34.
- Ambrosano, E.J.; Muraoka, T.; Ambrosano, G.M.B.; Trivelin, P.C.; Wutke, E.B.; Tamiso, L.G., 2000. O papel das leguminosas para adubação verde em sistemas orgânicos. In: *Curso regional de agricultura orgânica/adubação verde para agricultura orgânica*. Piracicaba, São Paulo.
- Andrade, D.S.; Murphy, P.J.; Giller, K.E., 2002. Effects of liming and legume/cereal cropping on populations of indigenous rhizobia in an acid Brazilian Oxisol. *Soil Biology e Biochemistry*, 34:477-485.
- Andreola, F.; Fernandes, S. A. P., 2007. A microbiota do solo na agricultura orgânica e no manejo de culturas, p. 21-37. In: Silveira, A. P. D. da; Freitas, S. S. (Eds.). *Microbiota do solo e qualidade ambiental*. Instituto Agrônomo, Campinas, São Paulo.
- Antoun, H.; Beauchamp, C.J.; Goussard, N.; Chabot, R.; Lalande, R., 1998. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effects on radishes (*Rhaphanus sativus* L.). *Plant Soil*, 204: 57-67.
- Antunes, J.E.L., 2010. *Diversidade genética e eficiência simbiótica de isolados de rizóbios nativos em feijão-fava (Phaseolus lunatus L.)*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí. 108pp.
- Araújo, R.S.; Hungria, M. Introdução, p.151-194. 1994. In: Ricardo, S.A.; Mariangela, H. (Eds.). *Microorganismos de importância agrícola*. Brasília: Embrapa-CNPAP (Documentos, 44).
- Araújo, A. S. F. I; Carneiro, R. F. V.; Bezerra, A. A. C.; Araújo, F. F., 2010. Coinoculação rizóbio e *Bacillus subtilis* em feijão-caupi e leucena: efeito sobre a nodulação, a fixação de N<sub>2</sub> e o crescimento das plantas. *Ciência Rural*, vol. 40, núm. 1.
- Bano, N.; Musarrat, J., 2003. *Isolation and characterization of phorate degrading soil bacteria of environmental and agronomic significance*. *Letters Appl. Microbiol.*, 36:349-353
- Barberi, A.; Moreira, F.M.S.; Florentino, L.A.; Rodrigues, M.I.D., 2004. Crescimento de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe BR 29 em meios de cultivo com diferentes valores de pH inicial. *Ciência e Agrotecnologia*, 28:397-405.

- Barroso, C.B.; Nahas, E., 2008. Solubilização de fosfato de ferro em meio de cultura. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43: 529-535.
- Beddington, J., 2010. *Food security: contributions from science to a new and greener revolution*. Philos. Trans. R. Soc. B 365, 61–71
- Belimov, A. et al., 2001. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 47, p. 642-652.
- Berraquero, F.R.; Baya, A.M.; Cormenzana, A.R., 1976. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. *Ars. Farmacéutica*, 17: 399-406.
- Bertan, I.; Carvalho, F.I.F.; Oliveira, A.C.; Oliveira, P.H.; Silva, J.A.G.; Benin, G.; Silva, G.O.; Hartwig, I.; Padilha, E.B., 2005. Caracteres associados à tolerância ao alumínio tóxico em genótipos de trigos sul brasileiros. *Revista Brasileira de Agrociência*, Pelotas, v.11, n.2, p.149-154.
- Biswas, C. et al. 2000a. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of Lowland rice. *Soil Scientific Society American*, 64: 1644-1650.
- Biswas, J. C. et al., 2000. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. *Agronomy Journal*, Madison, v. 92, p. 880–886.
- Biswas, J.C.; Ladha, J.K.; Dazzo, F.B.; Yanni, Y.G.; Rolfe, B.G. 2000b. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. *Agronomy Journal*, 92:880-886.
- Bhuvanewari, T.V.; Turgeon, B.G.; Bauer, W.D. 1980. Early events in the infection of soybean (*Glycine Max* L. Merr.) by *Rhizobium japonicum*. I. Localization of infectible root cells. *Plant Physiol.*, 60:1027-1032.
- Blamey, F.P.C.; Edwards, D.G.; Asher, C.J., 1983. Effects of aluminum, OH:Al and P:Al molar ratios and ionic strength on soybean root elongation in solution culture. *Soil Science*, Philadelphia, n.136, p.197-207.
- Bohnen, H. Acidez e calagem. In: Gianello, C., Bissani, C.A.; Tedesco, M.J. (eds) *Princípios de fertilidade de solo*. Porto Alegre: Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia, UFRGS, 1995. p.51-76.
- Bonetti, R.; Oliveira, L. A.; Costa, S. S., 1984. Eficiência de populações de *Rhizobium* sp. Phaseoli em alguns solos do Estado de Rondônia. I. Áreas com atividades agrícolas p. 398-402. In: *Anais da XII Reunião Latino Americana Sobre Rhizobium*, Campinas, SP, Brasil.
- Borges, P. R. S.; Saboya, R. C. C.; Saboya, L. M. F.; Santos, E. R. Dos S.; Souza, S. E. A. 2012. Distribuição De Massa Seca E Rendimento De Feijão-Caupi Inoculadas Com Rizóbio Em Gurupi, To. *Revista Caatinga*. 25:37-44.
- Bothe H., Zimmer W., Kloos K., Kaldorf M. 1994. *Azospirillum* and related organisms: Ecological, physiological, biochemical and genetical aspects, p. 43-52. In: Hegazi N.A.,

- Fayez M., Monib M. (Eds.). *Nitrogen fixation with non-legumes*. The American University in Cairo Press.
- Brockwell, J.; Herridge, D.F.; Morfthorpe, L.J.; Roughley, 1998. Numerical effects of Rhizobium population on legume symbiosis. 1998. In: Beck, D.P.; Materon, L. (Eds.). *Nitrogen fixation Legumes in Mediterranean Agriculture*. Martinus, Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Brockwell, J.; Pilka, A.; Holliday, R.A. , 1991. Soil pH is a major determinant of the numbers of naturally-occurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soil of New South Wales. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, Victoria, v.31, n.2, p.211-219.
- Buchenauer, H.1998. Biological control of soilborne diseases by rhizobacteria. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 105: 329-348.
- Buckman, H.O.; Brady, N.C. 1976. *Natureza e Propriedades dos Solos: Compêndio Universitário Sobre Edafologia*. Rio de Janeiro. 594p.
- Bushby, H.V.A. , 1990. The role of bacterial surface charge in the ecology of root nodule bacteria: a hypothesis. *Soil Biology and Biochemistry*, United States, v.22, n.1, p.1-9.
- Campo, R.J.; Wood, M., 2001. Residual effects of successive exposure of soybean Bradyrhizobium strains to aluminum on solid defined medium. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36: 1399-1407.
- Castro, S.; Permigliani, M.; Vinocur, M.; Fabra, A., 1999. Nodulation in peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots in the presence of native and inoculated rhizobia strains. *Applied Soil Ecology*, 13: 39-49.
- Castro, E. M.; Pereira, F. J.; Paiva, R., 2009. *Histologia Vegetal: Estrutura e Função de Órgãos Vegetativos*. Lavras: UFLA. 234 p.
- Chabot, R.; Beauchamp, C.J.; Kloepper, J.W.; Antoun, H., 1998. Effect of phosphorus on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphatesolubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Soil Biology e Biochemistry*, 30:1615-1618.
- Chai, B.; Wu, Y.; Liu, P.; Liu, B.; Gao, M. 2011. Isolation and phosphatesolubilizing ability of a fungus, *Penicillium* sp. from soil of an alummine. *Journal of Basic Microbiology*. 51: 5-14.
- Chagas Jr, A.F., 2000. *Efeito da inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato na fisiologia de quatro espécies de plantas de importância econômica da Amazônia*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 96 pp.
- Chagas Jr, A.F., 2007. *Características agronômicas e ecológicas de rizóbios isolados de solos ácidos e de baixa fertilidade da amazônia*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 172pp.

- Chagas Jr, A.F.; Santos, R.G.; Melo, L.C.R.; Oliveira, G.A. Oliveira, G.A.; Vizioli, B.; Chagas, F.B.L.; Costa, L.J., 2012. Effect of natural nodulation in the development of leguminous trees on soils of cerrado in Tocantins. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*. 3: 38-44.
- Chagas Jr, A. F.; Oliveira, L. A., 2001. Tolerância de bactérias solubilizadoras de fosfato à acidez de alumínio. *Revista da Universidade Federal do Amazonas: Ciências Agrárias e Ambientais*, 1: 39-51.
- Chagas Jr, A.F.; Oliveira, L.A.; Oliveira, A.N., 2009. Produção de ácido indolacético por rizóbios isolados de caupi. *Revista Ceres*. 56: 812-7.
- Chagas Jr, A.F.; Oliveira, L.A.; Oliveira, N.A., 2010a. Caracterização fenotípica de rizóbio nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. *Acta Scientiarum Agronomy*. 32: 161-169.
- Chagas Jr, A.F.; Oliveira, L.A.; Oliveira, N.A; Willerding, A.L., 2010b. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. *Acta Scientiarum Agronomy*. 32:359-366.
- Chagas Jr, A. F. ; Rahmeier, W. ; Santos, G. R. ; Chagas, L. F. B., 2010c . Eficiência Agronômica De Estirpes De Rizóbio Inoculadas Em Feijão-Caupi No Cerrado, Gurupi-To. *Revista Ciência Agronômica*. 41: 709-714.
- Chem W.M., Moulin L., Bontemps C., Vandamme P., Bena G., Boivin-Masson C., 2003. Legume symbiotic nitrogen fixation by Proteobacteria is widespread in nature. *Journal of Bacteriology*, 185: 7266–7272.
- Chen, H.; Richardson, A.E.; Rolfe, B.G., 1993. Studies of the physiological and genetic basis of acid tolerance in *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:1798-1804.
- Chen, W.X.; Yan, G.H.; Li, J.L., 1998. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45: 393-397.
- Chin-A-Woeng, T. F. C., de Priester, W., van der Brij, A., Lugtenberg, B. J. J., 1997. Description of the colonization of a gnotobiotic tomato rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain WCS365, using scanning electron microscopy. *The American Phytopathological Society*, 10: 79-86.
- Chouddhury, A.T.M.A.; Kennedy, I.R., 2004. Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustainable rice production. *Biology and Fertility of Soils*, 39: 219-227.
- Chabot R, Antoun H e Cescas M.P., 1993. *Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique*. *Can J Microbiol* 39, 941–7.



- Cline, G.R. 1991. Investigating effects of acidic soils on symbiotic nitrogen fixation. *Trivandrum. Trends in Soil Science*, 1:185-201.
- Coatti, G. C. ; Andrade, D. S. ; Cardoso, J. D. ; Matos, M. A. 2010. Produção de AIA e Diversidade Fenotípica de Estirpes Elite de Rizóbio Isoladas de Feijoeiro. *Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde*. 12: 49 -53.
- Cochrane, T. T.; Sanchez, L.G.; Azevedo, L.G.; Porras, J. A. e Garver, C.L. 1985. Land in Tropical America. CIAT-EMBRAPA- CPAC. 3, 3: 16-18.
- Contreras, A.R.; Dorantes, A.R.; Villafán, S.M.; Jiménez, S.P.; Tovar, A.R.; Zúñiga, L.A.G. 2010. Evaluación de la promoción del crecimiento de *Cynodon dactylon* L. por rizobacterias productoras de fitohormonas aisladas de um suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo. *Polibotánica*. 29: 131-147.
- Cook, R. J. 1986. Plant health and the sustainability of agriculture, with special reference to disease control by beneficial microorganisms. *Biology, Agriculture and Horticulture*, 3:211-232.
- Correa, O.S.; Barneix, A.J. 1997. Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*. *World J. Microbiology and Biotechnology*, 13:153-157.
- Costa, E.M.; Nóbrega, R.S.A.; Martins, L.V.; Amaral, F. H. C.; Moreira, F. M. S. 2011. Nodulação e produtividade de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. por cepas de rizóbio em Bom Jesus, PI. *Revista Ciência Agronômica*. 42:1-7.
- Coutinho, H.L.C., 2003. Biodiversidade: perspectivas e oportunidades biotecnológicas. (<http://www.bdtfat.org.br/publicações/padct/bio/cap9/1/>) Acesso em Novembro de 2011.
- Cunningham, J.E.; Kuiack, C., 1992. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphates by *Penicillium bilaii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58:1451-1458.
- Deacon, J. 2005. The microbial world: biological control: *Bacillus popilliae* ([www.biology.ed.ac.uk/research/groups/jdeacon/microbes/control](http://www.biology.ed.ac.uk/research/groups/jdeacon/microbes/control)). Acesso 10/11/2011.
- Dilworth, M.J.; Rynne, F.G.; Castelli; Vivas-Marfisi, A.I.; Glenn, A.R., 1999. Survival and exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti* WSM419 are affected by calcium and low pH. *Microbiology*, Reading, 145(7):1585-1593.
- Dobbelaere, S.; Vanderleyden, J.; Okon, Y., 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.22, p.107-149.
- Döbereiner, J.1997. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. *Soil Biology e Biochemistry*, 29: 771-774.
- Döbereiner, J.; Andrade, V. O. de; Alcantara, I. 1999. *Protocolo da Embrapa Agrobiologia para a produção de inoculantes para leguminosas*. Seropédica: Embrapa (Embrapa-CNPAB Documentos, 97).

Dreyfus, B.; Garcia, J.L.; Gillis, M., 1998. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38: 89-98.

Dupuy, N.C.; Dreyfus, B.L. 1992. Bradyrhizobium populations occur in deep soil under the leguminous tree *Acacia albida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 2415-2419.

Erum, E.; Bano, A., 2008. Variation in phytohormone production in *Rhizobium* strains at different altitudes of north areas of Pakistan. *International Journal of Agriculture and Biology*, Faisalabad, v. 10, p. 536-540.

Fernandes, S.A.P., 1995. *Avaliação de parâmetros químicos e biológicos em diferentes sistemas de manejo do solo*. Dissertação de Mestrado, Esalq/Universidade de São Paulo, Piracicaba, 98pp.

Ferreira, A.C.B.; Araújo, G.A.; Cardoso, A.A.; Fontes, P.C.R.; Vireira, C., 2003. Diagnose do estado nutricional molibdic do feijoeiro em razão do molibdênio contido na semente e sua aplicação foliar. *Revista Brasileira de Agrociência*, 9: 397-401.

Freire Filho, F.R.; Lima, J.A.A.; Ribeiro, V.Q., 2005. *Feijão-caupi: avanços tecnológicos*. Embrapa Informação Tecnológica, 519 pp.

Freire, J.R.J., 1992. Fixação do nitrogênio pela simbiose rizóbio/leguminosas, p 121-140. In: Cardoso, E.J.N., Tsai, S.N.M., Neves, M.C (Eds). *Microbiologia do solo*. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, São Paulo.

Fleming, W.E., 1968. *Biological control of the Japanese beetle*. U.S. Dept. Agric. Techn. Bull., U.S. Department of Agriculture, Washington, DC, USA 1383pp.

Flis, S. E.; Glen, A R.; Dilworth, M. J., 1993. The interaction between structure: gene cloning and sequencing p. 348-389. In: John Wiley e Sons Inc (Eds). *Principles of Genetics*. New York, USA.

Garcia C, Fernandez T, Costa F, Cerranti B e Masciandaro G.,1992. Kinetics of phosphatase activity in organic wastes. *Soil Biol Biochem* 25, 361-365.

Gerahty, N.; Caetano-Anolles, G.; Joshi, P.A.; Gresshoff, P.M., 1992. Anatomical analysis of nodule development in soybean reveals an additional autoregulatory control point. *Plant Science*, 58: 1-7.

Gemell, L.G.; Roughley, R.J., 1993. Field evaluation in acid soils of strains of *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* selected for their tolerance or sensitivity to acid soil factors in agar medium. *Soil Biol. Biochem.*, Oxford, 25(10):1447-1452.

Giller, K.E.; Wilson, K.J., 1993 *Nitrogen fixation in tropical cropping systems*. CAB International, Wallingford. 313p.

Glawischnig, E.; Tomas, A.; Eisenreich, W.; Spiteller, P; Bacher, A.; Gierl, A., 2000. Auxin biosynthesis in maize kernels. *Plant Physiology*, 123: 1109–1119.

Goldstein, A. H., 1896. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. *Am. J. Ahern. Agri.*, 1: 51- 57.

Goedert, W.J.; Lobato, E.; Lourenço, S., 1997. Nutrient use efficiency in Brazilian acid soils: Nutrient management and plant efficiency. *In: Moniz et al. (Eds.). Plant-Soil Interactions at Low pH*. Brazilian Soil Science Society. p. 97-104.

Gordon, S.A.; Weber, R.P., 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology*, 26:192-195.

Goodson, M.; Rowbury, R.J., 1989. Resistance of acid-habituation *Escherichia coli* to organic acids and its medical and applied significance. *Letters Appl. Microbiol.*, Oxford, 8(6):211-214.

Götz, M., Gomes, N.C., Dratwinski, A., Costa, R., Berg, G., Peixoto, R., Mendonça-Hagler, L., Smalla, K., 2005. Survival of gfp-tagged antagonistic bacteria in the rizosphere of tomato plants and their effects on the indigenous bacterial community. *FEMS Microbiology Ecology*, 56: 207-218.

Graham, P.H.; Draeger, K.J.; Ferrey, M.L.; Conray, M.J.; Hammer, B.E.; Martinez, E.; Aarons, S.R.; Quintino, C., 1994. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR 1899. *Can. J. Microbiol.*, 40:198-207.

Graham, P.H., 1992. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Canadian Journal of Microbiology* 38:485-492.

Grange, L.; Hungria, M., 2004. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. *Soil Biology e Biochemistry*, 36: 1389-1398.

Gravel, V.; Antoun, H.; Tweddel, R.J., 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology e Biochemistry*, 39: 1968–1977.

Gualter, R.M.R.; Boddey, R.M.; Rumjanek, N.G.; Freitas, A.C.R. De; Xavier, G.R., 2011. Eficiência agrônômica de estirpes de rizóbio em feijão-caupi cultivado na região da Pré-Amazônia maranhense. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 46: 303-308.

Gutiérrez-Manero FJ, Acero N, Lucas JA, Probanza A., 1996. The influence of native rhizobacteria on European alder growth. Characterization and biological assay of metabolites produced by growth promoting and growth inhibiting bacterial. *Plant Soil* 182: 67–74.

Gyaneshwar, P.; Kumar, G.N.; Parekh, L.J.; Poole, P.S., 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plant. *Plant and Soil*, 245:83-93.

Gyaneshwar, P.; Naresh Kumar, G.; Parekh, L.J., 1998. Effect of buffering on the phosphatesolubilizing ability of micro-organisms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14:669-673.

- Hafeez, F.Y.; Safdar, M.E.; Chaudhry, A.U.; Malik, K.A., 2004. Rhizobial inoculation improves seedling emergence, nutrient uptake and growth of cotton. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 44:617-622.
- Halder, A.K.; Chakrabartty, P.K., 1993. Solubilization of inorganic-phosphate by rhizobium. *Folia Microbiologica*, 38(4):325-330.
- Halder, A.K.; Mishra, A.K.; Bhattacharyya, P.; Chakrabartty, P.K., 1990. Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 36:81-92.
- Hallmann, J.; Quadt-Hallmann, A.; Mahaffee, W. F.; Kloepper, J. W., 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43: 895-914.
- Halder, A.K.; Chakrabartty, P.K., 1993. Solubilization of inorganic-phosphate by rhizobium. *Folia Microbiologica*, 38: 325-330.
- Hameed, S.; Yasmin, S.; Malik, K.A.; Zafar, Y.; Hafeez, F.Y., 2004. Rhizobium, Bradyrhizobium and Agrobacterium strain isolated from cultivated legumes. *Biology and Fertility of Soils*, 39:179-185.
- Hara, F.A.S., 2003. *Ecologia de Rizóbia em condições ácidas e de baixa fertilidade aa Amazônia*. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 154pp.
- Hara, F.A.S.; Oliveira, L.A., 2004. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. *Acta Amazônica*, 34:343-357.
- Hara, F.A.S.; Oliveira, L.A., 2005. Características fisiológicas e ecológicas de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40: 667-672.
- Hara, F.A.S.; Oliveira, L.A., de, 2007. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbio oriundos de solo ácido do município do Rio Preto da Eva. Amazonas. *Revista de Ciências Agrárias* (Belém), v. 48, p. 55-72.
- Hayward, A., C., 1994. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria, p.123-135. In: Hayward, A.C.; Hartman, G.,L. (Eds). *Bacterial Wilt. The disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. Cab. International, Wallingford, U.K.
- Holford I.C.R., 1997. *Soil phosphorus, its measurements and its uptake by plants*. Austr J Soil Res 35, 227-239.
- Holtz, G.P.; Sá, J.C., 1995. Resíduos culturais: reciclagem de nutrientes e impacto na fertilidade do solo. In: *Curso sobre manejo do solo no sistema de plantio direto*. Anais. Fundação ABC, Castro, Paraná.
- Howieson, J.G.; Robson, A.D.; Abbott, L.K., 1992. Acid tolerant species of *Medicago* produce root exudates at low pH which induce the expression of nodulation genes in *Rhizobium meliloti*. *Aust. J. Plant Physiol.*, Murdoch, 19(3):287-296.

Hume, D.J.; Blair, D.H., 1992. Effect of number of Bradyrhizobium japonicum applied in commercial inoculants on soybean seed yield in Ontario. *Canadian Journal of Microbiology*, 38: 588-593.

Hungria, M.; Araújo, R. S., 1994. *Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola*. CNPSo, CNPAF. EMBRAPA/ SPI. (EMBRAPA-CNPAF, Documento, 46), Brasília. 542p

Hungria, M.; Vargas, M.A.T.; Araújo, R.S., 1997. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro, p. 187-294. In: Vargas, M.A.T.; Hungria, M., (eds). *Biologia dos Solos do Cerrado*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC.

Hungria, M.; Vargas, M.A.T.; Andrade, D.S.; Campo, R.J.; Chueire, L.M.O.; Ferreira, M.C.; Mendes, I.C., 1999. Fixação biológica do nitrogênio em leguminosas de grãos, p. 597-620. In: Siqueira, J.O.; Moreira, F.M.S.; Lopes, A.S.; Guilherme, L.R.G.; Faquin, V.; Furtin Neto, A.E.; Carvalho, G.G. (Eds.). *Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas*. SBCS/UFLA/DCS, Lavras, MG.

Hungria, M.; Vargas, M. A. T., 2000. Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research*, 65: 151-164.

Hungria, M.; Chueire, L.M.O.; Coca, R.G.; Megías, M., 2001a. Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brazil. *Soil Biol. Biochem.*, 33:1349-1361.

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

Igual, J. M.; Rodriguez-Barrueco, C.; Cervantes, E., 1997. The effects of aluminum on nodulation and symbiotic nitrogen fixation in Casuarina cunninghamiana Miq. *Plant and Soil*, 190: 41- 46.

Igual, J.M.; Valverde, A.; Cervantes, E.; Velázquez, E., 2001. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. *Agronomie*, 21:561-568.

Illmer, P.; Barbato, A.; Schinner, F., 1995. Solubilization of hardly-soluble AlPO<sub>4</sub> with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biology e Biochemistry*, 27: 265-270.

Isherwood, K.F., 2000. *Mineral Fertilizer Use and the Environment*. International Fertilizer Industry Association, United Nations Environment Programme, Paris.

Jensen, J.B.; Egsgaard, H.; Onckelen, H.V.; Jochimsen, B.U., 1995. Catabolism of Indole-3-Acetic Acid and 4- and 5-Chloroindole-3-Acetic Acid in Bradyrhizobium japonicum. *Journal of Bacteriology*, 177: 5762-5766.

Jesus, E.C.; Moreira, F.M.S.; Florentino, L.A.; Rodrigues, M.I.D.; Oliveira, M.S., 2005. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. *Pesquisa. Agropecuária. Brasileira*, 40:769-775.

- Johnson, A. C.; Wood, M., 1990. DNA, a possible site of aluminium toxicity in Rhizobium. *Appl. Environmental Microbiology*, 56: 3629-3633.
- Jones D.L., 1998. *Organic acids in the rhizosphere – a critical review*. *Plant Soil* 205, 25-44.
- Jordan, D.C. 1984. Rhizobiaceae Conn, p.235-244. In: Krieg, N.R.; Holt, J.G. (Eds.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams e Wilkins 1984, London.
- Kahindi, J.H.P.; Woomeer, P.; George, T.; Moreira, F.M.S.; Karanja, N.K.; Giller, K.E., 1997. Agricultural intensification, soil biodiversity and ecosystem function in the tropics: the role of nitrogen-fixing bacteria. *Applied Soil Ecology*, 6: 55-76.
- Kawai, F.; Zhang, D.; Sugimoto, M., 2000. Isolation and characterization of acid and Al-tolerant microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 189: 143-147.
- Keltjens, W.G., 1997. Plant adaptation and tolerance to acid soils; it's possible Al avoidance – A review, p. 109-117. In: Moniz, A.C (Ed). *Plant-Soil Interactions at low pH: sustainable agriculture and forestry production*. Brazilian Soil Science Society, Viçosa, MG.
- Kerbauy, G.B., 2008. *Fisiologia Vegetal*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 452pp.
- Kieffer, M.; Neve, J.; Kepinski, S., 2010. Defining auxin response contexts in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*. 13: 12-20.
- Kim, K.Y.; McDonald, G.A.; Jordan, D., 1999. Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *E. coli* in culture medium. *Biol. Fert. Soil*, 24:347-352.
- Kim, K.Y.; Jordan, D.; McDonald, G.A., 1998. *Enterobacter agglomerans*, phosphate solubilizing bacteria and microbial activity in soil: Effect of carbon sources. *Soil Biol. Biochem.*, 30:995- 1003.
- Kloepper JW, Lifshitz R e Zablutowicz R.M., 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol* 7, 39-43.
- Kochar, M.; Srivastava, S., 2011. Surface colonization by *Azospirillum brasilense* SM in the indole-3-acetic acid dependent growth improvement of sorghum. *Journal of Basic Microbiology*. 51: n/a. doi: 10.1002/jobm.201100038.
- Kpémova, K.; Boher, B.; Nicole, M.; Calatayud, P.; Geiger, J.P. 1996. Cytochemistry of defense responses in cassava infected by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *Can. Journal of Microbiology*, 42:1131-1143.
- Kravchenko, L. V. et al., 2004. The effect of tryptophan present in plant root exudates on phytostimulating activity of rhizobacteria. *MAIK Nauka/Interperiodica - Microbiology*, Moscow, v. 73, p. 156-158.
- Kuklinsky-Sobral, J.; Araújo, W.L.; Mendes, R.; Geraldi, I.O.; Pizzirani-Kleiner, A.A.; Azevedo, J.L., 2004. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental Microbiology*, 6:1244-1251.

Lajudie, P.; Laurente-Fulele, E.; Willems, A.; Torck, U.; Coopman, R.; Collins, M.D.; Kersters, K.; Dreyfus, B.; Gillis, M., 1998. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixation bacteria nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 58: 1277-1290.

Lajudie, P. ; Lortet, G.; Neyra, M.; Badji, S.; Ndoye, I.; Boivin, C.; Gillis, M.; Dreyfus, B., 1992. Etude taxonomique des *Rhizobium* sp. d'Acacia et des *Sesbania*. *Interactions Plantes Microorganismes*, p.238-245. IFS/ORSTOM.

Lajudie, P.; Willems, A.; Pot, B.; Dewettinck D.; Maestrojuan, G.; Neyra, M.; Collins, M.D.; Dreyfus, B.; Kersters, K.; Gillis, M., 1994. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. Nov., *Sinorhizobium sahari* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *International Journal of Bacteriology*, 44: 715-733.

Lal, R., 1993. The role of no-till farming in sustainable agriculture in tropics, p. 29-62. Encontro latino americano sobre plantio direto na pequena propriedade. Anais... IAPAR, Ponto Grosso.

Lambrecht, M. et al., 2000. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends in Microbiology*, Cambridge, v. 8, p. 298- 300.

Lewis, G.P.; Schrire, B.; Machinder, B. e Lock, M., 2005. *Legumes of the World*. Surrey, Royal Botanic Gardens.

Lima, A.S.; Pereira, J.P.A.R.; Moreira, F.M.S., 2005. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. de solos da Amazônia. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40: 1095-1104.

Lindström, K.; Van Berkum, P.; Gillis, M.; Martínez, E.; Novikova, N.; Jarvis, B. 1995. Report from the roundtable on *Rhizobium* taxonomy, p. 807- 810. In: Tikhonovich, I.A.; Provorov, N.A.; Romanov, V.I.; Newton, W.E (Eds.) *Nitrogen fixation: fundamentals and applications*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Lum, M.R.; Hirsch, A.M., 2003. Rots and their symbiotic microbes: Strategies to obtain nitrogen and phosphorus in a nutrientlimiting environment. *Journal of Plant Growth Regulation*, 21:368-382.

Lynch, J.P., 2007. *Turner review no. Roots of the second green revolution*. Aust. J. Bot. 55, 493–512. Taiz, L e Zeiger, E. (2004). *Fisiologia Vegetal*. 3ª edição. Porto Alegre: Artmed. 559p.

Kravchenko, L. V. et al. The effect of tryptophan present in plant root exudates on phytostimulating activity of rhizobacteria. *MAIK Nauka/Interperiodica - Microbiology*, Moscow, v. 73, p. 156-158, 2004.

Malavolta, E., 1989. *ABC da Adubação*. Agronômica Ceres, São Paulo. 292pp.

- Mikanová, O.; Nováková, J. 2002. *Evaluation of the P-solubilizing activity of soil microorganisms and its sensitivity to soluble phosphate*. *Rostlinná Výroba*, 48(9):397-400.
- Mariano, R. L. R et al. 2000. Biocontrole de doenças de plantas, p 78-111 . In: Torres, J. B.; Michereff, S. J. (Eds.). *Desafios do manejo integrado de pragas e doenças*. UFRPE, Recife.
- Marin, V.A.; Baldani, V.L.D.; Teixeira, K.R.S.; Baldani, J.I., 1999. Fixação Biológica de Nitrogênio: Bactérias Fixadoras de Nitrogênio de Importância para a Agricultura Tropical. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 91). 34pp.
- Marra, L., M. et al. , 2012. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 357, p. 289-307.
- Martínez-Romero, E., 1994. Recent developments in Rhizobium taxonomy. *Plant and Soil*, 161:11-20.
- Martins, L.M.V., 1996. *Características ecológicas e fisiológicas de caupi (Vigna unguiculata) isoladas a partir de solos da região Nordeste do Brasil*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, Rio de Janeiro. 214pp.
- Martins, L. M. V.; Rangel, F. W.; Xavier, G. R.; Ribeiro, J. R. A.; Morgado, L. B.; Neves, M. C. P.; Rumjanek, N. G. 2003. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. *Biology and Fertility of Soils*, 38: 333-339.
- Martins, L.M.V.; Xavier, G.R.; Neves, M.C.P.; Rumjanek, N.G., 1997. *Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de "rizóbio"*. Seropédica. Embrapa Agrobiologia. (Embrapa-CNPAB. Comunicado Técnico no 19). 14pp.
- Marschner, H.; Dell, B. , 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil*, Dordrecht, v.159, p.89-102.
- Mathesius, U., 2003. Conservation and divergence of signalling pathways between roots and soil microbes: the Rhizobium-legume symbiosis compared to the development of lateral roots, mycorrhizal interactions and nematode-induced galls. *Plant Soil*, 255:105–119.
- Matiru, V. N.; Dakora, F. D. , 2004. Potencial use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. *African Journal of Biotechnology*, Nairobi, v. 3, p. 1-7.
- Mello, R.B.; Faria, S.M. 1998. *Compatibilidade de bactérias fixadoras de nitrogênio, rizóbio, com espécies da família leguminosae*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 3p. (Comunicado Técnico, N° 27).
- Melo, S.R.; Zilli, J.E. 2009. Fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijão-caupi recomendadas para o estado de Roraima. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44:1177-1183.
- Melloni, R.; Moreira, F.M. de S.; Nóbrega, R.S.A.; Siqueira, J.O. De., 2006. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata*(L.)



- Walp] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 30: 235-246.
- Michalczuk, L.; Ribnicky, D.M.; Cooke, T.J.; Cohen, J.D., 1992. Regulation of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in carrot cell cultures. *Plant Physiol*, 100: 1346–1353.
- Mikanová, O.; Kubat, J.; Vorisek, K.; Randova, D., 1995. The capacity of the strains rhizobiumleguminosarum to make phosphorus available. *Rostlinná Výroba*, 41:423-425.
- Mikanová, O.; Kubat, J., 1999. Pratical use of P-solubilization activity of Rhizobium species strains. *Rostlinná Výroba*, 45:407-409.
- Mikanova, O., 2000. *Study of the P-solubilizing microorganisms and their utilization for improving plant nutrition. Dissertation Thesis, Czech Univerzity of Agriculture Prague/Faculty of Agronomy, Prague.* p.1-13.
- Mikanová, O.; Nováková, J., 2002. Evaluation of the P-solubilizing activity of soil microorganisms and its sensitivity to soluble phosphate. *Rostlinná Výroba*, 48:397-400.
- Mohamed, S.H., Smouni, A., Neyra, M., Kharachaf, D., Filali-maltouf, A., 2000. Phenotypic characteristics of root- nodulating bacteria isolated from Acacia spp, grown in Libya. *Plant and Soil*, 224: 171-183.
- Moreira, F. M. de., 1991. *Caracterização de estirpe de rizóbio isoladas de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de divergência de Leguminosae introduzidas ou nativas da Amazônia e Mata Atlântica.* Tese de Doutorado, UFRRJ, Seropédica, RJ. 156 pp.
- Moreira, F. M. S., 2008. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam Leguminosae. In: Moreira, F. M. S.; Siqueira, J.O.; Brussard, L. *Biodiversidade do Solo em Ecossistemas Brasileiros.* Lavras, MG.
- Moreira, F.M.S.; Siqueira, J.O., 2002. *Microbiologia e bioquímica do solo.* UFLA, Lavras, MG. 626pp.
- Moreira, F.M.S.; Siqueira, J.O., 2006. *Microbiologia e bioquímica do solo.* UFLA, Lavras, Mg. 488pp.
- Mostasso, L.; Mostasso, F., L.; Vargas, M., A., T.; Hungria, M., 2002. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. *Field Crops Research*, 73: 121–132.
- Muglia, C.I.; Grasso, D.H., Aguilar, O.M., 2007. *Rhizobium tropici* response to acidity involves activation of glutathione synthesis. *Microbiology*, United Kingdom, n.153, p.1286-1296.
- Mukherjee, S.K.; Asanuma, S. 1998. Posible role of celular phosphate pool and subsequent accumulation of inorganic phosphate on the aluminum tolerance in Bradyrhizobium japonicum. *Soil Biology e Biochemistry*, 30:1511-1516.

- Multani, D.S.; Briggs, S.; Chamberlin, M.A.; Blakeslee, J.J.; Murphy, A.S.; Johal, G., 2003. Control of plant height in maize by an ABC transporter of the multi-drug resistance class. *Science*. 302: 81-84.
- Nahas, E., 2002. Microrganismos do solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas. *Bragantia*, 61: 267-275.
- Neves, M.C.P.; Rumjanek, N.G., 1997. Diversity and adaptability of soybean and cowpea rhizobia in tropical soils. *Soil Biology e Biochemistry*, 29: 889-895.
- Neves, M.C.P.; Rumjanek, N.G., 1998. Ecologia das bactérias diazotróficas nos solos tropicais, p. 15-60. In: Melo, I. S. de; Azevedo, J.L. de. (Eds.). *Ecologia Microbiana*. Embrapa- CNPMA, Jaguariúna, SP.
- Neves, M.C.P.; Martins, L.M.; Xavier, G.R.; Rumjanek, N.G., 1998a. Levantamento de estirpes de rizóbio capazes de nodular caupi (*Vigna unguiculata*) em solos do Nordeste do Brasil. I. Sertão. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 46). 10pp
- Neves, M.C.P.; Martins, L.M.; Xavier, G.R.; Rumjanek, N.G., 1998b. Levantamento de estirpes de rizóbio capazes de nodular caupi (*Vigna unguiculata*) em solos do Nordeste do Brasil. II. Zona da Mata. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 47). 8pp.
- Nicholaidis, J.J.; Sanchez, P. A.; Bandy, D.E.; Villachica, J.H.; Coutu, A.J.; Valverde, C.S., 1983. Crop production systems in the Amazon Basin, p 101-153. In: Moran, E. (Ed.) *The dilemma of Amazonia Development*. Westview.
- Nour, S.M.; Fernandez, M.; Normand, P.; Cleyet-marel, J.C., 1994. *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44: 511-522.
- Octive, J. C.; Johnson, A. C.; Wood, M. 1994. Effects of previous aluminium exposure on motility and nodulation by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *Soil Biology e Biochemistry*, 26: 1477-1482.
- Odee, D.W.; Haukka, K.; Mcinroy, S.G.; Sprent, J.I.; Sutherland, J.M.; YOUNG, J.P.W. 2002. Genetic and symbiotic characterization of rhizobia isolated from tree and herbaceous legumes grown in soils from ecologically diverse sites in Kenya. *Soil Biology e Biochemistry*, 34: 801-811.
- Odee, D.W.; Sutherland, J.M.; Makatiani, E.T.; Mcinroy, S.G.; Sprent, J.I. 1997. Phenotypic characteristics e composition of rhizobia associated with woody legumes growing in diverse Kenyan conditions. *Plant and Soil*, 188: 65-75.
- O'hara, G.W.; Goss, T.J.; Dilworth, M.J.; Glenn, R. , 1989. Maintenance of intracellular pH and acid tolerance *Rhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.55, p.1870-1876.

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

Oliveira, L.A., 1991a. Phosphorus related to plant growth, and plant-microorganism associations in Amazonian soils, p 186-195. In: Anais de Workshop “*Phosphorus Cycles In Terrestrial and Aquatic Ecosystems: Regional Workshop 3: South and Central América*”. Phosphorus Cycles Scientific Advisory Committee, Caracas, Venezuela.

Oliveira, L. A., 1991b. Ocupação racional da Amazônia: o caminho para preservar, p. 47-52. In: Val, A. L.; Fligliuolo, R.; Feldberger, E. (Eds.). *Bases Científicas para Estratégias de Preservação e Desenvolvimento da Amazônia: Fatos Perspectivas*.

Oliveira, L. A.; Bonetti, R., 1983. Fatores químicos limitantes do solo na nodulação, infecção por micorrizas VA e rendimento do feijão caupi num solo região de Manaus, p. 16. In: *IV Encontro de Pesquisadores da Amazônia*. Porto Valho, Rondônia.

Oliveira, L. A.; Graham, P. H., 1990. Speed of nodulation and competitive ability among strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. Phaseoli. *Archives of Microbiology*, 153:311-315.

Oliveira, L. A.; Guitton, L. T.; Moreira, F.W., 1994. Relações entre colonizações por fungos micorrízicos arbusculares e teores de nutrientes foliares em oito espécies florestais da Amazônia. *Acta Amazônica*, 29: 183-193.

Oliveira, L.A.; Magalhães, H.P., 1999. Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. *Revista de Microbiologia*, 30:203-208.

Oliveira, L. A.; Smith, T. J.; Bonetti, R., 1992. Efeito de adubações anteriores na nodulação e rendimento da soja e do feijão caupi num Latossolo amarelo da Amazônia. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 16:195-201.

Oliveira, L. A.; Yuyama, K.; Sylvester-Bradley, R., 1979. Efeitos de inoculantes em cultivares de soja em solos de terra firme da Amazônia Central. *Ciência e Cultura*, (Suplemento), 31:22-23.

Osorio Filho, B. D., 2009. *Rizóbios eficientes em Lotus em condições de estresse hídrico e promotores de crescimento em arroz irrigado*. 2009. 113 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Östin A, Ilić N, Cohen JD.1999. An in vitro system for tryptophan-independent indole-3-acetic acid biosynthesis from *Zea mays* seedlings. *Plant Physiol*, 119:173–178.

Park, H.-S., J. C. H. Chiang, and S.-W. Son, 2010. *The role of the central Asian mountains on the midwinter suppression of North Pacific storminess*. *J. Atmos. Sci.*, 67, 3706–3720.

Parret, A.H.; Schoofs, G.; Proost, P.; De-Mot, R., 2003. Plant lectin-like bacteriocin from a rhizosphere-colonizing *Pseudomonas* isolate. *Journal of Bacteriology*, 185: 897-908.

Patten, C.L.; Glick, B.R., 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 42: 207-220.

Peix, A.; Rivas-Boyer, A.A.; Mateos, P.F.; Rodriguez-Barrueco, C.; Martínez-Molina, E.; Velazquez, E., 2001. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biology e Biochemistry* 33:103-110.

Peick, B.; Graumann, P.; Schmid, R.; Marahiel, M.; Werner, D. 1999. *Differential pH-induced proteins in Rhizobium tropici CIAT 899 and Rhizobium etli CIAT 611*. *Soil Biol. Biochem.*, 31:189-194.

Pelegri, R.; Mercante, F.M.; Otsubo, I.M.N.; Otsubo, A.A., 2009. Resposta da cultura do feijoeiro à adubação nitrogenada e à inoculação com rizóbio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, n.33, p.219-226.

Pereira, E.G. 2000. Diversidade de rizóbio isolados em diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 93 pp.

Persello-Cartieaux, F.; Nussaume, L.; Robaglia, C, 2003. Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant, Cell and Environment*, v. 26, p. 189-199.

Piex, A.; Rivas-Boyer, A.A.; Mateos, P.F.; Rodriguez-Barrueco, C.; Martinez-Molina-E.; Velazquez, E, 2001. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biol. Biochem.*, 33(1): 103-110.

Prinsen, E.; Chauvux, N.; Schmidt, J.; John, M.; Wieneke, U.; Greef, J.D.; Schell, J.; Onckelen, H.V, 1991. Stimulation of indole-3-acetic acid production in *Rhizobium* by flavonoids. *Federation of European Biochemical Societies*, 282:53-55.

Raaijmakers, J.M., Weller, D.M, 2001. Exploiting genotypic diversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp: Characterization of superior root-colonizing *P. fluorescens* strain Q8rl- 96. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:2545-2554.

Radwan, T. S. D.; Mohamed, Z. K.; Reis, 2005. V. M. Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 40, p. 997-1004.

Rahmeier, W, 2009. Caracterização de isolados e eficiência de estirpes de rizóbio em feijão-caupi no cerrado, Gurupi-TO. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, Tocantins. 68pp.

Raid, B. V, 1991. *Fertilidade do solo e adubação*. São Paulo: Ceres. 347p.

Rausch, C., and Bucher, M, 2002. Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta*. 216, 23–37.

- Reinhardt, D.; Pesce, E.R.; Stieger, P.; Mandel, T.; Baltensperger, K.; Bennet, M.; Traas, J.; Friml, J.; Kuhlemeier, C, 2003. Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature*. 426: 255-260.
- Rodrigues, T.E, 1996. Solos da Amazônia, p.19-60. In: ALVAREZV. V. H; Fontes, L.E.F.; Fontes, M.P.F. (Eds.). *O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil e o desenvolvimento sustentado*. UFV/DPS/SBCS, Viçosa, MG.
- Rodríguez, H.; Fraga, R, 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Research Review Paper. Biotechnology Advances*, 17:319-339.
- Romeiro, R. S. (s/d) *Bactérias Fitopatogênicas*. UFV, Viçosa, MG.
- Rosenblueth, M.; Martínez-Romero, E, 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts Microbiology and Molecular. *Biology Reviews*,19: 827–837.
- Rumjanek, N. G.; Martins, L. M. V.; Xavier, G. R.; Neves, M. C. P, 2005. Fixação biológica de nitrogênio, p. 281-355. In: Freire Filho, F. R.; Lima, J. A. de A.; Ribeiro, V. Q. (Eds.). *Feijão-caupi: avanços tecnológicos*. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF.
- Sadowsky, M. J, 2000. Competition for nodulation in the soybean/Bradyrhizobium symbiosis, p. 279-293. In: Triplett, E. W. (Ed). *Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process*. Horizon Scientific Press, Madison.
- Sangoi, L.; Almeida, M.L.; Pucci, A.L.R.; Strieder, M.; Zanin, C.G.; Silva, L.C.; Vieira, R.J, 2008. A aplicação precoce de nitrogênio em cobertura não aumenta o rendimento de grãos de trigo cultivado na presença do alumínio. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.38, n.4, p.912-920..
- Santillana, N.; Arellano, C.; Zúñiga, D, 2005. Capacidade del *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). *Ecología Aplicada*, Lima, v. 4, p. 47-51.
- Santos, C.E.R.S.; Stamford, N.P.; Neves, M.C.; Rumjanek, N.G.; Borges, R.V.; Freitas, A.D.S. 2007. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 2:249-256.
- Santos, D.H.; Tiritans, C.S.; Foloni, J.S.S.; Fabris, L.B, 2010. Produtividade decana-de-açúcar sob adubação com torta de filtro enriquecida com fosfato solúvel. *Pesquisa Agropecuária Tropical*. 40: 454-461.
- Scholles, D.; Vargas, L.K, 2000. Biomassa microbiana e produção de C-CO<sub>2</sub> e N mineral em um podzólico Vermelho-Escuro submetido a diferentes sistemas de manejo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 24: 35-42.
- Schünmann, P. H. D.; Richardson, A. E.; Vickers, C. E.; Delhaize, E, 2004. Promoter analysis of the barley pht1;1 phosphate transporter gene identifies regions controlling root expression and responsiveness to phosphate deprivation. *Plant Physiology*, Bethesda, v. 136, n. 4, p. 4205-4214.

- Sharma, S.; Aneja, M.K.; Mayer, J.; Munch, J.C.; Schloter, M, 2005. Diversity of transcripts of nitrite reductase genes (nirK and nirS) in rhizospheres of grain legumes. *Applied Environment Microbiology*, 71: 2001-2007.
- Singleton, P.; Thies, J.; Bohlool, B. B. 1992. Useful models to predict response to legume inoculation. In: Mulongo, Y.K.; Gueye, M.; Spencer, S. (Eds.). *Biological Nitrogen Fixation and Sustainability of Tropical Agriculture*. John Wiley e Sons, Inc., New York, USA.
- Silva, A.C.S. ; Chagas Junior, A. F. ; Oliveira, L.A. ; Chagas, L. F. B, 2011.Ocorrência de bactérias solubilizadoras de fosfato nas raízes de plantas de importância econômica em Manaus e Rio Preto da Eva, Amazonas. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, v. 2, p. 48-52.
- Silva, A.F.; Nascimento, L.R.S.; Santos, C.E.R.S.; Freitas, A.D.S.; Lyra, M.C.C.P.; Sampaio, E.V.S.B. 2005. Isolamento e caracterização morfofisiológica de isolados de rizóbio em associação com caupi oriundos do Estado da Paraíba. In: *XXX Congresso Brasileiro de Ciências do Solo*. Anais... Recife. CD ROOM.
- Silva Filho, G.N.; Narloch, C. Scharf, R. 2002. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de Pinus e Eucalyptus de Santa Catarina. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37: 847-854.
- Silva Filho, G. N.; Vidor, C. 2000. Solubilizacao de fosfato por microrganismos na presença de fontes de carbono. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 24: 311-319.
- Silva, T.R.B. 2002. *Adubação nitrogenada e resíduos vegetais no desenvolvimento do feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.) em sistema de plantio direto*. Dissertação Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, SP. 56pp.
- Silva, V.N.; Silva, L.E.S.F.; Figueiredo, M.V.B, 2006. Atuação de rizóbios com rizobactéria promotora de crescimento em plantas na cultura do caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). *Acta Scientiarum Agronomy*, Maringá, v.28, n.3, p- 407-412.
- Silveira, E. B. 2001. Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontrole de doenças, p. 71-100. In: Michereff, S. J.; Barros, R. (Eds.). *Proteção de plantas na agricultura sustentável*. UFRPE, Recife.
- Silveira, E. L. *Inoculações de bactérias promotoras de crescimento no cultivo de arroz em solução nutritiva*. 2008. 99 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- Simon, T.; Kalalova, S.; Petrzik, K. 1996. Identification of Rhizobium strains and evaluation of their competitiveness. *Folia Microbiologica*, 41: 65-72.
- Siqueira, J.O.; Moreira, F.M.S. 1996. Microbiologia do solo e a sustentabilidade agrícola: Enfoque em fertilidade do solo e nutrição do vegetal, p. 1-42. In: *Universidade do Amazonas* (Eds). Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas.

Siqueira, J.O.; Moreira, F.M.S.; Grise, B.M.; Hungria, M.; Araújo, R.S. 1994. *Microorganismos e Processos Biológicos do Solo: Perspectivas Ambientais*. (EMBRAPA-CNPAF.Documentos, 45), SPI- Brasília. 142pp.

Smith, G.S.; Johnson, C.M.; Cornforth, I.S. 1983. Comparison of nutrient solutions for growth of plants in sand culture. *New Phytologist*, 94:537-548.

Spaepen, S. et al. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling, 2007. *FEMS Microbiology Reviews*, Amsterdam, v. 31, p. 425-448.

Soares, A.L.L.; Pereira, J.P.A.R.; Ferreira, P.A.A.; Vale, H.M.M.; Lima, A.S.; Andrade M.J.B.; Moreira, F.M.S. 2006. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). I – Caupi. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 30:795-802.

Solano BR, Maicas JB, Manero FJG, 2008. Physiological and molecular mechanisms of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). In: Ahmad I, Pichtel J, Hayat S (eds) *Plantbacteria interactions: strategies and techniques to promote plant growth*. Wiley, Weinheim, Germany, pp 41–52.

Somasegaran, P.; Hoben, H. J. 1985. *Methods in legume-Rhizobium technology*. NifTAL. Project and Mircen, Hawaii, USA. 365pp.

Son, H.J.; Park, G.T.; Cha, M.S.; Heo, M.S. 2006. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresource Technology*, 97:204-210.

Souza, R.A.; Hungria, M.; Franchini, J.C.; Chueire, L.M.O.; Barcellos, F.G.; Campo R.J. 2008. Avaliação qualitativa e quantitativa da microbiota do solo e da fixação biológica do nitrogênio pela soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43: 71-82.

Souchie, E. L. et al., 2005a. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 27 ,n. 11, p. 1149-1152, nov.

Specht, A.W.; Erdman, L.W.; Means, U.M.; Resnick, J.W. 1956. Effect of nutrition on *Trifolium hirtum* inoculated with *Rhizobium trifolii*. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 29:489-495.

Starkanova, G.; Vorisek, K.; Mikanova, O.; Rondova, D. 1999. P-solubilization activity of rhizobium species strains. *Rostlinna Vyroba*, 45: 403-406.

Stroschein, M. R.D. ; SÁ, E. L. S. ; Machado, R.G. ; Cabral, T. L. ; Bruxel, M. ; Giongo, A. ; Fontoura, R. C. 2011 . Caracterização e influência de rizóbios isolados de alfafa na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de arroz. *Ciência Rural*. 41: 1738-1743.

Stralio, R.; Rumjanek, N. G. 1999. Biodiversidade do rizóbio que nodula o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e os principais fatores que afetam a simbiose. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, (Documentos, 94). 51pp.

Stralioatto, R.; Teixeira, M. G.; Mercante, F. M. 2002. Fixação biológica de nitrogênio, p. 122-153. In: Aidar, H.; Kluthcouski, J.; Stone, L. F. *Produção de feijoeiro comum em várzeas tropicais*. Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás.

Sottero NA, Freitas SS, Melo AMT e Trani PE, 2006. Rizobactéria e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 30:225-234.

Sylvester-Bradley, R.; Asakawa, N.; La Torraca, S.; Magalhães, F.M.M.; Oliveira, L.A.; Pereira, R.M. 1982. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfato na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. *Acta Amazônica*, 12:15-22.

Taíz, L.; Zieger, E. 2004 *Fisiologia vegetal*. Artemed, Porto Alegre. 719pp.

Tanimoto, E. 2005. Regulation of root growth by plant hormones — roles for auxin and gibberellin. *Plant Sciences*, 24: 249–265.

Terefework, Z.; Lortet, G.; SUominen, L.; Lindström, K. 2000. Molecular evolution of interactions between rhizobia and their legume hosts, p.187-206. In.: Triplett, E.W. (Ed.). *Prokaryotic nitrogen fixation*. Horizon Scientific Press, Wymondham.

Thakuria, D.; Talukdar, N.C.; Goswami, C.; Hazarika, S.; Boro, R.C.; Khan, M.R. 2004. Characterization and screening of bacteria from the rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. *Current Science*, 86: 978-985.

Thies, J. E.; Bohlool, B. B.; Singleton, P. W. 1991b. Subgroups of the cowpea miscellany symbiotic specificity within Bradyrhizobium spp. for Vigna unguiculata, Phaseolus lunatus, Arachis hypogaea and Macroptilium atropurpureum. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 1540-1545.

Thies, J. E.; Singleton, P. W.; Bohlool.; B. 1991a. Influence of the size of indigenous rhizobial population on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-crop legumes. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 19-28.

Thornton, F.C.; Davey, C.B. 1983. Response of the clover Rhizobium symbiosis to soil acidity and Rhizobium strain. *Agronomy Journal*, 75:557-560.

Trinick, M.J. 1982. Competition between rhizobial strains for nodulation, p. 229-237. In: Vincent, J.M. (Ed). *Nitrogen fixation in legumes*. Academic Press, Sydney.

Tsai, S.M.; Baraibar, A.V.L.; Romani, V.L.M. Efeito de fatores do solo, 1992. In: CARDOSO, E.J.B.N. (coord.) *Microbiologia do solo*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo.

Tsavkelova, E.A.; Klimova, S.Y.; Cherdynseva, T.A.; Netrusov, A.I. 2006. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42: 117–126.



- Tucci, C.A.F. 1991. *Disponibilidade de fósforo em solos da Amazônia*. Tese de Doutorado, UFV, Viçosa, MG. 142pp.
- Vandamme, P.; Pot, B.; Gillis, M.; de Vos, P.; Kersters, K.; Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, 60: 407-438.
- Van Elsas, J.D., McSpadden Gardener, B.B., Wolters, A., Smit, E., 1993. Isolation, characterization and transfer of cryptic gene-mobilizing plasmids in the wheat rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 880-889.
- Van Loon, L. C., e Bakker, P. A. H. M. (2006). Root-associated bacteria inducing systemic resistance. In S. S. *Gnanamanickam (Ed.), Plant-associated bacteria* (pp. 269–316). Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Vargas, A.A.T.; Graham, P.H. 1988. Phaseolus vulgaris cultivar and Rhizobium strain in acid-pH tolerance and nodulation under acid conditions. *Field Crops Research*, 19: 91-101.
- Vargas, L.K.; Lisboa, B.B.; Schlindwein, G.; Granada, C.E.; Giongo, A.; Beneduzi, A.; Passaglia, L.M.P. 2009 .Occurrence of plant growthpromoting traits in clover-nodulating rhizobia strains isolated from different soils in Rio Grande Do Sul State. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 33: 1227-1235.
- Vargas, M.A.T.; Hungria, M. 1997. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. IN: Vargas, M.A.T.; Hungria, M. (Eds). *Biologia dos solos dos Cerrados*. Embrapa-CPAC, Planaltina.
- Vargas, M. A. T.; Suhet, A. R.; Mendes, I. C. 1994. *Fixação biológica de nitrogênio em solos de Cerrados*. SPI- EMBRAPA, Brasília. 83pp.
- Vega-Hernández, M.C.; Leon-Barrios, M.; Pérez-Galdona, R. 2002. Indole-3-acetic acid production from indole-3-acetonitrile in Bradyrhizobium. *Soil Biology e Biochemistry*, 34:665-668.
- Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255:571-586.
- Vance CP, Graham PH, Allan DL, 2000. Biological nitrogen fixation: phosphorus Ba critical future need? in *Nitrogen Fixation from Molecules to Crop Productivity*. eds Pederosa FO, Hungria M, Yates MG, Newton WE (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands).
- Vincent, J. M. 1970. *A manual for practical study of root nodule bacteria*. IBP Handbook N. 15. Blackwell Scient. Publ. 140p.
- Vidor, C.; Oliveira, L.A.; Lovato, P.E. 1986. Sobrevivência e competição de estirpes de Rhizobium e Bradyrhizobium, p. 247-299. In: *Reunião Latino Americana de Rhizobium, XII*. Universidade do Paraná, Paraná.

Vidor, C.; Kolling, J.; Freire, J.R.J.; Scholles, D.; Brose, E.; Pedroso, M.H.T, 1983. Fixação biológica do nitrogênio pela simbiose entre *Rhizobium* e leguminosas. *Boletim Técnico IPAGRO*, Porto Alegre, n.11, p.1-52.

Vincent, J. M. 1970. *A manual for practical study of root nodule bacteria*. IBP Handbook N. 15. Blackwell Scient. Publ. 140pp.

Wani, S. P.; Rupela, O. P., Lee, K. K, 1995. Sustainable agriculture in the semi-arid tropics through biological nitrogen fixation in grain legumes. *Plant and Soil*, 147:19-49.

Watkin, E.L.J.; O'Hara, G.W.; Glenn, A.R, 2003. Physiological responses to acid stress of an acid-soil tolerant and acid-soil sensitive strain of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. *Soil Biology e Biochemistry*, 35: 621-624.

Watkin, E. L. J.; O'Hara, G. W.; Howieson, J. G.; Glenn, A. R. 2000. Identification of tolerance to soil acidity in inoculant strains of *Rhizobium leguminosarum* by. Trifolii. *Soil Biology e Biochemistry*, 32: 1393-1403.

Weir, B.S. 2006. The current taxonomy of rhizobia ([www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia](http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia)). Acesso: 10/11/11.

Whitelaw, M.A. 2000. Growth promotion of plant inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*, 69: 99-151.

Wood, M. 1995. A mechanism of aluminum toxicity to soil bacteria and possible ecological implications. *Plant and Soil*, 171:63-69.

Yanni, Y. G. et al., 2001. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots. *Australian Journal of Plant Physiology*, Melbourne, v. 28, p. 845-870.

Xavier, G.R.; Martins, L.M.V.; Neves, M.C.P.; Rumjanek, N.G. 1998. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea rhizobia population. *Biology and Fertility of Soil*, 27:386-392.

Xavier, G.R.; Martins.; L.M.V; Ribeiro., J.R.A.; Rumjanek, N.G. 2006. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. *Caatinga*, 19: 25-33.

Xin, C.; Jian,-Jun, T.; Zhi-Guo, F.; Shui-Jin, H. 2002. Phosphate-solubilizing microbes in rhizosphere soil of 19 weeds in Southeastern China. *Journal of Zhejiang University Science*, 3:355-361.

Zahran, H.H., 1999. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63: 968-989.

Zakhia, F.; Lajudie, P. 2001. Taxonomy of Rhizobia. *Agronomie*, 21: 569-576.

- Zakharova E.A. *et al.* 1999. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. *European Journal Biochemistry*, 259: 572- 576.
- Zaman-Allah, M., B. Sifi, B. L'Taief, M.H. El-Aouni and J.J. Drevon, 2007. Rhizobial inoculation and P fertilization response in common bean (*Phaseolus vulgaris*) under glasshouse and field conditions. *Experimental Agriculture*, 43: 67-77.
- Zapata, F.; Amann, 1995. H.32P isotopic techniques for evaluating the agronomic effectiveness of rock phosphate materials. *Fertilizer Research*, 41: 189-195.
- Zilli, J.E.; Almeida, D.L.; Rumjanek, N.G.; Neves, M.C.P. 1998. *Levantamento da biodiversidade de rizóbio em diferentes áreas de um sistema integrado de produção agroecológica*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia (Embrapa-CNPAB. Documentos, 69). 15pp.
- Zilli, J.E.; Neves, M.C.P.; Rumjanek, N.G. 1998. Signalling specificity of rhizobia isolated from nodules of Phaseoleae and Indigofereae tribes. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 70: 743-750.
- Zilli, J.E.; Rumjanek, N.G.; Freire Filho, G.R. Neves, M.C.P. 2000. *Levantamento de rizóbios isolados de nódulos de caupi cultivado em amostras de solos do Cerrado do Estado do Piauí*. Seropédica: Embrapa Agrobiologi. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 125). 23pp.
- Zilli, J.E.; Valicheski, R.R.; Rumjanek, N.G.; Simões-Araújo, J.L.; Freire Filho, F.R.; Neves, M.C.P. 2006. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isolados de solo do Cerrado em caupi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41:811-818.

## 8. APÊNDICE

**Tabela A.** Resumo das análises de variação conjuntas contendo as fontes de variação (FV) graus de liberdade (GL) e valores dos quadrados médios com respectivas significâncias pelo teste F de crescimento radicular das plantas (mm/planta) de pepino em resposta à inoculação por isolados de rizóbios e 3 doses de AIA comercial.

### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Fator1(F1)	41	806653.03373	19674.46424	46.4005 **
Fator2(F2)	2	2753055.86111	1376527.93056	3246.4218 **
Int. F1xF2	82	570770.80556	6960.61958	16.4160 **
Tratamentos	125	4130479.70040	33043.83760	77.9310 **
Resíduo	378	160277.25000	424.01389	
Total	503	4290756.95040		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )