



MAIARA PAPARELE DOS SANTOS

**FIXAÇÃO DE N₂, SOLUBILIZAÇÃO DE
FOSFATO E PRODUÇÃO DE AIA POR
ESTIRPES DE *Bradyrhizobium* SIMBIÓTICAS
EM ANGICO VERMELHO E TAMBORIL**

LAVRAS – MG

2013

MAIARA PAPARELE DOS SANTOS

**FIXAÇÃO DE N₂, SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO E PRODUÇÃO DE
AIA POR ESTIRPES DE *Bradyrhizobium* SIMBIÓTICAS EM ANGICO
VERMELHO E TAMBORIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia e Bioquímica do Solo, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Ligiane Aparecida Florentino

Coorientadora

Dra. Fatima M. S. Moreira

LAVRAS - MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Santos, Maiara Paparele dos.

Fixação de N₂, solubilização de fosfato e produção de AIA por
estirpes de *Bradyrhizobium* simbióticas em angico vermelho e
tamboril / Maiara Paparele dos Santos. – Lavras: UFLA, 2013.

70 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Ligiane Aparecida Florentino.

Bibliografia.

1. Bactérias fixadoras de nitrogênio. 2. Simbiose. 3. Ácido-3-
indolacético. 4. Espécies arbóreas. 5. Bactérias promotoras de
crescimento vegetal. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 589.90133

MAIARA PAPARELE DOS SANTOS

**FIXAÇÃO DE N₂, SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO E PRODUÇÃO DE
AIA POR ESTIRPES DE *Bradyrhizobium* SIMBIÓTICAS EM ANGICO
VERMELHO E TAMBORIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia e Bioquímica do Solo, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 4 de março de 2013.

Dra. Fatima Maria de Souza Moreira UFLA

Dr. Marco Aurélio Carbone Carneiro UFLA

Dra. Fernanda de Carvalho UFLA


Dra. Ligiane Aparecida Florentino

Orientadora

LAVRAS - MG

2013

*A Deus,
Aos meus pais, Ana e Odair, pelo carinho e apoio,
A minha irmã, Tamires, pela compreensão,
Ao meu namorado, Rauber, pela calma e paciência.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação Microbiologia Agrícola, pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao projeto CNPQ/MAPA 578635/2008-9 “Avaliação da eficiência de inoculantes microbianos de leguminosas em regiões inexploradas e de métodos para seu controle de qualidade e inspeção visando à expansão de seu uso na agricultura Brasileira”, pelo financiamento para a execução deste trabalho.

A Dra. Ligiane A. Florentino, pela orientação, paciência, confiança e dedicação.

A Dra. Fatima M. S. Moreira, pela coorientação e confiança.

Aos técnicos Marlene Aparecida de Souza e Manuel Aparecido da Silva, pela ajuda sempre que necessário.

A Natana, pela ajuda, paciência, risadas e companheirismo.

A Amanda, pelo auxílio e conselhos.

Aos professores, pelo conhecimento passado durante as aulas.

A todos os amigos e colegas do laboratório que ajudaram, ou no experimento ou com conversas.

Aos amigos e colegas da universidade e de Lavras.

A minha família, pelo apoio de sempre.

Muito obrigada

RESUMO GERAL

Estudos referentes à fixação biológica de nitrogênio em leguminosas arbóreas são importantes, já que estas são utilizadas em diversos aspectos, incluindo em áreas de recuperação. As bactérias promotoras de crescimento vegetal são aquelas que contribuem de alguma forma para o desenvolvimento da planta, porém, existem poucos estudos com relatos do uso dessas bactérias com espécies de leguminosas arbóreas. Dessa forma, o presente trabalho foi realizado como objetivo de avaliar a nodulação e a eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* inoculadas em *Enterolobium contortisiliquum* (tamboril) e *Anadenanthera macrocarpa* (angico-vermelho). Objetivou-se, também, avaliar, *in vitro*, a capacidade dessas estirpes em promover o crescimento vegetal, solubilizando fosfatos inorgânicos, produzindo o fito-hormônio e fixando nitrogênio em vida livre. Todas as estirpes estudadas foram capazes de formar nódulos com o tamboril e o angico-vermelho. As estirpes INPA 54B e INPA 86A foram as mais eficiente na simbiose com tamboril e as estirpes USDA 76, UFLA 03-325, INPA 104A, UFLA 03-33, UFLA03-144, UFLA 04-212, SEMIA 587, UFLA 03-154, ATCC 10324 e UFLA 04-275, BR 4406, BR 4101, (*Ochobactrum*) e BR 4812 (*Burkholderia*), as mais eficientes na simbiose com o angico-vermelho. O AIA foi produzido pelas estirpes INPA 54B, BR 29, ST2-12, UFLA 03-315, UFLA 03-317, UFLA 03-153, UFLA 03-324, INPA 03-11B, UFLA 03-38, USDA 76 e BR 4101. Dezesete estirpes foram capazes de solubilizaram fosfato de cálcio em meio sólido. Apenas a estirpe SEMIA 587 se mostrou capaz de fixar nitrogênio em vida livre. Dessa forma, as estirpes eficientes na simbiose e as promotoras de crescimento vegetal apresentam potencial para mais estudos, visando à aplicação em campo.

Palavras-chave: Bactérias fixadoras de nitrogênio. Espécies arbóreas. Bactérias promotoras de crescimento vegetal.

GENERAL ABSTRACT

Studies related to biological nitrogen fixation in legume trees are important, since they are used in various ways, including in areas of recovery. The plant growth-promoting bacteria are those that contribute in some way to the development of the plant, but there are few studies relating these bacteria with leguminous trees. Thus, this study aimed to evaluate nodulation and symbiotic effectiveness of the strains inoculated in *Enterolobium contortisiliquum* (tamboril) and *Anadenanthera macrocarpa* (angico-vermelho). The aim was also to evaluate in vitro the ability of these strains to promote plant growth, solubilizing inorganic phosphates, producing phytohormone and fixing nitrogen in the wild. All stems studied were able to form nodules with tamboril and angico-vermelho. The strains INPA 54B and 86A INPA were the most efficient in symbiosis with tamboril and strains USDA 76, UFLA 03-325, INPA 104A, UFLA 03-33, UFLA03-144, UFLA 04-212, SEMIA 587, UFLA 03-154, ATCC 10324 e UFLA 04-275, BR 4406, BR 4101, (*Ochobactrum*) and BR 4812 (*Burkholderia*) the most efficient in symbiosis with angico-vermelho. The AIA was produced by strains INPA 54B, BR 29, ST2-12, UFLA 03-315, 03-317 UFLA, UFLA 03-153, 03-324 UFLA, INPA 03-11B, 03-38 UFLA, USDA 76 and BR 4101. 17 strains were able to solubilize calcium phosphate solid medium. Just strain SEMIA 587 was capable of fixing nitrogen in the wild. Thus, the effective strains in symbiosis and plant growth promoters has potential for further studies aiming to field application.

Keywords: Nitrogen fixing bacteria. Tree species. Plant growth promoting bacteria.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	10
1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Fixação biológica de nitrogênio	13
2.2	Bactérias fixadoras de N₂ do gênero <i>Bradyrhizobium</i>	14
2.3	Bactérias promotoras de crescimento vegetal	15
2.4	Solubilização de fosfato	17
2.5	Produção de ácido-3-indolacético	19
2.6	Leguminosas	20
2.6.1	<i>Enterolobium contortisiliquum</i> (Vell.) Morong	24
2.6.2	<i>Anadenanthera macrocarpa</i> (Benth.) Brenan	24
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
	SEGUNDA PARTE	34
	ARTIGO 1 <i>Bradyrhizobium</i> spp.: eficiência simbiótica em tamboril e angico-vermelho e o potencial de uso como promotoras do crescimento vegetal	34

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) é um macronutriente importante para todas as formas de vida. Este elemento, na forma gasosa (N_2), compõe grande parte do ar atmosférico, aproximadamente 78%, entretanto, nessa forma, se encontra indisponível para a maioria dos organismos. Para estar disponível, o N_2 deve ser transformado em NH_3 , o que pode acontecer por meio de descargas elétricas, processos industriais e, principalmente, pela fixação biológica por bactérias, que representa a maior parte do nitrogênio fixado no mundo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Estes microrganismos, representados pelas bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN), são capazes de romper esta ligação e transformar o nitrogênio atmosférico em amônia (NH_3), sendo, dessa forma, possível de ser utilizado pelas plantas e por outros organismos. Estas bactérias possuem uma enzima, a nitrogenase, que possibilita que elas realizem este processo. Algumas espécies BFN podem estabelecer simbiose com diversas espécies de leguminosas, podendo ser chamadas de bactérias nodulíferas em leguminosas (BNL), pois formam nódulos nas raízes e/ou, excepcionalmente, no caule.

Nessa simbiose, a BNL disponibiliza o nitrogênio necessário para o desenvolvimento da leguminosa e esta fornece fotoassimilados para a BNLs. Estas bactérias são conhecidas vulgarmente por rizóbios. Este processo apresenta uma grande vantagem econômica, pois substitui, parcial ou totalmente, os fertilizantes nitrogenados utilizados na agricultura, gerando uma economia de bilhões, todos os anos, no cultivo de leguminosas. Além da capacidade de fixar o nitrogênio, as BNLs podem apresentar a capacidade de promover o crescimento

vegetal por outros processos, e são conhecidas como bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV).

A promoção do crescimento vegetal pelos microrganismos pode ocorrer de forma direta ou indireta, sendo a primeira pela solubilização de fosfato e a produção de hormônios, como o ácido indolacético (GLICK; BASHAN, 1997), entre outros. O uso das BPCVs pode auxiliara planta a se estabelecer em solos de baixa fertilidade natural ou, mesmo, degradados. No entanto, a maior parte dos estudos com as BPCVs está relacionada com espécies de interesse agrícola, como caupi (*Vigna unguiculata*L.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), soja (*Glycine max* L.) e outras, sendo poucos os estudos envolvendo leguminosas florestais (LUCY; REED; GLICK, 2004).

O uso de leguminosas em áreas degradadas é amplamente difundido pelos seus benefícios, como produção de serapilheira com baixa relação C/N, que favorece a decomposição rápida pelos microrganismos e, conseqüentemente, aumentando a ciclagem de nutrientes, que favorece o desenvolvimento de outras espécies vegetais, contribuindo, principalmente, para o aporte do nitrogênio no solo.

Entretanto, é necessária a seleção de BNLs que estabeleçam simbiose eficiente com as leguminosas utilizadas, garantindo, assim, o máximo de desenvolvimento do vegetal. *Anadenanthera macrocarpa*, conhecida como angico-vermelho e *Enterolobium contortisiliquum*, conhecida como tamboril, são duas espécies nativas, de crescimento rápido, recomendadas para o uso em reflorestamentos (LORENZI, 2002) e, portanto, de interesse.

O presente trabalho foi realizado como objetivo de avaliar a nodulação e a eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* inoculadas em *Enterolobium contortisiliquum* (tamboril) e *Anadenanthera macrocarpa* (angico-vermelho). Objetivou-se, também, avaliar, *in vitro*, a capacidade destas

estirpes em promover o crescimento vegetal, solubilizando fosfatos inorgânicos, produzindo o fito-hormônio e fixando nitrogênio em vida livre.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fixação biológica de nitrogênio

A importância do nitrogênio para organismos vivos é claramente evidenciada pela presença deste nutriente na composição de aminoácidos, proteínas, DNA e outras estruturas da célula. A maior parte do nitrogênio, cerca de 78%, encontra-se na atmosfera na forma de N_2 , porém, a maioria dos organismos não é capaz de utilizá-lo, devido à força da tripla ligação de pontes de hidrogênios, que confere alta estabilidade a esta molécula (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A fixação biológica do nitrogênio (BFN) foi primeiramente descrita pelos cientistas Hellriegel e Wilfarth, em 1886, que relataram a existência de nódulos nas raízes de leguminosas. Estes pesquisadores observaram que os microrganismos presentes nos nódulos poderiam utilizar moléculas de nitrogênio em forma gasosa. Em 1888, Beijerinck isolou a primeira estirpe de bactéria do nódulo da raiz (FRANCHE; LINDSTRÖM; ELEMERIC, 2009).

Ao longo de muitos anos, estudos e pesquisas foram realizados, já que este processo apresenta grande importância econômica e ambiental. Economicamente, a FBN reduz a necessidade de fertilizantes químicos que apresentam um alto custo. Além disso, os fertilizantes químicos necessitam de transporte e armazenamento adequados, cuidados na sua aplicação e podem provocar contaminação de solos e da água, sendo a inoculação de FBN uma alternativa viável, que não causa danos ao ambiente e de baixo custo.

Dentre as bactérias fixadoras de nitrogênio, encontram-se aquelas que são de vida livre, as associativas e as que estabelecem simbiose com as leguminosas. Estas últimas são capazes de formar estruturas especializadas denominada nódulos e são conhecidas como bactérias nodulíferas de

leguminosas (BNL). Uma vez formados os nódulos, as BNL, por meio da enzima nitrogenase, quebram a tripla ligação do nitrogênio atmosférico, fixando na forma de amônia (NH₃), que é translocada para a planta. Em contrapartida, há o fornecimento de fotoassimilados para as bactérias (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

2.2 Bactérias fixadoras de N₂ do gênero *Bradyrhizobium*

Segundo Jordan (1982), a partir de uma reunião do Subcomitê Internacional sobre *Agrobacterium* e *Rhizobium*, durante o IV Simpósio Internacional sobre Nitrogênio Fixação, em 1980, foi proposta a criação de um novo gênero de BNL, *Bradyrhizobium*, para as bactérias isoladas de nódulos de leguminosas que apresentavam crescimento lento. *Bradyrhizobium* são bactérias gram-negativas, aeróbias, que não têm a formação de esporos, possuem um flagelo polar ou subpolar tornando móveis, com um crescimento lento em meio extrato de levedura-manitol. Elas não apresentam colônias superiores a 1 mm de diâmetro, dentro de 5 a 7 dias e a temperatura ideal de crescimento é de 25 a 30 ° C (JORDAN, 1982).

A simbiose entre as leguminosas e *Bradyrhizobium* é amplamente estudada pela sua importância econômica e ecológica. É amplamente utilizado na agricultura, principalmente na cultura da soja (*Glycine max* L.) e do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*(L.) Walp.). Na cultura da soja, quatro estirpes são aprovadas pelo Ministério da Agricultura, duas de *B. japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) e duas de *B. elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019) (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2011).

O caupi é uma espécie promíscua para vários gêneros de rizóbio (MOREIRA et al., 2006), porém, as estirpes que apresentam melhor resultado nesta nodulação são as de *Bradyrhizobium*, sendo recomendadas a UFLA03-84,

INPA03-11B, BR3262, BR3267. A simbiose entre espécies de leguminosas e o *Bradyrhizobium* pode garantir o nitrogênio parcial ou total, como é o caso da soja, necessário para o desenvolvimento da planta, contribuindo para a redução dos custos de produção (ZAHARAN, 1999). Estudos sempre são realizados no intuito de selecionar estirpes mais eficientes e competitivas para a inoculação.

Estirpes de *Bradyrhizobium* são amplamente encontradas em ecossistemas das regiões tropicais e temperadas. No Brasil, a maioria das estirpes isoladas de nódulos de leguminosas florestais na Amazônia foi classificada como *Bradyrhizobium* (MOREIRA et al., 1993; MOREIRA, 1997). Segundo a Instrução Normativa nº 13, de 24 de março de 2011 (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2011), das 23 espécies de leguminosas arbóreas que têm estirpes autorizadas para a produção de inoculantes no Brasil, 17 apresentam pelo menos uma estirpe de *Bradyrhizobium*.

As estirpes de *Bradyrhizobium* podem trazer, além do benefício da fixação biológica do nitrogênio, a produção de substâncias promotoras de crescimento vegetal. Estudos mostram a produção destas substâncias, como a produção do AIA (ANTOUN et al., 1998; BOIERO et al., 2007) e a solubilização de fosfatos inorgânicos nos solos (ANTOUN et al., 1998). Devido à importância econômica desse gênero, o estudo sobre o potencial de uso além da fixação biológica deve ser mais explorado.

2.3 Bactérias promotoras de crescimento vegetal

As bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) são aquelas capazes de promover o desenvolvimento da planta de forma direta ou indireta. Estas bactérias são encontradas na rizosfera e também são conhecidas como “rizobactérias promotoras de crescimento”. As BPCV são, na grande maioria,

de vida livre (KLOEPPER; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, 1989), porém, bactérias simbióticas formadoras de nódulos também apresentam a capacidade de ser BPCV.

Na promoção do crescimento de forma direta, as bactérias sintetizam um composto ou facilitam a absorção de certos nutrientes do meio ambiente, fornecendo, dessa forma, para a planta, nitrogênio fixado, fósforo solubilizado do solo e fito-hormônios, como as auxinas (GLICK; BASHAN, 1997). Também pode ocorrer, como efeito direto, a redução do potencial de membrana das raízes (BASHAN; LEVANONY, 1991) e síntese de algumas enzimas que regulam o nível de hormônio na planta (GLICK; PENROSE, 1998). Na promoção indireta do crescimento, a bactéria diminui ou previne os efeitos deletérios de organismos patogênicos (GLICK; BASHAN, 1997), pela síntese de sideróforos (LEONG, 1986) e antibióticos.

As substâncias sintetizadas pelas bactérias, conhecidas como substâncias reguladoras do crescimento vegetal (SRCP), são compostos orgânicos naturais, que interferem nos processos fisiológicos das plantas. Estas substâncias também podem ser produzidas não só pelo microrganismo, mas também pela própria planta, como as auxinas. Fatores como disponibilidade de nutrientes, temperatura, pH, composição e quantidade de substrato na rizosfera afetam a síntese de SRCP (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A maior parte dos estudos envolvendo as BPCV está relacionada com a aplicação na agricultura. Estudos mostram que, além da capacidade de fixar nitrogênio, algumas estirpes dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* apresentam potencial de utilização como BPCV em não leguminosas, como o rabanete (*Raphanus sativus* L.), na produção de fito-hormônios, na solubilização de fosfato e na produção de sideróforos (ANTOUN et al., 1998). Juntamente com resíduos orgânicos, *Bacillus subtilis*, uma BPCV, apresentou potencial para

incrementar a nutrição e o crescimento de algodão (*Gossypium* L.) e soja (*Glycine max* L.) (ARAUJO, 2008).

As BPCV também são utilizadas associadas a bactérias nodulíferas para o melhor desenvolvimento do vegetal. Silva et al. (2007) observaram que, quando inoculado BPCV, *Paenibacillus* e *Bacillus*, na simbiose entre caupi (*Vigna unguiculata* L.) e *Bradyrhizobium* (BR2001), ocorreu um aumento na nodulação e, como consequência, promoveu uma melhor fixação de nitrogênio. Petersen, Srinivasan e Chanway (1996) observaram que a inoculação de *Paenibacillus polymyxa*, juntamente com *Rhizobium etli*, em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), aumentou a densidade de rizóbio na superfície da raiz, mostrando a ação indireta de *P. polymyxa* sobre o rizóbio e, também, o aumento do número de nódulos e de raízes laterais da planta.

Pesquisas sobre a utilização de BPCV em áreas florestais são raras, quando comparadas com as de aplicação agrícola. Estudos com espécies arbóreas podem beneficiar o setor comercial de espécies arbóreas e também o reflorestamento de ambientes degradados, em diversas regiões (LUCY; REED; GLICK, 2004). Os benefícios da utilização de BPCV em espécies florestais são significativos, aumentando a sobrevivência das plantas e potencializando o crescimento e também o controle de doenças (ENEBAK; WEI; KLOEPPER, 1998).

2.4 Solubilização de fosfato

O fósforo (P), assim como o nitrogênio, é um elemento exigido em grande quantidade para o crescimento dos organismos. Este elemento é constituinte de biomoléculas, como ácidos nucleicos, coenzimas e outros, e, ao mesmo tempo, é um dos nutrientes que mais limitam a produção agrícola, por ser encontrado nos solos tropicais em formas altamente insolúveis. Quando

disponível nos solos de forma solúvel, as plantas podem absorver o P na solução de solo como ânions de fosfato, predominantes nas formas de HPO_4^{2-} e H_2PO_4^- (WAKELIN et al., 2004).

A baixa disponibilidade em solos tropicais deve-se à sua ligação a outros componentes químicos. Geralmente, em solos ácidos, a maior parte desse elemento se encontra ligada a óxido de ferro e alumínio, como é o caso dos trópicos, e, em solos alcalinos ou neutros, ele se liga ao cálcio. Em estudo de Barroso e Nahas (2005) sobre as frações de fósforo encontradas em solos brasileiros sob pastagem, cultivo de milho, mata e florestas, foi demonstrado que a mais frequente foi a de fosfato de ferro, seguida de fosfato de alumínio e fosfato de cálcio.

Alguns fungos e bactérias têm a capacidade de disponibilizar este fosfato ligado a outro elemento, processo responsável por aumentar a disponibilidade de P no solo. Estudo com diferentes espécies bacterianas, quanto à sua capacidade de solubilização, mostram que espécies de *Rhizobium*, *Pseudomonas* e *Bacillus* apresentam o maior potencial de solubilização (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999).

Segundo dados encontrados na literatura, estes microrganismos solubilizam o fosfato inorgânico por dois mecanismos principais: pela produção de ácidos orgânicos ou pela secreção de prótons (H^+) (ILLMER; BARBATO; SCHINNER, 1995). A solubilização do fosfato também varia de acordo com a natureza do mineral de fosfato fornecido e a composição do meio que o microrganismo é inoculado (GYANESHWAR; PENROSE; LI, 1998). Em campo, esta eficiência varia de acordo com o tipo de solo e a cultura (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999).

Inicialmente, Gerretsen (1948) observou que a quantidade de fósforo assimilado pelas plantas inoculadas com microrganismos rizosféricos foi maior do que no tratamento sem inoculação, demonstrando a capacidade dos

microrganismos de solubilizar fósforo inorgânico, contribuindo, assim, para o desenvolvimento da planta. Dentre os microrganismos solubilizadores de fosfato, merecem destaque as bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico que, além de fornecer o N para o desenvolvimento vegetal, podem também contribuir com o fornecimento de P para as plantas (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999; MARRA et al., 2012).

2.5 Produção de ácido-3-indolacético

As auxinas são compostos que estimulam o crescimento, sendo o ácido-3-indolacético (AIA) a principal auxina encontrada nas plantas, nas quais é produzido no meristema apical do caule, folhas jovens, flores, frutos em desenvolvimento e sementes, sendo também encontrado nas raízes. O seu transporte ocorre unidirecionalmente, através de células parenquimáticas do floema e parenquimáticas que circulam os tecidos vasculares (RAVEN; RAY; EICHHORN, 2001). Este fito-hormônio é o mais estudado e também o que tem maior ocorrência de produção pelas bactérias.

Entre as BPCV, tem sido demonstrado que o aumento da proliferação da raiz está relacionado com a biossíntese de AIA. Dobbelaere et al. (1999), estudando mutantes de *Azospirillum*, constataram que o aumento da raiz está relacionado com a biossíntese de AIA pela bactéria. Este aumento da raiz auxilia na melhor absorção de nutrientes e na liberação de exsudados. Estudos de Kaneshiro e Kwoleck (1985) demonstraram que a inoculação de mutantes espontâneos de *B. japonicum* que produziam mais AIA resultou em um aumento do volume do nódulo da raiz.

Estudos com estirpes de *Azospirillum brasilense* mostraram a existência de, pelo menos, três vias biossintéticas de AIA, sendo duas dependentes de triptofano, via do ácido indole-3-acetamida (IAM) e via do ácido indole-3-

piruvato (IpyA), e uma via independente de triptofano (PRINSEN et al., 1993). A via do ácido indole-3-pirúvico (IPyA) é a via principal para a produção de AIA na presença de triptofano exógeno (DOBBELAERE et al., 1999). O aminoácido L-triptofano funciona como um precursor fisiológico na biossíntese de auxina em plantas e em microrganismos (KHALID; ARSHAD; ZAHIR, 2004).

Chagas-Junior, Oliveira e Oliviera (2009) avaliaram, em meio de cultura, a produção de AIA de rizóbios isolados de solos da Amazônia, verificando que as 92 estirpes produziram AIA sem a adição de triptofano, porém, em 52 isolados, a adição e a elevação da concentração de triptofano aumentaram a produção deste fito-hormônio. Prinsen et al. (1993) elucidaram que 90% do AIA produzido por *Azospirillum brasilense* são sintetizados pela via não dependente de triptofano.

2.6 Leguminosas

A família das Leguminosas é constituída por três subfamílias, Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae, de acordo com Lewis et al. (2003). Esta família apresenta uma grande diversidade de espécies nos biomas brasileiros, sendo elas de porte herbáceo, arbustivo ou arbóreo. Segundo Franco, Resende e Campello (2003), a grande diversidade desta família a situa como importante e estratégica na sustentabilidade ecológica, social e econômica. Dessa forma, a família das leguminosas apresenta ampla importância para toda a sociedade, sendo utilizada em diversos aspectos.

Na agricultura em geral, muitas espécies de leguminosas são de importância econômica pela produção de grãos, fibras, carne e biocombustível. Na alimentação humana, devido à sua alta concentração de proteínas, em países em desenvolvimento, as leguminosas são uma alternativa à proteína animal

(PHILLIPS, 1993). Além da sua importância nutricional, a inclusão das leguminosas na dieta tem muitos efeitos benéficos na prevenção e no controle de várias doenças metabólicas, como doenças coronarianas e diabetes (THARANATHAN; MAHADEVAMMA, 2003). Também são utilizadas na cobertura vegetal do solo e como adubação verde, favorecendo a conservação e a fertilidade do solo, com o aumento da matéria orgânica no solo, a ciclagem de nutrientes e a ativação da atividade microbiota do solo.

Em estudos utilizando a adubação verde em sistemas cafeeiros, foi observado que *Arachispintoi*, *Calopogonium mucunoides*, *Stizolobium aterrimum* e *Stylosanthes guianensis* melhoram a ciclagem de nutrientes, por meio da microbiota do solo, os quais se tornam acessíveis para a cultura após a mineralização dos resíduos das leguminosas (MATOS et al., 2008; MATOS et al., 2011).

Outro aspecto que vem sendo estudado é a utilização das leguminosas arbóreas na recuperação de solos degradados pela mineração e/ou pela atividade agropecuária. A habilidade que a maioria das espécies arbóreas desta família tem de obter nitrogênio pela simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio contribui para o estabelecimento destas nos sistemas florestais, auxiliando na recuperação de solos degradados e acelerando, dessa forma, a sucessão natural (FRANCO; FARIA, 1997).

Na degradação, a remoção da superfície do solo e, conseqüentemente, a retirada da matéria orgânica causam sérios problemas na estrutura do solo, bem com na disponibilidade de água e na atividade biológica, prejudicando o suprimento de nutrientes essenciais com N, P e S para as plantas (FRANCO et al., 1995). A recuperação natural de florestas tropicais é, na maioria das vezes, precária e lenta, devido a fatores como baixa fertilidade no solo, esgotamento do banco de sementes local, distância de florestas nativas, que são fontes de

semente e dominância de gramíneas, que impedem a colonização de outras espécies (PARROTTA; TURNBULL; JONES, 1997).

A recuperação de solos degradados deve ser baseada em uma estratégia segundo a qual as espécies utilizadas sejam de crescimento rápido e também possam melhorar o solo pelo aporte de matéria orgânica (FRANCO et al., 1995). Costa et al. (2004) avaliaram diferentes leguminosas arbóreas, *Mimosa caesalpinifolia* (sabiá), *Acacia auriculiformis* (acácia) e *Gliricidia sepium* (gliricídia), utilizadas na revegetação de uma área degradada e, comparando a quantidade e a qualidade nutricional da serapilheira a de uma capoeira vizinha, observaram que as espécies foram eficientes na produção de serapilheira, alcançando valores obtidos na capoeira vizinha.

Além da produção de serapilheira, que ocorre com a plantação de espécies florestais, as leguminosas auxiliam no aporte de nitrogênio em solos degradados. A matéria vegetal das leguminosas, no geral, apresenta baixa relação carbono/nitrogênio (C/N), ou seja, a liberação dos nutrientes da matéria vegetal é mais rápida, quando comparada com plantas que têm relação C/N alta (FRANCO et al., 1995). Outro aspecto é o estudo da simbiose do rizóbio com a leguminosa arbórea, já que esta disponibiliza o nitrogênio para a planta.

Entretanto, algumas espécies de leguminosas não têm a capacidade de formar simbiose com microrganismos fixadores de nitrogênio atmosférico, sendo a maioria destas espécies pertencentes à subfamília Caesalpinoideae. A nodulação também auxilia a planta a se estabelecer no ambiente degradado e, antes da introdução da leguminosa, é necessário o estudo da espécie utilizada e do rizóbio a ser inoculado.

A simbiose depende de fatores da planta e do microrganismo simbionte. A leguminosa hospedeira pode ter alta promiscuidade na simbiose, apresentando ampla variedade de bactérias, pela qual é capaz de formar nódulo, ou pode ser altamente específica, nodulando apenas com poucas ou uma espécie de rizóbio.

Não existe relação entre a filogenia da planta e a do microrganismo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Porém, a planta e o rizóbio que estabelecem associação coevoluiram na mesma região (LIE et al., 1987).

As leguminosas podem estabelecer a simbiose com o rizóbio nativo e aqueles que são introduzidos por meio da inoculação nas sementes ou inoculados na planta (PÉREZ-RAMIREZ et al., 1998; BALA et al., 2003). *Leucocephala calothyrsus* é capaz de nodular em solos de diferentes continentes, por possuir rizóbios compatíveis. Mas, algumas espécies podem ter necessidade de rizóbios provenientes do seu local de origem, como *Sesbania sesban*, que não é capaz de nodular na maioria dos solos africanos (BALA et al., 2003). É observada alta especificidade e eficiência entre a simbiose com *Sesbania virgata* com o simbionte *Azorhizobium doebereineriae* (FLORENTINO et al., 2009a; FLORENTINO; MOREIRA et al., 2009b)

Anadenanthera macrocarpa, conhecida como angico-vermelho e *Enterolobium contortisiliquum*, conhecida como tamboril, são duas espécies arbóreas utilizadas em reflorestamento e formam simbiose com rizóbios. Dentre as espécies arbóreas estudadas para o reflorestamento de pastagens na região de Mata Atlântica, *E. contortisiliquum* foi uma das que apresentaram um rápido estabelecimento nesse tipo de ambiente (SOUCHIE et al., 2006).

Lacerda e Figueiredo (2009) selecionaram seis espécies arbóreas nativas para recompor a mata ciliar, acompanhando a sobrevivência pelo plantio de mudas e semeadura direta a lanço. O resultado obtido mostra que *E. contortisiliquum* foi indicada para reflorestamento a partir de semeadura direta, pela sua baixa germinação das sementes e rápido crescimento da plântula e *A. macrocarpa* para reflorestamento a partir do plantio de mudas, pela sua alta taxa de germinação e crescimento lento.

Estas duas espécies têm importância em outros setores. A madeira do tamboril é utilizada para a elaboração de móveis e na construção civil. Esta

espécie também é utilizada em embarcações, pranchetas, palitos de fósforo, (TOMAZELLO FILHO et al., 1982), para fins ornamentais e como alimento animal, também no processo de obtenção de celulose, com fins medicinais, na arborização urbana (SARMENTO; VILLELA, 2010), para a produção de carvão e melífera. O angico-vermelho também é utilizado na construção civil, na produção de carvão, em arborização urbana, com fins medicinais, como melífera, em paisagismo e na produção de resina. Para a utilização de qualquer que seja a aplicação, é importante conhecer a sua ecologia.

2.6.1 *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong

O tamboril, como é popularmente conhecido, pertence à família Leguminosae-Mimosoideae. É uma espécie encontrada no Pará, no Maranhão e no Piauí até o Mato Grosso do Sul e o Rio Grande do Sul, em floresta pluvial e semidecídua, sendo particularmente frequente na floresta latifoliada da bacia do Paraná. É uma espécie ótima para o reflorestamento de áreas degradadas de preservação em plantios mistos, devido ao seu rápido crescimento inicial (LORENZI, 2002).

É uma espécie decídua no inverno, heliófita, seletiva, higrófito, pioneira, difundida em várias formações florestais. É pouco comum em florestas primárias e frequentemente concentrada em solos úmidos. Sua frequência é maior em capoeiras em estágios mais adiantados da sucessão secundária (LORENZI, 2002).

2.6.2 *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan

O angico-vermelho, como é popularmente chamado, pertence à família Leguminosae-Mimosoideae. É uma espécie encontrada no Maranhão e no

nordeste do país até São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul, principalmente nas florestas latifoladas semidecíduais. Esta espécie apresenta crescimento rápido, mostrando a sua capacidade para o reflorestamento de áreas degradadas e de conservação (LORENZI, 2002).

É uma planta decídua, pioneira, heliófita, seletiva e xerófito, características das capoeiras e florestas secundárias situadas em terrenos cascalhentos e arenosos. Também é comum em interior da mata primária densa. É frequente em cerradões e matas de galeria de todo Brasil Central. Ocorre, de preferência, em terrenos drenados e altos, podendo formar agrupamentos quase homogêneo (LORENZI, 2002).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As bactérias fixadoras de nitrogênio apresentam grande importância econômica e ambiental, e o nitrogênio fixado por estas estirpes auxilia no desenvolvimento do vegetal. Além de fixar o nitrogênio, algumas bactérias também auxiliam no desenvolvimento da planta, de forma direta ou indireta, sendo conhecidas como bactérias promotoras de crescimento vegetal. Espécies do gênero *Bradyrhizobium* são amplamente utilizadas na agricultura e também no setor de espécies florestais. Estas bactérias podem apresentar a capacidade de promover o crescimento da planta por meio de outros processos além da fixação biológica do nitrogênio.

Dessa forma, pesquisas com estirpes eficientes na simbiose de espécies arbóreas se tornam importantes para auxiliar a planta a se estabelecer melhor no ambiente. Também são importantes estudos a respeito da capacidade destas estirpes em promover o crescimento da planta, por meio da produção de auxinas, como o AIA, solubilizando fosfatos inorgânicos de cálcio, alumínio e ferro e fixando nitrogênio em vida livre.

REFERÊNCIAS

ANTOUN, H. N. et al. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus*L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v.204, p.57–67, 1998.

ARAÚJO, F. F. de. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com a farinha de ostra e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 2, p. 456-462, mar./abr. 2008.

BALA, A. et al. Nodulation of tree legumes and the ecology of their native rhizobial populations in tropical soils **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 22, p. 211–223, 2003.

BARBERI, A. et al. Nodulação em leguminosas florestais em viveiros no sul de Minas Gerais. **Cerne**, Lavras, v. 4, n. 1, p. 145-153, jan./mar. 1998.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 29, n. 1, p. 73–83, 2005.

BASHAN, Y.; LEVANONY, Y. Alterations in membrane potential and in proton efflux in plant roots induced by *Azospirillum brasilense*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 137, p. 99-103, 1991.

BOIERO, L. et al. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. **Applied microbiology and biotechnology**, Berlin, v. 74, n. 4, p. 874-880, 2007.

BORDELEAU, L. M.; PRÉVOST, D. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 161, p. 115-125, 1994.

CHAGAS-JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A. de; OLIVIERA, A. N. O. de. Produção de ácido indolacético por rizóbios isolados de caupi. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 56, n. 6, p. 812-817, nov./dez. 2009.

COSTA, G. S. et al. Aporte de Nutrientes pela serapilheira em uma área degradada e revegetada com leguminosas arbóreas. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 28, n. 6, p. 919-927, nov./dez. 2004.

DOBBELAERE, S. et al. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 212, p. 155–164, 1999.

ENEBAK, S. A.; WEI, G.; KLOEPPER, J. W. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedlings. **Forest Science**, Bethesda, v. 44, n. 1, p. 139-144, 1998.

FLORENTINO, L. A. et al. *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 5, p. 667-676, set./out. 2009a.

FLORENTINO, L. A.; MOREIRA, F. M. Características simbióticas e fenotípicas de *Azorhizobium doebereineriae*, microssimbionte de *Sesbania virgata*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 2, p. 215-226, mar./abr. 2009b.

FRANCHE, C.; LINDSTRÖM, K.; ELEMERIC, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 321, p. 35–59, 2009.

FRANCO, A. A. et al. Uso de leguminosas florestais noduladas e micorrizadas como agentes de recuperação e manutenção da vida do solo: um modelo tecnológico. In: FISCHER, E.; CARVALHO, L. F. A. V.; CUNHA, N. L. da. (Ed.). **Oecologia Brasiliensis**: volume 1: estruturas, funcionamento e manejo de ecossistemas brasileiros. Rio de Janeiro: Creative Commons Attribution, 1995. p. 459-467.

FRANCO, A. A.; FARIA, S. M. de. The contribution of N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, n. 5, p. 897-903, May 1997.

FRANCO, A. A.; RESENDE, A. S.; CAMPELLO, E. F. C. Importância das leguminosas arbóreas nativas recuperação de áreas degradadas e na sustentabilidade de sistemas agroflorestais. IN: SEMINÁRIO SISTEMAS AGROFLORESTAIS E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL, 2003, Campo Grande. **Anais ...**Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2003.

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

GLICK, B. R.; BASHAN, Y. Genetic manipulation of plants grow-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. **Biotechnology Advances**, Elmsford, v. 15, n. 2, p. 353-378, Feb. 1997.

GLICK, B. R.; PENROSE, D. M.; LI, J.A Model for the Lowering of Plant Ethylene Concentrations by Plant Growth-promoting Bacteria. **Journal of Theoretical Biology**, Amsterdam, v. 190, n. 1, p. 63-68, Jan. 1998.

GYANESHWAR, P.; KUMAR, G. N.; PAREKH, L. J. Effect of buffering on the phosphate-solubilizing ability of microorganisms. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 14, n. 5, p. 669-673, Oct. 1998.

ILLMER, P.; BARBATO, A.; SCHINNER, F. Solubilization of hardly-solubilization of hardly-soluble AlPO₄ with P-solubilizing microorganisms. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 27, n. 3, p. 265-270, Mar. 1995.

JORDAN, D. C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 32, n. 1. p. 136-139, Jan. 1982.

KANESHIRO, T.; KWOLEK, W. F. Stimulated nodule formation of soybeans by *Rhizobium japonicum* mutant (B-14075) that catabolizes the conversion of tryptophan to indol-3-pyruvic acid. **Plant Science**, Amsterdam, v.42, p. 141-146, 1985.

KHALID, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z. A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, n. 3, p.473-480, Mar. 2004.

KLOPPER, J. W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Tibtech**, Cambridge, v. 7, n. 2, p. 39-44, Feb. 1989.

LACERDA, D. A. M.; FIGUEIREDO, P. S. Restauração de matas ciliares do rio Mearim no município de Barra do Corda-MA: seleção de espécies e comparação de metodologias de reflorestamento. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 39, n. 2, p. 295-304, 2009.

LEONG, J. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. **Annual Reviews of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p.187-208, Sept. 1986.

LEWIS, G. P. et al. Leguminosae or fabaceae ? In: KLITGAARD, B. B.; BRUNEAU, A. (Ed.). **Advances in legume systematic**: parte 10 Royal. Kew: Royal Botanic Gardens Botanic, 2003. p. 1-3.

LIE, T. A. et al. Co-evolution of the legume-Rhizobium association. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 100, p. 171-181, 1987.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil: volume 1. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

LUCY, M.; REED, E.; GLICK, B. R. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 86, n. 2, p. 1-25, Aug. 2004.

MARRA, L. M. et al. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 357, p. 289-307, 2012.

MATOS, E. D. et al. Decomposition and nutrient release of leguminous plants in coffee agroforestry systems. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 35, n. 1, p. 141-149, jan./fev. 2011.

MATOS, E. D. et al. Green manure in coffee systems in the region of zona da mata, Minas Gerais: characteristics and kinetics of carbon and nitrogen mineralization. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 32, n. 6, p. 2027-2035, nov./dez. 2008.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instituição Normativa nº 13, de 24 de Março de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, 25 mar. 2011.

MOREIRA, F. M. S. et al. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosa e by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, New York, v. 16, n. 1, p. 135–146, Apr. 1993.

MOREIRA, F. M. S. et al. *Azorhizobium doebereinerare* sp Nov. microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.). Pers. **Systematic and Applied Microbiolpgy**, v. 29, n. 2, p. 197-206, 2006.

MOREIRA, F. M. S. Nitrogen-fixing Leguminosae-nodulating bacteria. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. **Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems**. Wallingford: CAB International Publishing, 2006. p. 237-270.

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

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006.

PARROTTA, A. J.; TURNBULL, J. W.; JONES, N. Catalyzing native forest regeneration on degraded tropical lands. **Forest Ecology and Management**, Cambridge, v. 99, n. 1, p.1-7, 1997.

PÉREZ-RAMÍREZ, N. P. et al. Seeds of *Phaseolus vulgaris* bean carry *Rhizobium etli*. **FEMS Microbiology Ecology**, Hoboken, v. 164, n. 2, p. 289-296, July 1998.

PETERSEN, J. P.; SRINIVASAN, M.; CHANWAY, C. P. *Bacillus polymyxa* stimulates increased *Rhizobium etli* populations and nodulation when co-resident in the rhizosphere of *Phaseolus vulgaris*. **FEMS Microbiology Letters**, Hoboken, v. 142, n. 1, p. 271-276, Aug. 1996.

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

PRINCEN, E. et al. *Azospirillum brasilense* Indol-3-Acetic Acid Biosynthesis: Evidence for a Non-Tryptophan Dependent Pathway. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 6, n. 5, p. 609-615, 1993.

RAVEN, P. H.; RAY, F. E.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

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

SARMENTO, M. B.; VILLELA, F. A. Sementes de espécies florestais nativas do sul do Brasil. **Informativo Abrates**, Londrina, v. 20, n. 1-2, p. 39-44, 2010.

SILVA, V. S. da et al. Estirpes de *Paenibacillus* promotoras de nodulação específica na simbiose *Bradyrhizobium-caupi*. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 29, n. 3, p. 331-338, mar. 2007.

SOUCHIE, E. L. et al. Arborização de pastagem na região da Mata Atlântica. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 12, n. 2, p. 22-27, fev. 2006.

THARANATHAN, R. N.; MAHADEVAMMA, S. Grain legumes a boon to human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 14, n. 12, p. 507-518, Dec. 2003.

TOMAZELLO FILHO, M. et al. Madeiras de espécies florestais do estado do Maranhão: identificação e aplicações. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 1., 1982, Belo Horizonte. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 1982. p. 1-5.

ZAHARAN, H. H. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 63, n. 4, p. 968-989, Dec. 1999.

WAKELIN, S. A. et al. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. **Biology and Fertility Soils**, Berlin, v. 40, n. 1, p. 36-43, Jan. 2004.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

***Bradyrhizobium* spp.: eficiência simbiótica em tamboril e angico-vermelho e o potencial de uso como promotoras do crescimento vegetal**

Maiara P. Santos¹; Ligiane A. Florentino²; Natana C. de Castro³; Amanda A. Guimarães⁴; Fatima M. S. Moreira⁵

Normas da NBR 6022 ABNT (2003)

¹Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Ciências do Solo, Laboratório de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, Mestranda em Microbiologia Agrícola. maiarapsantos@gmail.com

²Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Ciências do Solo, Laboratório de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo. ligianeflorentino@gmail.com

³Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Ciências do Solo, Laboratório de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, Estudante de Engenharia Ambiental. natanacaren@yahoo.com.br

⁴Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Ciências do Solo, Laboratório de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo. amandaazarias@yahoo.com.br

⁵Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Ciências do solo, Laboratório de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo. fmoreira@dcs.ufla.br

Resumo: O trabalho foi realizado com objetivo de avaliar a nodulação e a eficiência simbiótica de estirpes do gênero *Bradyrhizobium*, quando inoculadas no tamboril (*Enterolobium contortisiliquum*) e no angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa*). Também foi avaliada a capacidade destas estirpes, *in vitro*, de produzir fito-hormônio, solubilizar fosfatos inorgânicos e fixar nitrogênio em vida livre. As 27 estirpes de *Bradyrhizobium* utilizadas neste estudo pertencem à coleção do Setor de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo da Universidade Federal de Lavras (UFLA). O teste de nodulação e eficiência simbiótica foi realizado em tubetes contendo areia e vermiculita na proporção 1:2(v:v), por um período de 70 dias. Para a realização dos testes fisiológicos, foram realizados experimentos de: produção de AIA (ácido-3-indolacético) em meio 79 e Dygs, com e sem adição de triptofano; solubilização em meio sólido de fosfatos inorgânicos de cálcio (meio NBRIP), alumínio (meio GES) e ferro (meio GELP) e fixação biológica do nitrogênio em vida livre utilizando o meio semissólido LO. Todas as estirpes inoculadas foram capazes de formar simbiose com o tamboril e com o angico-vermelho. As estirpes INPA 54B e INPA 86A foram as mais eficientes na simbiose com tamboril e as estirpes USDA 76, UFLA 03-325, BR 4406 e BR 4101, as mais eficientes na simbiose com o angico-vermelho. O AIA foi produzido pelas estirpes INPA 54B, BR 29, UFLA 04-212, UFLA 03-315, UFLA 03-317, UFLA 03-153, UFLA 03-324, INPA 03-11B, UFLA 03-38, USDA 76 e BR 4101. Dezesete estirpes foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio em meio sólido, tendo a INPA 104A, UFLA 03-318, BR 29, UFLA 03-84, ST2-12 e BR 4812 solubilizado fosfato de cálcio a um índice de solubilização médio, e nenhuma estirpe foi capaz de solubilizar fosfato de ferro e alumínio. Apenas a estirpe SEMIA 587 se mostrou capaz de fixar nitrogênio em vida livre. Para a aplicação destas estirpes eficientes na simbiose e promotoras de crescimento vegetal, é necessária a realização de estudos em vasos com solo e em campo.

Palavras-chave: *Enterolobium contortisiliquum*; *Anadenanthera macrocarpa*; Fixação biológica de nitrogênio.

***Bradyrhizobium* spp.: Efficiency in symbiotic tamboril and angico-vermelho and the potential for use as plant growth promoting**

Abstract: The objective of this study was to evaluate nodulation and symbiotic effectiveness of strains of the genus *Bradyrhizobium* inoculated on tamboril (*Enterolobium contortisiliquum*) and angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa*). We also evaluated the ability of these strains in vitro to produce phytohormone, solubilize inorganic phosphates and nitrogen fixation in the wild. The 27 *Bradyrhizobium* strains used in this study belong to the collection of the Department of Biology, Microbiology and Biological Processes of Soil UFLA (UFLA). The test for nodulation and symbiotic efficiency was performed in tubes containing sand and vermiculite in the proportion 2:1 (v: v) for a period of 70 days. To achieve the physiological tests, experiments were carried out: production of IAA (3-indoleacetic acid) in medium 79 and Dygs, with and without the addition of tryptophan; solubility in solid of inorganic phosphates of calcium (half NBRIP), aluminum (half GES) and iron (half GELP) and biological nitrogen fixation in the wild using semi solid LO. All inoculated strains were able to form a symbiosis with the tamboril and with the angico-vermelho. The INPA strain 54B and 86A INPA were the most efficient in symbiosis with tamboril and strains USDA 76, 03-325 UFLA, BR 4406 and BR 4101 the most efficient in symbiosis with angico-vermelho. The AIA was produced by strains INPA 54B, BR 29, UFLA 04-212, UFLA 03-315, 03-317 UFLA, UFLA 03-153, 03-324 UFLA, INPA 03-11B, 03-38 UFLA, USDA 76 and BR 4101. 17 strains were able to solubilize calcium phosphate solid medium, and the INPA104A, UFLA 03-318, BR 29, UFLA 03-84, ST2-12, and BR 4812 solubilize calcium phosphate at a rate of solubilization medium, and no strain was capable of solubilizing iron phosphate and aluminum. Just strain SEMIA 587 was capable of fixing nitrogen in the wild. For efficient implementation of these strains in symbiosis and promote plant growth, it is necessary to carry out studies in pots with soil and field.

Keywords: *Enterolobium contortisiliquum*; *Anadenanthera macrocarpa*; Biological nitrogen fixation.

1 Introdução

As atividades antrópicas, como queimadas, desmatamentos, mineração e a própria atividade agropecuária, alteramos atributos químicos, físicos e biológicos do solo. A regeneração natural destas áreas, na maioria das vezes, é lenta, sendo necessária a intervenção para que esta seja bem sucedida. Uma medida que tem sido adotada com sucesso é a utilização de leguminosas arbóreas de rápido crescimento, promovendo o aporte de matéria orgânica no solo (FRANCO et al., 1995). Além disso, o cultivo de leguminosas nessas áreas pode ser, ainda, indicado devido ao fato de estas plantas estabelecerem simbiose com as bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, resultando na entrada de carbono e nitrogênio no ambiente, auxiliando o desenvolvimento das espécies leguminosas.

O tamboril (*Enterolobium contortisiliquum*) e o angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa*) são espécies vegetais da família das leguminosas que apresentam crescimento rápido e baixa exigência na fertilidade do solo, são grandes produtoras de serrapilheira e estabelecem simbiose com os rizóbios, introduzindo nitrogênio no sistema solo. Além disso, há relatos, na literatura, de que estas duas espécies apresentam o potencial de utilização em reflorestamento de matas ciliares (LACERDA; FIGUEIREDO, 2009). O tamboril também pode ser utilizado em sistema silvipastoril (SOUCHIE et al., 2006) e é capaz de crescer em solos contendo metais pesados (TRANNIN; MOREIRA; SIQUEIRA, 2001; SILVA et al., 2011).

Dentre os gêneros de rizóbios, *Bradyrhizobium* tem sido amplamente encontrado em nódulos de leguminosas florestais da região Amazônica (MOREIRA et al., 1993; MOREIRA, 1997). Das 23 espécies de leguminosas arbóreas que possuem estirpes autorizadas para a produção de inoculantes no Brasil, 17 têm, pelo menos, uma estirpe de *Bradyrhizobium* (MINISTÉRIO DA

AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2011). As estirpes deste gênero contribuem para o estabelecimento e o desenvolvimento da planta hospedeira por meio da produção de substâncias capazes de auxiliar no crescimento da planta, sendo também conhecidas como bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) (ANTOUN et al., 1998; VERSSEY, 2003).

Apesar da grande importância das BPCV, poucos trabalhos relatam o uso da inoculação dessas bactérias em leguminosas arbóreas (LUCY; REED; GLICK, 2004). Dessa forma, o presente trabalho compõe-se de dois estudos: o primeiro teve como objetivo avaliar nodulação e a eficiência simbiótica de estirpes do gênero *Bradyrhizobium*, quando inoculadas em *Anadenanthera macrocarpa* (angico-vermelho) e *Enterolobium contortisiliquum* (tamboril); no segundo, o objetivo foi avaliar, *in vitro*, a capacidade destas estirpes de produzir fito-hormônio, solubilizar fosfatos inorgânicos e fixar nitrogênio em vida livre.

2 Material e Métodos

2.1 Estirpes utilizadas

As estirpes bacterianas utilizadas neste estudo pertencem à coleção do Setor de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo (SBMPBS) da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e foram isoladas de diferentes biomas (Tabela 1). Estas bactérias foram estudadas quanto à capacidade de estabelecer simbiose com duas leguminosas arbóreas (tamboril e angico-vermelho) e também foi analisado o potencial dessas estirpes de atuar como promotoras de crescimento vegetal.

Tabela 1 Estirpes utilizadas no experimento, suas origens e referências

Estirpe	Bioma	Sistema de uso do solo	Planta hospedeira ou fonte do isolamento	Referência
<i>Bradyrhizobium</i>				
INPA 86A	Amazônia	Floresta	<i>Swartzia</i> Schreb sp	SBMPBS/UFLA
INPA 10A	Amazônia	Floresta	<i>Samanea saman</i> (Jaq.) Merr.	SBMPBS/UFLA;
INPA 54B	Amazônia	Floresta	<i>Inga</i> Mill. Sp	SBMPBS/UFLA; Moreira et al., 1998
INPA 104A	Amazônia	Floresta	<i>Campsiandra surinamensis</i> Benth	SBMPBS/UFLA;
INPA 237B	Amazônia	Floresta	<i>Pterocarpus</i> Jacq	SBMPBS/UFLA;
UFLA03-280	Amazônia	Agrofloresta	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp	SBMPBS/UFLA; Jaramillo et al., (submetido)
UFLA03-315	Amazônia	Floresta	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp	SBMPBS/UFLA
UFLA03-144	Amazônia	Agricultura	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp	SBMPBS/UFLA; Guimarães et al., 2012
UFLA03-318	Amazônia	Pasto	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp	SBMPBS/UFLA
UFLA03-317	Amazônia	Pasto	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp	SBMPBS/UFLA
UFLA03-38	Cerrado	Agricultura	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp	SBMPBS/UFLA; Florentino et al., 2010
UFLA03-33	Cerrado	Agricultura	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp	SBMPBS/UFLA; Florentino et al., 2010
UFLA03-324	Mata Atlântica	Agricultura	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp	SBMPBS/UFLA; Rufini et al., (submetido)
UFLA03-319	Mata Atlântica	Agricultura	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp	SBMPBS/UFLA; Rufini et al., (submetido)
UFLA03-325	Mata Atlântica	Agricultura	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp	SBMPBS/UFLA; Rufini et al., (submetido)
UFLA03-153	Minas Gerais	Mineração de Bauxita	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp	SBMPBS/UFLA; Melloni et al., 2006
UFLA03-164	Minas Gerais	Mineração de Bauxita	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp	SBMPBS/UFLA; Melloni et al., 2006
UFLA04-275	Cerrado	Campo Rupestre	<i>Macroptilium atropurpureum</i> (DC.) Urb.	SBMPBS/UFLA de Carvalho, 2010
UFLA04-212	Amazônia	Agricultura	<i>Macroptilium atropurpureum</i> (DC.) Urb.	SBMPBS/UFLA
BR29	Mata Atlântica	-	-	FEPAGRO/UFRGS; Peres et al,1993

Tabela 1, conclusão

Estirpe	Bioma	Sistema de uso do solo	Planta hospedeira ou fonte do isolamento	Referência
<i>Bradyrhizobium</i>				
SEMIA 587	Mata Atlântica	-	-	FEPAGRO/UFRGS; Peres et al,1993
ATCC 10324	-	-	-	Jordan, 1984
USDA 76	-	-	-	Kuykendall, 1992
BTA-1T	-	-	<i>Chamaecytisus proliferus</i> (L.f.)	Vinuesa et al., 2005
UFLA 03-84	Amazônia	Pasto	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp	SBMPBS/UFLA; Soares et al., 2006
INPA 03-11B	Amazônia	Floresta	<i>Centrosema</i> (DC.) Benthsp.	SBMPBS/UFLA; Soares et al., 2006
BR4406 ^R	Mata Atlântica	-	-	EMBRAPA Agrobiologia; Faria, 1997
<i>Burkholderia</i> spp.				
UFLA03-154	Mata Atlântica	Mineração de Bauxita	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp	SBMPBS/UFLA;
BR4812 ^R	Mata Atlântica	-	-	EMBRAPA Agrobiologia; Faria, 1997
<i>Ochobactrum</i> spp.				
BR4101 ^R	Mata Atlântica	-	-	EMBRAPA Agrobiologia; Faria, 1997

^R: estirpes recomendadas para espécies arbóreas

2.2 Eficiência simbiótica em espécies arbóreas

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições. O experimento de nodulação e eficiência simbiótica foi realizado em casa de vegetação e as plantas foram cultivadas em tubetes de polipropileno com capacidade volumétrica de 280 cm³, contendo uma mistura de areia e vermiculita na proporção 1:2 (v:v), esterilizados e adicionados de solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1950) esterilizada, de acordo com a necessidade das plantas.

As sementes das duas leguminosas arbóreas foram obtidas no Laboratório de Sementes, no Departamento de Engenharia Florestal da UFLA. As sementes de tamboril passaram pelo processo de quebra de dormência por meio de escarificação química, em 30 minutos em ácido sulfúrico P. A. (H₂SO₄) e, em seguida, lavadas em água destilada (DAVIDE; FARIA; BOTELHO, 1995). As sementes do angico-vermelho não necessitaram passar pelo processo de quebra de dormência, sendo realizada apenas a desinfestação, na qual foram submersas em álcool etílico, por 30 segundos e em hipoclorito de sódio (NaClO) P.A. a 2%, por 5 minutos. Após esse processo, as sementes foram lavadas, sucessivas vezes, em água destilada esterilizada.

A germinação das sementes de ambas as espécies foi feita em placas de Petri contendo papel filtro com água destilada, tendo sido esterilizadas por três dias, antes de serem plantadas. No momento do plantio, foram colocadas duas sementes germinadas em cada tubete e, após uma semana, uma das plântulas foi toda descartada, com o auxílio de uma pinça esterilizada, deixando-se apenas uma planta/tubete. Nesse mesmo período, uma semana após o plantio, foi feita também a inoculação com 1mL de suspensões das estirpes de *Bradyrhizobium*, que corresponde a 1×10^9 células. Para isso, elas foram cultivadas em meio 79

(FRED; WAKSMAN, 1928), também conhecido como YMA (VINCENT, 1970), semissólido por cinco dias.

Dentre as estirpes de *Bradyrhizobium* estudadas, foram selecionadas aquelas já aprovadas pelo MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2011) como inoculantes para espécies arbóreas: BR 4406 (tamboril) e estirpes de outros gêneros, como a de *Ochobactrum* BR 4101 (*Erythrina speciosa*), e a estirpe de *Burkolderia* BR 4812 (*Piptadenia stipulacea*). Além dos tratamentos inoculados com as estirpes de *Bradyrhizobium* e as estirpes inoculantes, foram utilizados dois controles sem inoculação, um contendo uma mínima quantidade de N mineral ($5,25 \text{ mg L}^{-1}$), sendo considerado apenas uma dose que contribui para o processo de fixação biológica de nitrogênio e não interferindo na nodulação, e o outro contendo $52,5 \text{ mg L}^{-1}$ de N mineral, de acordo com a solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), a $\frac{1}{4}$ de força.

Ambos os experimentos foram conduzidos por 70 dias. O experimento do angico-vermelho foi realizado no período de novembro de 2011 a janeiro de 2012, com as temperaturas mínimas e máximas entre 13 e 33 °C, de acordo com os dados do Instituto Brasileiro de Meteorologia. O experimento do tamboril foi realizado no período de setembro de 2012 a novembro de 2012, com as temperaturas entre mínimas e máximas entre 12 e 35 °C, de acordo com os dados do Instituto Brasileiro de Meteorologia. Após o período de cultivo, foram analisados: nodulação (positiva ou negativa), altura (AL), matéria seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR), eficiência relativa (ER), que é calculada pela fórmula $ER = (MSPA \text{ inoculada} / MSPA \text{ com N} \times 100)$ e relação MSR/MSPA. Os valores de MSPA e MSR foram obtidos por secagem em estufa, a 70°C, por 72 horas, período no qual se obtém o peso constante em estufa. Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o software Sisvar 5.3

(FERREIRA, 2008) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5%.

2.3 Produção de hormônio de crescimento vegetal – auxina (ácido-3-indolacético)

O delineamento estatístico utilizado foi o DIC, com três repetições. As estirpes listadas na Tabela 1 foram testadas quanto à capacidade de produzir ácido-3-indolacético (AIA), utilizando dois tipos de meio de cultura: meio 79 (FRED; WAKSMAN, 1928) e o meio Dygs (RODRIGUES-NETO; MALAVOLTA JUNIOR; VICTOR, 1986). O controle positivo utilizado foi a estirpe BR 11001, da espécie *Azospirillum brasilense*. Os isolados foram cultivados em meio líquido 79 sem a adição de azul de bromotimol e em meio Dygs líquido, por cinco dias. O número de células foi ajustado no meio 79, utilizando-se solução salina (0,85%) estéril até que o meio atingisse a turbidez equivalente à escala McFarland nº 2 (6×10^8 células). No meio Dygs, o número de células foi ajustado também se utilizando solução salina (0,85%) estéril, até atingir uma D.O. 0,5 a 600 nm, no espectrofotômetro. Esta diferença se deve à cor do meio Dygs, sendo a padronização correta deste meio possível de ser realizada somente em espectrofotômetro.

Após o ajuste do número de células do inóculo, uma alíquota de 500 μ L de solução bacteriana foi inoculada em 20 mL dos respectivos meios de cultivo, 79 e Dygs sem L-triptofano e meios 79 e Dygs suplementados com 100 mg L⁻¹ de L-triptofano) e incubados, por 72 horas, a 30 °C, sob agitação, a 112 rpm. Após este tempo, foram centrifugadas, a 13.000 rpm, por 10 minutos e, logo em seguida, retirados 3 mL do sobrenadante e colocados em tubos, adicionando-se 2 mL do reagente de Salkowski (SARWAR; KREMER, 1995). O material foi

reservado, por 30 minutos, no escuro, para o desenvolvimento da coloração rósea, indicativo da produção de AIA.

A intensidade da cor foi determinada em espectrofotômetro, a 535 nm (ASGHAR et al., 2002). A concentração do AIA foi estimada utilizando-se uma curva padrão previamente preparada com meio de cultura esterilizado não inoculado e quantidades conhecidas de AIA: 0, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g m L}^{-1}$, de acordo com a equação $y = 0,0273x + 0,292$ ($R^2 = 0,99$). Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o software Sisvar 5.3 (FERREIRA, 2008) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5%. Também foi utilizada a correlação de Pearson para avaliar se houve influência do desenvolvimento da raiz pela produção de AIA

2.4 Solubilização de fosfato de cálcio, alumínio e ferro

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com oito repetições. As estirpes foram avaliadas quanto à capacidade de solubilizar fosfato inorgânico de cálcio, alumínio e ferro. A estirpe UFLA 03-09 *Acinetobacter* sp. (MARRA et al., 2012) foi utilizada como controle positivo no fosfato de cálcio. Para a avaliação do fosfato de cálcio, foi utilizado o meio NBRIP (NAUTIYAL, 1999), com pH ajustado para 6,8. A avaliação do fosfato de alumínio foi com o meio GES (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982), com o pH ajustado para 4,5. A avaliação do fosfato de ferro foi com o meio GELP (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982), com pH ajustado para 6,8.

As estirpes foram inoculadas em meio 79, até se obterem colônias isoladas. As colônias foram suspensas em um tubo contendo 20 mL de solução salina (NaCl 0,85%) estéril, até atingir a turbidez equivalente à escala McFarland nº 2 (6×10^8 células). Vinte microlitros desta suspensão de células foram inoculados em quatro pontos equidistantes na placa, contendo os

diferentes meios de cultura. Essas placas foram incubadas e, a cada três dias, com o auxílio de um paquímetro digital, foi medido o diâmetro do halo de solubilização, no período de 15 dias. Foi obtido o índice de solubilização (IS) das estirpes e a sua capacidade de solubilização foi classificada como baixa ($IS < 2$ mm), média ($2 \leq IS < 4$ mm) e alta ($IS > 4$ mm) (BERRAQUERO; BAYA; CORMENZANA, 1976).

Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o software Sisvar 5.3 (FERREIRA, 2008) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5%.

2.5 Fixação do nitrogênio em vida livre

As estirpes foram cultivadas em meio 79 até a obtenção de colônias isoladas, as quais foram inoculadas em frascos contendo 5mL de meio semissólido LO-livre de nitrogênio (DREYFUS; GARCIA; GILLIS, 1988), para determinar a sua capacidade de fixar N_2 no estado de vida livre. A fonte de carbono original deste meio é o lactato de sódio, mas também foi utilizado o manitol como única fonte de carbono.

As estirpes utilizadas como controles positivos foram a BR5401^T (*Azorhizobium doebereinae*) (MOREIRA et al., 2006) e a ORS571^T (*A. caulinodans*) (DREYFUS; GARCIA; GILLIS, 1988). Os testes foram realizados em triplicata e os frascos foram incubados, durante 14 dias, a 28 °C. Após esse período, verificou-se se as bactérias fixaram N_2 no estado de vida livre, evidenciado pela formação de película perto da superfície do meio de cultura. Os controles positivos foram comparados com as amostras. As estirpes que formaram películas durante este período foram consideradas como tendo um crescimento positivo, enquanto aquelas que não formaram película, como tendo apresentado crescimento negativo.

3 Resultados

3.1 Nodulação e eficiência simbiótica das estirpes de *Bradyrhizobium* inoculadas em tamboril e angico-vermelho

No experimento com o tamboril e com o angico-vermelho, os tratamentos sem inoculação, um contendo N mineral e o outro contendo pequena quantidade de N mineral, não apresentaram nodulação, indicando a ausência de contaminação.

No tamboril, todos os tratamentos inoculados com as estirpes testadas foram capazes de nodular esta leguminosa. De modo geral, todas, com exceção da estirpe INPA 03-11B, foram capazes de contribuir para o desenvolvimento do tamboril (Figura 1). Os tratamentos inoculados com as estirpes INPA 54B e INPA 86A apresentaram valores significativamente mais elevados de MSPA, quando comparados às demais estirpes, incluindo a estirpe BR 4406, recomendada como inoculante dessa espécie arbórea.

As estirpes UFLA 03-144, BR 4101, UFLA 03-318, BR 4406, UFLA 03-315 e INPA 10A também se mostraram eficientes, porém, com valores inferiores ao da INPA 54B e da INPA 86A. Dentre as estirpes que apresentaram melhor resultado, três são oriundas de Minas Gerais (UFLA 03-144, UFLA 03-318, UFLA 03-315), três são da Amazônia (INPA 54B, INPA 86A, INPA 10A) e duas são recomendadas (BR 4101 e BR 4406) (Tabela 1).

Na matéria seca da raiz do tamboril, o tratamento que apresentou maior peso foi o que continha N mineral, seguido dos tratamentos inoculados com as estirpes de *Bradyrhizobium*, INPA 54B, UFLA 03-84, BTA- 1T e SEMIA 587e a estirpe de *Ochobactrum*, BR 4101.

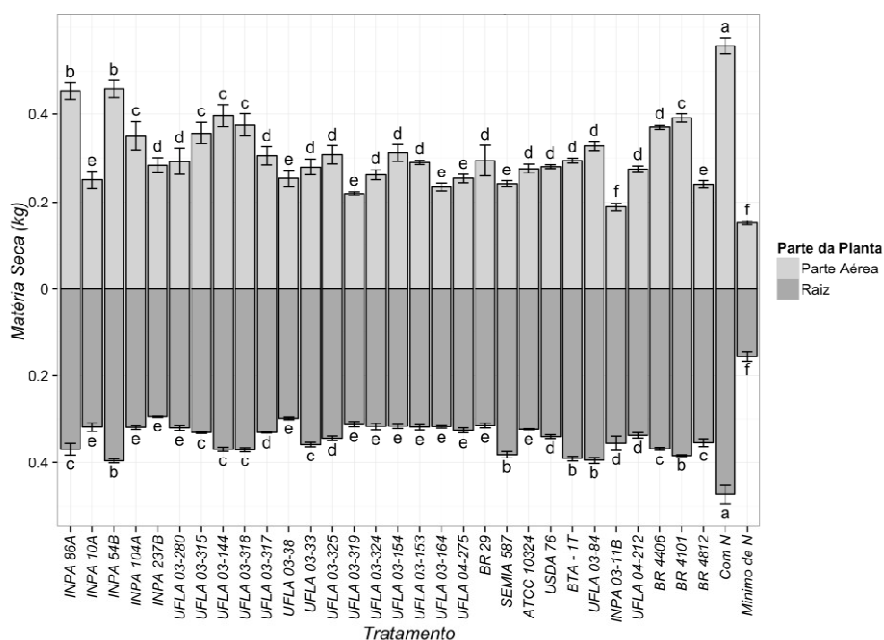


Figura 1 Matéria seca da parte aérea (MSPA) e matéria seca da raiz (MSR)(g) do tamboril com os diferentes tratamentos: com inoculação (indicada na tabela à identificação da estirpe) e os dois tratamentos sem inoculação: um contendo N mineral (com N mineral) e o outro contendo pequena quantidade de N mineral (mínimo N). *Médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. CV (%): 11,27 e CV(%): 5,22, respectivamente

Para a altura, foram observados dois grupos: um com o resultado semelhante ao do tratamento contendo N mineral (Figura 2) (INPA 54B, BR 4101, UFLA 03-318, UFLA 03-315, INPA 104A, UFLA 03-84, UFLA 03-154, UFLA 03-325, UFLA 03-317, BTA 1T, BR 29, UFLA 03-280, INPA 237B, USDA 76, ATCC 10324, UFLA 03-324, UFLA 04-275 e UFLA 03-38) e outro com o resultado semelhante ao do controle, contendo pequena quantidade de N mineral (INPA 86A, UFLA 03-144, BR 4406, UFLA 03-153, UFLA 04-212, INPA 10A, SEMIA 587, BR 4812, UFLA 03-154, UFLA 03-319 e INPA 03-11B). Analisando-se os valores de MSPA (Figura 1) e altura, verifica-se que,

apesar de algumas estirpes contribuírem para desenvolvimento da parte aérea, como INPA 86A, BR 4406 e INPA 10A, estes tratamentos não foram os que apresentaram maior altura (Figura 2).

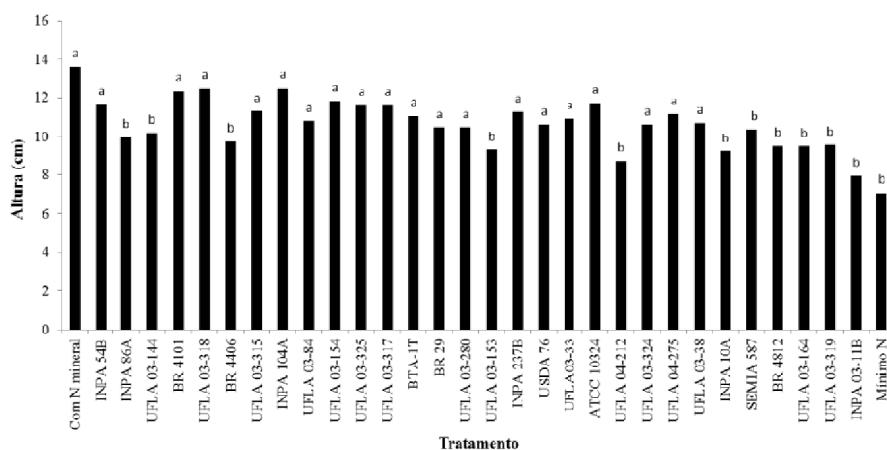


Figura 2 Altura (cm) do tamboril com os diferentes tratamentos: com inoculação (indicada na tabela a identificação da estirpe) e os dois tratamentos sem inoculação: um contendo N mineral (Com N mineral) e o outro contendo pequena quantidade de N mineral (Mínimo N). *Médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. CV (%): 13,68

Para a matéria seca total, o tratamento com N mineral apresentou o melhor resultado, tendo, entre os tratamentos inoculados, as estirpes INPA 54B e INPA 86A sido as que apresentaram os melhores resultados (Figura 3).

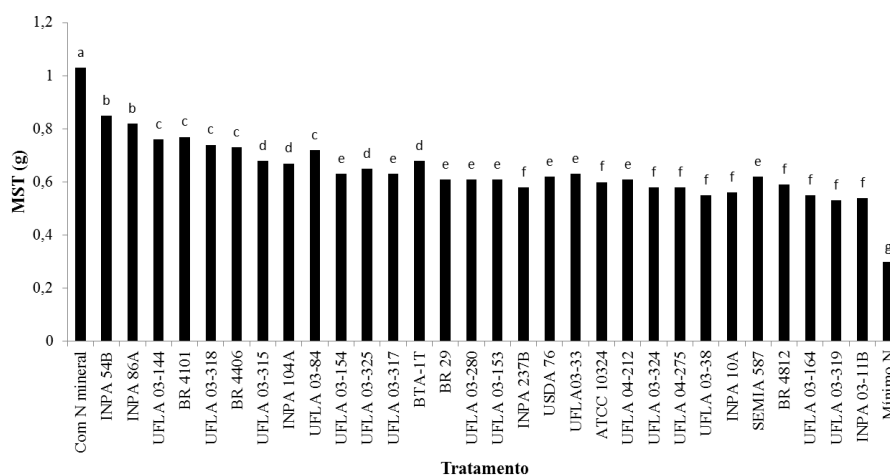


Figura 3 Matéria seca total (g) do tamboril com os diferentes tratamentos: com inoculação (indicada na tabela a identificação da estirpe) e os dois tratamentos sem inoculação: um contendo N mineral (com N mineral) e o outro contendo pequena quantidade de N mineral (mínimo N). *Médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. CV(%): 6,12

A eficiência relativa (ER) das estirpes no tamboril variou de 33,7%, na estirpe menos eficiente (INPA 03-11B), até 81,1% na INPA 86A e 89,9% na INPA 54B, que se mostraram as estirpes mais eficientes (Tabela 2).

Tabela 2 Eficiência relativa (ER) das estirpes inoculadas no tamboril

Tratamento	ER(%) ¹	Tratamento	ER(%)
Com N mineral	100 a	UFLA 03-153	51,8 d
INPA 54B	81,9 b	INPA 237B	50,7 d
INPA 86A	81,1 b	USDA 76	50,2 d
UFLA 03-144	70,8 c	UFLA 03-33	50 d
BR 4101	69,8 c	ATCC 10324	49,3 d
UFLA 03-318	67,1 c	UFLA 04-212	49,2 d
BR 4406*	66,1 c	UFLA 03-324	46,7 d
UFLA 03-315	63,7 c	UFLA 04-275	45,2 e
INPA 104A	62,5 c	UFLA 03-38	45,1 e
UFLA 03-84	58,3 d	INPA 10A	44,6 e
UFLA 03-154	55,6 d	SEMIA 587	43,0 e
UFLA 03-325	54,9 d	BR 4812	42,8 e
UFLA 03-317	54,5 d	UFLA 03-164	41,7 e
BTA-1T	52,5 d	UFLA 03-319	39,1 e
BR 29	52,5 d	INPA03-11B	33,7 f
UFLA 03-280	52,2 d	Sem N mineral	27,14 f

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade; ¹ER= MSPA inoculada/MSPA com N x 100; * estirpe recomendada como inoculante dessa espécie. CV(%): 11, 04

Os resultados obtidos pela relação matéria seca da parte aérea/matéria seca da raiz mostram que esta relação é alta nos isolados INPA 54B e INPA 86A, se assemelhando ao tratamento com N (Figura 4).

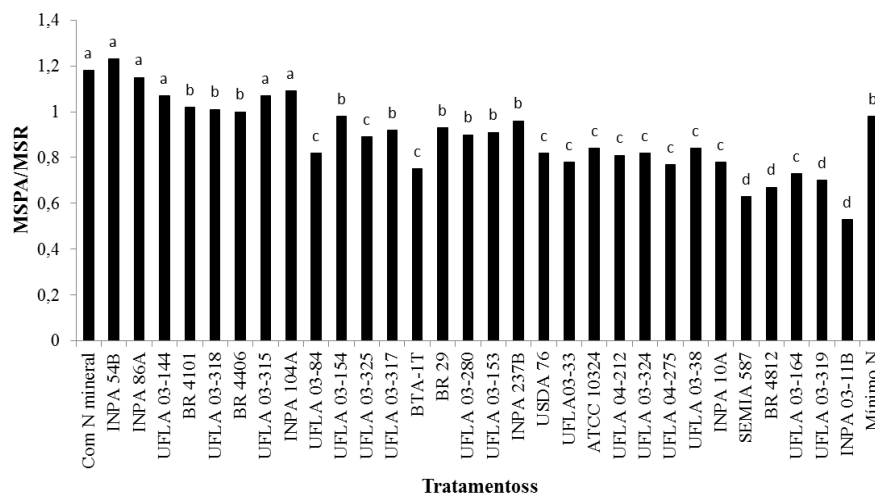


Figura 4 Matéria seca da parte aérea/matéria seca da raiz do tamboril com os diferentes tratamentos: com inoculação (indicado na tabela à identificação da estirpe) e os dois tratamentos sem inoculação: um contendo N mineral (Com N mineral) e o outro contendo pequena quantidade de N mineral (Mínimo N). *Médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. CV(%): 20,14

De acordo com os resultados apresentados, as estirpes INPA 54B e INPA 86A, isoladas da região Amazônica, foram as que apresentaram os melhores resultados, em todas as variáveis analisadas no tamboril. Foram observadas estirpes que apresentaram maior potencial de fixar nitrogênio para esta espécie arbórea em relação à estirpe BR 4406, recomendada pela Embrapa Agrobiologia como inoculante do tamboril.

Todas as estirpes testadas foram capazes de nodular o angico-vermelho. Para os valores de MSPA desta espécie, observa-se que 13 estirpes foram igualmente eficientes ao tratamento contendo N mineral (Figura 5). O tratamento contendo pequena quantidade de N mineral foi o que apresentou menor valor de MSPA, de forma que a inoculação com todas as estirpes estudadas foi capaz de contribuir para o desenvolvimento desta leguminosa.

Em relação aos valores de MSR, os tratamentos inoculados com as estirpes USDA 76, UFLA 03-325, BR 4406, BR 4101, BTA 1T, UFLA 03-38 e UFLA 03-317 proporcionaram valores de MSR semelhantes aos do tratamento contendo N mineral (Figura 5). As estirpes INPA 237 B, INPA 86A, UFLA 03-315 e UFLA 03-144 apresentaram resultado semelhante ao do tratamento contendo pequena quantidade de N mineral.

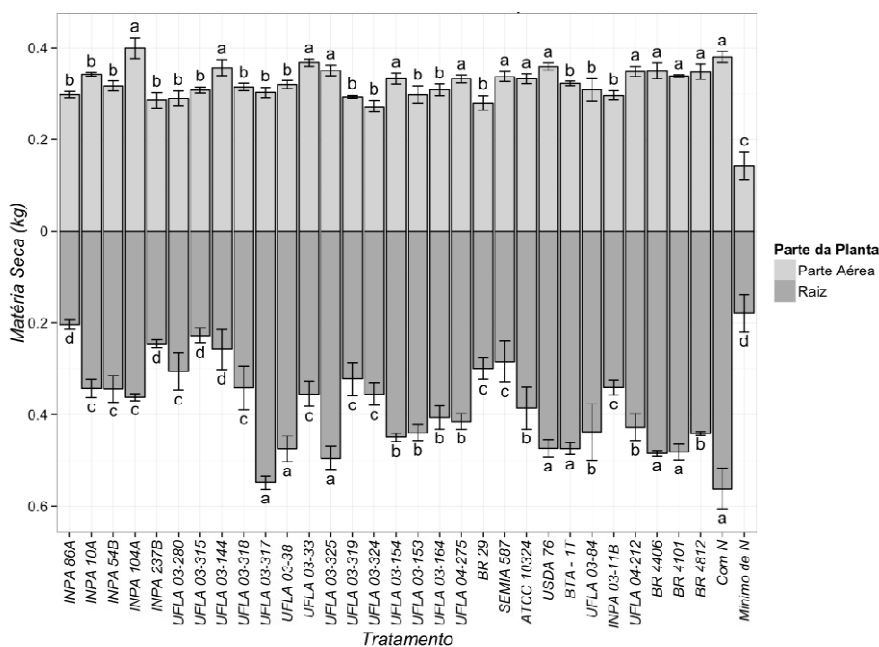


Figura 5 Matéria seca da parte aérea e matéria seca da raiz (MSR) (g) do angico-vermelho com os diferentes tratamentos: com inoculação (indicada na tabela a identificação da estirpe) e os dois tratamentos sem inoculação: um contendo N mineral (com N mineral) e o outro contendo pequena quantidade de N mineral (mínimo N). *Médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. CV(%): 12,28 e CV(%): 16,84, respectivamente

As estirpes INPA 104A, UFLA 03-33, BR 4406, SEMIA 587, UFLA 03-154, UFLA 04-275, INPA 54B e INPA 10A mostraram a altura similar à do controle com N mineral (Figura 6).

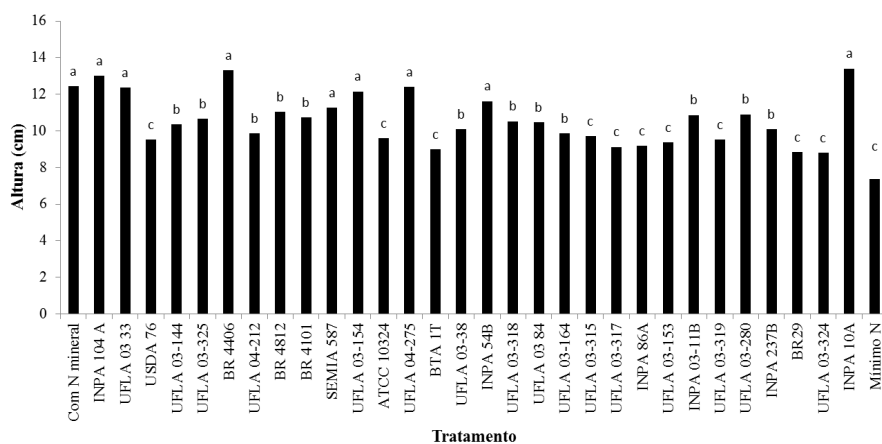


Figura 6 Altura (cm) do angico-vermelho com os diferentes tratamentos: com inoculação (indicada na tabela a identificação da estirpe) e os dois tratamentos sem inoculação: um contendo N mineral (com N mineral) e o outro contendo pequena quantidade de N mineral (mínimo N). *Médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. CV(%): 6,63

Na matéria seca total, as estirpes USDA 76, UFLA 03-325, BR 4406, BR 4101 e UFLA 03-317 apresentaram resultados semelhantes ao do controle com N mineral (Figura 7).

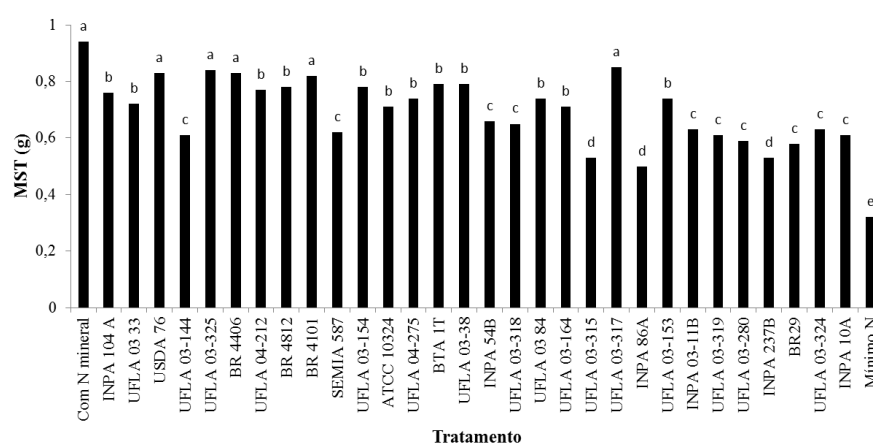


Figura 7 Matéria seca (g) total do angico-vermelho com os diferentes tratamentos: com inoculação (indicada na tabela a identificação da estirpe) e os dois tratamentos sem inoculação: um contendo N mineral (com N mineral) e o outro contendo pequena quantidade de N mineral (mínimo N). *Médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. CV(%): 10,06

No angico-vermelho, a eficiência relativa das estirpes se mostrou alta, entre 70,2% da INPA 10A até 100%, apresentado pela estirpe INPA 104A, se mostrando igualmente eficiente ao controle com N mineral (Tabela 3). As estirpes INPA 104A, UFLA 03-33, USDA 76, UFLA 03-144, UFLA 03-325, BR 4406, UFLA 04-212, BR 4812, BR 4101, SEMIA 587, UFLA 03-154, ATCC 10324 e UFLA 04-275 não diferiram estatisticamente do tratamento contendo N mineral.

Tabela 3 Eficiência relativa (ER) das estirpes inoculadas no angico-vermelho

Tratamento	ER(%) ¹	Tratamento	ER(%)
Com N mineral	100 a	INPA 54B	83,9 b
INPA 104A	100 a	UFLA 03-318	82,6 b
UFLA 03 33	96,8 a	UFLA 03-84	81,1 b
USDA 76	94,6 a	UFLA 03-164	81,1 b
UFLA 03-144	93,9 a	UFLA 03-315	80,9 b
UFLA 03-325	92,3 a	UFLA 03-317	79,6 b
BR 4406	91,9 a	INPA 86A	78,9 b
UFLA 04-212	91,7 a	UFLA 03-153	78,4 b
BR 4812	91,4 a	INPA 03 11B	77,9 b
BR 4101	89,0 a	UFLA 03-319	77,2 b
SEMIA 587	88,6 a	UFLA 03-280	76,3 b
UFLA 03-154	87,5 a	INPA 237B	75,2 b
ATCC 10324	87,4 a	BR 29	73,6 b
UFLA 04-275	87,3 a	UFLA 03-324	71,7 b
BTA 1T	84,6 b	INPA 10A	70,2 b
UFLA 03-38	83,9 b	Sem N mineral	37,2 c

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade; ¹ER= MSPA inoculada/MSPA com N x 100. CV(%): 12,14

Na relação matéria seca da parte aérea/matéria seca da raiz, as estirpes UFLA 03-144, UFLA 03-315 e INPA 86A foram as que obtiveram os melhores valores (Figura 8).

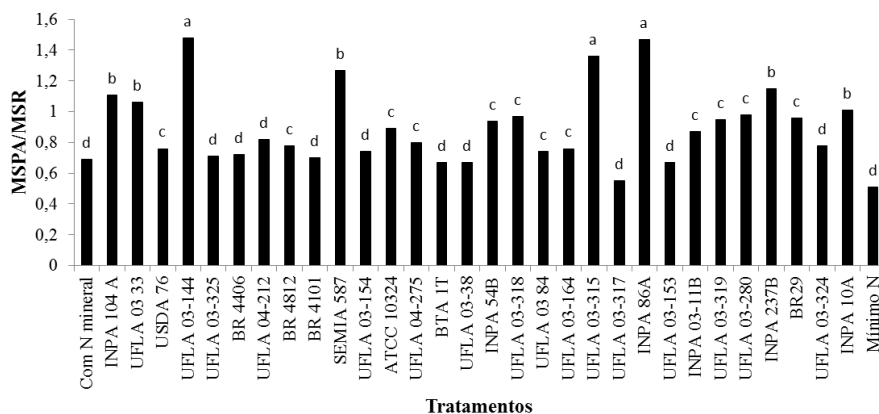


Figura 8 Matéria seca da parte aérea/matéria seca da raiz do angico-vermelho com os diferentes tratamentos: com inoculação (indicada na tabela a identificação da estirpe) e os dois tratamentos sem inoculação: um contendo N mineral (com N mineral) e o outro contendo pequena quantidade de N mineral (mínimo N). *Colunas seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. CV(%): 20,14

De acordo com os resultados apresentados, as estirpes USDA 76, UFLA 03-325, INPA 104 A, UFLA 03-33, UFLA03-144, UFLA 04-212, SEMIA 587, UFLA 03-154, ATCC 10324 e UFLA 04-275 e as estirpes recomendadas para espécies arbóreas, BR 4101, BR 4812 e BR 4406, foram as mais eficientes, em todas as variáveis analisadas no angico-vermelho.

3.2 Produção de hormônio de crescimento vegetal – auxina (ácido-3-indolacético)

Conforme apresentado na Tabela 4, dentre as 30 estirpes testadas quanto à produção do fito-hormônio AIA, apenas 13 apresentaram este potencial. Em meio Dygs com triptofano, apenas as estirpes INPA 54B, BR 29 e UFLA 04-212 se mostraram capazes de produzir AIA. Já em meio 79 com triptofano, as

estirpes UFLA 03-315, UFLA 03-317, UFLA 03-153, UFLA 03-324, INPA 03-111B, UFLA 03-38, BR 29, USDA 76 e BR 4101 se mostraram capazes de produzir AIA. Em meio Dygs sem triptofano, apenas o controle *Azospirillum brasilense*, BR11001, produziu AIA. Em meio 79 sem triptofano não foi observada produção de AIA pelas estirpes estudadas.

Dentre as estirpes que produziram AIA, UFLA 03-315, UFLA 03-318, UFLA 03-33, BR 4101, INPA 54B, UFLA 03-11B, USDA 76 e UFLA 03-317, quando inoculadas no tamboril, proporcionaram os maiores valores de MSR. No angico-vermelho, as estirpes que proporcionaram maiores valores de MSR foram UFLA 03-38, UFLA 03-317, USDA 76, INPA 54B e UFLA 03-153.

A correlação de Pearson foi negativa entre o desenvolvimento da raiz e a produção de AIA pelas estirpes no tamboril ($r = - 0,03$) e não foi significativa no angico-vermelho ($r = 0,04$).

Tabela 4 Produção de AIA ($\mu\text{g ml}^{-1}$) pelas estirpes

Estirpes	AIA($\mu\text{g ml}^{-1}$)
Meio 79 com triptofano	
UFLA03-38	0,1 a
UFLA 03-315	0,15 a
UFLA 03-318	0,65 b
BR29	1,15 c
UFLA03-33	1,25 c
UFLA 03-317	1,8 d
UFLA 03-153	2,05 e
USDA 76	2,13 e
INPA03-11B	2,36 f
BR4101	3,2 g
UFLA 03-324	3,86 h
BR11001*	4,86 i
Meio Dygs sem triptofano	
BR11001*	7,81
Meio Dygs com triptofano	
INPA54B	3,62 a
UFLA 04-212	3,79 a
BR29	8,4 a
BR11001*	10,16 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade; *Controle positivo. Meio 79 com triptofano CV(%): 5,0; Meio Dygs com triptofano CV(%): 5,84

3.3 Solubilização de fosfato de cálcio, alumínio e ferro

No meio para teste de solubilização de fosfato de ferro (P-Fe), todas as estirpes cresceram, mas não apresentaram halo de solubilização e, no meio de solubilização de fosfato de alumínio (P-Al), nenhuma estirpe cresceu. Já no meio para teste de solubilização de fosfato de cálcio (P-Ca), 17 das estirpes testadas foram capazes de solubilizar o fosfato, como mostrado na Tabela 5. O índice de solubilização destas estirpes se mostrou baixo nas estirpes INPA 10A, INPA 237A, UFLA 03-144, UFLA 03-154, UFLA 03-153, ATCC 10324,

USDA 76, BR 4406 e BR 4101 e médio nas estirpes INPA 104A, UFLA 03-318, UFLA 03-164, BR 29, UFLA 03-11B, UFLA 04-212, BR 4812 e UFLA 03-09, sendo esta última a estirpe utilizada como controle positivo para a solubilização de fosfato.

Tabela 5 Índice de solubilização (IS) do fosfato de cálcio $[Ca_3(PO_4)_2]$ das estirpes

Estirpes	P-Ca		Estirpes	P-Ca	
	IS			IS	
INPA 86A	CNS ^(a)		UFLA 03-154	1,2	
INPA 10A	1,34 ^(b)		UFLA 03-153	1,53	
INPA 54B	CNS		UFLA 03-164	3,06	
INPA 104A	2,85		UFLA 04-275	NC ^(c)	
INPA 237B	1,67		BR 29	2,02	
UFLA 03-280	CNS		SEMIA 587	CNS	
UFLA 03-315	CNS		ATCC 10324	1,34	
UFLA 03-144	1,99		USDA 76	0,49	
UFLA 03-318	3,31		BTA - 1T	CNS	
UFLA 03-317	3,31		UFLA 03-84	3,24	
UFLA 03-33	CNS		INPA 03-11B	CNS	
UFLA 03-38	CNS		UFLA 04-212	2,05	
UFLA 03-325	CNS		BR 4406	1,28	
UFLA 03-319	CNS		BR 4101	1,12	
UFLA 03-326	CNS		BR 4812	2,08	
UFLA 03-09 ^(e)	2,63				

^(a)CNS = cresceu e não solubilizou; ^(b) IS= diâmetro do halo(mm)/diâmetro da colônia(mm), avaliados no 15º dia de incubação; ^(c)NC= não cresceu; ^(e) Controle positivo. CV(%): 6,5

3.4 Fixação do nitrogênio em vida livre

Em relação à fixação de nitrogênio em vida livre, apenas as estirpes utilizadas como controle, BR 5401 (*A. doebereineriae*) e ORS 571 (*A. caulinodans*) e a estirpe de *Bradyrhizobium* SEMIA 587 foram capazes de fixar

o nitrogênio em vida livre, quando a fonte de carbono foi o lactato. As outras estirpes não foram capazes de fixar nitrogênio em vida livre com lactato ou manitol como fonte de carbono.

4 Discussão

A nodulação do tamboril e do angico-vermelho com estirpes de *Bradyrhizobium* é relatada na literatura (BARBERI et al., 1998; TRANNIN; MOREIRA; SIQUEIRA, 2001; SANTOS et al., 2008). Para tamboril, a estirpe recomendada como inoculante é a BR4406, da espécie *B. elkani*. Já para o angico-vermelho, as estirpes recomendadas são de *Burkholderia tropica*, BR 9001e BR 9004 (MOREIRA et al., 2010).

Devido ao potencial de utilização destas espécies em reflorestamento, estudos visando selecionar estirpes mais eficientes têm sido constantemente desenvolvidos. No presente trabalho, o tamboril estabeleceu simbiose com todas as estirpes testadas, tendo as estirpes INPA 54B e INPA 86A proporcionado maior desenvolvimento da parte aérea, quando comparadas com a estirpe inoculante (BR 4406) e as demais estudadas. Estes resultados concordam com o de outros autores, que verificaram que esta leguminosa estabelece simbiose com diferentes estirpes de rizóbios, as quais apresentam grande variabilidade em relação à capacidade de fornecer N para o desenvolvimento do tamboril (MOREIRA et al., 2012).

Trannin, Moreira e Siqueira (2001) também observaram que a estirpe BR 4406 é eficiente na nodulação com o tamboril, porém, outras estirpes podem apresentar resultados semelhantes ou até superiores. Estes resultados mostram a necessidade de estudos visando à seleção de estirpes inoculantes para espécies arbóreas, como o tamboril. É importante ressaltar, ainda, que a eficiência da

simbiose entre rizóbio e leguminosa pode ser influenciada de acordo com as condições edafoclimáticas, não avaliadas neste estudo.

Em relação à simbiose das estirpes de *Bradyrhizobium* com o angico-vermelho, verificou-se que todas as estirpes testadas foram capazes de nodular com esta espécie e mostraram alta eficiência na simbiose. Chaves, Carneiro e Barroso(2006), ao avaliarem a produção de mudas de angico-vermelho, em casa de vegetação, verificaram que a inoculação da estirpe BR 9001 forneceu o N necessário para o desenvolvimento da planta, não sendo necessária a adição de N na forma de sulfato de amônio e nitrato de amônio. Entretanto, estirpes de *Bradyrhizobium* também podem nodular com esta espécie arbórea e contribuir para o desenvolvimento vegetal, igualmente ao tratamento com N mineral, como mostrado no presente estudo.

A simbiose entre angico-vermelho e *Bradyrhizobium* é relatada por outros autores, como Santos et al. (2008), em cujo trabalho a inoculação da estirpe nativa de *Bradyrhizobium*I-290 forneceu o N necessário para o desenvolvimento e o crescimento de mudas desta leguminosa. No presente estudo, as estirpes USDA 76, UFLA 03-325, INPA 104A, UFLA 03-33, UFLA03-144, UFLA 04-212, SEMIA 587, UFLA 03-154, ATCC 10324 e UFLA 04-275 e as estirpes recomendadas para espécies arbóreas, BR 4101, BR 4812 e BR 4406 proporcionaram um bom desenvolvimento da planta, indicando a necessidade de estudos futuros visando à utilização desta estirpe como inoculante para esta espécie.

A relação MSPA/MSR, segundo Birchler et al. (1998), em mudas de *Pinus halepensis*, deve ter um valor menor que 2, sendo este valor aplicado na maioria das espécies. No tamboril, pode-se observar que todos os tratamentos apresentaram esta relação abaixo de 2, tendo o tratamento com N e as estirpes INPA 54B, INPA 86A sido as que apresentaram a maior relação. No angico-vermelho, todos os tratamentos também se mostraram abaixo de 2. Estes

resultados mostram que todas as estirpes contribuíram para o desenvolvimento equilibrado da parte aérea e da raiz.

Foi demonstrado, em estudos, que a inoculação com estirpes de rizóbios em espécies arbóreas é importante não apenas no desenvolvimento inicial realizado em viveiros, mas também após a sua transferência para o campo. Galiana et al. (1998) observaram que a inoculação de *Bradyrhizobium* teve efeito positivo no crescimento de *Acacia mangium* até três anos depois do plantio da árvore. Ao avaliar *Dalbergia nigra* após doze meses de cultivo em solo de Mata Atlântica e solo de eucalipto, verificou-se que as mudas inoculadas com *Bradyrhizobium* apresentaram desenvolvimento semelhante ao de mudas que receberam N (SANTIAGO; GARCIA; SCOTTI, 2002).

Algumas das estirpes de *Bradyrhizobium* estudadas também apresentaram capacidade de atuar como BPCV, o que pode ser evidenciado, principalmente, por meio da produção de AIA.

As estirpes testadas quanto à capacidade de produzir AIA só conseguiram produzir este fito-hormônio quando adicionado o precursor triptofano, indicando que as estirpes produzem o AIA pela via dependente de triptofano, que pode ser a via do ácido indole-3-acetamida (IAM) e a via do ácido indole-3-piruvato (IpyA) (PRINSEN et al., 1993). Já controle BR 11001 tem a capacidade de produzir este hormônio pela via não dependente de triptofano, já relatada por Prinsen et al. (1993), ao estudarem as estirpes SpF94 e SpM 7918 de *Azospirillum brasilense*.

Foi demonstrado que a produção de AIA contribui para o desenvolvimento da raiz da planta (DOBBELAERE et al., 1999). Porém, no presente trabalho, não foi observada esta correlação entre crescimento da raiz do tamboril e do angico-vermelho e produção de AIA pelas estirpes. O maior desenvolvimento do sistema radicular na produção de mudas de espécies

leguminosas favorece a maior aquisição de nutrientes e resistência à seca por estas plantas no campo.

Chagas-Junior, Oliveira e Oliviera (2009) observaram que os isolados de rizóbio da região Amazônica foram capazes de produzir AIA com ou sem a adição de triptofano, destacando 38 isolados com produção acima de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Destas, cinco apresentam características culturais de *Bradyrhizobium*. No presente estudo, das dez estirpes oriundas da região amazônica, somente quatro produziram AIA: UFLA 54B, UFLA 03-315, UFLA 03-318 e UFLA 03-317, tendo a primeira sido a que apresentou a maior concentração de AIA, $3,62 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Quando produzido em altas concentrações, o AIA pode ter efeito contrário, ou seja, inibir o crescimento da planta. Boiero et al. (2007) observaram que três estirpes de *B. japonicum*, E109, USDA 110 e SEMIA 5080, se mostraram com potencial para auxiliar no crescimento da planta pela produção de AIA, sendo a produção destas estirpes de $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,82 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,7 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Portanto, a maioria das estirpes do presente trabalho produziu AIA entre $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (UFLA 03-08) e $3,86 \mu\text{g mL}^{-1}$ (UFLA 03-324); apenas a estirpe BR 29 teve uma produção mais elevada, de $8,4 \mu\text{g mL}^{-1}$, podendo contribuir para o crescimento vegetal das espécies estudadas.

A solubilização em meio de fosfato de cálcio, o crescimento no meio P-Fe e o não crescimento no P-Al corroboramos resultados de estudos de outros autores, nos quais a maioria dos microrganismos solubiliza P ligado ao cálcio e somente poucos conseguem solubilizar o P ligado ao alumínio e ao ferro (SOUCHIE et al., 2005a; SILVA-FILHO; VIDOR, 2000; MARRA et al., 2012). Na literatura encontra-se associação entre o não crescimento dos solubilizadores em meio com o P-Al, devido ao fato de este não ser um elemento necessário para o crescimento dos microrganismos, ao contrário do ferro, que é um

micronutriente requerido para o crescimento dos organismos, justificando o crescimento destes microrganismos no meio de P-Fe.

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). Não foi observada correlação entre o local de origem da estirpe com a sua capacidade de solubilização.

Estudo de Souchies et al. (2005b) mostram que o uso de estirpes solubilizadoras de fosfato, BR 9001 e BR 9004, pode exercer efeito benéfico sobre a formação de mudas de angico-vermelho. Entretanto, nesse mesmo estudo foi observado que a inoculação destas bactérias, BR 4407 e BR 6205, inibiu o desenvolvimento do tamboril, o que pode ter ocorrido devido a algum tipo de incompatibilidade entre a bactéria solubilizadora e a planta ou entre os microrganismos da rizosfera da planta (SOUCHIES et al., 2005b). Dessa forma, estudos envolvendo a inoculação de bactérias solubilizadoras e produtoras de AIA apresentam potencial de utilização, no entanto, são necessárias novas pesquisas.

Os dados obtidos com a fixação de nitrogênio em vida livre corroboram os de Oliveira (2009), segundo o qual as estirpes de *Bradyrhizobium* UFLA 03-84, INPA 03-11B, UFLA 03-164, UFLA 04-0321, UFLA 03-162, UFLA 03-172, UFLA 03-163 e 88C3 foram testadas quanto à capacidade de fixar nitrogênio em vida livre e nenhuma formou película no meio LO. UFLA 03-84, INPA 03-11B, e UFLA 03-164 obtiveram o mesmo resultado no presente estudo. A SEMIA 587 é uma estirpe de *B. elkanii* recomendada pelo MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2011) como inoculante da soja (*Glycinemax* L.), mas não existem trabalhos afirmando que ela é capaz de fixar nitrogênio em vida livre.

5 Conclusão

Dentre as estirpes de *Bradyrhizobium* avaliadas, todas foram capazes de nodular com o tamboril, sendo INPA 54B e INPA 86A as mais eficientes na nodulação com essa planta. No angico-vermelho, todas as estirpes testadas também nodularam, sendo as estirpes de *Bradyrhizobium* USDA 76, UFLA 03-325, INPA 104A, UFLA 03-33, UFLA03-144, UFLA 04-212, SEMIA 587, UFLA 03-154, ATCC 10324, UFLA 04-275 e a BR 4406, as mais eficientes na simbiose essa planta. As estirpes recomendadas para espécie florestal, a de *Ochobactrum* spp., BR 4101, e a de *Burkholderia* spp., BR 4812, também foram eficientes na simbiose com o angico-vermelho.

Nos testes *in vitro*, observou-se que 13 estirpes foram capazes de produzir o AIA na presença de triptofano. As estirpes não apresentaram capacidade de solubilizar fosfato de ferro e alumínio e, no meio de fosfato de cálcio, 17 delas foram capazes de solubilizar o fósforo em meio sólido. Apenas a estirpe SEMIA 587 se mostrou como fixadora de nitrogênio em vida livre. Para a aplicação destas estirpes eficientes na simbiose e promotoras de crescimento vegetal, é necessária a realização de estudos em vasos com solo e em campo.

Referências

- ANTOUN, H. N. et al. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v.204, p.57-67, 1998.
- ASGHAR, H. N. et al. Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 35, n. 4, p. 231-237, Apr. 2002.
- BARBERI, A. et al. Nodulação em leguminosas florestais em viveiros no sul de Minas Gerais. **Cerne**, Lavras, v. 4, n. 1, p. 145-153, jan./mar. 1998.

BERRAQUERO, F. R.; BAYA, A. M.; CORMENZANA, A. R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **ArsPharmacéutica**, Granada, v. 17, n. 4, p. 399-406, Apr. 1976.

BIRCHLER, T. et al. La planta ideal: revisión del concepto, parámetros de finitorios e implementación práctica. **Investigación Agraria, Sistemas y Recursos Forestales**, Madrid, v. 7, n. 1-2, p. 109-121, 1998.

BOIERO, L. et al. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. **Applied microbiology and biotechnology**, Berlin, v. 74, n. 4, p. 874-880, 2007.

CARVALHO, F. de. **Abundância de espécies de plantas e diversidade de simbiontes radiculares em campos rupestres da Serra do Cipó, MG**. 2010. 121 f. Tese (Doutorado em Ecologia Conservação e Manejo da Vida Silvestre) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CHAGAS-JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A. de; OLIVIERA, A. N. O. de. Produção de ácido indolacético por rizóbios isolados de caupi. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 56, n. 6, p. 812-817, nov./dez. 2009.

CHAVES, L. L. B.; CARNEIRO, J. G. A.; BARROSO, D. G. Crescimento de mudas de *Anadenanthera macrocarpa* (benth) brenan (angico -vermelho) em substrato fertilizado e inoculado com rizóbio. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, n. 6, p. 911-919, nov./dez. 2006.

DAVIDE, A. C.; FARIA, J. M. R.; BOTELHO, S. A. **Propagação de espécies florestais**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1995.

DOBBELAERE, S. et al. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 212, p. 155-164, 1999.

DREYFUS, B.; GARCIA, J. L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. Nov., a stem-nodulating Nitrogen-Fixing Bacterium Isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 38, n. 1, p. 89-98, Jan. 1988.

FARIA, S. M. de. **Obtenção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies florestais (Aproximação 1997)**. Seropédica: EMBRAPA, 1997. (Recomendação Técnica, 1).

FERREIRA, D. F. SISVAR: a program for statistical analysis and teaching. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, n. 2, p. 36–41, jul./dez. 2008.

FLORENTINO, L. A. et al. Diversity and efficiency of *Bradyrhizobium* strains isolated from soil samples collected from around *Sesbania virgata* roots using cowpea as trap species. **Revista Brasileira Ciência Solo**, Viçosa, v. 34, n. 4, p. 1113-1123, jul./ago. 2010.

FRANCO, A. A. et al. Uso de leguminosas florestais noduladas e micorrizadas como agentes de recuperação e manutenção da vida do solo: um modelo tecnológico. In: FISCHER, E.; CARVALHO, L. F. A. V.; CUNHA, N. L. da. (Ed.). **Oecologia Brasiliensis**: volume 1: estruturas, funcionamento e manejo de ecossistemas brasileiros. Rio de Janeiro: Creative Commons Attribution, 1995. p. 459-467.

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

GALIANA, A. et al. Improvement of nitrogen fixation in *Acacia mangium* through inoculation with rhizobium. **Agroforestry System**, Dordrecht, v.40, n. 3, p. 297–307, 1998.

GUIMARÃES, A. A. et al. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the western Amazon by using cowpea as the trap plant. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 18, p. 6726–6733, Aug. 2012.

HOAGLAND, D. A.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: California Agriculture Exp. Station, 1950.

JORDAN, D. C. *Rhizobiaceae* Conn. 1938. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. D. BERGEYS'S. **Manual of systematic bacteriology**. London: Willians and Wilkins, 1984. p. 234-244.

KUYKENDALL, L. et al. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* a proposal for *Bradyrhizobium elkanni* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**. Ottawa, v. 38, n. 6, p. 501-505, Aug. 1992.

LACERDA, D. A. M.; FIGUEIREDO, P. S. Restauração de matas ciliares do rio Mearim no município de Barra do Corda- MA: seleção de espécies e comparação de metodologias de reflorestamento. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 39, n. 2, p. 295-304, 2009.

LUCY, M.; REED, E.; GLICK, B. R. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 86, n. 2, p. 1-25, Aug.2004.

MARRA, L., M. et al. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 357, p. 289-307, 2012.

MELLONI, R. et al. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) walp] e feijoeiro (*Phaseolu vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 30, n. 5, p. 235-246, set./out. 2006.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instituição Normativa nº 13, de 24 de Março de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, 25 mar. 2011.

MOREIRA, F. M. S. et al. *Azorhizobium doebereinae* sp Nov. microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.). Pers. **Systematic and Applied Microbiolgy**, v. 29, n. 2, p. 197-206, 2006.

MOREIRA, F. M. S. et al. Bactérias fixadoras de N₂ e fungos micorrízicos arbusculares em espécies florestais: avanços e aplicações biotecnológicas. In: MERGULÃO, A. C. do E. S. et al. **Biotecnologia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais**. Brasília. Embrapa, 2010.

MOREIRA, F. M. S. et al. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, New York, v. 16, n. 1, p. 135–146, Apr. 1993.

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

MOREIRA, F. M. S.; HAUKKA, K.; YOUNG, J. P. W. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. **Molecular Ecology**, Amsterdam, v. 7, n. 7, p. 889–895, July 1998.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2006.

MOREIRA, F. T. A. et al. Obtenção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação de nitrogênio em tamboril (*Enterolobium contortisiliquum* (vell.) morong) (Fabaceae). **HOLOS**, Natal, v. 28, n. 4, p. 69-79, set. 2012.

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

OLIVEIRA, S. M. de. **Processos promotores de crescimento vegetal por bactérias diazotróficas de vida livre ou simbióticas de feijão comum, caupi e siratro**. 2009. 66 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PERES, J. R. R. et al. Eficiência e competitividade de estirpes de rizóbio para soja em solo de Cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 17, n. 6, p. 357-363, nov./dez. 1993.

PRINCEN, E. et al. *Azospirillum brasilense* Indol-3-Acetic Acid Biosynthesis: Evidence for a Non-Tryptophan Dependent Pathway. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 6, n. 5, p. 609-615, 1993.

RODRIGUES-NETO, J.; MALAVOLTA JUNIOR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. Citri Tipo B. Summa. **Phytopatologica**, Botucatu, v. 12, n. 1-2, p. 16, 1986.

SANTIAGO, J. M.; GARCIA, Q.; SCOTTI, M. R. Effect of post-planting inoculation with *Bradyrhizobium* sp and mycorrhizal fungi on the growth of Brazilian rosewood, *Dalbergia nigra* Allem. ex Benth., in two tropical soils. **New Forests**, Amsterdam v. 24, n. 1, p. 15-25, 2002.

SANTOS, D. R. dos et al. Micorriza e rizóbio no crescimento e nutrição em n e p de mudas de angico-vermelho. **Caatinga**, Mossoró, v. 21, n. 1, p. 76-82, Jan. 2008.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 172, p. 261-269, 1995.

SILVA, R. F. da et al. Comportamento de *Peltophorum dubium* (Spreng.)Taub., *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan e *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong cultivadas em solo contaminado com cobre. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 1, p. 103-110, jan./mar. 2011.

- SILVA-FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fostatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 24, n. 3, p.311-319, mar./abr. 2000.
- SOARES, A. L. L. et al. Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em perdões (MG). I caupi. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 30 n. 5, p. 803-811, set./out. 2006.
- SOUCHIE, E. L. et al. Arborização de pastagem na região da Mata Atlântica. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 12, n. 2, p. 22-27, fev. 2006.
- SOUCHIE, E. L. et al. Mudanças de espécies arbóreas inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares. **Floresta**, Curitiba, v. 35, n. 2, p. 329-334, maio/ago 2005b.
- SOUCHIE, E. L. et al. 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. 2005a.
- SYLVESTER-BRADLEY, R. et al. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfato na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 1, n. 12, p. 15-22, 1982.
- TRANNIN, I. C. B.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Crescimento e nodulação de *Acacia mangium*, *Enterolobium contortisiliquum* e *Sesbania virgata* em solo contaminado com metais pesados. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 25, n. 5, p. 743-753, set./out. 2001.
- VERSSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 255, p. 571-586, 2003.
- VINCENT, J. M. A. **Manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970.
- VINUESSA, P. et al. *Bradyrhizobium canariense* sp nov., and acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionidae: Genistaceae) from the Canary Islands. Along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. Genistearum, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, n. 2, p. 569-575, 2005.