



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL**

JOEL QUINTINO DE OLIVEIRA JÚNIOR

SELEÇÃO DE ESTIRPES EFICIENTES PARA LEGUMINOSAS FLORESTAIS

**Pesquisador Sergio Miana de Faria
Orientador**

**SEROPÉDICA, RJ
Julho- 2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL**

JOEL QUINTINO DE OLIVEIRA JÚNIOR

SELEÇÃO DE ESTIRPES EFICIENTES PARA LEGUMINOSAS FLORESTAIS

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Florestal, como requisito para a obtenção do título de Engenheiro Florestal, Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

SERGIO MIANA DE FARIA

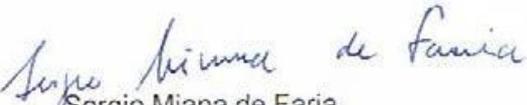
Orientador

**SEROPÉDICA, RJ
Julho - 2011**

SELEÇÃO DE ESTIRPES EFICIENTES PARA LEGUMINOSAS FLORESTAIS

Comissão Examinadora:

Monografia aprovada em 4 de julho de 2011


Sergio Miana de Faria
Pesquisador-Embrapa Agrobiologia
(orientador)


Alexander Silva de Resende
Pesquisador-Embrapa Agrobiologia
Membro


Michele Aparecida Pereira da Silva
Doutoranda Embrapa Agrobiologia
Membro

DEDICATÓRIA

*Primeiramente a Deus pela grande benção, a minha família pelo grande apoio e suporte
para a realização desse grande sonho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, pelo imenso apoio para a conclusão do curso de Engenharia Florestal, especialmente aos meus pais Joel e Alcidia que possibilitaram a realização deste sonho, aos meus irmãos João Carlos e Adrielle Cardoso pelo carinho e compreensão nos momentos de necessidade.

Especialmente a minha noiva Ana Paula pelo grande carinho e incentivo em todos os momentos, pela grande amizade, companheirismo compartilhados diariamente durante todo o curso.

À Embrapa Agrobiologia pela oportunidade de aprofundar meus conhecimentos.

Ao pesquisador Sergio Miana de Faria pela orientação e oportunidade de iniciação científica;

Aos membros da banca pelo tempo e atenção disponibilizados.

À família do laboratório de Leguminosas da Embrapa Agrobiologia: Telmo Félix, Carlos Fernando da Cunha e Adriana Santos do Nascimento pelo grande apoio, e alegria contagiante no horário de trabalho.

Aos estagiários do laboratório de Leguminosas pelo, em particular a Fernando Soares Gonçalves e Keila Dalle Laste, pela paciência em passar suas experiências, ao Wardsson Lustrino Borges, Eduardo Fonseca, Augusto Jaeger, Oduvaldo Filho, João Marcelo, Alessandro de Paula, Felipe e Ariene, pela grande ajuda no plantio e coleta dos experimentos.

Aos funcionários da casa de vegetação da Embrapa Agrobiologia: Aurélio, Serginho, Roberto, e Claudinho pela imensa dedicação na prestação de serviços.

Aos companheiros de Rural, Leandro Abrahão (Du Norte), Rafael, Milene, Arthur Vinicius, Lucas Ferreira, Danilo, Erick, pelo bom humor e alegria sempre compartilhados.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela educação gratuita e de qualidade. Gostaria de agradecer a todas as pessoas que possibilitaram direta e indiretamente a realização deste sonho.

À Deus pelas grandes bênçãos derramadas sobre a minha vida.

Meus sinceros agradecimentos.

“Vim, Vi e Venci”
Júlio César

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo selecionar estirpes de bactérias eficientes na fixação biológica de nitrogênio para quatro espécies leguminosas florestais com potencial de uso em programas de recuperação de áreas. A seleção de estirpes possibilita a diminuição do uso de insumos agrícolas nos plantios em áreas degradadas, induzindo uma recuperação mais natural, através de ciclagem de nutrientes.

Os experimentos foram realizados na Embrapa Agrobiologia em casa de vegetação, localizada em Seropédica-RJ. As estirpes testadas pertencem à coleção da Embrapa e foram obtidas a partir de coletas de nódulos em campo ou coletada da espécie em viveiro. As bactérias foram isoladas dos nódulos, purificadas e depois testadas. Cada experimento recebeu como tratamento de controle positivo três fontes diferentes de nitrogênio mineral (NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, e KNO_3) e controle negativo, tratamento sem adição de bactérias ou nitrogênio mineral

A seleção promovida seguiu diferentes condições de ensaio, de acordo com a base II e III descrita por FARIA (2000), que consiste em experimento realizado em “vaso Leonard” com substrato estéril, e vaso com solo não estéril.

Os experimentos foram montados em delineamento em blocos ao acaso, com três repetições em vaso “Leonard” e quatro repetições em vaso com solo não estéril.

As variáveis adotadas para avaliação dos experimentos foram à Massa Seca da Parte Aérea, Massa Seca de Raiz e a Massa Seca dos Nódulos. Após coletados os dados determinou-se **Eficiência**= $(\text{MSPA TRAT}/\text{MSPA T}_{\text{abs}})\times 100$, e a **Eficácia**= $(\text{MSPA TRAT}/\text{MSPA T}_{\text{nitrogenada}})\times 100$ de cada tratamento. A testemunha nitrogenada foi selecionada pela melhor média de incremento apresentada entre os tratamentos nitrogenados.

Todas as espécies trabalhadas são típicas da região Norte e Nordeste exceto a *Mimosa flocculosa* Burkart que ocorre mais para a região Sul. A escolha das espécies baseou-se no potencial que as apresentam para uso em programas de áreas degradadas.

As melhores estirpes para *Clitoria fairchildiana* R.A. Howard em base II foram as BR 3624 e a BR 8651, foram as BR 3614 e BR 3469 para *Mimosa flocculosa* Burkart, para *Mimosa dormiens* Humb. & Bonpl as melhores foram as BR 4802 e a BR 3463 em condição estéril. Para a espécie *Mimosa dormiens* Humb. & Bonpl em condição não estéril foram as BR 3506 e a BR 3463, foram as BR 3430 e a BR 3429 as melhores para *Mimosa acutistipula* Benth na base III.

Palavras-chave: Áreas degradadas, FBN, Nodulação.

ABSTRACT

This study had the aim of select efficient strains of bacteria in biological nitrogen fixation for four forest legume species with potential for use in reclamation programs. The selection of strains allows decreased use of agricultural inputs in the plantations in degraded areas, inducing a more natural recovery through nutrient cycling. The experiments were carried out at Embrapa Agrobiologia in a greenhouse, located in Seropédica-RJ. The strains tested belong to the collection of Embrapa and were obtained from collections of nodes in the field or collected the species in captivity. The bacteria were isolated from nodules, purified and then tested. Each experiment received treatment as a positive control three different sources of mineral nitrogen (NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and KNO_3) and negative control treatment without bacteria or mineral nitrogen. The selection promoted followed different test conditions, according to the bases II and III described by FARIA (2000), which consists of experiment in "Leonard jar" with sterile substrate and vase with non-sterile soil. The experiments were mounted in a randomized block design with three replications for "jar Leonard" and four replications in pot with non-sterile soil. The variables adopted for the evaluation of the experiments were to Shoot's Dry Mass, Root's Dry Mass and Nodule's Dry Mass. After the data collected was determined Efficiency = $(\text{SDM treat} / \text{SDM Tabs}) \times 100$, and Effectiveness = $(\text{SDM treat} / \text{SDM Tnitrogen}) \times 100$ of each treatment. Witness N was selected by the best average growth shown between the nitrogen treatments. Worked all species are typical of the region North and Northeast except the *Mimosa flocculosa* Burkart that occurs most in the South. The choice of species was based on the potential that they have for use in programs of degraded areas. The best strains for *Clitoria fairchildiana* RA Howard II were based on BR 3624 and BR 8651, was the BR3469 and BR3614 to *Mimosa flocculosa* Burkart, to *Mimosa dormiens* Humb. & Bonpl were the best BR 4802 and BR 3463 in sterile condition. For the same species *Mimosa dormiens* Humb. & Bonpl in non-sterile conditions were the BR 3506 and BR 3463, BR 3430 and the BR3429 were the best for *Mimosa acutistipula* Benth in base III.

Keywords: degraded areas, BNF, Nodulation.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	X
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1.Fixação biológica de nitrogênio.....	2
2.2.Seleção de estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio.....	2
2.3.Nitrogênio.....	10
2.4.Leguminosas.....	10
2.5.Especificidade na relação planta e bactéria nas Leguminosas.....	11
2.6. Obtenção das estirpes.....	11
2.7.Seleção de estirpes.....	12
3. METODOLOGIA.....	12
3.1. Experimentos.....	12
3.1.2. Experimentos em condição estéril (base II).	12
3.1.3.Experimentos em condição não estéril (base III).	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	16
4.1.Condição estéril:.....	16
4.1.1Mimosa dormiens.....	16
4.1.2.Mimosa Flocculosa.....	12
4.1.3.Clitoria fairchildiana.....	13
4.2.Condição não estéril.....	17
4.2.1.Mimosa acutistípula.....	17
4.2.2.Mimosa dormiens.....	19
5. CONCLUSÃO.....	21
6. REFERÊNCIAS :.....	22
7. ANEXO.....	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Frasco com inóculo em meio semi-sólido.....	13
Figura 2: Placa de Petri com teste de germinação	13
Figura 3: Casa de vegetação estéril.....	14
Figura 4: Casa de vegetação não estéril.....	15
Figura 5: Comparação entre o Tratamento inoculado e as Testemunhas nitrogenada e a absoluta.	18
Figura 6: Análise de evolução de Eficiência da bactéria X Peso dos Nódulos para <i>Mimosa dormiens</i>	12
Figura 7: Comparação do incremento entre o Tratamento inoculado e as Testemunhas nitrogenada e absoluta.....	13
Figura 8: Análise de evolução de Eficiência da bactéria X Peso dos Nódulos para <i>Clitória fairchildiana</i>	14
Figura 9: Comparação do incremento entre a Testemunha nitrogenada o Tratamento inoculado e a Testemunha absoluta.	17
Figura 10: Nódulos de <i>Clitória fairchildiana</i>	17
Figura 11: Análise comparativa dos tratamentos de <i>Mimosa acutistípula</i>	18
Figura 12: Comparação do incremento entre o Tratamento inoculado a Testemunha nitrogenada e a Testemunha absoluta.....	19
Figura 13: Análise comparativa dos tratamentos de <i>Mimosa dormiens</i>	20
Figura 14: Comparação do incremento entre a Testemunha nitrogenada o Tratamento inoculado e a Testemunha absoluta.....	21
Figura 15: Nódulos de <i>Mimosa dormiens</i> Humb. & Bonpl.....	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise química do substrato procedente do Campo experimental da Embrapa Agrobiologia.....	15
Tabela 2: Influência da inoculação de estirpes de rizóbio para <i>Mimosa dormiens</i>	16
Tabela 3: Influência da inoculação de estirpes de rizóbio em <i>Mimosa flocculosa</i>	13
Tabela 4. Influência da inoculação de estirpes fixadoras de nitrogênio em <i>Clitoria fairchildiana</i>	14
Tabela 5: Influência da inoculação de estirpes de rizóbio para <i>Mimosa acutistípula</i>	19
Tabela 6: Influência da inoculação de estirpes de rizóbio para <i>Mimosa dormiens</i>	20

1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional no cenário mundial faz com que aumente gradualmente a exploração dos recursos naturais existentes, gerando cada vez mais áreas em situação de degradação. Estima-se que por volta de 28% (236 milhões de ha) do território brasileiro são de áreas degradadas (BOT et al., 2000) originadas por causa de atividades como agricultura, pastagens não sustentáveis, áreas de mineração, exploração madeireira e ocupação imprópria das regiões urbanas (CABRAL et al., 2002), entre outras.

Estas áreas perturbadas apresentam baixos teores de matéria orgânica, o que prejudica a estruturação do solo, torna a atividade biológica insuficiente e diminui a disponibilidade de água e de nutrientes às plantas, principalmente o nitrogênio e o fósforo (FRANCO et al. 1995). Alteração das propriedades (físicas, químicas e biológicas) do meio ambiente, causada por qualquer forma de matéria ou energia, resultante das atividades humanas que direta ou indiretamente afetam o equilíbrio desses sistemas, gerando a degradação de forma gradual ou acelerada desta área.

Diante do cenário ambiental existente, o estudo para a redução dos impactos ao ambiente e o aumento de programas com um foco de sustentabilidade torna-se necessário. A tecnologia desenvolvida para o plantio de leguminosas inoculadas existe com o objetivo de construir um programa sustentável para a melhoria de qualidade ambiental e criar uma alternativa viável e de baixo custo para a recuperação de áreas degradadas (BARBERI et al., 1998).

A seleção de estirpes eficientes na fixação biológica de nitrogênio visa gerar benefícios como a redução no uso de adubos nitrogenados, contribuindo para um fornecimento de nitrogênio para a planta e reduzir assim os impactos do nitrogênio ao ambiente, promovendo uma melhora no custo x benefício de realização de programas de recuperação de áreas.

A capacidade de estabelecer a simbiose com a bactéria não é uma unanimidade entre as leguminosas. A frequência de nodulação apresenta-se de forma diferenciada entre as subfamílias de leguminosas, sendo mais comum na subfamília Papilionoideae, seguida por Mimosoideae e pouco expressiva na Caesalpinoideae (ALLEN & ALLEN, 1981; FARIA & GUEDES, 1999; SPRENT, 2001). Em Caesalpinoideae, a capacidade de nodulação é restrita ao gênero *Chamaecrista* e a alguns grupos da tribo Caesalpinoideae.

A seleção de estirpes de rizóbio é um avanço da biotecnologia que possibilita o plantio de leguminosas fixadoras de nitrogênio em áreas com condições edafoclimáticas desfavoráveis. Essa tecnologia visa buscar a melhor associação entre a espécie de leguminosas e a estirpes.

Com rápido crescimento dessas espécies inoculadas ocorrerá uma rápida deposição de material orgânico sobre o solo, melhorando as condições físicas, químicas e biológicas deste, induzindo uma maior ciclagem de nutrientes. Desta forma, com a melhora nas condições irá facilitar o estabelecimento de novas espécies.

O objetivo deste trabalho foi selecionar estirpes de bactérias eficientes na fixação biológica para *Clitoria fairchildiana* R.A. Howard, *Mimosa dormiens* Humb. & Bonpl e *Mimosa flocculosa* Burkart em base II e para *Mimosa dormiens* Humb. & Bonpl e *Mimosa acutistipula* Benth em base III.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Fixação biológica de nitrogênio

Os estudos sobre a fixação biológica de nitrogênio tiveram início no século XIX, quando Beijerinck observou a formação de nódulos em raízes de plantas de ervilha. Nos anos seguintes, constatou-se que estes nódulos eram colonizados por bactérias. Estas bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas têm sido denominadas, coletivamente, de rizóbio. O nome rizóbio originou-se da primeira espécie descrita *Rhizobium leguminosarum* (FRANK, 1879; 1889).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo pelo qual o N_2 atmosférico é reduzido a NH_4^+ , podendo dessa forma, ser transferido para compostos contendo carbono, a fim de produzir aminoácidos e outras substâncias orgânicas que contêm nitrogênio (RAVEN *et al.*, 2001), sendo a FBN responsável pelo aprisionamento de aproximadamente 60% do nitrogênio na Terra (KIM & REES, 1994).

A fixação de N_2 é dependente da espécie hospedeira e do rizóbio, no entanto pode ser limitada por fatores como o pH do solo, toxidez de alumínio, manganês, deficiência de cálcio, fósforo, molibdênio etc., estresse hídrico ou temperaturas elevadas (SIQUEIRA & FRANCO 1988; BORDELEAU & PRÉVOST, 1994, MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

As classes de organismos fixadores de nitrogênio mais importantes são as bactérias de vida livre e as simbióticas (RAVEN, *et al.* 2001). As bactérias simbióticas são os mais importantes em termos da quantidade total de nitrogênio fixado. Estas associações podem ser importantes em sistemas de agricultura sustentável (BALDANI, 1996) e em sistemas perturbados que se encontram em estádios de reabilitação, uma vez que o nitrogênio é escasso nesses ecossistemas (SILVA, 1994).

2.2. Seleção de estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio

Na medida em que a expectativa de vida aumenta, a demanda por recursos naturais cresce levando-os muitas vezes a exaustão. Um bom exemplo é a Mata Atlântica que hoje possui cerca de 7% do seu território original e consiste no bioma com maior número de espécies ameaçadas de extinção. Para tentar recuperar áreas que estão sendo degradadas constantemente pelo homem, a Embrapa se dedica ao trabalho de procurar a melhor associação, o casamento perfeito entre uma espécie de leguminosa e uma estirpe de rizóbio.

Os estudos sobre a capacidade de nodulação e fixação de N_2 pelo rizóbio tiveram início na década de 60 com o estudo sobre a capacidade de nodulação da espécie *Mimosa caesalpiniiifolia* (Döbereiner 1967), em espécies florestais somente foram aprofundados na Embrapa a partir da década de 80 (FARIA *et al.* 1984, 1987, 1989), devido ao uso espécies de leguminosas na recuperação de áreas degradadas, e por se tratar de uma tecnologia sustentável e ambientalmente correta.

A busca por bactérias que sejam capazes de fixar nitrogênio eficientemente é grande, pois a associação perfeita pode diminuir o alto custo com adubos nitrogenados. O insumo nitrogenado geralmente tem baixo aproveitamento agrônômico e podem ser poluentes do solo, água e atmosfera, podendo chegar a perdas de até 70% (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

As características altamente desejáveis em estirpes de rizóbio indicadas para a inoculação de leguminosas arbóreas são a eficiência simbiótica, capacidade de sobrevivência

no solo e habilidade competitiva para colonizar as raízes da planta hospedeira, promovendo uma nodulação abundante (FRANCO et al., 1991).

No Brasil, o melhor exemplo dessa busca é a cultura da soja. Na qual a adubação sintética nitrogenada é totalmente substituída pela utilização de inoculantes contendo bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, o que representou uma economia para o país de cerca de US\$ 6 bilhões no ano de 2006 (HUNGRIA et al., 2006), possibilitando maior competitividade de preço para exportação.

Estima-se que aproximadamente 25% das leguminosas existentes tenham sido examinadas (MOREIRA et al., 2010), segundo Faria et al (1999), das espécies estudadas 88% são espécies nodulíferas e 12% não nodulam. A maioria das espécies não nodulíferas são Caesalpinioideae. Nesse grupo, apenas 19% das espécies foram estudadas e dessas, 76% são incapazes de estabelecer simbiose com rizóbio. Mimosoideae e Papilionoideae, 19% e 25%, foram estudadas e dessas, 90% e 96% respectivamente nodularam.

A Embrapa possui uma lista com espécies de Leguminosas florestais que já passaram pelo processo de seleção e estão com os respectivos inoculantes prontos para uso.

2.3. Nitrogênio

Entre os nutrientes das plantas superiores, o nitrogênio ocupa o primeiro lugar em quantidade presente por unidade de fitomassa (ARNOLD & VANDIEST, 1991), juntamente com o fósforo, é o mais limitante aos sistemas de produção (ODUM, 2001; RICKFLES, 2003), principalmente em condições tropicais (FRANCO et al., 1992). A maior parte dele no planeta Terra (93,8%), está na crosta terrestre. Os 6,8% restantes estão na ecosfera, destes, 99,96% do nitrogênio está sob a forma de N₂ na atmosfera, e o restante (0,04%), estão na forma orgânica ou inorgânica existente nos ecossistemas terrestre ou aquático (ROSWALL, 1979).

O nitrogênio gasoso (N₂), é quimicamente inerte a temperaturas comuns, e diferentemente de outros elementos. Apesar de termodinamicamente favorável, a reação de redução do nitrogênio atmosférico a amônia (FBN), requer uma energia de ativação extremamente alta, não ocorrendo espontaneamente sem a presença de catalisadores adequados. Existe o processo industrial de redução do nitrogênio gasoso a uma forma assimilável para a planta é o processo denominado Haber-Bosch, que produz a maioria dos fertilizantes nitrogenados utilizados nos sistemas agrícolas e florestais, onde a ligação tripla do nitrogênio é rompida em condições de alta pressão e temperatura (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Outro processo de redução que ocorre na natureza são as descargas elétricas na atmosfera. Contudo, a contribuição desse processo é relativamente baixa quando comparada a forma biológica e a industrial de fixação (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

A fixação biológica de nitrogênio é a forma mais eficiente e objetiva de adição de nitrogênio dentro do sistema, utilizando espécies de leguminosas como principal instrumento. O papel do nitrogênio na sucessão secundária merece especial atenção pelo seu potencial de perda nos ecossistemas tropicais (GUARIGUATA e OSTERTAG, 2001).

2.4. Leguminosas

A família *Leguminosae* possui cerca de 3000 espécies encontradas em todo o território nacional, é a terceira maior família das Angiospermas possuindo cerca de 20.000 espécies e 700 gêneros (LEWIS, 2005), só sendo superada pela *Orchidaceae* e *Asteraceae* (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Esta família possui um destaque econômico devido aos múltiplos serviços que fornece a sociedade. Dentre as funções produtivas, podem-se destacar a produção de alimentos, madeira, forragem, lenha, carvão, mel e outros produtos. No que diz respeito as funções protetoras, pode se ressaltar o controle de erosão, a estabilidade de taludes, quebra ventos, aumento no estoque e qualidade da água, além de funções conservacionistas. (HERRERA et al., 1993; FRANCO e FARIA, 1997; FARIA *et al.*, 1999; FARIA, 2010).

A família possui características favoráveis para recuperação de áreas como resistência a condições edafoclimáticas adversas, pôr dispor de uma alta biodiversidade capaz de forma associação com bactérias fixadoras de nitrogênio, pôr possuírem uma baixa relação C/N e uma alta distribuição pelo mundo, não sendo encontradas somente na Antártida e nas Ilhas Malvinas (SPRENT, 2001).

2.5. Especificidade na relação planta e bactéria nas Leguminosas

A interação entre leguminosas e rizóbio é um exemplo de associação biológica intensamente estudada, cujos benefícios para a sustentabilidade agrícola são reconhecidos devido ao processo de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN). Além dos fatores edafoclimáticos, esse processo é também influenciado pelas características genótípicas do macro e microsimbionte e modulado por uma intensa troca de sinais moleculares, refletindo nas diferentes respostas em relação à faixa hospedeira, especificidade e eficiência simbiótica (HARTWIG, 1998).

Os mecanismos envolvidos na simbiose, que determinam a especificidade hospedeira, ainda não estão completamente elucidados, contudo sabe-se que flavonóides e compostos fenólicos exsudados das raízes ativam ou inibem genes bacterianos da nodulação (PETERS & LONG, 1988).

A simbiose entre estirpes de rizóbio e espécies de leguminosas pode variar de altamente específicas até altamente promíscua, sendo capazes de estabelecer associação com poucos ou vários parceiros (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002).

Algumas espécies são extremamente específicas com relação à estirpe, como se observa em espécies da tribo Mimoseae que somente associam-se com estirpes isoladas de espécies da própria tribo. As espécies da tribo Phaseoleae são mais promíscuas com relação às bactérias, podendo associar-se eficientemente com estirpes isoladas de tribos diferentes ou de outra subfamília (MELLO, 1998).

A especificidade hospedeira citada acima se caracteriza como sendo a capacidade de espécies leguminosas formarem nódulos e fixar nitrogênio com diferentes estirpes de rizóbio isoladas de outras espécies e/ou representa a habilidade de uma estirpe de rizóbio em provocar a nodulação e fixar N_2 quando associada a cultivares ou espécies do hospedeiro específico (DOBEREINER *et al.*, 1971)

Dessa forma, a seleção de estirpes eficientes para cada espécie de leguminosa, visa à produção de inoculantes específicos, sendo um dos componentes fundamental para o sucesso da tecnologia de uso de espécies arbóreas (FARIA, 2000).

2.6. Obtenção das estirpes

O processo de obtenção das estirpes tem início com experimentos conduzidos em diferentes etapas, basicamente se subdividindo em trabalhos de campo e em casa de vegetação. As bactérias podem ser obtidas de formas diferentes, por meio de nódulos coletados no campo ou pelo plantio de sementes em casa de vegetação.

Primeiramente as sementes de interesse quando ortodoxas passam por um processo de escarificação, onde estas são imersas em H₂SO₄ por um tempo variável de acordo com a característica tegumentar de cada tipo de semente. Após esse processo as sementes são plantadas em substrato contendo areia e vermiculita na proporção 2:1 (v/v) onde são inoculadas com uma mistura de 200-300 estirpes e acondicionadas em casas de vegetação. Respeitado o período de crescimento mínimo característico de cada espécie, é feita a coleta para a verificação da ocorrência ou não da nodulação. Verificada a nodulação, esses nódulos são identificados e armazenados em frascos hermeticamente fechados contendo cloreto de cálcio anidro sobreposto com uma camada de algodão (FARIA et al.,1989). O isolamento e purificação das bactérias ocorrem em condições controladas de laboratório utilizando capela de fluxo laminar.

Inicialmente os nódulos reidratados em água esterilizada, tratados por 30 segundos com álcool etílico anidro, em seguida em H₂O₂ (Peróxido de Hidrogênio) por 4 minutos e lavados 8 vezes em água esterilizada. Com uma pinça, cada nódulo é macerado e a suspensão que fica na extremidade da pinça, após a maceração, é riscada em placa contendo meio de cultura extrato de levedura com manitol (VICENT,1970).

Após 3 a 11 dias de incubação à 30°C, usando uma alça de platina, a massa de bactérias formadas sobre o meio é novamente riscada no mesmo meio de cultura para a obtenção de colônias isoladas. Cada cultura que irá constituir uma estirpe deve ser proveniente de uma colônia isolada da bactéria.

2.7. Seleção de estirpes

A metodologia para seleção de estirpes para leguminosas florestais segue quatro bases de recomendação. Na base de recomendação I, a seleção é feita em condições estéreis de laboratório para testar se a bactéria purificada é rizóbio e se possui a capacidade de nodular a planta testada. Para a base de recomendação II as estirpes selecionadas na etapa anterior são testadas em vasos “Leonard” em casa de vegetação, utilizando substrato esterilizado. A base de recomendação III é feita em vasos com solo não estéril, avaliando a competitividade das bactérias testadas com as estirpes nativas do solo. A etapa IV consiste no teste em condições de campo das estirpes selecionadas na etapa III (FARIA, 2000), de acordo com as normas da RELARE (Rede de Laboratórios para Recomendação Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola).

3. METODOLOGIA

3.1. Experimentos

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação localizado na Embrapa Agrobiologia, Seropédica RJ. Foram feitos experimentos em quatro espécies de leguminosas florestais (*Mimosa dormiens*, *Mimosa flocculosa*, *Clitória fairchildiana*, *Mimosa acutistípula*) nas diferentes etapas de seleção, foram feitos 5 experimentos, com três experimentos em vaso “Leonard” e dois em vaso com solo, para produzir inoculantes específicos e substituir a utilização de insumos nitrogenados quando feito o plantio dessas espécies.

3.1.2. Experimentos em condição estéril (base II).

Foram utilizados vasos “Leonard” contendo substrato autoclavado de areia e vermiculita 2:1 (v/v) (VINCENT, 1970).

Nos experimentos foram utilizadas 66 estirpes diferentes que pertencem a coleção e estão listadas na tabela em anexo, estas são pertencentes a coleção da Embrapa Agrobiologia. Que possui cerca de 3000 colônias isoladas. Cada estirpe utilizada foi riscada em uma placa de Petri com meio 79 sólido (FRED & WAKSMAN, 1928), para obtenção de colônias isoladas. Os inóculos foram produzidos em meio 79 semi-sólido (FRED & WAKSMAN, 1928) e permaneceram sob agitação horizontal orbital (1500rpm) até apresentarem crescimento. Para cada inóculo de uma mesma estirpe teve duas repetições para parâmetros de análise visual (cor).

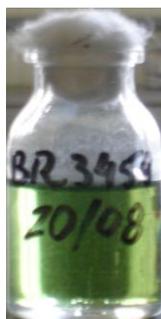


Figura 1: Frasco com inóculo em meio semi-sólido

O delineamento utilizado foi de blocos ao acaso (DBC) com três repetições, sendo os tratamentos utilizados constituídos de: estirpe de bactérias, e três fontes de nitrogênio mineral (NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3) respectivamente TN1(Nitrato de Amônio), TN2(Sulfato de Amônio) e TN3(Nitrato de Potássio), e testemunha absoluta.

As sementes foram escarificadas em ácido sulfúrico 98% por tempo variável e em seguida desinfestadas em peróxido de hidrogênio 30% por 5 minutos. Logo após estas foram colocadas em placa Petri esterilizada contendo papel filtro e algodão e levadas a câmara de germinação até a emissão da radícula. As sementes somente foram plantadas após suas radículas alcançarem aproximadamente 1cm.



Figura 2: Placa de Petri com teste de germinação

No momento do plantio, foi adicionado com uma pipeta de precisão, 1 mL de inóculo por plântula. Cada vaso recebeu 4 plântulas (dependendo da disponibilidade de semente), posteriormente foi realizado o desbaste deixando-se uma plântula por vaso, com o objetivo de

homogeneizar o crescimento durante o arranque inicial da planta. Todos os tratamentos receberam solução nutritiva a cada 15 dias (SOMASEGARAN & HOBEN, 1985).

Semanalmente adicionou-se uma solução de 5mg de N/ml na testemunha nitrogenada, sendo a dosagem inicial de 4 ml, aumentada dependendo da resposta apresentada pela planta.

Os experimentos foram coletados quando estes apresentavam diferença visual, geralmente durante o período de 3 a 4 meses, ou altura de 30 a 40 cm.

Os resultados foram analisados utilizando o teste Scot Knott a 5% de comparação de médias no programa estatístico SISVAR (FERREIRA,2003).



Figura 3: Casa de vegetação estéril

Foram calculadas a eficiência e a eficácia de cada tratamento inoculado de acordo com as fórmulas abaixo:

$$Eficiência = \left(\frac{MPAS\ trat}{MPAS\ testabs} \right) \times 100$$

Onde:

MPAS tratamento: massa da parte aérea seca do tratamento inoculado;

MPAS testemunha absoluta: massa da parte aérea seca da testemunha absoluta;

E a eficácia segundo a fórmula:

$$Eficácia = \left(\frac{MPAS\ trat}{MPAS\ testnitr} \right) \times 100$$

Onde:

MPAS: tratamento: massa da parte aérea seca do tratamento inoculado;

MPAS: testemunha com nitrogênio mineral: massa da parte aérea seca da testemunha nitrogenada.

Para calcular a eficiência foram utilizados os dados de massa de parte aérea seca de cada tratamento inoculado em comparação com a massa da testemunha absoluta que não recebeu nenhum tratamento. Para calcular a eficácia foi utilizada a massa de parte aérea seca de cada tratamento inoculado em comparação com a testemunha nitrogenada que induziu o maior incremento de massa (FARIA, 2000).

3.1.3. Experimentos em condição não estéril (base III).

Nesta fase são utilizados os resultados obtidos na experimentação em condições estéreis. Foram utilizados recipientes de polietileno (4 dm³) contendo solo (argissolo vermelho-amarelo) não esterilizado, coletado no Campo Experimental da Embrapa, cuja a análise química está na tabela 1.

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso constituído de quatro repetições. Os tratamentos foram: estirpes de rizóbio, testemunha absoluta e testemunha nitrogenada. As estirpes utilizadas e a fonte de nitrogênio mineral correspondem às estirpes e fonte de nitrogênio mineral que proporcionaram o maior incremento de massa de parte aérea seca na seleção sob condições esterilizadas para o mesmo hospedeiro. Foram utilizadas 10 estirpes diferentes para seleção nesta condição e estão listadas no anexo

As etapas de produção de inóculos, preparo das sementes e plantio das mesmas, colheita, juntamente com as variáveis avaliadas são as mesmas observadas nos experimentos que seguiram a base II.



Figura 4: Casa de vegetação não estéril

Foi feita uma análise química do solo para conhecimento das condições do solo no momento do plantio do experimento e desenvolvimento da planta. Não foi promovido nenhum tipo de adubação no substrato utilizado.

Tabela 1. Análise química do substrato procedente do Campo experimental da Embrapa Agrobiologia.

Substrato	pH em	Al	Ca+ Mg	Ca	Mg	P	K
	H2O						
	cmol _c /dm ³				mg/dm ³		
Argissolo V-A	5,2	0,1	2,8	1,6	1,2	6,7	39

Os valores obtidos pela análise indicam o estado em que se encontra o solo utilizado, para uma observação de alguma eventualidade durante o desenvolvimento das plantas. O valor de Al encontrado ainda não prejudica o desenvolvimento das mesmas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Condição estéril:

4.1.1 *Mimosa dormiens*

Das 64 estirpes testadas, 33 estirpes não formaram nódulos e 16 apresentaram um desenvolvimento menor que a testemunha absoluta, o que indica uma incompatibilidade entre a estirpe e a espécie de leguminosa.

O experimento teve uma duração de 78 dias para a coleta, foi plantado dia 31/08/09 e foi coletado dia 19/11/09. Foram aplicados 140 mg de N/planta. A fonte mineral que apresentou um maior incremento visual para espécie foi NH_4NO_3 (Nitrato de amônio), por demonstrar uma eficiência bem superior às demais testemunhas nitrogenadas, e possuindo uma média para massa da parte aérea seca de 2,17g no tratamento.

As duas melhores estirpes foram a BR 4802 e a BR 3463, com uma eficiência de: 11835% e 9272% e uma eficácia de: 156% e 122% respectivamente. Esses valores de eficácia possibilitam à substituição parcial a total do insumo nitrogenado já que foram superiores a testemunha nitrogenada, porém não o bastante para descartar uma adubação. Essas estirpes apresentaram um desenvolvimento respectivamente de 120 e 93 vezes maior que a testemunha absoluta.

É possível observar uma relação entre a nodulação e o desempenho da simbiose na figura 6 (Eficiência e a Eficácia), já que o aumento nos valores de eficiência e eficácia acompanhou os valores de MSN. Os dados refletem essa relação claramente como a eficiência aumenta com o aumento do peso dos nódulos.

Existe também uma relação entre a nodulação e o hospedeiro das estirpes, uma vez que os maiores valores observados de eficiência e eficácia são de estirpes isoladas de espécies da subfamília Mimosoidea, confirmando a existência de uma especificidade dentro desta subfamília.

Os tratamentos apresentaram diferença estatística pelo teste Scott Knott a 5%.

Tabela 2: Influência da inoculação de estirpes de rizóbio para *Mimosa dormiens*.
(CONTINUA)

Tratamentos	Massa seca			(%)	
	Parte aérea(g)	Nódulos(mg)	Raiz(g)	EFICIÊNCIA	EFICÁCIA
BR 8603	0,008 a1	0,0 a1	0,006 a1	29	0,4
BR 3815	0,009 a1	0,0 a1	0,012 a1	33	0,4
BR 6815	0,012 a1	0,0 a1	0,014 a1	42	0,5
BR 3807	0,013 a1	0,0 a1	0,079 a1	47	0,6
BR 4406	0,015 a1	0,0 a1	0,027 a1	52	0,7
BR 5404	0,017 a1	0,0 a1	0,015 a1	60	0,8
BR 3610	0,019 a1	0,0 a1	0,035 a1	65	0,9
BR 5611	0,019 a1	0,0 a1	0,016 a1	66	0,9

TABELA 2. CONTINUAÇÃO

BR 8801	0,019 a1	0,0 a1	0,247 a1	66	0,9
BR 8404	0,019 a1	0,0 a1	0,025 a1	67	0,9
BR 4103	0,020 a1	0,0 a1	0,047 a1	71	0,9
BR 4007	0,021 a1	0,0 a1	0,011 a1	72	1,0
BR 3630	0,022 a1	0,0 a1	0,013 a1	76	1,0
BR 3611	0,023 a1	0,0 a1	0,035 a1	79	1,0
BR 8007	0,024 a1	0,0 a1	0,021 a1	85	1,1
BR 8651	0,026 a1	0,0 a1	0,018 a1	92	1,2
Tabs	0,029 a1	0,0 a1	0,059 a1	100	1,3
BR 3632	0,031 a1	2,0 a1	0,031 a1	109	1,4
BR 6610	0,032 a1	0,0 a1	0,005 a1	112	1,5
BR 5004	0,032 a1	0,0 a1	0,030 a1	112	1,5
BR 3450	0,040 a1	0,0 a1	0,049 a1	140	1,8
BR 4301	0,041 a1	0,0 a1	0,036 a1	142	1,9
BR 3624	0,045 a1	0,0 a1	0,032 a1	157	2,1
BR 3432	0,046 a1	0,0 a1	0,068 a1	160	2,1
BR 3614	0,049 a1	0,0 a1	0,059 a1	170	2,2
BR 3617	0,055 a1	0,0 a1	0,034 a1	191	2,5
BR 9002	0,059 a1	0,0 a1	0,051 a1	207	2,7
BR 3609	0,063 a1	0,0 a1	0,095 a1	219	2,9
BR 3466	0,064 a1	25,6 a1	0,259 a1	225	3,0
BR 3804	0,065 a1	0,0 a1	0,030 a1	227	3,0
BR 2216	0,068 a1	9,8 a1	0,029 a1	237	3,1
BR 3634	0,074 a1	0,0 a1	0,084 a1	257	3,4
BR 6010	0,076 a1	0,0 a1	0,100 a1	266	3,5
BR 5610	0,099 a1	0,0 a1	0,099 a1	345	4,6
BR 5401	0,105 a1	0,0 a1	0,159 a1	366	4,8
BR 6609	0,107 a1	0,0 a1	0,136 a1	373	4,9
BR 3461	0,116 a1	42,4 a1	0,062 a1	404	5,3
BR 3608	0,138 a1	0,0 a1	0,088 a1	480	6,3
BR 6205	0,163 a1	15,7 a1	0,104 a1	570	7,5
BR 8205	0,196 a1	13,9 a1	0,096 a1	684	9,0
BR 4816	0,209 a1	2,4 a1	0,170 a1	728	9,6
BR 5609	0,222 a1	5,6 a1	0,135 a1	774	10,2
BR 3454	0,243 a1	9,6 a1	0,097 a1	846	11,2
BR 3628	0,249 a1	11,7 a1	0,198 a1	869	11,5
BR 9004	0,261 a1	21,5 a1	0,060 a1	912	12,0
BR 827	0,308 a1	0,6 a1	0,047 a1	1073	14,2
BR 4830	0,337 a1	57,9 a1	0,180 a1	1176	15,5
BR 8601	0,679 a1	54,4 a1	0,292 a1	2370	31,3

TABELA 2. CONTINUAÇÃO					
BR 3467	0,693 a1	40,7 a1	0,034 a2	2417	31,9
BR 3459	0,721 a1	52,3 a1	0,293 a1	2515	33,2
BR 824	0,740 a1	44,8 a1	0,264 a1	2580	34,1
TN3	0,781 a1	0,0 a1	0,639 a2	2723	36,0
BR 3522	0,819 a1	29,9 a1	0,341 a2	2858	37,8
BR 3462	0,886 a2	265,0 a1	0,476 a2	3092	40,8
BR 5005	0,893 a2	20,7 a1	0,287 a1	3115	41,2
BR 4305	0,949 a2	38,7 a1	0,353 a2	3309	43,7
BR 3509	0,959 a2	36,7 a1	0,354 a2	3346	44,2
BR 8653	1,061 a2	49,2 a1	0,481 a2	3700	48,9
BR 3514	1,141 a2	59,5 a1	0,456 a2	3981	52,6
TN2	1,145 a2	0,0 a1	0,635 a2	3994	52,8
BR 4405	1,145 a2	51,5 a1	0,452 a2	3994	52,8
BR 3473	1,448 a2	70,6 a1	0,571 a2	5051	66,7
BR 3506	1,642 a2	77,0 a1	0,538 a2	5728	75,7
BR 3505	1,802 a2	92,8 a1	0,600 a2	6286	83,0
BR 3469	1,911 a2	97,8 a1	0,645 a2	6665	88,1
TN1	2,170 a3	0,0 a1	0,974 a3	7569	100,0
BR 3463	2,658 a3	95,4 a1	0,872 a3	9272	122,5
BR 4802	3,393 a3	142,9 a1	0,528 a2	11835	156,3
CV(%)	110,56	271,36	92,91		

Médias comparadas pelo teste Scott Knott (p=0,05)

1-EFICIÊNCIA=(MSPA TRAT/MSPA TABS)x100

2-EFICÁCIA=(MSPA TRAT/MSPA TN(NH₄NO₃))x100



Figura 5: Comparação entre o Tratamento inoculado e as Testemunhas nitrogenada e a absoluta.

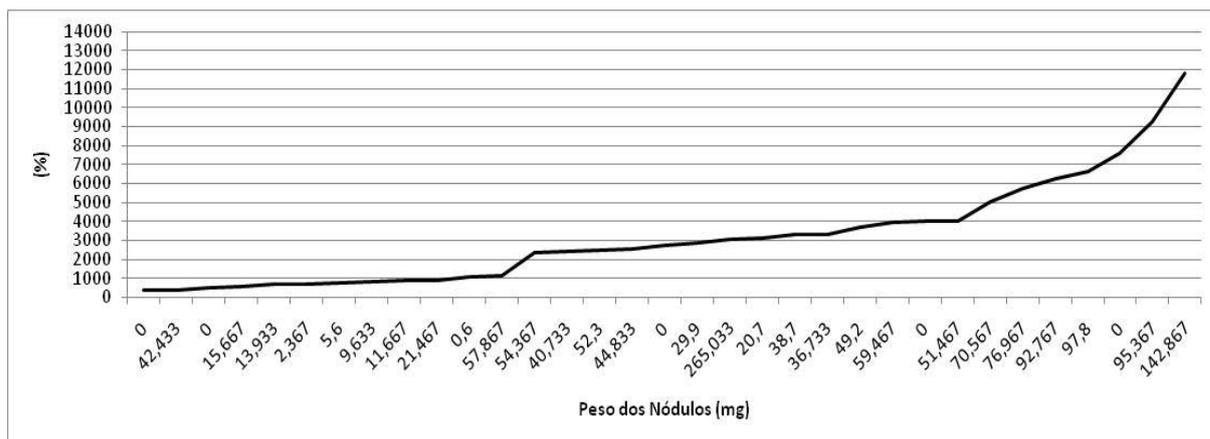


Figura 6: Análise de evolução de Eficiência da bactéria X Peso dos Nódulos para *Mimosa dormiens*

4.1.2. *Mimosa Flocculosa*

Para *Mimosa flocculosa* foram testadas seis estirpes, dentre as quais duas não induziram a formação de nódulos, são elas BR 4103 e BR4802.

O mesmo resultado foi encontrado para *Mimosa pellita*, que também não induziram a formação de nódulos, o que pode sugerir baixa compatibilidade entre estas estirpes e estas espécies.

Foram testadas duas fontes de nitrogênio mineral: NH_4NO_3 (nitrato de amônio) e KNO_3 (nitrato de potássio), que receberam por planta 200 mg de N/planta. A fonte KNO_3 apresentou o maior desenvolvimento de MSPA. A coleta ocorreu aos 112 dias após o plantio, onde os tratamentos apresentavam diferença visual, foi plantado o experimento dia 04/07/08 e coletado 23/09/08.

As estirpes que proporcionaram o maior acúmulo de MPAS foram BR 3614 e BR 3469, com eficiência 6166% e 2531%, respectivamente e eficácia 212% e 87%, cada. Com um desenvolvimento de aproximadamente 62 e 25 vezes superior ao controle negativo (testemunha absoluta).

As duas estirpes são do gênero *Burkholderia sp.*, o que confirma a existência de uma especificidade da espécie, podendo visualizar uma maior afinidade pela estirpe BR3614 já que o valor da eficiência foi o dobro. Na mesma tabela os valores de eficácia podem possibilitar à substituição parcial a total do uso do nitrogênio no plantio pois as estirpes obtiveram valores próximos ao da testemunha nitrogenada.

Entre os tratamentos inoculados que apresentaram formação de simbiose a estirpe BR 3462 foi a que menos se desenvolveu com massa de parte aérea seca e a menor massa de nódulos secos. Já a BR 3614 além de possuir a maior MPAS, também apresentou a maior MSN, indicando uma correlação entre estes valores.

Entre os tratamentos não houve diferença estatística pelo teste Scott Knott a 5%, possivelmente devido ao coeficiente de variação alto.

Tabela 3: Influência da inoculação de estirpes de rizóbio em *Mimosa flocculosa*

Tratamentos	Massa seca		(%)	
	Parte aérea(mg)	Nódulos(mg)	EFICIÊNCIA	EFICÁCIA
T absoluta	22,33 a	0,00 a	100	3
BR 4802	59,37 a	0,00 a	266	9
BR 4103	87,00 a	0,00 a	390	13
BR 3462	205,33 a	19,53 a	919	32
BR 3459	417,67 a	30,23 a	1870	64
NH ₄ NO ₃	503,33 a	0,00 a	2254	77
BR 3469	565,33 a	29,57 a	2531	87
KNO ₃	650,33 a	0,00 a	2912	100
BR 3614	1377,03 a	114,50 a	6166	212
CV(%)	105,80	223,67		

Médias comparadas pelo teste Scott Knott (p=0,05)

1-EFICIÊNCIA=(MSPA TRAT/MSPA T_{ABS})x100

2-EFICÁCIA=(MSPA TRAT/MSPA TN(NH₄NO₃))x100

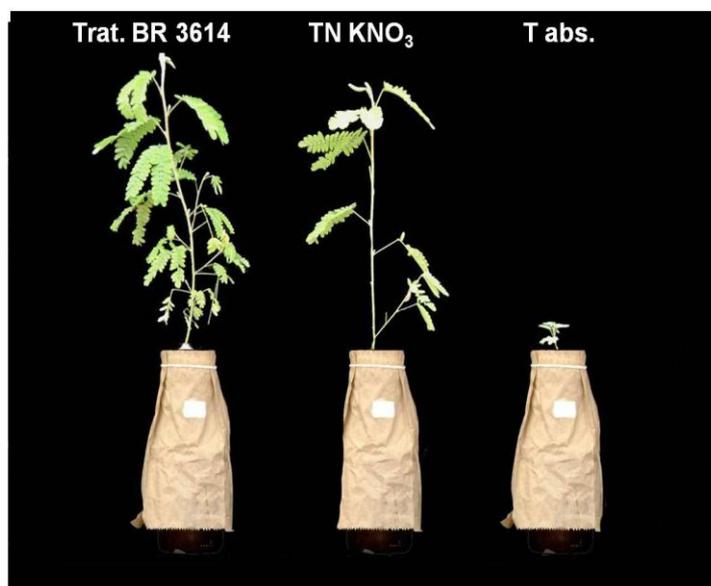


Figura 7: Comparação do incremento entre o Tratamento inoculado e as Testemunhas nitrogenada e absoluta.

4.1.3. *Clitoria fairchildiana*

Foram testadas 64 estirpes diferentes, com 9 apresentando desenvolvimento inferior a testemunha absoluta e somente 3 não formaram nódulos. O que ressalta a grande capacidade dessa espécie de associar-se com estirpes distintas eficientemente e a promiscuidade observada dentro de espécies pertencentes a esta subfamília. Também pode ser observado

com formação de dois grupos distintos de médias estatísticas, sendo o grupo com média a maior que o b.

As melhores estirpes foram a BR 3624 e a BR 8651 com eficiência de 367% e 334,54% e eficácia de 100,98% e 92,04% respectivamente. Existe a possibilidade de uma especificidade entre as estirpes e a espécie, pois as quatro melhores estirpes são do gênero *Bradyrhizobium sp.*

Os valores apresentados de eficácia não recomendam uma exclusão parcial do uso de insumos nitrogenados. Com a necessidade de somente uma adubação de cobertura reduzida para melhor desenvolvimento da planta, devido ao um desenvolvimento inferior a testemunha nitrogenada

Foram aplicados na testemunha nitrogenada 435mg de N/planta. Isso indica o grande benefício que se tem com a inoculação, já as melhores estirpes apresentaram valores de eficácia próximos ao desempenho da testemunha nitrogenada visto no gráfico abaixo com os trinta melhores tratamentos.

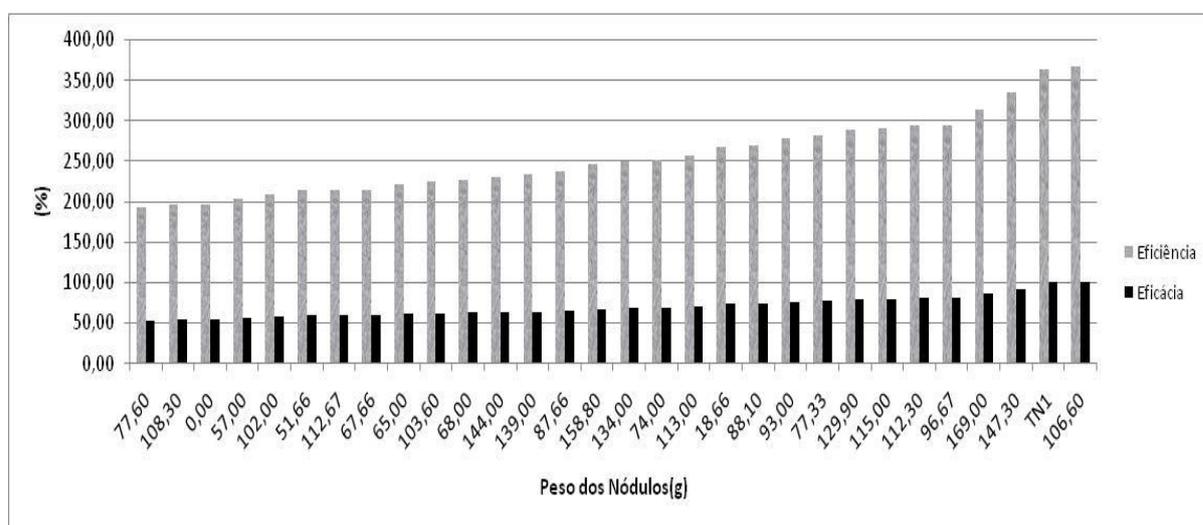


Figura 8: Análise de evolução de Eficiência da bactéria X Peso dos Nódulos para *Clitoria fairchildiana*

O gráfico acima também permite observar o incremento em eficiência com o aumento no peso dos nódulos.

O tratamento nitrogenado com o maior incremento foi o NH_4NO_3 (Nitrato de amônio), apresentando uma média de 2,39g de MSPA.

O experimento foi coletado aos 98 dias após o plantio, sendo plantado 24/06/10 e coletado 16/09/10, quando foi observada uma diferença visual significativa entre os tratamentos.

Os tratamentos apresentaram diferença estatística pelo teste Scott Knott a 5%.

Tabela 4. Influência da inoculação de estirpes fixadoras de nitrogênio em *Clitoria fairchildiana*. (CONTINUA)

Tratamentos	Massa seca		(%)	
	Parte aérea(g)	Nódulos(mg)	EFICIÊNCIA	EFICÁCIA
BR3459	0,39 b	0,00 b	59	16
BR3509	0,45 b	0,00 b	68	19

TABELA 4. CONTINUAÇÃO

BR2216	0,46 b	3,30 b	69	19
BR3469	0,46 b	6,63 b	70	19
BR3505	0,48 b	0,00 b	74	20
BR3630	0,55 b	5,67 b	83	23
BR8205	0,57 b	22,33 b	87	24
BR3450	0,59 b	39,00 b	90	25
BR3506	0,62 b	10,66 b	94	26
TN3	0,64 b	0,00 b	98	27
Tabs	0,65 b	8,33 b	98	27
Tabs	0,66 b	0,00 b	100	28
BR3608	0,69 b	5,33 b	105	29
TN2	0,71 b	0,00 b	108	30
BR3467	0,77 b	28,66 b	117	32
BR4305	0,77 b	3,33 b	117	32
BR824	0,77 b	86,33 a	117	32
BR6610	0,80 b	5,67 b	121	33
BR4007	0,80 b	9,00 b	122	34
BR3454	0,81 b	71,00 a	123	34
BR3461	0,85 b	1,30 b	130	36
BR4830	0,86 b	24,30 b	130	36
BR3632	0,87 b	49,33 b	133	36
BR4103	0,88 b	64,33 a	134	37
BR3463	0,89 b	51,66 b	135	37
BR6010	0,90 b	48,33 b	137	38
BR9002	0,92 b	45,66 b	140	38
BR8404	0,92 b	61,00 a	140	39
BR3611	0,92 b	41,33 b	141	39
BR8801	0,93 b	21,00 b	141	39
BR3614	0,96 b	25,33 b	147	40
BR3514	1,02 b	61,66 a	155	43
BR3473	1,04 b	138,30 a	158	44
BR5401	1,05 b	11,00 b	159	44
BR4802	1,11 b	65,60 a	170	47
BR3432	1,12 b	73,00 a	170	47
BR8601	1,20 b	68,00 a	182	50
BR3634	1,22 b	39,66 b	186	51
BR3462	1,24 a	87,60 a	189	52
BR3815	1,27 a	77,60 a	193	53
BR6815	1,29 a	108,30 a	197	54
BR827-2	1,30 a	0,00 b	197	54
BR827	1,34 a	57,00 b	204	56
BR4406	1,37 a	102,00 a	209	58
BR5404	1,41 a	51,66 b	214	59

TABELA 4. CONTINUAÇÃO

BR4301	1,41 a	112,67 a	215	59
BR3804	1,41 a	67,66 a	215	59
BR3610	1,45 a	65,00 a	221	61
BR3609	1,48 a	103,60 a	225	62
BR3522	1,49 a	68,00 a	227	63
BR4816	1,51 a	144,00 a	230	63
BR5610	1,53 a	139,00 a	233	64
BR6205	1,56 a	87,66 a	237	65
BR3628	1,61 a	158,80 a	246	68
BR5004	1,64 a	134,00 a	250	69
BR3807	1,65 a	74,00 a	252	69
BR6609	1,69 a	113,00 a	257	71
BR5609	1,75 a	18,66 b	267	73
BR3466	1,77 a	88,10 a	270	74
BR8007	1,82 a	93,00 a	278	76
BR9004	1,85 a	77,33 a	282	78
BR3617	1,89 a	129,90 a	288	79
BR5005	1,91 a	115,00 a	290	80
BR4405	1,94 a	112,30 a	295	81
BR8653	1,94 a	96,67 a	295	81
BR5611	2,06 a	169,00 a	313	86
BR8651	2,20 a	147,30 a	335	92
TN1	2,39 a	0,00 b	363	100
BR3624	2,41 a	106,60 a	367	101
CV(%)	57,09	53,8		

Médias comparadas pelo teste Scott Knott (p=0,05)

1-EFICIÊNCIA=(MSPA TRAT/MSPA T_{ABS})x100

2-EFICÁCIA=(MSPA TRAT/MSPA TN(NH₄NO₃))x100



Figura 9: Comparação do incremento entre a Testemunha nitrogenada o Tratamento inoculado e a Testemunha absoluta.

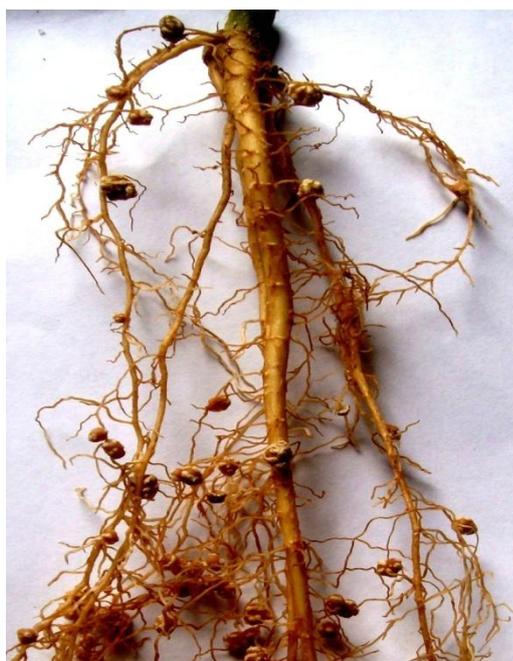


Figura 10: Nódulos de *Clitória fairchildiana*.

4.2. Condição não estéril

4.2.1. *Mimosa acutistípula*

Experimento subsequente da base II, sendo implantado com os melhores tratamentos, sendo conduzido com base na recomendação III (vaso com solo não estéril).

O experimento foi coletado 112 dias após o plantio, quando ocorreu a diferenciação visual entre os tratamentos.

Foram testadas quatro estirpes previamente selecionadas na base de recomendação II. Dentre as testadas as que produziram um maior ganho de massa foram a BR 3430, e a BR 3429. As Estirpes apresentaram um ganho de massa aproximadamente 3 vezes superior a testemunha absoluta (figura 9).

As melhores estirpes são pertencentes ao gênero *Burkholderia sp.* o que demonstra a preferência dessa espécie de leguminosa por estirpes desse gênero. A existência de uma especificidade entre Leguminosas da subfamília Mimosoideae e estirpes do gênero *Burkholderia sp.* é então confirmada.

As estirpes mostraram uma eficiência superior a testemunha nitrogenada de aproximadamente 2 vezes.

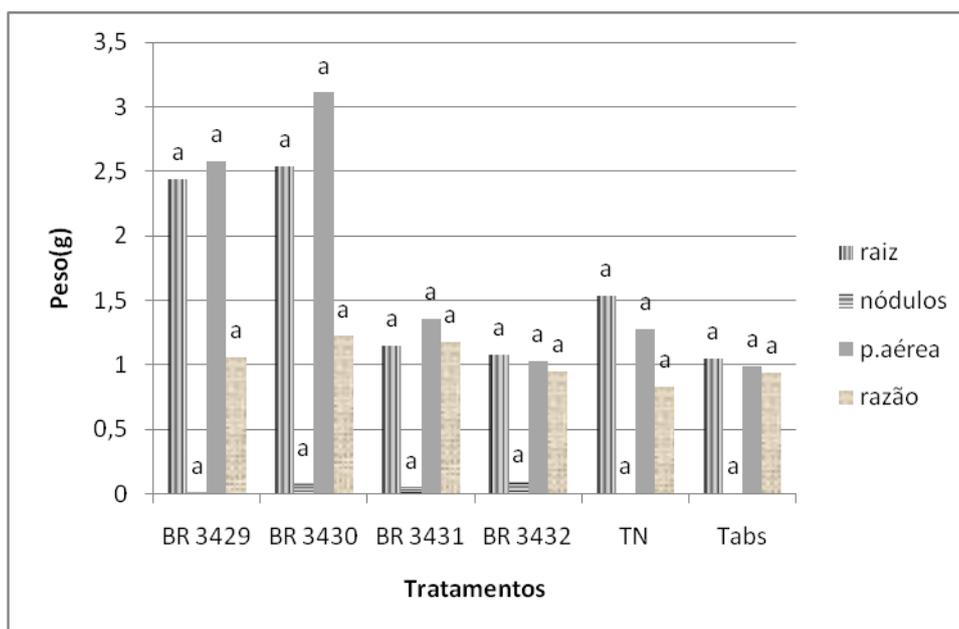


Figura 11: Análise comparativa dos tratamentos de *Mimosa acutistípula*

O gráfico acima relata o efeito dos tratamentos sobre o desenvolvimento da espécie, apresenta uma contribuição equivalente para a raiz e parte aérea, pois a razão MSPA/MSR é constante entre os tratamentos

A quantidade de nódulos encontrados na testemunha absoluta indica a presença de estirpes nativas no solo. Este tratamento apresentou a menor massa de parte aérea seca (MPAS), mostrando que as bactérias nativas do substrato são menos eficientes que as estirpes introduzidas.

Foram aplicados 240 mg de N/planta, o que equivale uma aplicação 120Kg de nitrogênio em 1ha e proporcionou um incremento de massa seca de parte aérea de 1,28g. A presença de nódulos na testemunha nitrogenada indica que a dose aplicada não foi suficiente para evitar a formação de simbiose com as estirpes nativas.

Os tratamentos não apresentaram diferença estatística pelo teste Scott Knott 5%, possivelmente devido ao coeficiente de variação.

Tabela 5: Influência da inoculação de estirpes de rizóbio para *Mimosa acutistípula*

Tratamentos	Massa Seca			(%)	
	Parte aérea(g)	Nódulos(mg)	Raiz(g)	Eficiência	Eficácia
BR 3429	2,58 a	13,25 a	2,44 a	261	202
BR 3430	3,11 a	86,3 a	2,54 a	314	243
BR 3431	1,36 a	52,2 a	1,15 a	137	106
BR 3432	1,03 a	93,8 a	1,08 a	104	80
TN	1,28 a	3,9 a	1,54 a	129	100
TabS	0,99 a	7,425 a	1,05 a	100	77
CV(%)	89,03	161,23	62,42		

Médias comparadas pelo teste Scott Knott (p=0,05)

1-EFICIÊNCIA=(MSPA TRAT/MSPA T_{ABS})x100

2-EFICÁCIA=(MSPA TRAT/MSPA TN(NH₄NO₃))x100

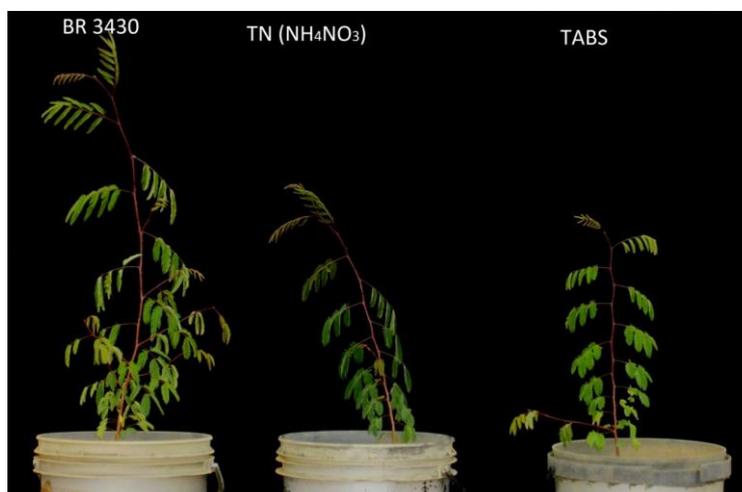


Figura 12: Comparação do incremento entre o Tratamento inoculado a Testemunha nitrogenada e a Testemunha absoluta.

4.2.2. *Mimosa dormiens*

O experimento teve duração de 119 dias. Foram testadas seis estirpes pré selecionadas no experimento feito em base II, dentre elas as melhores foram às estirpes BR 3506 e a BR 3463, com eficiência de 120% e 106% e com eficácia de 78% e 70% respectivamente.

Foram aplicadas 140mg de N/planta, que representa aplicar 70 Kg de nitrogênio por há. Toma-se como base o desenvolvimento apresentado pela testemunha nitrogenada (TN) no resultado de eficácia, o tratamento com a BR3506 acumulou 54,81Kg e a BR3463 48,72Kg de nitrogênio por ha.

A ausência de nódulos na TN indica que a dose aplicada de N/planta foi o suficiente para evitar a formação de simbiose proporcionando um acúmulo de massa de 6,82g de massa seca de parte aérea.

A presença de nódulos na testemunha Absoluta relata a presença de estirpes nativas no solo. Este tratamento apresentou a menor massa seca da parte aérea seca (MSPA), mostrando que as bactérias nativas do solo não são mais eficientes que as estirpes introduzidas.

As estirpes inoculadas que propiciaram uma eficiência menor que a testemunha absoluta, isso indica a incompatibilidade e ineficiência na fixação, já que apresentaram os maiores de MSN.

A ausência de nódulos na testemunha nitrogenada indica que a quantidade aplicada foi o suficiente para que não ocorresse a necessidade pela planta de forma simbiose com as estirpes nativas no solo.

As duas melhores estirpes foram isoladas de espécies do gênero *Mimosa sp.* confirmando a existência de uma especificidade dentro da espécie.

A análise entre a MSPA/MSR das duas melhores estirpes indicou um desenvolvimento de 1,51 para a BR3506 e 1,22 para a BR3463, o que indica a contribuição em MSPA, que irá gerar a cobertura do solo. Esses valores indicam que a inoculação influencia um incremento maior em 51% para a MSPA em BR3506 e 22% em BR3463 (figura 12).

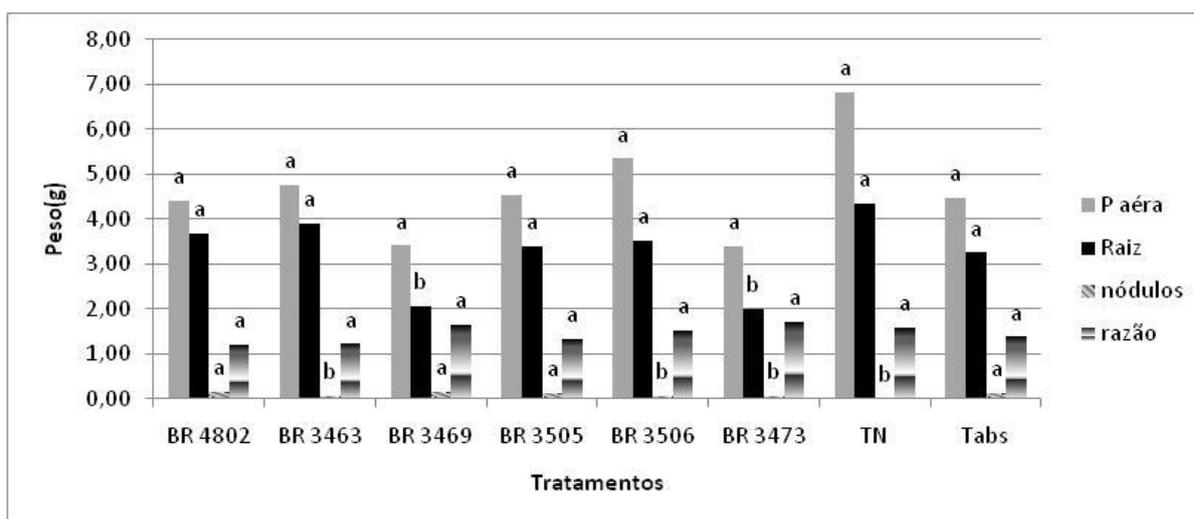


Figura 13: Análise comparativa dos tratamentos de *Mimosa dormiens*

A análise dos tratamentos apresenta uma razão constante não tendo um efeito específico sobre uma parte da planta.

As eficiências encontradas pela BR3469 e BR3473, indicam a incompatibilidade e ineficiência na fixação, já que apresentaram altos valores de MSN, e baixo valor de eficiência.

Os tratamentos não apresentaram diferença estatística pelo teste Scott Knott 5%.

Tabela 6: Influência da inoculação de estirpes de rizóbio para *Mimosa dormiens*

Tratamentos	Massa Seca			EFICIÊNCIA EFICÁCIA (%)	
	Parte aérea(g)	Nódulos(mg)	Raiz(g)		
BR 4802	4,42 a	159,20 a	3,68 a	99	65
BR 3463	4,75 a	60,20 b	3,90 a	106	70
BR 3469	3,41 a	149,00 a	2,06 b	76	50
BR 3505	4,54 a	127,70 a	3,40 a	102	66
BR 3506	5,35 a	64,70 b	3,53 a	120	78
BR 3473	3,40 a	57,70 b	2,00 b	76	50
TN	6,82 a	0,00 b	4,33 a	153	100
Tabs	4,46 a	117,20 a	3,25 a	100	65
CV (%)	26,32	58,34	32,35		

Médias comparadas pelo teste Scott Knott ($p=0,05$)

$1-EFICIÊNCIA=(MSPA\ TRAT/MSPA\ T_{ABS})\times 100$

$$2\text{-EFICÁCIA}=(\text{MSPA TRAT}/\text{MSPA TN}(\text{NH}_4\text{NO}_3))\times 100$$



Figura 14: Comparação do incremento entre a Testemunha nitrogenada o Tratamento inoculado e a Testemunha absoluta.



Figura 15: Nódulos de *Mimosa dormiens* Humb. & Bonpl.

5. CONCLUSÃO

Ao término dos experimentos realizados pode-se concluir que as melhores estirpes utilizadas para *Clitoria fairchildiana* R.A. Howard em base II foram as BR 3624 e a BR 8651. Enquanto as BR 3614 e BR 3469 apresentaram os resultados mais eficazes para *Mimosa flocculosa* Burkart. Na espécie *Mimosa dormiens* Humb. & Bonpl as que se destacaram foram as BR 4802 e a BR 3463. Já em condição não estéril (base III) para a espécie *Mimosa dormiens* Humb. & Bonpl as estirpes com as quais se obteve o melhor resultado foram as BR3506 e a BR 3463, com os mesmos parâmetros experimentais a *Mimosa acutistipula* Benth desenvolveu-se mais com a utilização das BR 3430 e a BR 3429. Ao final do processo de seleção as melhores estirpes serão utilizadas para a produção de inoculantes específicos.

6. REFERÊNCIAS :

- ALLEN, E.K. & ALLEN, O.N. **The Leguminosae: A Source Book of Characteristics Uses and Nodulation.** Wisconsin, University of Wisconsin Press 1981 812 p.
- ARNOLD, G.; & VANDIEST, A. **Nitrogen supply, tree growth and soil acidification.** Fertilizer Research, The Hague, v.27, n.1, p.29-38, 1991
- BALDANI, V.L.D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de inoculação e infecção de plantas de arroz e, ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica.** 265p. Tese (Doutorado). Rio de Janeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996
- BARBERI, A; CARNEIRO, M.A.C.; MOREIRA F.M.S;SIQUEIRA, J. **Nodulação em leguminosas florestais em viveiros do Sul de Minas Gerais.** CERNA, Larvas, v.4 pg145-153, 1998.
- BORDELEAU, L. M.; PRÉVOST, D. **Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments.** Plant and soil, Dordrecht, v. 161, p. 115 – 125, 1994.
- BOT, A.J., NACHTERHAELE AND A. YOUNG. 2000. **Land resource potencial and constraints at regional and country levels.** Land and Water Development Division, Food and Agriculture Organization of the United Nations , Rome
- de FARIA, S.M., A.A. FRANCO, R.M. JESUS, M.S. MENANDRO, J.R. BAITELLO, E.S.P. MUCCI, J. DÖBEREINER AND J.I. SPRENT. 1984. **New nodulating legume trees from South-East Brazil.** New Phytol. 98:317–328.
- de FARIA, S.M., G.P. LEWIS, J.I. SPRENT AND J.M. SUTHERLAND. 1989. **Occurrence of nodulation in the Leguminosae.** New Phytol. 111:607–619.
- de FARIA, S.M., S.G. MCINROY AND J.I. SPRENT. 1987. **The occurrence of infected cells, with persistent infection threats, in legume root nodules.** Can. J. Bot. 65:553–558.
- de FARIA, S.M.;OLIVARES, F.L. de; LIMA, H.C.; MELO, R.B.; XAVIER, R. **Nodulação em florestais, especificidade hospedeira e as implicações na sistemática de Leguminosae.** In: Reunião Brasileira Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, 23., Reunião Brasileira sobre Micorrizas, 7., Simposio Brasileiro de Microbiologia do Solo, 5., e Reunião Brasileira de Biologia do Solo, 2. FertiBio, 98. Anais. Caxambu, UFLA, cap.V. p.667-686, 1999.
- DÖBEREINER, J. 1967. **Efeito da inoculação de sementeiras de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*) no estabelecimento e desenvolvimento das mudas no campo.** Pesqui. Agropecu. Bras. 2:301–305.
- DOBEREINER, J. **Inoculação cruzada e eficiência na simbiose de leguminosas tropicais.** In: Dobereiner, J.; Eira , P.A. da.; Franco, A.A. & Campelo, A.B.P., Eds. As leguminosas na agricultura tropical. p.181-192, 1971.

de FARIA, S.M.. & GUEDES, R.E. **Obtenção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies florestais (aproximação 1999)**. Embrapa-CNPAB; p.2,1999.

de. FARIA, S.M.; LIMA, H.C.; OLIVARES, F.L.; MELO, R.B.; XAVIER, R.P. **Nodulação Em Espécies Florestais, Especificidade Hospedeira e Implicações na Sistemática de Leguminosae**. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E.; CARVALHO, J.G. (Eds). Inter-Relação Fertilidade, Biologia do solo e Nutrição das Plantas. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Lavras: Universidade Federal de Lavras/Departamento de Ciência do Solo, 1999. p. 667-686.

de. FARIA,S.M.. **Obtenção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies florestais**. Seropédica:EMBRAPA Agrobiologia. Documentos n^o 116,10p. dez/2000.

de. FARIA,S.M.,DIEDHIOU,A.G.,LIMA,H.C. de,RIBEIRO,R.D., GALIANA,A., CASTILHO,A.F.,HENRIQUE,J.C. **Evaluating the nodulation status of leguminous species from the Amazonian Forest of Brazil**. Journal of Experimental Botany. Vol.61, No.11, pp.3119-3127, 2010.

FERREIRA, D.F. **Sistema para análise de variância para dados balanceados (Sisvar)**. Lavras: UFLA, 2003. versão 4.3.

FRANCO A.A. CAMPOS, D.N., CUNHA, C.D., CAMPELLO, E.F., MONTEIRO, E.M.S., SANTOS, C.J.F., FONTES, A.M. & FARIA, S.M. **Regevegação de solos degradados**. In: **Workshop sobre recuperação de áreas degradadas** , Itaguaí, RJ. 1990, Anais...Rio Janeiro, UFRRJ, Dep.Ciências Ambientais, 1991, p.133-157.

FRANCO, A. A. et al. **Revegetação de solos degradados**. Seropédica: Embrapa CNPBS, 8 p. 1992 (Embrapa . CNPBS. Comunicado Técnico, 9).

FRANCO, A. A.; DIAS, L. E.; FARIA, S. M. de; CAMPELLO, E. F. C.; SILVA, E. M. R. **Uso de leguminosas florestais noduladas e micorrizadas como agentes de recuperação e manutenção da vida do solo: Um modelo tecnológico**. In: ESTEVES, F. de A. (Coord.) Estrutura, funcionamento e manejo de ecossistemas brasileiros. Rio de Janeiro, 459-467p. (Oecologia Brasilienses, v. 1),UFRJ, 1995.

FRANCO, A.A. & FARIA, S.M. de. **The Contribution Of N₂-Fixing Tree Legumes To Land Reclamation And Sustainability In The Tropics**. Soil Biology Biochemistry, v. 29, N° 5/6, P. 897-903, 1997.

FRANK, B. Ueber **die Parasiten in den Wurzelan-schwillungen der Papilionaceen**. **Botanic Ztg**. v. 37, p 376-387, 394-399, 1879.

FRANK, B. Ueber **die Pilzsymbiose der Leguminosen**. Ber Deut. Bot. Ges., v.7, p. 332-346, 1889.

FRED, E. B. & WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology with special reference to the microorganisms of the soil.** New York: Mcgraw-Hill Book Company, New York, 145p., 1928

GUARIGUATA, M.R.; OSTERTAG, R. **Neotropical secondary forest succession: changes in structural and functional characteristics.** Forest Ecology and Management, v.148, p.185-206, 2001.

HARTWIG, U. **The regulation of symbiotic N₂ Fixation: a conceptual model of N feedback from the ecosystem to the gene expression level.** *Perspectives in plant Ecology, evolution and systematics*, v. 1, p. 92-120, 1998.

HERRERA, M.A.; SALAMANCA, C.P.; BAREA, J.M. **Inoculation Of Woody Legumes With Select Arbuscular Mycorrhizal Fungi And Rhizobia To Recover Desertified Mediterranean Ecosystems.** Applied Environment Microbiology, 59 (1), 129-133. 1993.

KIM, J., REES, D.C. **Nitrogenase and biological nitrogen fixation.** Biochemistry, Washington, v.33, p.387-397, 1994.

LEWIS, G.; SCHIRIRE, B. D.; MACKINDER, B. A; LOCK, J. M. (2ed). **Legumes in the world,** Royal Botanic Gardens, Kew, UK, 2005.

MELLO, R.B., FARIA, S.M., **Contabilidade de bactérias fixadoras de nitrogênio, rizóbio, com espécies da família Leguminosae.** Comunicado técnico 27. Embrapa-CNPAB; p.2, 1998.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** Cap.3 Editora UFLA. 2002.

MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo.** 2º ed. Atual e Aplicada, Lavras, Ed. UFLA, 2006. 729p.

MOREIRA, F.M.S., HERISING, E.J., BIGNELL, D.E., **Manual de Biologia dos Solos Tropicais,** Editora Ufla, 2010

ODUM, E.P. **Fundamentos de ecologia.** 6^o ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. 976p.

PETERS, N.K. & LONG, S.R. **Alfafa root exudates and compounds, which promote or inhibit of *R. meliloti* nodulation genes.** Plant Physiology, v.88, p. 396-110, 1988.

RAVEN, P H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.671-684. 2007.

RICKFLES, R.E. **A economia da natureza.** Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2003. 503p.

SILVA, G.P. **Caracterização química, física e mineralógica de materiais provenientes da mineração de ferro e comportamento de plantas para sua revegetação.** Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1994. 76p. (Tese de Mestrado)

SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. **Biologia do solo** : fundamentos e perspectivas, Ciências Agrárias nos Trópicos. Brasília: MEC/ABEAS; Lavras: ESAL/ FAEPE, 1988. 236p.

SOMASEGARAN, P. & HOBEN, H.J. **Methods in legume - Rhizobium Technology.** Niftal-USAID PP 367. 1985.

SPRENT, J. I. **Nodulation in legumes.** Kew: Royal Botanic Gardens, 2001.

VINCENT, J. M. **A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria.** Blackwell Scientific, Oxford, 1970.

7. ANEXO

Lista com estirpes utilizadas nos experimentos

Identificação	Espécie	Hospedeiros	Local de coleta
BR 2216		<i>Desmodium discolor</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 3429	<i>Burkholderia sp</i>	<i>Mimosa acutistipula</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 3430		<i>Mimosa acutistipula</i>	Fortaleza
BR 3431		<i>Mimosa acutistipula</i>	Fortaleza
BR 3432	<i>Burkholderia sp</i>	<i>Mimosa acutistipula</i>	Fortaleza
BR 3450		<i>Mimosa caesalpinifolia</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 3454	<i>Burkholderia mimosarum</i>	<i>Mimosa scabrella / Mimosa flocculosa</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 3459		<i>Mimosa flocculosa</i>	Fepagro (RS)
BR 3461	<i>Burkholderia nodosa</i>	<i>Mimosa bimucronata</i>	Marilândia (MG)
BR 3462	<i>Burkholderia sp</i>	<i>Mimosa flocculosa / Mimosa tenuiflora</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 3463	<i>Rhizobium sp</i>	<i>Mimosa flocculosa</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 3466	<i>Burkholderia sp</i>	<i>Mimosa tenuiflora / Mimosa camporum</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 3467	<i>Burkholderia mimosarum</i>	<i>Mimosa pellita / Desmodium leiocarpum</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 3469	<i>Burkholderia sp</i>	<i>Mimosa camporum</i>	Porto Trombeta (PA)
BR 3473		<i>Mimosa somnians</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 3505	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	<i>Mimosa sp.</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 3506	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	<i>Mimosa setosa</i>	Porto Trombeta (PA)
BR 3509	<i>Burkholderia sp</i>	<i>Mimosa pigra</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 3514		<i>Mimosa setosa</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 3522		<i>Mimosa setosa</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 3608	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Acacia decurrens / Acacia mearnsii (acácia negra) / Leucaena diversifolia</i>	Campos de Jordão (SP)
BR 3609	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Acacia auriculiformes</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 3610		<i>Acacia auriculiformes</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 3611	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Acacia podalyriifolia / Erythrina falcata / Erythrina verna / E. variegata</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 3614	<i>Burkholderia sp</i>	<i>Acacia mearnsii</i>	
BR 3617	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Acacia mangium</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 3624		<i>Acacia auriculiformes</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 3628	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Acacia saligna</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 3630	<i>Mesorhizobium amorphae</i>	<i>Acacia angustissima / Acacia farnesiana</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 3632		<i>Acacia farnesiana</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 3634		<i>Acacia melanoxylon</i>	Botucatu (SP)
BR 3804	<i>Mesorhizobium plurifarum</i>	<i>Acacia salicina / Chamaecrista ensiformis</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 3807		<i>Chamaecrista nictitans</i>	
BR 3815		<i>Chamaecrista cathartica</i>	Mariana (MG)
BR 4007	<i>Ensifer meliloti</i>	<i>Prosopis juliflora</i>	Fortaleza (CE)
BR 4103	<i>Burkholderia sp</i>	<i>Ormosia nitida</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 4301	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	<i>Calliandra surinamensis / Chamaecrista nictitans</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 4305		<i>Calliandra macrocalyx</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 4405		<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 4406	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Enterolobium contortisiliquum / Enterolobium cyclocarpum / Desmodium</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 4802	<i>Rhizobium sp</i>	<i>Piptadenia gonoacantha / Piptadenia moniliformis</i>	
BR 4816		<i>Prosopis juliflora</i>	São Paulo-Embrapa
BR 4830		<i>Piptadenia adiantoides</i>	Mariana (MG)
BR 5004	<i>Bradyrhizobium sp</i>	<i>Dimorphandra jorgei / Dimorphandra exaltada / Ateleia glazioveana</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 5005	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Dimorphandra jorgei / Acacia salicina / Dimorphandra exaltada</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 5401	<i>Azorhizobium doebereineriae</i>	<i>Sesbania virgata</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 5404	<i>Azorhizobium doebereineriae</i>	<i>Sesbania marginata</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 5609	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Falcataria mollucana / Erythrina verna / Erythrina falcata / E. fusca / Inga</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 5610	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Falcataria mollucana / Albizia lebbeck / Sclerolobium paniculatum</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 5611	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Falcataria mollucana / Albizia lebbeck</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 6010	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Lonchocarpus costatus</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 6205	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Albizia saman / Enterolobium cyclocarpum / Poecilanthe parviflora / Pseu</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 6609	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Inga sessilis / Inga semialata</i>	Porto Murinho (BA)
BR 6610	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	<i>Inga semialata / Inga thibaudiana / Chamaecrista nictitans</i>	Mogi Guaçu (SP)
BR 6815	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Albizia pedicellaris</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 8007	<i>Burkholderia sp</i>	<i>Clitoria fairchildiana</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 8205	<i>Bradyrhizobium sp</i>	<i>Poecilanthe parviflora</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 824		<i>Leucaena leucocephala</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 827	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Leucaena leucocephala / Acosmium bijugum / Parapiptadenia rigida</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 8601	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Bowdichia virgiloides</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 8603	<i>Bradyrhizobium sp</i>	<i>Bowdichia virgiloides</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 8651	<i>Bradyrhizobium sp</i>	<i>Pterocarpus indicus</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 8653	<i>Bradyrhizobium sp</i>	<i>Pterocarpus indicus</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 8801	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>Gliricidia sepium / Leucena diversifolia / Stryphnodendron guianense</i>	Embrapa Agrobiologia (RJ)
BR 9002	<i>Rhizobium sp</i>	<i>Parapiptadenia pterospema / Acacia farnesiana / Acacia crassicarpa / Ae</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)
BR 9004	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Parapiptadenia pterospema</i>	Reserva Natural Vale - Linhares (ES)