

Seleção de estirpes de rizóbio de alta eficiência
na fixação de nitrogênio para *Inga edulis* Mart.
em condições estéreis



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agrobiologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
103**

**Seleção de estirpes de rizóbio de alta eficiência
na fixação de nitrogênio para
Inga edulis Mart. em condições estéreis**

*Marcelo Antoniol Fontes
Juliana Müller Freire
Bruno Gomes Moraes
Fernanda Dourado dos Santos
Sergio Miana de Faria*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agrobiologia
Rodovia BR 465, km 7
CEP 23891-000, Seropédica, RJ
Caixa Postal 74.505
Fone: (21) 3441-1500
Fax: (21) 2682-1230
www.embrapa.br/agrobiologia
www.embrapa.br/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Agrobiologia

Presidente
Bruno José Rodrigues Alves

Secretária-Executiva
Carmelita do Espírito Santo

Membros
*Ednaldo Silva de Araújo, Janaina Ribeiro Costa
Rouws, Luc Felicianus Marie Rouws, Luis
Cláudio Marques de Oliveira, Luiz Fernando
Duarte de Moraes, Marcia Reed Rodrigues
Coelho, Maria Elizabeth Fernandes Correia,
Nátia Élen Auras*

Supervisão editorial
Maria Elizabeth Fernandes Correia

Normalização bibliográfica
Carmelita do Espírito Santo CRB7/5043

Tratamento das ilustrações
Maria Christine Saraiva Barbosa

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Maria Christine Saraiva Barbosa

Foto da capa
Marcelo Antoniol Fontes

1ª edição
1ª impressão: (2020): Edição eletrônica

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Agrobiologia

SELEÇÃO de estirpes de rizóbio de alta eficiência na fixação de nitrogênio
para *Inga edulis* Mart. em condições estéreis. / Marcelo Antoniol Fontes et al.
Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2020.

22 p.; (Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 103).
ISSN: 1676-6709.

1. Bradyrhizobium. 2. Inoculação. 3. Fixação Biológica de Nitrogênio.
4. Biomassa.

I. Fontes, Marcelo Antoniol. II. Freire, Juliana, Mueller. III. Morais, Bruno Gomes.
IV. Dourado, Fernanda dos Santos. V. Faria, Sérgio Miana de. VI. Embrapa
Agrobiologia. XII. Série.

633.2 - CDD 23. ed.

Sumário

Resumo	7
Abstract	8
Introdução.....	9
Material e Métodos	11
Resultados e Discussão	12
Conclusão.....	19
Agradecimentos.....	20
Referências bibliográficas	20

Seleção de estirpes de rizóbio de alta eficiência na fixação de nitrogênio para *Inga edulis* Mart. em condições estéreis

Marcelo Antoniol Fontes¹

Juliana Müller Freire²

Bruno Gomes Moraes³

Fernanda Dourado dos Santos⁴

Sergio Miana de Faria²

Resumo – *Inga edulis* Mart. é uma importante espécie de árvore fixadora de nitrogênio. Cresce bem em solos ácidos, produz frutos comestíveis, fornece sombra e lenha e tem um alto potencial para uso em programas de reflorestamento e agroflorestas em muitos países da América Latina. Para obter plântulas vigorosas dessa espécie fixadora de nitrogênio, o presente trabalho testou 56 estirpes de rizóbio para identificar as mais eficientes para *Inga edulis*. O experimento foi conduzido em condições esterilizadas de casa de vegetação e as sementes foram semeadas em vasos de “Leonard” contendo vermiculita: areia esterilizada na proporção de 2:1 (v:v). O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com três repetições. As seguintes variáveis foram medidas após 150 dias: raiz, parte aérea, nódulos e biomassa total. A eficiência e eficácia relativa foram calculadas. Das 56 estirpes, 40 nodularam *Inga edulis*. As linhagens que mais promoveram crescimento foram as isoladas de espécies de *Inga edulis* (BR 6610) e as de *Clitoria fairchildiana* (BR 8807) e *Acacia mangium* (BR 3617), todas do gênero *Bradyrhizobium*. A biomassa produzida pelas plantas inoculadas com as estirpes mais eficientes foi, em média, 375% superior ao controle absoluto, indicando alta eficácia e eficiência das estirpes de rizóbio selecionadas.

Termos para indexação: *Bradyrhizobium*, inoculação, FBN.

¹ Analista A, Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 7 CEP: 23891-000, Seropédica, RJ. marcelo.fontes@embrapa.br.

² Pesquisador(a) A, Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 7 CEP: 23891-000, Seropédica, RJ. juliana.muller@embrapa.br; sergio.defaria@embrapa.br.

³ Bolsista PIBIC, CNPq, graduando em Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. bmoraes2007@yahoo.com.br.

⁴ Analista B, Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 7 CEP: 23891-000, Seropédica, RJ. fernanda.dourado@embrapa.br.

Selection of high-efficiency rhizobial strains in nitrogen fixation for *Inga edulis* Mart. under sterile conditions

Abstract – *Inga edulis* Mart. is an important nitrogen-fixing tree species. It grows well in acidic soils, produces edible fruits, provides shade and firewood, and have a high potential for use in reforestation and agroforestry programs in many countries in Latin America. In order to obtain vigorous seedlings of this nitrogen-fixing species, the present work tested 56 strains of rhizobia to identify the most efficient strains for *Inga edulis*. The experiment was conducted under sterile greenhouse conditions; seeds were sown in pots of “Leonard” containing sterilized vermiculite: sand in a proportion of 2:1 (v: v). The experimental design was a randomized blocks design with three replications. The following variables were measured after 150 days: root, shoot, nodules, and total biomass. The efficiency and relative effectiveness were calculated. Out of 56 strains, 40 nodulated *Inga edulis*. The strains that most promoted growth were those isolated from species of *Inga edulis* (BR 6610), and those from *Clitoria fairchildiana* (BR 8807) and *Acacia mangium* (BR 3617), all of the *Bradyrhizobium* genus. The biomass produced by plants inoculated with the most efficient strains was, on average, 375% higher than the absolute control, indicating high efficacy and efficiency of the selected rhizobia strains.

Index terms: *Bradyrhizobium*, inoculation, BNF.

Introdução

A implementação do Plano ABC (Agricultura de Baixo Carbono) e os compromissos que o Brasil tem assumido para recuperação das florestas estabelecem um cenário de aumento da demanda por inoculantes de rizóbio para leguminosas arbóreas madeiráveis e/ou com aptidão para a recuperação de áreas degradadas. Estima-se que nos próximos 20 anos, como parte de acordos internacionais como o Desafio de Bonn e Iniciativa 20×20, sejam reflorestados cerca de 12 milhões de hectares de florestas no Brasil (SOARES FILHO *et al.*, 2014; BONN CHALLENGE, 2019; WRI, 2018). Com apenas 13% da vegetação original (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2019), a Mata Atlântica é o bioma que mais deve ser beneficiado por esta meta de restauração.

Considerando esse cenário, a família Leguminosae se destaca dentre as famílias de plantas que podem compor essa restauração ambiental. Estima-se que a família contenha, ao todo, 770 gêneros e aproximadamente 20 mil espécies (LEWIS *et al.*, 2005; LPWG, 2013, LPWG, 2017), das quais cerca de 2.700 são encontradas no Brasil (FLORA DO BRASIL, 2020).

A grande maioria das espécies desta família se associa simbioticamente com bactérias genericamente chamadas de rizóbio (ALLEN e ALLEN 1981; de FARIA *et al.*, 1984, 1987, 1989, 2010; MOREIRA, 2006; SPRENT 2009). A característica de estabelecer simbiose com rizóbios está presente em cerca de 90% das Papilionoideae e Mimosoideae (hoje clado da Caesalpinioideae) (LPWG, 2017) e em pouco mais de 20% das Caesalpinioideae, não considerando o clado Mimosoid recém-admitido (LPWG, 2017). Contudo, é provável que menos de 30% das leguminosas do Brasil tenham sido estudadas quanto à capacidade de estabelecer simbiose com rizóbios (MOREIRA, 2006; de FARIA *et al.*, 2010).

A seleção de bactérias eficientes na fixação de nitrogênio e a inoculação são pré-requisitos para o uso dessas espécies uma vez que existe especificidade na eficiência da simbiose entre bactérias e as plantas hospedeiras em muitos clados (ANDREWS e ANDREWS, 2017; de FARIA *et al.*, 2020). Para obtenção de estirpes de alta eficiência na fixação de nitrogênio são necessárias várias etapas de acordo com a legislação atual (BRASIL, 2011). A primeira etapa é realizada em condições esterilizadas, tanto em laboratório quanto em casa

de vegetação; a segunda, é conduzida em substrato não esterilizado; e, por fim, a terceira é realizada em campo ou viveiro de produção de mudas.

A contribuição dessa tecnologia para a produção de mudas de leguminosas florestais ainda é pequena. Isso decorre da não produção comercial desses insumos: sua produção é economicamente inviável devido ao grande número de espécies existentes, tornando necessária a produção de pequenas doses de muitos inoculantes diferentes para atender ao setor produtivo.

O gênero *Inga* compreende cerca de 300 espécies e ocorre desde o paralelo 24° N no México até 34° S no Uruguai (LEWIS *et al.*, 2005). Pertence a tribo Ingeae da subfamília Caesalpinioideae, Leguminosae (LPWG, 2017). Por meio da simbiose com bactérias diazotróficas, as espécies vulgarmente chamadas de Ingá são autossuficientes em nitrogênio, elemento de maior demanda dos vegetais e responsável pelo crescimento vegetativo das plantas. Por conta dessa simbiose, as espécies de Ingá são capazes de crescer nos mais diferentes biomas brasileiros, incluindo ambientes antropizados e carentes em matéria orgânica.

O Ingá-de-metro, vermelho ou macarrão (*Inga edulis* Mart.), como é conhecido, ocorre desde a Amazônia até o Rio Grande do Sul, ocupando os mais distintos biomas brasileiros como restingas, floresta ombrófila, floresta estacional semidecidual e áreas antropizadas (FLORA DO BRASIL, 2020). É uma espécie amplamente cultivada, rústica, de alta plasticidade, fixadora de nitrogênio e como produtora de frutos comestíveis atraem a avifauna. Além disso, apresenta alto potencial de uso em restauração ambiental em sistemas agroflorestais, contribuindo para uma grande produção de biomassa e acúmulo de nutrientes no solo (FALCÃO e CLEMENT, 2000; RANGEL-VASCONCELOS *et al.*, 2016). Estima-se que através da fixação biológica de nitrogênio, o *Inga edulis* plantado na densidade de 5.000 árvores ha⁻¹ possa produzir anualmente 5 t ha⁻¹ de cobertura verde (LEBLANC *et al.*, 2005).

Por razão desse alto potencial, testou-se 56 estirpes de rizóbio com o objetivo de se obter as estirpes mais eficientes para esta espécie. Buscou-se, ainda, conhecer quais estirpes selecionadas de diferentes espécies de plantas seriam eficientes na inoculação de *Inga edulis* como estratégia de se obter estirpes eficientes que sejam comuns para diversas espécies florestais.

Material e Métodos

O experimento foi realizado em casa de vegetação, localizada na Embrapa Agrobiologia, km 7 BR 465, Seropédica RJ, a 22° 45' S de latitude e 43° 45' W de longitude, a 33 m de altitude.

Analisou-se as estirpes isoladas do hospedeiro assim como estirpes recomendadas para outras espécies florestais, totalizando 56 estirpes estudadas no experimento. Destas, duas eram oriundas do mesmo gênero *Inga* (BR 6609, BR 6610), três foram novos isolados de *Inga edulis* (BR 14315, BR 14221, BR 14222), e seis oriundas de espécies da tribo Ingeae (BR 4305, BR 4301, BR 4406, BR 5609, BR 6815, BR 6205). Também foram testadas estirpes recomendadas para grandes culturas como a soja (BR 29 – SEMIA 5019), feijão-comum (BR 322 – SEMIA 4077, BR 96 – SEMIA 587, BR 520 – SEMIA 4080), feijão-caupi (BR 3301 – SEMIA 6463, BR 3302 – SEMIA 6461), todas da tribo Phaseoleae, assim como de *Clitoria fairchildiana* (BR 8007) e de *Crotalaria* (BR 2003), desta mesma tribo. Foram testadas estirpes de outras tribos como Mimoseae (BR 3432, 3450, 3454, 3461, 3462, 3466, 3467, 3469, 3473, 3505, 3509, 4007, 4812, 4830, 9004), Acacieae (BR 3522, 3608, 3609, 3611, 3617, 3628, 3630, 3632, 3634), Cassieae (BR 3804, 3807, 3815), Sesbanieae (BR 5401, 14224), Dalbergieae (BR 8402, 8653), Desmodieae (BR 2216), Sophoreae (BR 8601), Millettieae (BR 6010), Robinieae (BR 8801), Caesalpinioideae (BR 5004), Brogniartieae (BR 8205).

As estirpes foram crescidas em meio de cultura 79, também conhecido por YM (VINCENT, 1970) contendo azul de bromotimol em agitação orbital entre 4 e 6 dias a temperatura entre 28°C a 30°C. O delineamento experimental foi de blocos casualizados com três repetições, duas plantas por vaso. Utilizou-se vasos de “Leonard” contendo vermiculita: areia esterilizadas na proporção de 2:1 (v:v). As sementes foram pré-germinadas em placas de Petri sobre duas camadas de papel filtro após serem esterilizadas superficialmente com peróxido de hidrogênio (35%) por dois minutos e lavadas em água estéril até a retirada total do peróxido. Foram semeadas duas plântulas por vaso, e o desbaste feito após 15 dias, deixando apenas uma plântula por vaso. A inoculação das plantas com as estirpes se deu no ato do transplante acrescentando 1 mL de inoculante líquido por vaso.

Utilizou-se dois controles, um com adição de nitrogênio mineral (testemunha nitrogenada) e outro sem inoculação e sem adubação

(testemunha absoluta). O controle nitrogenado não foi inoculado, e recebeu semanalmente, a aplicação de cerca de 15 mg de N dependendo da idade da planta. Foi adicionado um total de 310 mg de N durante todo o experimento, que durou 150 dias.

Adicionalmente foi aplicada, quinzenalmente, em todos os tratamentos, uma solução nutritiva contendo KCl, CaCl_2 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4(\text{H}_2\text{O})_7$, H_3BO_3 , MnSO_4 , $\text{ZnSO}_4(\text{H}_2\text{O})_7$, $\text{CuSO}_4(\text{H}_2\text{O})_5$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4(\text{H}_2\text{O})_2$, seguindo recomendações de Norris e Date (1976), intercalada com o uso de água estéril durante todo o período do experimento.

As seguintes variáveis foram mensuradas após 150 dias: biomassa dos nódulos e a biomassa produzida pela planta (parte aérea, raiz e total). Para isso, as respectivas biomassas foram secas em estufa a 65°C até a obtenção de massa constante, e pesadas em balança com duas casas decimais.

Calculou-se a eficácia relativa (ER) através da fórmula $\text{ER} = \text{massa seca total de mudas inoculadas} \times 100 / \text{massa seca total de mudas controle nitrogenado}$ e a eficiência relativa através da fórmula $\text{EfR} = \text{massa seca total de mudas inoculadas} \times 100 / \text{massa seca total de mudas controle absoluto}$.

Realizou-se análise de variância e quando houve diferenças pelo teste F, aplicou-se o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o Pacote Agrícola-e do Programa R (R CORE TEAM, 2018).

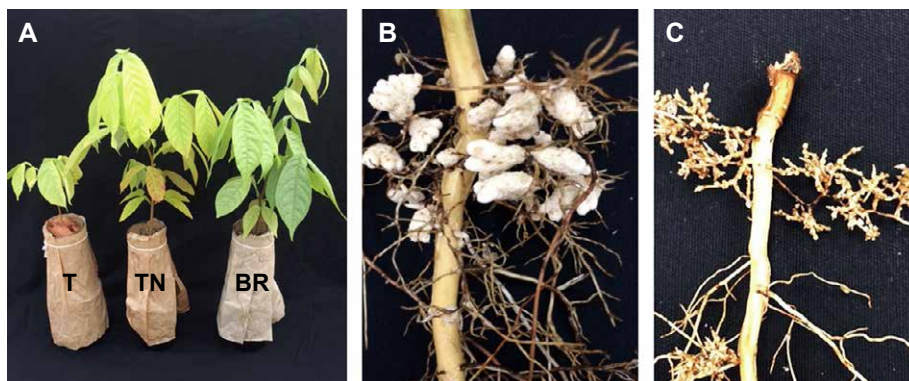
Resultados e Discussão

Em virtude da pouca disponibilidade de inoculantes para espécies arbóreas no país, a estratégia utilizada foi testar tanto as estirpes de rizóbios disponíveis no mercado como aquelas já testadas e recomendadas pela Embrapa Agrobiologia para espécies florestais. Essa estratégia visou obter um inoculante comum e eficiente para várias espécies. Algumas estirpes de rizóbio são capazes de serem eficientes para mais de 30 espécies arbóreas (de FARIA *et al.*, 2020).

As espécies de *Inga* são preferencialmente noduladas por *Bradyrhizobium* (LEBLANC *et al.*, 2005; da SILVA *et al.*, 2014; PORTO *et al.*, 2017; de FARIA *et al.*, 2020) e os resultados aqui apresentados confirmam esta informação, pois as seis estirpes mais eficientes no desenvolvimento da planta de *Inga edulis* foram todas de *Bradyrhizobium*. Esse grupo de bactérias

também é o preferencial de vários gêneros da família Leguminosae como *Acacia*, *Aeschynome*, *Albizia*, *Ateleia*, *Bowdichia*, *Centrolobium*, *Dalbergia*, *Deguelia*, *Dimorphandra*, e de vários gêneros de Caesalpinoideae e mesmo Papilionoideae de origem tropical (MOREIRA *et al.*, 1993, ANDREWS e ANDREWS, 2017; de FARIA *et al.*, 2020).

As estirpes mais eficientes para o *Inga edulis* foram as oriundas de isolamentos de espécies do próprio gênero (BR 6610 e BR 6609), estirpes essas que já são autorizadas pelo MAPA para a inoculação de espécies do gênero *Inga*, identificada por *Bradyrhizobium* sp., além da estirpe proveniente de *Clitoria fairchildiana* (BR 8807; *Bradyrhizobium* sp.) e de *Acacia mangium* (BR 3617; *Bradyrhizobium* sp.), que também foram muito eficientes quando testadas em outras espécies do gênero *Inga* (resultados não publicados) (Figura 1). Essas estirpes proporcionaram um crescimento da planta (massa total) variando de 8,43g a 10,1g, sendo o maior com a estirpe BR 3617 (Figura 1). Não houve, entretanto, diferença estatística entre essas três estirpes de bactérias e nem quando comparados ao controle com adição de nitrogênio mineral, que alcançou 8,3g. Porém, quando comparadas ao controle absoluto (2,5g), sem adição de nitrogênio e sem inoculação, o alcance dessas três melhores estirpes, na média do peso total da planta seca, foi de 375%, indicando alta eficiência.



Fotos: Marcelo Antoniol Fontes

Figura 1. **A.** Plantas de *Inga edulis* comparando T (Testemunha absoluta), TN (Testemunha com adição de N mineral) e BR (inoculada com a estirpe BR 3617). **B.** Nódulos normais e fixadores de nitrogênio induzidos pela estirpe *Bradyrhizobium* sp. BR 3617. **C.** Nódulos ineficientes induzidos por uma estirpe de *Rhizobium* sp. (BR 8601) obtida de *Bowdichia virgilioides*.

A BR 3617 já se mostrou eficiente para outras espécies, destacando-a como uma estirpe de amplo espectro e com potencial para recomendação para múltiplas espécies, tais como *Erythrina verna* Vell., *E. variegata* L., *Acacia crassicaarpa* A.Cunn. ex Benth., *A. mangium* Willd., *A. saligna* (Labill.) H.L.Wendl., *Pseudosamanea guachapele* (Kunth) Harms, *Albizia procera* (Roxb.) Benth., *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb., *Inga thibaudiana* DC. e *Tachigali vulgaris* L.G.Silva & H.C.Lima (de FARIA *et al.*, 1999; de FARIA *et al.*, 2020).

Das 56 estirpes testadas, 16 não nodularam o *Inga edulis*. Deste total, 13, são de bactérias de gêneros que usualmente não nodulam o gênero *Inga*: *Paraburkholderia*, *Rhizobium* ou *Azorhizobium* (Tabela 1). Todas as estirpes testadas e recomendadas para espécies de gêneros da mesma tribo Ingeae (*Enterolobium*, *Samanea*, *Falcataria*, *Albizia* e *Calliandra*) não foram eficientes para *Inga edulis*, apesar de todas serem *Bradyrhizobium*. As estirpes recomendadas para as grandes culturas como soja (BR 29 e BR 96), feijão-comum (BR 322) e feijão-caupi (BR 3301 e 3302) testadas também não foram eficientes para o crescimento de *Inga edulis*. Algumas estirpes até conseguiram nodular o Ingá, porém com baixa eficiência: os inúmeros nódulos formados além de diminutos não eram fixadores de nitrogênio ou ineficientes (Figuras 1C). Esse foi o caso das estirpes BR 14222 e BR 14221, isolados novos do *Inga edulis* (Tabela 1).

A eficiência (T) da inoculação foi superior a 100% para 15 estirpes testadas, indicando superioridade das mudas inoculadas em relação às mudas não adubadas e não inoculadas (controle absoluto). Foram elas: BR 2003, BR 3301, BR 3302, BR 3611, BR 3617, BR 3630, BR 4406, BR 5609, BR 6205, BR 6609, BR 6610, BR 8007, BR 8653, BR 8801, BR 14315 (Figura 2).

Avaliando a eficácia (TN) da inoculação, observa-se que apenas três estirpes, as BR 3617, BR 6610 e BR 8807 apresentaram eficácia superior a 100%, ou seja, com matéria seca total maior do que as mudas do tratamento nitrogenado. Essas estirpes apresentaram valores de eficácia variando de 100 a 121% (Figura 2).

Os valores de eficácia entre as leguminosas podem variar bastante em condições estéreis ou não (FRANCO e de FARIA, 1997). A baixa eficácia indica que mais estirpes de rizóbio devam ser testadas ou que este é o limite da eficiência da fixação biológica de nitrogênio para aquela determinada

Tabela 1. Massa seca da parte aérea de plantas de *Inga edulis* inoculado com diferentes estirpes de rizóbio aos 150 dias em casa de vegetação sob condições controladas.

Estirpe	Hospedeiro original	Identificação	A Peso nódulos secos (g)	B Peso da parte aérea seca (g)	C Peso da raiz seca (g)	A+B+C (g)
BR 2003	<i>Crotalaria spectabilis</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	0,25c	1,50 b	0,81 b	2,56 b
BR 2216	<i>Desmodium discolor</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	0,11 c	0,97 b	0,86 b	1,94b
BR 29	<i>Glycine max</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	0,22 c	1,10 b	1,04 b	2,36 b
BR 322	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium tropici</i>	0,11 c	1,23 b	1,07 b	2,41 b
BR 3301	<i>Vigna unguiculata</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	0,42 c	1,48 b	1,03 b	2,94 b
BR 3302	<i>Vigna unguiculata</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	0,74b	1,93 b	1,60 b	4,27 b
BR 3432	<i>Mimosa acutistipula</i>	<i>Paraburkholderia</i> sp.	0,00 c	1,09 b	0,78 b	1,86 b
BR 3450	<i>Mimosa caesalpinhiifolia</i>	<i>Paraburkholderia</i> sp.	0,00 c	1,19 b	0,95 b	2,14 b
BR 3454	<i>Mimosa scabrella</i>	<i>Paraburkholderia mimosarum</i>	0,00 c	0,48 b	0,41 b	0,89 b
BR 3461	<i>Mimosa bimucronata</i>	<i>Paraburkholderia nodosa</i>	0,12 c	1,33 b	1,01 b	2,47 b
BR 3462	<i>Mimosa floculosa</i>	<i>Paraburkholderia</i> sp.	0,28 c	1,51 b	0,96 b	2,75 b
BR 3466	<i>Mimosa tenuiflora</i>	<i>Paraburkholderia</i> sp.	0,00 c	0,92 b	0,85 b	1,77 b
BR 3467	<i>Mimosa peltita</i>	<i>Paraburkholderia mimosarum</i>	0,01 c	0,49 b	0,49 b	0,99 b
BR 3469	<i>Mimosa camporum</i>	<i>Paraburkholderia mimosarum</i>	0,00 c	1,18 b	1,24 b	2,42 b
BR 3473	<i>Mimosa xanthocentra</i>	<i>Paraburkholderia</i> sp.	0,00 c	0,52 b	0,47 b	0,98 b
BR 3505	<i>Mimosa somnians</i>	<i>Paraburkholderia</i> sp.	0,16 c	1,04 b	0,91 b	2,11 b
BR 3509	<i>Mimosa velloziana</i>	<i>Paraburkholderia</i> sp.	0,16 c	0,67 b	0,80 b	1,63 b
BR 3522	<i>Mimosa setosa</i>	<i>Paraburkholderia</i> sp.	0,18 c	1,08 b	1,01 b	2,27 b
BR 3608	<i>Acacia decurrens</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	0,02 c	0,85 b	0,51 b	1,39 b
BR 3609	<i>Acacia auriculiformis</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	0,28 c	1,06 b	0,80 b	2,14 b

Tabela 1. Massa seca da parte aérea de plantas de *Inga edulis* inoculado com diferentes estirpes de rizóbio aos 150 dias em casa de vegetação sob condições controladas. (continuação)

Estirpe	Hospedeiro original	Identificação	A Peso nódulos secos (g)	B Peso da parte aérea seca (g)	C Peso da raiz seca (g)	A+B+C (g)
BR 3611	<i>Acacia podalyriifolia</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	0,30 c	1,56 b	1,03 b	2,88 b
BR 3617	<i>Acacia mangium</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	1,94a	4,82 a	3,38 a	10,14a
BR 3628	<i>Acacia saligna</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	0,15 c	1,22 b	0,90 b	2,27 b
BR 3630	<i>Acaciella angustissima</i>	<i>Mesorhizobium amorphae</i>	0,82b	0,95 b	0,86 b	2,63 b
BR 3632	<i>Vachellia farnesiana</i>	<i>Mesorhizobium</i> sp.	0,32 c	0,87 b	0,66 b	1,85 b
BR 3634	<i>Acacia melanoxylon</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	0,01 c	0,90 b	0,78 b	1,68 b
BR 3804	<i>Chamaecrista ensiformis</i>	<i>Mesorhizobium plurifarium</i>	0,20 c	0,47 b	0,37 b	1,04 b
BR 3807	<i>Chamaecrista nictitans</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	0,19 c	1,11 b	0,77 b	2,07 b
BR 3815	<i>Chamaecrista cathartica</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	0,07 c	0,77 b	0,68 b	1,52 b
BR 4007	<i>Prosopis juliflora</i>	<i>Ensifer meliloti</i>	0,22 c	1,04 b	0,73 b	1,99 b
BR 4301	<i>Calliandra surinamensis</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	0,00 c	0,84 b	1,20 b	2,04 b
BR 4305	<i>Calliandra macrocalyx</i>	<i>Paraburkholderia</i> sp.	0,16 c	0,84 b	0,51 b	1,51 b
BR 4406	<i>Enterolobium gummiiferum</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	0,26 c	1,22 b	1,06 b	2,54 b
BR 4812	<i>Piptadenia stipulacea</i>	<i>Paraburkholderia</i> sp.	0,00 c	1,00 b	1,09 b	2,09 b
BR 4830	<i>Piptadenia adiantoides</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	0,00 c	1,19 b	0,87 b	2,06 b
BR 5004	<i>Dimorphandra jorgei</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	0,18 c	0,86 b	0,93 b	1,97 b
BR 520	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium freirei</i>	0,00 c	0,48 b	0,39 b	0,87 b
BR 5401	<i>Sesbania virgata</i>	<i>Azorhizobium doebereineriae</i>	0,03 c	0,65 b	0,70 b	1,38 b
BR 5609	<i>Falcataria moluccana</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	1,08 b	2,44 b	1,34 b	4,86 b
BR 6010	<i>Deguelia costata</i>	<i>Bradyrhizobium mercantiei</i>	0,00 c	1,12 b	1,04 b	2,15 b

Tabela 1. Massa seca da parte aérea de plantas de *Inga edulis* inoculado com diferentes estirpes de rizóbio aos 150 dias em casa de vegetação sob condições controladas. (continuação)

Estirpe	Hospedeiro original	Identificação	A Peso nódulos secos (g)	B Peso da parte aérea seca (g)	C Peso da raiz seca (g)	A+B+C (g)
BR 6205	<i>Samanea saman</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	0,49 c	1,98 b	1,19 b	3,66 b
BR 6609	<i>Inga sessilis</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	1,65a	3,85 a	1,56 b	7,06 a
BR 6610	<i>Inga marginata</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	1,40a	4,76 a	2,58 a	8,73 a
BR 6815	<i>Albizia pedicularis</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	0,00 c	0,48 b	0,37 b	0,85 b
BR 8007	<i>Clitoria fairchildiana</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	1,56 a	4,20 a	2,67 a	8,43 a
BR 8205	<i>Poecilanthe parviflora</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	0,03 c	1,27 b	1,04 b	2,34 b
BR 8402	<i>Dalbergia nigra</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	0,00 c	0,91 b	0,81 b	1,72 b
BR 8601	<i>Bowdichia virgilioides</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	0,18 c	0,99 b	0,82 b	1,99 b
BR 8653	<i>Pterocarpus indicus</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	1,13 b	3,65 a	2,45 a	7,23 a
BR 8801	<i>Gliricidia sepium</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	0,14 c	1,27 b	1,20 b	2,61 b
BR 9004	<i>Parapiptadenia pterosperma</i>	<i>Paraburkholderia nodosa</i>	0,06 c	0,83 b	0,73 b	1,62 b
BR 96	<i>Glycine max</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	0,01 c	0,75 b	0,70 b	1,46 b
BR 14222	<i>Inga edulis</i>	<i>Rhizobium</i>	0,21 c	1,21 b	0,84 b	2,25 b
BR 14315	<i>Inga edulis</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	0,99 b	4,93 a	2,17 a	8,09 a
BR 14224	<i>Sesbania sesban</i>	<i>Rhizobium</i>	0,21 c	1,12 b	1,14 b	2,47 b
BR 14221	<i>Inga edulis</i>	<i>Rhizobium</i>	0,01 c	0,78 b	0,54 b	1,33 b
TN			0,0c	5,13a	3,23a	8,36a
T			0,0c	1,53b	0,97b	2,50b

Legenda: TN – Testemunha com adição de N mineral; T – Testemunha absoluta. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Em negrito as melhores estirpes.

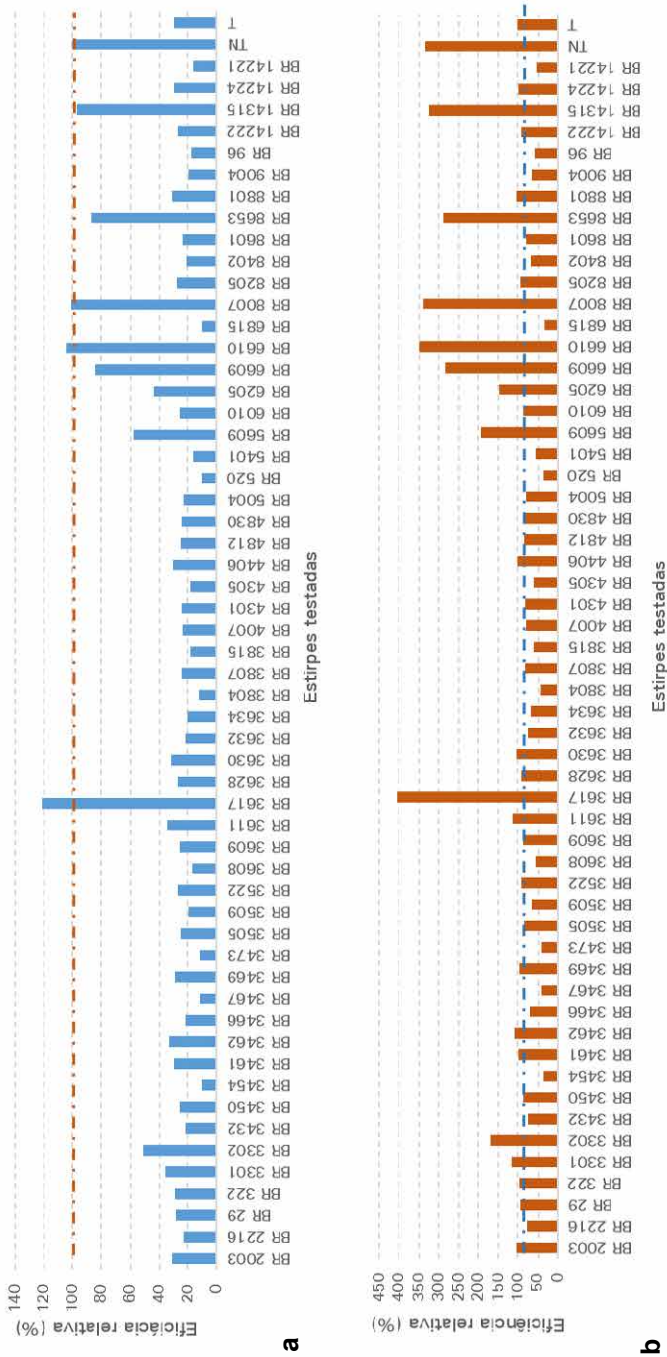


Figura 2. (a) Eficácia relativa (%) calculada para as mudas inoculadas em relação ao controle nitrogenado; **(b)** Eficácia relativa (%) calculada para as mudas inoculadas em relação ao controle absoluto (mudas não adubadas e não inoculadas). A linha tracejada marrom mostra a eficiência relativa e a linha tracejada azul mostra a eficácia relativa.

espécie. Para o gênero *Inga* estes valores podem ser considerados altos, e se aproximam dos encontrados por Porto *et al.* (2017) em condições estéreis para sete estirpes de *Inga edulis*.

Ressalta-se que os controles adubados com N são passíveis de manipulação, uma vez que, a quantidade de N adicionado não é limitada e é dependente do período do experimento. Tenta-se obter o maior desenvolvimento possível das plantas neste tratamento e, assim, tê-lo como referência da eficiência das estirpes em teste (de FARIA *et al.*, 2020). Desta forma, os valores da eficácia (TN) são muito variáveis como os observados por Grossman *et al.* (2006) estudando *Inga oerstediana* que não encontraram maior produção de biomassa em nenhuma das mudas inoculadas em relação ao controle nitrogenado; Franco e de Faria (1997) encontraram eficácia de 81% para as estirpes BR 6609 e BR 6610 em *I. marginata* e Maia e Scotti (2010) que encontraram eficácia de até 80% em mudas de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* inoculadas com BHICB-ing3.

As estirpes aqui selecionadas ainda devem ser testadas em condições não estéreis em casa de vegetação (vasos com solo) ou em viveiro de produção de mudas e no campo. O processo de seleção das bactérias mais eficientes na fixação de nitrogênio em condições não estéreis pode restringir ainda mais o número de estirpes de alta eficiência e a eficácia das estirpes em função da competição com bactérias nativas e presentes no solo.

Conclusão

As estirpes mais eficientes para *Inga edulis* pertencem ao gênero *Bradyrhizobium*.

Inga edulis é capaz de nodular eficientemente com estirpes de outras espécies de leguminosas como *Acacia mangium*, *Clitoria fairchildiana* e *Pterocarpus indicus*.

As estirpes que se mostraram mais eficientes na fixação de nitrogênio em condições estéreis para *Inga edulis* foram BR 3617, BR 6610 e BR 8007.

Agradecimentos

À EMBRAPA por financiar o projeto “Produção de Sementes de Leguminosas Arbóreas com Qualidade Genética para Restauração Ambiental da Mata Atlântica” sob o nº 12.13.14.016.00.00 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa PIBIC.

Referências

- ALLEN O.; ALLEN K. **The Leguminosae: a source book of characteristics, uses and nodulation**. Madison, WI, USA: University of Wisconsin Press, 1981.
- ANDREWS, M.; ANDREWS, M. E. Specificity in legume-rhizobia symbioses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, p. 705, 2017
- BONN CHALLENGE. Disponível em: <<http://www.bonnchallenge.org/>>. Acesso em: 29 out. 2019.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 13, de 24 de março de 2011. Aprova as normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura... **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 25 mar. 2011. Seção 1, p. 3.
- FALCÃO M. de A.; CLEMENT C. R. Fenologia e produtividade do Ingá-cipó (*Inga Edulis*) na Amazônia Central. **Acta Amazônica**, v. 30, n. 2, p. 173-180, 2000.
- FARIA, S. M. de; BALIEIRO, F. de C.; PAULA, R. R.; SANTOS, F. M.; ZILLI, J. E. Biological nitrogen fixation (BNF) in mixed-forest plantations. In: CARDOSO, E. J. B. N.; GONÇALVES, J. L. de M.; BALIEIRO, F. de C.; FRANCO, A. A. (Ed.). **Mixed plantations of eucalyptus and leguminous trees: soil, microbiology and ecosystem services**. Cham: Springer, 2020. Cap. 6, p. 103-135.
- FARIAS, S. M. de; DIEDHIOU, A. G.; LIMA, H. C.; RIBEIRO, R. D. de; GALIANA, A.; CASTILHO, A. F.; HENRIQUES, J. C. Evaluating the nodulation status of leguminous species from the Amazonian forest of Brazil. **Journal of Experimental Botany**, v. 61 n. 11, p. 3119-3127, 2010.
- FARIA, S. M. de; JESUS, R. M.; MENANDRO, M. S.; BAITELLO, J. B.; MUCCI, E. S. F.; DOBEREINER, J.; SPRENT, J. L. New nodulating legume trees from south-east Brazil. **New Phytologist**, v. 98, n. 2, p. 317-328, 1984.
- FARIA, S. M. de; LEWIS, G. P.; SPRENT, J. I.; SUTHERLAND, J. M. Occurrence of nodulation in the Leguminosae. **New Phytologist**, v. 111, p. 607-619, 1989.
- FARIA, S. M. de; LIMA, H. C. de. Additional studies of the nodulation status of legume species in Brazil. **Plant and Soil**, v. 200, p. 185-192, 1998.
- FARIA, S. M. de; LIMA, H. C. de; MUCCI, E. S. F.; SPRENT, J. L. Nodulation of legume trees from South East Brazil. **Plant and Soil**, v. 99, p. 347-356, 1987.

FARIA, S. M. de; LIMA, H. C. de; OLIVARES, F. L.; MELO, R. B.; XAVIER, R. 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. (Ed.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. VICOSA: SBCS; LAVRAS: UFLA/DCS, 1999. p. 667-686.

FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 05 out. 2020.

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**, v. 29, n.5-6, p. 897-903, 1997.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica-Período 2017-2018**. São Paulo, 2019. Disponível em: <<http://mapas.sosma.org.br>>. Acesso em: 01 dez 2019.

GROSSMAN, J. M.; SHEAFFER, C.; WYSE, D.; BUCCIARELLI, B.; VANCE, C.; GRAHAM, P. H. An assessment of nodulation and nitrogen fixation in inoculated *Inga oerstediana*, a nitrogen-fixing tree shading organically grown coffee in Chiapas, Mexico. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, n. (4), p. 769-784, 2006.

JUSTINO, G. C.; OMENA-GARCIA R. P.; SANTOS, A. M. S.; CAMARGOS L. S., SODEK, L.; GONÇALVES, J. F. C. Nitrogen used strategies of nodulated amazonian legume: *Inga edulis*. **Journal of Tropical Forest Science**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2017.

LEBLANC, H. A.; MCGRAW, R. L.; NYGREN, P.; LE ROUX, C. Neotropical legume tree *Inga edulis* forms N₂-fixing symbiosis with fast-growing *Bradyrhizobium* strains. **Plant and soil**, v. 275, n. 1-2, 123-133, 2005.

LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. (Ed.). **Legumes of the world**. Melbourne, AU: Royal Botanic Gardens, 2005.

LPWG. The Legume Phylogeny Working Group. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **Taxon**, v. 66, n. 1, p. 44-77, 2017.

LPWG, Legume Phylogeny Working Group. Legume phylogeny and classification in the 21th century: progress, prospects and lessons for the other species-rich clades. **Taxon**, v. 62, p. 217-2487, 2013.

MAIA, J.; SCOTTI, M. R. Growth of *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* under rizobia inoculation. **Revista de la Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal**, v.10, n. 2, p. 139-149, 2010.

MOREIRA, F. M. de S. Nitrogen-fixing Leguminosae-nodulating Bacteria. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (Ed.). **Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems**. Wallingford: CABI Publishing, 2006. 280 p.

NORRIS, D. O.; DATE, R.A. Legume bacteriology. In: Shaw, N.H., Bryan, W.W. (Eds.) **Tropical pasture research - principles and methods**. Brisbane: CAB. p. 134-173, 1976.

PORTO, D. S.; FARIAS, E. do N. C.; CHAVES, J. da S.; SOUZA, B. F.; MEDEIROS, D. R.; ZILLI, J. E.; SILVA, K. da. Symbiotic effectiveness of *Bradyrhizobium ingae* in promoting growth of *Inga edulis* Mart. seedlings. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 41, 2017.

RANGEL-VASCONCELOS, L. G. T.; KATO, O. R.; VASCONCELOS, S. S.; OLIVEIRA, F. DE A. Acúmulo de biomassa e nutrientes de duas leguminosas arbóreas introduzidas em sistema de pousio na Amazônia. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 26, n. 3, p. 735-746, jul./set. 2016.

R CORE TEAM 2018. R: **A language and environment for statistical computing**. Viena: R Foundation for Statistical Computing, 2018. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 25 out. 2019.

SILVA, K.; MEYER, S. E. de; ROUWS, L. F. M.; FARIAS, E. N. C.; SANTOS, M.A.O.; O'HARA, G.; ARDLEY, J. K.; WILLEMS, A.; PITARD, R. M.; ZILLI, J. E. *Bradyrhizobium ingae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Inga laurina* grown in Cerrado soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 3395-3401, 2014.

SOARES FILHO, B. RAJÃO, R.; MACEDO, M.; CARNEIRO, A.; COSTA, W.; COE, M.; RODRIGUES, H.; ALENCAR, A. Cracking Brazil's forest code. **Science**, v. 344, n. 6182, p. 363-364, 2014.

SPRENT, J. I. **Legume nodulation: a global perspective**. Chichester, UK: Wiley-Blackwell, 2009. 183 p.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodulate bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 164 p. (IPB Handbook, 15).

World Resources Institute. <<https://www.wri.org/our-work/project/initiative-20x20>>. Acesso em: 25 out. 2019.

