

**CARACTERIZAÇÃO DA NODULAÇÃO E RESPOSTA DE MUDAS  
DE *INGA* spp. À INOCULAÇÃO COM BACTÉRIAS  
DIAZOTRÓFICAS, NO PARQUE NACIONAL SERRA  
DO DIVISOR, AMAZÔNIA OCIDENTAL**

**GLÓRIA DA SILVA ALMEIDA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL**

**FACULDADE DE TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB**

**FACULDADE DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL**

**CARACTERIZAÇÃO DA NODULAÇÃO E RESPOSTA DE MUDAS  
DE *INGA* spp. À INOCULAÇÃO COM BACTÉRIAS  
DIAZOTRÓFICAS, NO PARQUE NACIONAL SERRA  
DO DIVISOR, AMAZÔNIA OCIDENTAL.**

**GLÓRIA DA SILVA ALMEIDA**

**DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA  
FLORESTAL DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA COMO PARTE DOS REQUISITOS  
NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS  
FLORESTAIS.**

**APROVADA POR:**

Prof. Dr. Anderson Marcos de Souza - UnB  
Orientador

Prof. Dr. Reginaldo Sérgio Pereira - UnB

Prof. Dr. Cícero Célio de Figueiredo – UnB

Profª. Dra. Rosana de Carvalho Cristo Martins - UnB

Brasília - DF  
Fevereiro de 2013

A DEUS, a minha mãe, Francisca de Jesus Silva  
e à memória do meu pai Francisco Almeida.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer ao autor e consumidor da minha fé, DEUS, por tudo o que tem me concedido e por mais esta vitória alcançada.

A minha família: Francisca de Jesus (mãe) pelo amor, apoio e orações. As minhas irmãs: Andréia e Adriana Almeida pelas palavras de incentivo e carinho. Nicolly (Flor) e Samuel (coração) vocês são dádivas de Jeová na minha vida, se existisse um “instrumento” que pudesse mensurar a escala do meu amor por vocês, este simplesmente não suportaria tamanha grandeza. Família Almeida, infinitamente, AMO VOCÊS!!!!

Ao Elber Ribeiro, uma teimosia sua permitiu-me chegar até aqui, você sempre acreditou mais em mim do que eu mesmo, você é um grande homem, que Deus te abençoe sempre. Obrigada por TUDO!

Aos ex- professores e mais que amigos, Rafael e Claudene Calderon, vocês são fora de série, *muchas gracias* por TUDO e principalmente por permitir-me ser parte da família de vocês. Ao Luiz Felipe (Lipe) e a Maria Eduarda (Duda), que me proporcionaram momentos de felicidades amenizando a saudade dos meus. Família Calderon, vocês foram anjos de Deus na minha vida (vocês sabem o porquê) serei eternamente grata.

A ilustríssima professora Eliane Oliveira da UFAC, pela amizade e co-orientação que foi fundamental para a realização deste.

Ao professor Elizio Ferreira - UFAC, que cedeu o espaço físico do seu laboratório de solos para a instalação do experimento.

Ao Paulo Oliveira, chefe do PSND – ICMBio - CZS, amigo e parceiro de pesquisa, pelo apoio logístico e operacional nas coletas de campo no Parque Nacional da Serra do Divisor.

Ao senhor Sebastião Aragão, morador do PSND, que auxiliou nas coletas botânicas, como guia de campo e pela concessão da sua casa como base de apoio para toda a equipe de campo, Sebastião Aragão, o Sr. foi incrível.

Aos alunos da UFAC: Alan Juan, Jonas, Luan Oliveira, Andréia e Adriana Almeida, sem a ajuda de vocês, o trabalho teria sido mais árduo, obrigada pelo apoio tanto em campo quanto em laboratório. A professora Maria Cristina – UFAC, pela identificação das plantas.

Aos amigos e companheiros da pós graduação da UNB, que tornaram os meus dias em Brasília mais amenos, e também que contribuíram para a melhoria deste. A minha gratidão a: Fabrício Assis, Fabricia Menezes, Alexandre Carvalho, Eder Miguel, Lamartine Soares, Lara Helena, Luciane Gomes (Lú), Kamilla Andrade e Henrique Mews.

Fabrício: tudo resume-se em “desistir é pior do que fracassar e disponha”, lição para toda a vida. Fabricia, sua companhia foi balsamo nos momentos difíceis, obrigada por compartilhar risos e lágrimas. Alexandre (“malinha”), ao mestre das palavras, obrigada pela amizade. Kamilla Andrade, apoio nas horas certas. Lú, mulher de fé e que irradia alegria nos lugares por onde pisam as plantas dos seus pés.

Aos secretários da pós graduação: Pedro e Chiquinho, sempre dispostos a ajudar.

Ao meu orientador, Anderson Marcos, que foi um pai, pela orientação, pelo apoio, conselhos e pela ajuda que contribuíram para a melhoria deste e principalmente para o aperfeiçoamento do meu aprendizado. Homem que por excelente orientação, alcançou a admiração de outrem.

Agradeço também a banca examinadora pelas contribuições. E a todos os professores de pós-graduação do Programa de Ciências Florestais da Universidade de Brasília que contribuíram de forma direta ou indireta para o meu crescimento profissional e intelectual. Em especial o Prof. Eraldo Matricardi pelos momentos de descontração no Laboratório de Manejo, pelos incentivos e palavras de sabedoria.

E por fim, mas não menos importante agradeço a CAPES REUNI, pela concessão da bolsa de mestrado.

**A TODOS, MUITO OBRIGADA!**

“A mente que se abre a uma nova ideia,  
Jamais voltará ao seu tamanho original.”  
([Albert Einstein](#))

## RESUMO

O Acre é um dos estados da Amazônia que mantém grande parte de sua área preservada. Das suas Unidades de Conservação, o Parque Nacional Serra do Divisor (PNSD) possui grande valor ambiental, por sua alta biodiversidade. Entretanto, a sua conservação sofre constantes ameaças, principalmente pelas populações tradicionais, através da agricultura de subsistência, tendo como consequência o surgimento de áreas degradadas. Uma alternativa à recuperação dessas áreas é o uso de leguminosas com capacidade de fixação biológica de nitrogênio. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de nodulação em espécies *Inga* sp., bem como isolar e testar o efeito da inoculação no desenvolvimento e estabelecimento de mudas. Diferentes espécies de *Inga* spp. de populações naturais do PNSD foram avaliadas, quanto à sua capacidade de nodulação, obtenção de colônias de bactérias diazotróficas, e morfologia das colônias. Posteriormente, os nódulos foram isolados em laboratório da Universidade Federal do Acre (UFAC – Campus Floresta), e as estirpes foram utilizadas para a inoculação de sementes de *Inga edulis* Marté (Inga rabo de macaco) e *Inga* sp. (Inga canela). Para avaliação da efetividade da inoculação foram testadas 12 isolados de bactérias diazotróficas de estirpes de *Inga* spp. em relação ao uso ou não de adubação nitrogenada. O experimento foi implantado no delineamento inteiramente casualizado e após 120 dias foi avaliado o desenvolvimento e estabelecimento das mudas. Morfologicamente, os nódulos variaram de esféricos a ramificados, e sua coloração de marrom a bege. Relação positiva foi verificada entre o peso seco dos nódulos e o peso seco da parte aérea das duas espécies. Diferença significativa foi encontrada entre os tratamentos com inoculação e sem inoculação, sendo positivo o uso de inoculantes no desenvolvimento das mudas. Não foi detectado efeito de especificidade das estirpes para com as espécies. A estirpe IRM quando inoculada, propiciou a obtenção das maiores médias. Houve diferença significativa para a avaliação dos parâmetros de qualidade de mudas, tanto para *Inga edulis* quanto para *Inga* sp. (Inga canela) sendo os tratamentos que utilizaram a inoculação com bactérias diazotróficas os que apresentaram mudas de melhor qualidade.

**PALAVRAS CHAVES:** *Inga* spp. ; fixação biológica de nitrogênio; produção de mudas.

## ABSTRACT

Acre is one of Amazon states with most of its forest area still preserved. Within its Conservation Units, the *Serra do Divisor* National Park – PNSD presents major environmental importance due to its high biodiversity. However, its conservation is oftenly threatened mainly by traditional populations through subsistence agriculture, which causes an increase in degraded areas. An alternative to recover these areas is using legumes with capacity of biological nitrogen fixation. Therefore, the aim of this work was to study the nodulation potential of *Inga* spp species, and also to isolate and test the effect of the inoculation in the development and establishment of seedlings. Different *Inga* spp. species were assessed from natural populations of PNSD, with respect to their nodulation capacity, obtainance of diazotrophic bacteria colonies, and colonies' morfology. Afterwards, the nodules were isolated in laboratory (UFAC – Floresta Campus), and the strains were used for the inoculation of the seeds of *Inga edulis* Mart. and *Inga* sp. In order to assess inoculation effectiveness, 12 *Inga* spp. strains were tested with regard to the utilization of nitrogen adubation use or lack of its utilization. The experiment design was entirely randomized and after 120 days the seedlings' development and establishment were evaluated. In terms of morfology, the nodules varied from spherical to branchy, and the color ranged from brown to beige. Positive relation was found between nodules dry weight and aboveground dry weight of both species. Significant difference was found between the treatments with and without inoculation, whereas the use of inoculants was positive for the seedlings' development. It was not verified effect of strains specificity within species. When the IRM strain was inoculated, it enabled the obtainance of higher averages. There was significant difference between the evaluation of seedlings parameters of quality, not only for *Inga Edulis* Mart. but also for *Inga* sp., whereas the treatments with diazotrophic bacteria innoculation presented better quality seedlings.

KEY WORDS: *Inga* spp.; biological fixation; seedlings production.



## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES .....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. OBJETIVO GERAL.....	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
3.1. DEGRADAÇÃO, UMA AMEAÇA A BIODIVERSIDADE.....	16
3.2. AS LEGUMINOSAS ARBÓREAS E A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO .....	17
3.3. AS BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E O CRESCIMENTO VEGETAL.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1. CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO .....	22
4.2. SELEÇÃO DAS MATRIZES E AVALIAÇÃO DOS REGENERANTES.....	23
4.3. CARACTERIZAÇÃO DOS NÓDULOS DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS .....	25
4.4. DELINEAMENTO ESTATÍSTICO PARA CARACTERIZAÇÃO DA NODULAÇÃO.....	25
4.5. ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS COLÔNIAS.....	26
4.6. COLETA, BENEFICIAMENTO E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES ...	30
4.7. INOCULANTES DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS .....	32
4.8. INSTALAÇÃO DO EXPERIMENTO QUANTO À RESPOSTA A INOCULAÇÃO.....	32
4.9. DELINEAMENTO ESTATÍSTICO E OBTENÇÃO DOS RESULTADOS .....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
5.1. RELAÇÃO SIMBIÓTICA EM REGENERANTES DE <i>INGA</i> SPP. ....	35
5.2. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS NÓDULOS DE DUAS ESPÉCIES DE <i>INGA</i> SPP.....	36
5.3. A OCORRÊNCIA DA NODULAÇÃO E O DESENVOLVIMENTO DAS PLÂNTULAS NO CAMPO.....	41
5.4. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ISOLADAS .....	43
5.5. Resposta de mudas de <i>Inga</i> spp. à inoculação com bactérias diazotróficas.....	53
5.6. INFLUÊNCIA DA INOCULAÇÃO SOBRE PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE MUDAS DE <i>INGA</i> SPP.....	59
6. CONCLUSÕES .....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Padrões utilizados para a caracterização morfológica dos nódulos de <i>Inga</i> ssp. forma. Fonte adaptada HANNA et al. (2010). .....	25
Tabela 2- Características morfológicas das colônias de rizóbios em relação a sua forma, elevação, borda, aspectos da superfície e produção de muco.....	29
Tabela 3- Ocorrência da nodulação espontânea em espécies de <i>Inga</i> spp. em diferentes habitats.....	36
Tabela 4- Caracterização dos nódulos encontrados em regenerantes de <i>Inga</i> spp., no PARNA Serra do Divisor. ....	37
Tabela 5- Morfologia tipológica de nódulos, conforme classificação adaptada da proposta de Corby (1984). Fonte: HANNA, et.a l., (2010).....	40
Tabela 6- Número de nódulos encontrados por classe de altura em regenerantes de <i>Inga</i> spp., no PARNA Serra do Divisor. ....	41
Tabela 7- Características morfológicas de bactérias diazotróficas isoladas de nódulos retirados de regenerantes de <i>Inga</i> spp. ....	44
Tabela 8- Padrões morfológicos encontrados para estirpes isoladas de nódulos de regenerantes de <i>Inga</i> spp. ....	51
Tabela 9- Matriz de similaridade da caracterização morfológica de estirpes de bactérias diazotróficas de <i>Inga</i> spp.....	51
Tabela 10- Análise de variância da resposta de mudas de <i>Inga</i> spp., à inoculação com bactérias diazotróficas. ....	53
Tabela 11- Efeito da inoculação com bactérias diazotróficas nos parâmetros de qualidade de mudas de <i>Inga</i> spp.....	60

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Caracterização do Parque Nacional Serra do Divisor e distribuição dos setores sul e norte conforme plano de manejo.....	22
Figura 2. Via transitória utilizada para marcação das árvores matrizes de <i>Inga</i> spp. ....	23
Figura 3. Coleta dos indivíduos jovens de <i>Inga</i> spp., utilizados para caracterização da nodulação.....	24
Figura 4. Coleta dos nódulos em raízes de regenerantes de <i>Inga</i> spp. ....	26
Figura 5. Disposição de nódulos presentes em raízes de regenerantes de <i>Inga</i> spp.....	27
Figura 6. Isolamento das estirpes obtidas de raízes de regenerantes de <i>Inga</i> spp. ....	28
Figura 7. Estirpes isoladas de regenerantes de <i>Inga</i> spp., incubadas para crescimento e caracterização morfológica.....	30
Figura 8. Coleta de sementes de indivíduos adultos de <i>Inga</i> sp.....	31
Figura 9. Sementes de <i>Inga</i> sp., antes de receber o beneficiamento. ....	32
Figura 10. Vasos de <i>Leonard</i> modificados, para a implantação do experimento.....	33
Figura 11. Peneiramento e secagem do solo de barranco a pleno sol .....	34
Figura 12. Mudanças desbastadas 30 dias após a semeadura das sementes de <i>Inga</i> spp.....	34
Figura 13. Nódulos encontrados em raízes de regenerantes de <i>Inga edulis</i> Mart (Inga rabo de macaco).....	38
Figura 14. Nódulos encontrados em raízes de regenerantes de <i>Inga</i> sp. (Inga canela). .	38
Figura 15. Proporcionalidade existente entre o peso dos nódulos (PSN) e o peso seco da parte aérea (PSPA) e peso seco da raiz (PSR) em plântulas de <i>Inga edulis</i> Mart. (Inga rabo de macaco).....	42
Figura 16. Proporcionalidade existente entre o peso dos nódulos (PSN) e o peso seco da parte aérea (PSPA) e peso seco da raiz (PSR) em plântulas de <i>Inga</i> sp. (Inga canela)..	42
Figura 17. Bactérias diazotróficas isoladas de estirpes de <i>Inga edulis</i> Mart. (Inga rabo de macaco) em meio de cultura 79' .....	45
Figura 18. Aparência oleosa do muco da estirpe isolada de nódulos de <i>Inga</i> sp. (Inga larga) em meio de cultura 79' .....	46
Figura 19. Aparência do muco rugoso e seco de colônias isoladas de estirpes de <i>Inga marginata</i> Kunth (Inga piula-IP) em meio de cultura 79' .....	47
Figura 20. Colônias de estirpes de <i>Inga laurina</i> (Sw.) (Inga ferro-IF), em meio de cultura 79' .....	48
Figura 21. Colônias de bactérias diazotróficas de estirpes de <i>Inga</i> sp (Inga canela-IC).49	
Figura 22. Tempo de crescimento das colônias de bactérias diazotróficas de estirpes de <i>Inga</i> spp. ....	50
Figura 23: Análise de agrupamento de padrões morfológicos de estirpes de bactérias diazotróficas de <i>Inga</i> spp. ....	52
Figura 24. Resposta de mudas de <i>Inga</i> spp., à inoculação com bactérias diazotróficas. A) mudas de <i>Inga edulis</i> Mart. - IRM. B) mudas de <i>Inga</i> sp. (Inga canela). Sem nitrogênio (S/N), com nitrogênio (C/N), Inoc. (inoculada).....	54
Figura 25. Resposta de mudas de <i>Inga</i> spp. à inoculação com estirpes de bactérias diazotróficas. <i>Inga edulis</i> Mart. (IRM), <i>Inga marginata</i> Kunth (IP), <i>Inga</i> sp. (Inga canela - IC), <i>Inga laurina</i> (Sw.) Willd. (IF), <i>Inga</i> sp. (Inga larga-IL). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. ....	57
Figura 26. Valores médios referentes à biomassa (Peso seco de raiz e parte aérea) obtida de mudas de <i>Inga</i> spp., inoculadas com estirpes de bactérias diazotróficas. <i>Inga edulis</i> Mart. (IRM), <i>Inga marginata</i> Kunth (IP), <i>Inga</i> sp. (Inga canela - IC), <i>Inga laurina</i> (Sw.) Willd. (IF), <i>Inga</i> sp. (Inga larga-IL)..	59

Figura 27.Relção entre altura da parte aérea e diâmetro de coleto de mudas de <i>Inga</i> spp., inoculadas com estirpes de bactérias diazotróficas. <i>Inga edulis</i> Mart. (IRM), <i>Inga marginata</i> Kunth (IP), <i>Inga</i> sp. (Inga canela - IC), <i>Inga laurina</i> (Sw.) Willd. (IF), <i>Inga</i> sp. (Inga larga-IL).....	61
Figura 28.Relção entre altura da parte aérea e massa seca da parte aérea de mudas de <i>Inga</i> spp., inoculadas com estirpes de bactérias diazotróficas. <i>Inga edulis</i> Mart. (IRM), <i>Inga marginata</i> Kunth (IP), <i>Inga</i> sp. (Inga canela -IC), <i>Inga laurina</i> (Sw.) Willd. (IF), <i>Inga</i> sp.( Inga larga -IL)..	62

## LISTA DE ABREVIACÕES

CSR – Crescimento do Sistema Radicular  
DAP - Diâmetro a Altura do Peito  
EBC - Empresa Brasil de Comunicação  
FBN – Fixação Biológica de Nitrogênio  
IC – Inga Canela  
IF – Inga Ferro  
IL - Inga Larga  
IP - Inga Piula  
IRM - Inga Rabo de Macaco  
IQD – Índice de Qualidade de Dickson  
MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento  
MMA – Ministério do Meio Ambiente  
PNSD – Parque Nacional da Serra do Divisor  
PSPA – Peso Seco da Parte Aérea  
PSR – Peso Seco da Raiz  
RHDC – Relação Altura Diâmetro do Coleto  
RHPMSPA – Relação da Altura e Peso Seco da Parte Aérea  
RPMSPAR – Relação Peso da Matéria Seca da Parte Aérea e Raiz  
RPCP - Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas  
SQR – Sistema de Queima e Roça  
SNUC – Sistema Nacional de Unidades de Conservação  
UFAC – Universidade Federal do Acre

## 1. INTRODUÇÃO

Dos estados que compreendem a Amazônia Legal, o estado do Acre tem ganhado atenção por possuir grande parte de sua área ainda preservada, contribuindo grandemente para a manutenção do bioma amazônico (ACRE, 2006).

Segundo a SOS Amazônia (1998), das unidades de conservação presentes no estado, o Parque Nacional Serra do Divisor (PNSD) é considerado de grande valor ambiental, principalmente por representar uma área de alta biodiversidade. Por estar localizado no extremo oeste do Brasil, possui características peculiares no que se refere à sua vegetação e fauna, o que reforça a sua importância para com a conservação dos recursos presentes na Amazônia. Aliada à beleza cênica, o PNSD contribui também para: a prestação de serviços ambientais; proteção da riqueza florística e da fauna; estudos dos elementos da biodiversidade; proteção dos sítios paleontológicos; e preservação da bacia hidrográfica do Alto Rio Juruá, onde está localizado.

Embora criado para fins da conservação, residem no interior do PNSD, aproximadamente cerca de 1.000 famílias, as quais sobrevivem dos recursos naturais ali disponíveis. Das diversas atividades de subsistência, a agricultura, a pecuária e o extrativismo de produtos florestais madeireiros e não madeireiros de forma predatória, são as atividades que oferecem maiores riscos à proteção do PNSD, tendo acarretado o surgimento de áreas degradadas no seu interior. Consoante o resumo executivo do PNSD, definiu-se as suas áreas degradadas como zona de recuperação, que totalizam mais de 9% (75 mil há) do PNSD, a qual é constituída basicamente nas áreas de várzeas, classificadas como sendo de significância muito alta para conservação, e nelas concentra-se a população residente do parque.

A recuperação das áreas degradadas já identificadas tornou-se uma necessidade, principalmente aquelas utilizadas por agricultura baseado no sistema de queima e roça (SQR), que após o cultivo são abandonados. Estas pequenas áreas se somadas contribuem significativamente para o desmatamento quando comparadas a “grandes” áreas de agropecuária.

Em alguns pontos, a mata ciliar tem dado lugar a agricultura agravando o processo de erosão e assoreamento ao longo das margens do Rio Juruá. Dentre as alternativas para recuperar estas áreas em curto prazo é o plantio de leguminosas nativas com potencial de fixação biológica de nitrogênio. No nódulo o nitrogênio fixado pelas bactérias é transferido para as leguminosas na forma de aminoácidos, enquanto

carboidratos produzidos por essas plantas são fornecidos às bactérias e servem como fonte de energia (FREIRE, 1992). Estes microrganismos diazotróficos endofíticos, podem desempenhar importante papel na reabilitação e sustentabilidade dos ecossistemas (OLIVEIRA et al., 2008), uma vez que incorporam mais de 500 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> de N<sub>2</sub>, por meio da fixação biológica ao sistema solo-planta, que juntamente com o fósforo, são os nutrientes que mais limitam o estabelecimento e o desenvolvimento vegetal (SIQUEIRA; FRANCO, 1988). Esses microrganismos podem produzir e liberar substâncias reguladoras do crescimento vegetal como auxinas, giberelinas e citocininas, as quais contribuem para melhorar a nutrição mineral e a utilização de água pelas plantas e contribuem para diminuir a acidez do solo (NASCIMENTO et. al. ,2003) e no controle de fitopatógenos (GLICK ; BASHAN, 1997).

Desta forma, conhecer as espécies florestais leguminosas nativas que são capazes de fixar nitrogênio, bem como caracterizar a ocorrência de nodulação, constitui-se uma excelente ferramenta para se gerar conhecimento sobre o uso destas espécies em futuros programas de recuperação de áreas degradadas no Parque Nacional da Serra do Divisor.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Caracterizar em campo a ocorrência de nodulação em duas espécies de *Inga* spp., bem como avaliar em viveiro a reposta das mudas quanto à inoculação com estirpes de bactérias diazotróficas.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar em campo a ocorrência de nodulação em regenerantes de duas espécies de *Inga* spp., bem como realizar uma análise morfológica dos nódulos;
- Isolar estirpes de bactérias diazotróficas de ocorrência em espécies de *Inga* spp., a fim de serem utilizadas como inoculantes no processo de produção de mudas;
- Avaliar a reposta de mudas de *Inga* spp., quanto á inoculação com bactérias diazotróficas.

### **3. REFERENCIAL TEÓRICO**

#### **3.1. DEGRADAÇÃO, UMA AMEAÇA A BIODIVERSIDADE**

De acordo com o MMA (2000), a Convenção da Diversidade Biológica (CDB), da qual o Brasil é signatário, está sentada sobre três grandes eixos que são: a) conservação da biodiversidade; b) o uso sustentável dos recursos naturais; c) a distribuição equitativa das riquezas.

O Brasil, embora tenha sido um país privilegiado com a generosa riqueza de seus ecossistemas enfrenta sérios problemas ambientais no que se refere à conservação de sua biodiversidade, como a fragmentação das paisagens e o declínio persistente da diversidade biológica como resultado da intensificação do desenvolvimento e avanço constante da fronteira agrícola (BRANDON, 2005).

O Estado como forma de superação destas dificuldades busca ordenar a proteção do patrimônio biológico e o uso dos recursos naturais com a adoção de inúmeras normas e iniciativas de políticas ambientais como a instituição do Sistema Nacional de Unidades de Conservação – SNUC (BRASIL, 2000).

Contudo, as últimas décadas do século 20 foram marcadas por uma crescente preocupação quanto à preservação do meio ambiente, principalmente no setor agropecuário, que sofre questionamentos quanto ao do modelo de produção vigente, pois o aumento da produção obtida está relacionado a degradação agrícola e a contaminação dos alimentos, evidenciando a fragilidade dos sistemas de produção agrícola moderno (ESPINDOLA, 2005).

A manifestação do homem sobre os ecossistemas manifesta-se basicamente nas atividades de agricultura, pastagem e extração de madeira, praticas estas das quais são observados perdas irreparáveis na diversidade florística e faunística, acarretando a aceleração dos processos de erosão e declínio da fertilidade do solo e da perda da qualidade da água, pela sedimentação (ARAUJO; CARVALHO, 1997).

Consoante Araujo Filho (2007), a degradação do solo está geralmente associada às práticas inadequadas da agricultura, e à perda da fertilidade e da matéria orgânica, tendo como consequência a diminuição da disponibilidade de nutrientes. As deficiências nutricionais são as principais limitações ao desenvolvimento dos vegetais sejam eles anuais ou perenes.



Preocupado com a situação, plano do governo Federal promete em 2011 incentivar produtores recuperar áreas degradadas nos próximos dez anos, a meta inclui 15 milhões de ha para produção. Atualmente, o país tem cerca de 47 milhões de hectares ocupados com a agricultura e 170 milhões de hectares usados para a pecuária. A intenção é aumentar a produção agropecuária, sem que para tal, seja necessário mais avanços sobre áreas de florestas. O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), pretende financiar o plantio de 300 mil hectares (ha) de florestas. Em mais 550 mil ha será financiado o plantio com espécies que realizam a fixação biológica de nitrogênio; em 800 mil ha, o plantio direto na palha, e em 400 mil ha, será feita a integração lavoura-pecuária-floresta (EBC, 2011).

O uso de fertilizantes nitrogenados é responsável pelo uso de cerca de pelo menos um terço da energia consumida na agricultura moderna o que implica em maiores custos para os agricultores (GLIESSMAN, 2000), conseqüentemente, a recuperação de áreas degradadas demanda altos custos, contribuindo para o avanço do desmatamento florestal em busca de novas áreas férteis para a agricultura, contribuindo com a degradação das florestas, conseqüentemente colocando em ameaça a biodiversidade brasileira, tornando evidente a necessidade do uso de novas tecnologias para a recuperação de áreas degradadas que não demandem altos custos de implantação.

### **3.2. AS LEGUMINOSAS ARBÓREAS E A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO**

Nos trópicos, a Leguminosae é uma das famílias botânicas mais importantes, com mais de 650 gêneros que estão distribuídos entre os representantes herbáceos, arbustivos e arbóreos (POLHIL et al., 1981; FRANCO et al., 2003). Apresenta aproximadamente 20.000 espécies, das quais estão classificadas nas subfamílias Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (SPRENT, 2001; FIGUEIREDO, 2008). Na Amazônia, tem amplo destaque em diferentes ecossistemas, sendo a mais importante família de plantas dentre as lenhosas e a mais numerosa em espécies e gêneros nativos (SILVA et al., 1989).

A família Leguminosae está distribuída em todo o mundo (SPRENT, 2001), é representada em sua maior parte por árvores tropicais (DOBEREINER, 1984). A

maioria destas espécies possui a capacidade de se associar a bactérias fixadoras de nitrogênio (ALLEN ALLEN, 1981; FARIA et al., 1989; SPRENT, 2001).

As leguminosas fixam nitrogênio através da simbiose com bactérias conhecidas por "rizóbio" dos gêneros: *Rhizobium*; *Bradyrhizobium*; *Azorhizobium*; *Ensifer* (*Sinorhizobium*); *Mesorhizobium*; *Methylobacterium*; *Burkholderia*; *Cupriavidus*, *Devosia*; *Herbaspirillum*; *Ochrobactrum*; e *Phyllobacterium* (WEIR, 2006). O resultado desta interação é evidenciado pela presença de nódulos nas raízes destas espécies. Entretanto, a fixação biológica de nitrogênio ainda é pouco estudada em espécies arbóreas, principalmente na Amazônia, fazendo-se necessários estudos nesta região, com estirpes adaptadas às condições edafoclimáticas do local.

Além disso, as leguminosas apresentam potencial para uso em sistemas agroflorestais – SAF's, para recuperação e reabilitação de áreas degradadas e para ajudar a manutenção da sustentabilidade dos solos (HERRERA et al., 1993; FRANCO e FARIA, 1997; FRANCO et al., 2000; URQUIAGA; ZAPATA, 2000; RESENDE et al., 2003).

As leguminosas possuem uma característica comum, a capacidade de se associar com bactérias que formam nódulos e fixam nitrogênio. A nodulação tem sido relatada na maioria das espécies da sub-famílias *Mimosoideae* e *Papilionoideae*, sendo que na subfamília *Caesalpinioideae*, é menos expressiva (FARIA; GUEDES, 1999; BARBERI et al, 1998; SPRENT, 2001).

O uso de leguminosas florestais micorrizadas e inoculadas com *Rhizobium* promove o retorno da resiliência ambiental contribuindo para a sustentabilidade dos ecossistemas ao reincorporar estas áreas degradadas ao processo produtivo da floresta (FARIA; LIMA, 2002; OLIVEIRA, 2008), uma vez que incorporam N<sub>2</sub> por meio da fixação biológica além de produzir e liberar substâncias reguladoras do crescimento vegetal como auxinas, giberelinas e citocininas, as quais contribuem para melhorar a nutrição mineral e a utilização de água pelas plantas e para diminuir a acidez do solo, elevando o pH no perfil estudado, (NASCIMENTO et al. ,2003).

Logo, uma alternativa para a sustentabilidade dos sistemas de produção pode ser obtida pelo repovoamento com leguminosas arbustivo-arbóreas, espécies vegetais de crescimento rápido, com capacidade de fixação simbiótica de nitrogênio e que podem, inclusive, ser utilizadas para a aceleração da sucessão secundária progressiva (FRANCO et al., 1992). Esta é uma tecnologia de baixo custo e viável para recuperação de solos degradados, pois, promove a sua melhoria, através do aporte de matéria

orgânica e pela adição e reciclagem de nutrientes (LASSUS, 1990; MONTAGNINI; SANCHO, 1990; WINCKLER, 1997).

As leguminosas apresentam grande potencial de fixação biológica de nitrogênio, pois as bactérias da ordem Rhizobiales, num processo simbiótico, formam estruturas altamente específicas, os nódulos, nas raízes de plantas da família Leguminosae, onde ocorre a conversão do N<sub>2</sub> atmosférico em amônia, que é então incorporada em diversas formas de N orgânico, para utilização pela planta hospedeira. Essas bactérias conseguem quebrar a tripla ligação do N<sub>2</sub> atmosférico pela ação de um complexo enzimático, chamado nitrogenase; este processo é denominado de fixação biológica do Nitrogênio (FBN) (NOVAIS et al., 2007). No nódulo o nitrogênio fixado pelas bactérias é transferido para as leguminosas na forma de aminoácidos, enquanto carboidratos produzidos por essas plantas são fornecidos às bactérias e servem como fonte de energia (FREIRE, 1992).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo pelo qual o N<sub>2</sub> atmosférico é reduzido a NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e assim fica disponível para ser transferido para compostos contendo carbono, a fim de produzir aminoácidos e outras substâncias orgânicas que contêm nitrogênio (RAVEN et al., 2001).

A associação entre planta e bactéria apresenta grande importância do ponto de vista econômico e ecológico, podendo dispensar total ou parcialmente o uso de fertilizantes nitrogenados industriais, e com isso viabiliza o plantio das espécies reduzindo os custos com esse insumo (BARBERIE et al., 1998; NOVAIS et al., 2007; FIGUEIREDO et al., 2008;). Essa associação pode incorporar mais de 500 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> de N ao sistema solo-planta, que, juntamente com o fósforo, são os nutrientes que mais limitam o estabelecimento e o desenvolvimento vegetal (SIQUEIRA; FRANCO, 1988).

O nitrogênio é o nutriente de maior demanda dos vegetais e a oportunidade e a capacidade de obter esse elemento do ar torna-as alvo de varias pesquisas em busca da sustentabilidade ambiental e econômica (FARIA; LIMA, 2002). Conhecer as espécies de leguminosas que são capazes de fixar nitrogênio constitui-se uma excelente ferramenta que possa contribuir na reabilitação de áreas degradadas

### **3.3. AS BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E O CRESCIMENTO VEGETAL**

A exceção da água, o nitrogênio é geralmente considerado o nutriente mais limitante para o crescimento de plantas no seu ambiente (FRANCO; DÖBEREINER 1994; REIS, et al., 2006). A atmosfera terrestre é composta por 78% de gás de Nitrogênio, e apesar da abundância, as plantas e os animais não conseguem utilizar este elemento de forma direta por está disponível em uma forma quimicamente estável, ou seja, não assimilável pelos seres vivos, fazendo-se necessário uma transformação que torne possível esta assimilação.

Entretanto, organismos denominados diazotróficos, pertencentes ao grupo dos procariotos, conseguem converter o nitrogênio da atmosfera em amônia, a qual será assimilada por eucariontes, e o mecanismo responsável pela incorporação de nitrogênio à biomassa é chamado de fixação biológica de nitrogênio.

No solo, estes microrganismos diazotróficos, fixadores de nitrogênio, estão disponíveis em grande quantidade e diversidade, sendo fundamental para o desenvolvimento do vegetal para a ciclagem de nutrientes (GRAY; SMITH, 2005; MOREIRA, 2010), contribuindo também para a melhoria das características físicas, químicas e biológicas do solo.

De acordo com Gray e Smith (2005), existe no solo um grande número de bactérias capazes de promover o crescimento vegetal, das quais podem ser divididas em: bactérias que residem dentro das células das plantas, estas produzem nódulos, estruturas especializadas na fixação biológica de nitrogênio em espécies de leguminosas e bactérias que se desenvolvem extracelularmente nos tecidos das raízes de diversas plantas, porém, não produzem nódulos, mas com capacidade de promover o desenvolvimento vegetal através da produção de substâncias específicas denominadas fitormônios. Essas bactérias são chamadas de rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCP) (KOKALIS-BURELLE et al., 2006) e também podem atuar como agente de biocontrole (KLOEPPER, 1996; WHIPPS, 2001), capazes de proteger as plantas de microrganismos fitopatogênicos (BLOEMBERG, 2001).

As rizobactérias fitoestimuladoras de crescimento de plantas atuam de forma direta, por meio da produção de fitohormônios, como auxinas, citocininas, giberelinas e etileno (DOBBELAERE et al., 2003). O efeito das rizobactérias promotoras de crescimento vegetal tem sido bastante estudado em culturas agrônomicas (KLOEPPER, 1996), todavia estudos destes microrganismos, em espécies arbóreas também têm evidenciado resultados promissores (ISHIDO; CHANWAY, 2000). As RPCP podem

ser inoculadas nas sementes, raízes, estacas ou no solo (BOWEN; ROVIRA, 1999), e a expressão da promoção do crescimento pode ser observada na melhoria da germinação de sementes, na emergência de plântulas, no aumento de peso de matéria seca da raiz e da parte aérea, no comprimento de raiz e da parte aérea e na produção (WHIPPS, 1997).

Segundo Evans e Burris (1992), podem ser caracterizadas três grupos de bactérias fixadoras de nitrogênio: de vida livre, que fixam o nitrogênio para seu próprio uso; diazotrofos associativos, que contribuem para o crescimento da planta sem a formação de estruturas diferenciadas, não estabelecendo uma simbiose e, os diazotrofos simbióticos, que estabelecem uma interação muito estreita entre o macro e microsimbionte, e em alguns casos, são formadas estruturas diferenciadas denominadas nódulos.

Segundo Baldani e Baldani (2005), desde a década de 1950, tem sido identificado a ocorrência de bactérias diazotróficas (fixadoras de nitrogênio atmosférico), processo realizado mediante associação simbiótica com vegetais da família das leguminosas. Consoante Dobbelaere e Croonenborghs (2002) e Moreira (2011), estes microorganismos (bactérias diazotróficas) denominadas de rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCP) são produtoras de fitormônios promotores de crescimento como citocininas, giberilinas e auxinas, contribuindo para o melhor desenvolvimento e estabelecimento das mudas em campo.

Diversos fatores influenciam a FBN em Leguminosas. Tanto os fatores bióticos como os abióticos podem atuar sobre a bactéria e/ou sobre o hospedeiro afetando a simbiose. De acordo com Moreira e Siqueira (2006), os fatores limitantes são: a) características intrínsecas da espécie hospedeira (capacidade de nodular); b) fatores edáficos como o pH e o nitrogênio mineral presente no solo; c) clima; e d) populações de bactérias nativas do solo.

As quantidades de N<sub>2</sub> fixado e os efeitos da inoculação na produção dependem muito da estirpe de rizóbio empregada e da leguminosa cultivada (SIQUEIRA e FRANCO, 1988). A formação de nódulos não representa necessariamente que a estirpe de rizóbio esteja fixando nitrogênio eficientemente, o que resulta em gasto energético para a planta. Estirpes de rizóbio e espécies de leguminosas podem variar de altamente específicas até altamente promíscuas, se são capazes de estabelecer simbiose com poucos parceiros ou com vários parceiros (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002). Dessa forma, a seleção de estirpes eficientes para cada espécie de leguminosa, visando a

produção de inoculantes específicos, é um dos componentes fundamentais para o sucesso da tecnologia de uso de espécie arbórea (FARIA, 2000).

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

##### 4.1. CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

A pesquisa foi realizada no Setor Sul do Parque Nacional da Serra do Divisor (PNSD), esta Unidade de Conservação está localizada no extremo oeste do estado Acre (Figura 1), na região do alto rio Juruá, fronteira com o Peru, cujas coordenadas são: Norte: S 07°07'00" e 73°40'20"; Leste: S 09°08'40" e 72°40'00"; Sul: S 09°24'40" e 73°12'40"; Oeste: S 07°32'40" e 73°59'20", e cuja área é de aproximadamente 840 mil ha, conforme Decreto Federal no 97.839, de 16 de junho de 1989. O parque é considerado uma unidade de Proteção Integral com base no Sistema Nacional de Unidades de Conservação – SNUC/2000.

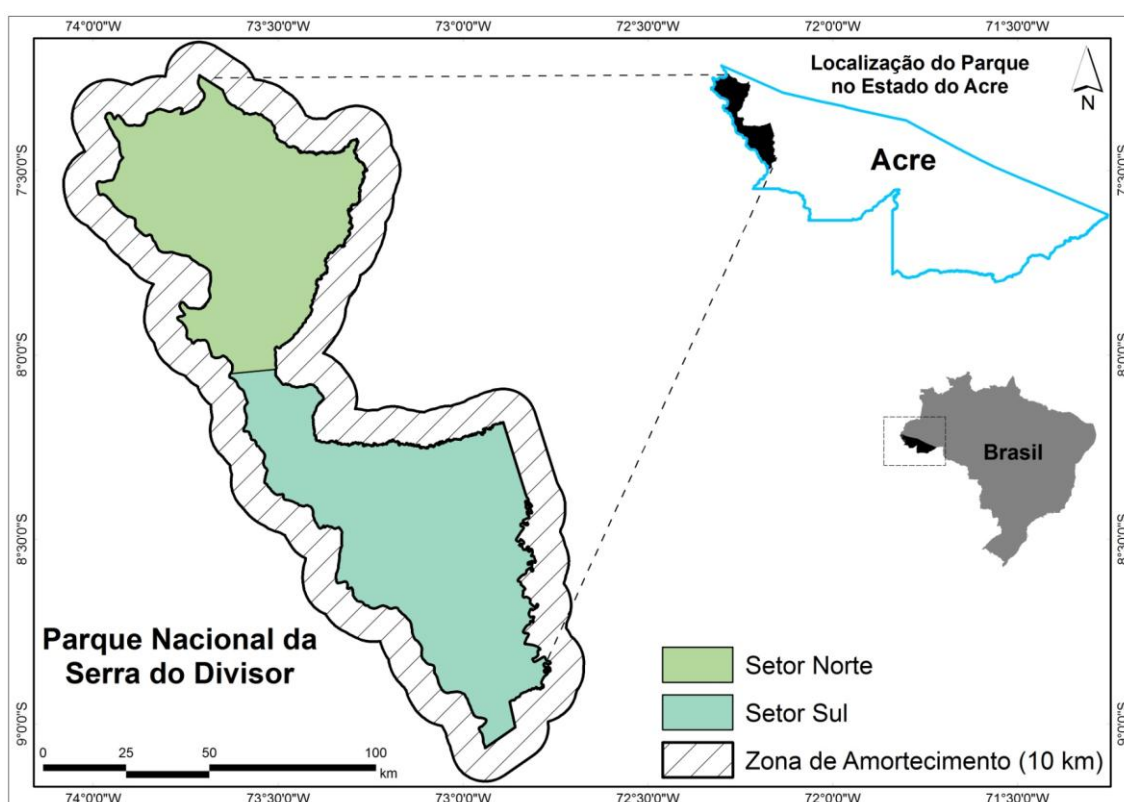


Figura 1. Caracterização do Parque Nacional Serra do Divisor e distribuição dos setores sul e norte conforme plano de manejo.

O clima é quente e úmido, e a precipitação média anual do PNSD é de 2.200 mm. A temperatura média mensal é de 26°C no período chuvoso, podendo diminuir 3°C ou 4°C no período seco. Quando comparado com outras áreas do Estado do Acre, a Serra do Divisor próximo as Cordilheiras dos Andes, na fronteira com o Peru, o clima é mais úmido e frio (SOS AMAZÔNIA et al., 1998).

De acordo com Plano de manejo do PNSD (1998), o relevo é bastante dissecado com cristas de altitudes de 300 a 600 m, o que torna seu acesso e ocupação antrópica bastante difícil. O índice de dissecção é mediano e a intensidade do aprofundamento da drenagem também mediana, variando entre 250 a 600 m. De modo geral, os solos do PNSD são predominantemente argissolos e neossolos.

#### 4.2. SELEÇÃO DAS MATRIZES E AVALIAÇÃO DOS REGENERANTES

Para a seleção das matrizes, expedições foram realizadas no Setor Sul do PNSD, tendo como referência as vias transitórias presentes (Figura 2).



Figura 2. Via transitória utilizada para marcação das árvores matrizes de *Inga* spp.

Com o intuito de se detectar a ocorrência de nodulação em regenerantes de *Inga* spp., regenerantes de diferentes espécies foram escolhidos de forma aleatória com o intuito de se observar a presença ou não de nódulos.

Para a realização do estudo observacional foram selecionadas duas espécies de *Inga* spp., tendo como principal critério de escolha a densidade dos indivíduos no PSND (identificação visual), potencial de utilização, produção de sementes, facilidade de coleta de propágulos (sementes), facilidade de germinação de semente e produção de mudas.

De cada espécie foram avaliados dez indivíduos adultos de *Inga* spp., os quais foram identificados quanto ao DAP (diâmetro a altura do peito) e altura total. A marcação das árvores foi feita respeitando sempre que possível uma distância mínima de 50 m entre os indivíduos.

Para cada indivíduo adulto no seu entorno foram amostrados dentro de um raio de 20 metros, dez indivíduos jovens (plântulas) com altura inferior a 50 cm. Os dez indivíduos jovens amostrados foram coletados (Figura 3) e destes foram feitas as seguintes avaliações: a) contagem dos nódulos; b) medição da altura; c) medição do diâmetro de coleto; c) peso seco do sistema radicular; d) comprimento da raiz; e) peso seco da parte aérea. Após a realização destas medidas, os nódulos coletados foram armazenados em frascos hermeticamente fechados contendo cloreto de cálcio anidro sobreposto com uma camada de algodão (FARIA et al., 1989, FARIA; FRANCO, 2002).



Figura 3. Coleta dos indivíduos jovens de *Inga* spp., utilizados para caracterização da nodulação.



### 4.3. CARACTERIZAÇÃO DOS NÓDULOS DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

Uma vez coletados e armazenados, os nódulos foram pesados em balança de precisão, medidos em relação ao diâmetro e classificados quanto à morfologia, cor, forma e peso conforme Tabela 1.

Tabela 1- Padrões utilizados para a caracterização morfológica dos nódulos de *Inga* ssp. forma. Fonte adaptada HANNA et al. (2010).



### 4.4. DELINEAMENTO ESTATÍSTICO PARA CARACTERIZAÇÃO DA NODULAÇÃO

Para análise dos resultados os dados obtidos foram submetidos à análise correlação a fim de verificar a influência do peso seco dos nódulos na produção de matéria seca.

#### 4.5. ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS COLÔNIAS

Os nódulos foram coletados em raízes de regenerantes de cinco espécies de *Inga* spp. em 12 estirpes, isto em solos do Setor Sul do PNSD.

Para a coleta dos nódulos as raízes destas leguminosas (Figura 4) foram escavadas de 20 a 30 cm de profundidade no solo (Figura 5), posteriormente armazenadas em sacos de polietileno, com resíduos de solo, visando manter as condições para a conservação da qualidade fisiológica dos nódulos.



Figura 4. Coleta dos nódulos em raízes de regenerantes de *Inga* spp.



Figura 5. Disposição de nódulos presentes em raízes de regenerantes de *Inga* spp.

No laboratório de Química da Universidade Federal do Acre, os nódulos foram lavados, e aqueles que tinham mais de seis meses de armazenamento foram reidratados com água destilada por 8 horas, posteriormente desinfestados seguindo os procedimentos descritos por Vincent (1970) como segue: os nódulos foram tratados por 30 segundos com álcool etílico anidro, em seguida com hipoclorito e lavados oito vezes em água esterilizada.

O isolamento das estirpes foi realizado em capela de fluxo laminar, seguindo a metodologia preconizada por Faria e Franco (2002). Com o auxílio de uma pinça, aproveitando a última água de lavagem, os nódulos foram esmagados e a suspensão após a esmagadura, foi riscada em placa de petri (Figura 6), contendo meio de cultura “79” extrato de levedura com manitol (Vincent, 1970).

























Figura 6. Isolamento das estirpes obtidas de raízes de regenerantes de *Inga* spp.

As placas com meio 79' e azul de bromotimol apresentam um pH em torno de 6,8, e cor verde. Assim, a caracterização da alteração do pH foi definido pela modificação da cor do meio de cultura. Segundo Fred e Wakesman (1928), os Rizóbios que alcalinizam e acidificam o meio, causam a mudança na cor do indicador para azul e amarelo respectivamente. O diâmetro das colônias foram mensurados com escalímetro, e colônias maiores que 1 mm de diâmetro foram classificadas como produtoras de muito muco.

As características relacionadas à forma da colônia, elevação da colônia, a borda da colônia, aspectos da superfície das colônias e a produção de muco foram classificados consoante tabela 2. A caracterização morfológica das colônias permite a verificação da diversidade de microrganismos que foram isolados.

Tabela 2- Características morfológicas das colônias de rizóbios em relação a sua forma, elevação, borda, aspectos da superfície e produção de muco.

Classificação das colônias bacterianas: Forma					
					
Puntiforme	Circular	Irregular			
Classificação das colônias bacterianas: Elevação					
					
Plana	Lente	Convexa	Drop-like	Umbanada	Umbilicada
Classificação das colônias bacterianas: Borda da colônia					
					
Inteira	Ondulada	Filamentosa	Lobada	Denteada	Nenhuma
Classificação das colônias bacterianas: Superfície da colônia					
					
	Rugosa	Lisa	Papilosa		
Classificação das colônias bacterianas: Produção de muco.					
					
Escasso	Pouco	Moderado	Abundante		

Fonte: adaptado de Costa Júnior, 2009.

Para cada estirpe foram efetuadas cinco repetições, sendo as placas incubadas em condições ambiente para o desenvolvimento das colônias (Figura 7), posteriormente foram repicadas para um novo meio de cultura, até a obtenção de colônias puras, estas foram caracterizadas quanto a velocidade de crescimento, reação do pH no meio, quantidade de muco produzido e coloração da colônia, como resultado aproximado para a identificação do gênero.



Figura 7. Estirpes isoladas de regenerantes de *Inga* spp., incubadas para crescimento e caracterização morfológica.

A estimativa da velocidade de crescimento das estirpes foi feita de acordo com o número de dias requeridos para que as colônias atingissem 1mm de diâmetro: de três a cinco dias, crescimento rápido (CR); de seis a sete dias, crescimento intermediário (CI); de oito a dez dias, crescimento lento (CL) (MARTINS, 1997).

Posteriormente, as culturas foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio de cultura inclinado. As colônias purificadas assim originadas foram depositadas em Banco de Germoplasma constituído na UFAC – Campus Floresta.

A fim de verificar, as características em comum entre as colônias de diferentes estirpes, os dados obtidos foram agrupados mediante a análise de *Cluster*. A análise de cluster foi sintetizada baseando-se no cálculo das distâncias euclidianas entre os objetos estudados de todas as variáveis consideradas (PEREIRA, 2001).

#### **4.6. COLETA, BENEFICIAMENTO E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES**

Das duas espécies de *Inga* spp., *Inga edulis* Mart (*Inga* rabo de macaco). e *Inga* sp. (*Inga* canela), as fontes de propágulos (sementes) (Figura 8), foram coletadas diretamente nos indivíduos adultos. Considerando o longo intervalo de tempo entre a

coleta das sementes e o isolamento das bactérias para a obtenção das colônias puras e, conseqüentemente, a produção dos inoculantes, e ainda considerando a recalcitrância das sementes desta espécie, o beneficiamento constituiu-se da retirada da sarcotesta (Figura 9). A desinfestação das sementes foi realizada com hipoclorito, álcool 70% e posteriormente lavadas com água destilada e esterilizada, as sementes foram armazenadas em sacos de polietileno desinfestados em câmaras frias por um período de 60 dias na Universidade Federal do Acre, Campus Floresta.



Figura 8. Coleta de sementes de indivíduos adultos de *Inga* sp.



Figura 9. Sementes de *Inga* sp., antes de receber o beneficiamento.

#### **4.7. INOCULANTES DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS**

Para a obtenção dos inóculos, as colônias purificadas foram repicadas em tubo de ensaio contendo meio de cultura “79” líquido, e incubadas por um período de 15 dias para a multiplicação das células das bactérias diazotróficas. Para o teste de inoculação, foi aplicado 1 ml de inoculante no momento do plantio das sementes.

#### **4.8. INSTALAÇÃO DO EXPERIMENTO QUANTO À RESPOSTA A INOCULAÇÃO**

O experimento foi conduzido, separadamente para espécies de *Inga edulis* Mart (Inga rabo de macaco – IRM) e *Inga* sp. (Inga canela) e foi realizado no laboratório de solos da Universidade Federal do Acre – Campus Floresta. Antes da implantação do mesmo, o local foi desinfestado utilizando hipoclorito e álcool 70%.

Como tratamentos para a avaliação da resposta das mudas à inoculação foram utilizados os seguintes tratamentos: T1 – sem adubação nitrogenada e sem inoculação; T2 – sem inoculação e com adubação nitrogenada; T3 – Inoculação com estirpe de *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco – IRM); T4 – Inoculação com estirpe de *Inga edulis*



Mart. (*Inga* rabo de macaco – IRM2); T5 – Inoculação com estirpe de *Inga edulis* Mart. (*Inga* rabo de macaco– IRM3); T6 – Inoculação com estirpe de *Inga edulis* Mart. (*Inga* rabo de macaco - IRM4); T7 – Inoculação com estirpe de *Inga marginata* Kunth - (*Inga* piula – IP); T8 – Inoculação com estirpe de *Inga marginata* Kunth (*Inga* piula – IP1); T9 – Inoculação com estirpe de *Inga* sp. (*Inga* canela- IC); T10 – Inoculação com estirpe de *Inga* sp. (*Inga* canela– IC1); T11 – Inoculação com estirpe de *Inga* sp. (*Inga* canela– IC2); T12 – Inoculação com estirpe de *Inga laurina* (Sw.) (*Inga* ferro- IF); T13 – Inoculação com estirpe de *Inga laurina* (Sw.) (*Inga* ferro– IF1); T14 – Inoculação com estirpe de *Inga* sp. (*Inga* larga – IL).

No ensaio, empregaram-se vasos de *Leonard* modificados, elaborados com garrafas petis (Figura 10), preparados com solução nutritiva de *Hoagland*. Os vasos foram desinfestados com hipoclorito 50%, imersos por oito horas em uma caixa d'água de 500 litros. Posteriormente foram lavados com água corrente e colocados para secar em local asséptico. Como substrato foi utilizado o solo de barranco e areia na proporção 2:1, o solo foi peneirado e seco a pleno sol (Figura 11), posteriormente esterilizado três vezes a 120°C por 20 minutos. Cada vaso, continha 2,5 kg de solo, os mesmos foram cobertos com papel e amarrados com barbante para evitar o surgimento de algas. No momento do plantio receberam três sementes por vaso e 1 ml de inoculantes para os tratamentos inoculados (T-inoculado). O raleio ou desbaste ocorreu 30 dias após o plantio (Figura 12).



Figura 10. Vasos de *Leonard* modificados, para a implantação do experimento.



Figura 11. Peneiramento e secagem do solo de barranco a pleno sol



Figura 12. Mudas desbastadas 30 dias após a semeadura das sementes de *Inga* spp.

#### **4.9. DELINEAMENTO ESTATÍSTICO E OBTENÇÃO DOS RESULTADOS**

O delineamento utilizado no experimento foi inteiramente casualizado – DIC, sendo adotados os seguintes tratamentos: testemunha - sem adubação e inoculação; adubação nitrogenada sem inoculação; e inoculação cruzada com 12 estirpes de *Inga* spp., para cada espécie separadamente. Cada tratamento recebeu quatro repetições, totalizando 112 mudas.

As avaliações das características morfológicas e as determinações dos índices de qualidade das mudas (GOMES, 2001) foram realizadas 120 dias após a semeadura, onde foram medidas as seguintes variáveis: medição do comprimento do sistema radicular (CR); peso de matéria seca da parte aérea (PSPA); peso de matéria seca da raiz (PSR), a relação entre a altura da parte aérea e o diâmetro de coleto (RHDC); relação entre a altura da parte aérea e o peso seco da parte aérea (RHPMSPA); relação entre o peso de matéria seca da parte aérea e o peso de matéria seca das raízes (RPMSPAR); e o índice de qualidade de Dickson- IDQ (DICKSON et al., 1960).

A secagem do material para obtenção do peso de matéria seca foi feita em estufa com circulação de ar a 70°C por um período de 72 horas.

Para análise dos resultados os dados obtidos foram submetidos à Análise da Variância (ANOVA), mediante o “teste Scott-Knott a 1% e 5% de probabilidade, utilizando-se o software estatístico ASSISTAT versão 7.6 beta. (SILVA e AZEVEDO, 2002).

### **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **5.1. RELAÇÃO SIMBIÓTICA EM REGENERANTES DE *INGA* SPP.**

Dos regenerantes das diferentes espécies de *Inga* spp. amostrados aleatoriamente, foi constatada a nodulação espontânea ou relação simbiótica em cinco espécies de *Inga* spp. (tabela 3), revelando a diversidade de habitats de ocorrência da associação simbiótica entre planta e bactéria. Os nódulos encontrados foram coletados

para posterior isolamento para produção de inoculantes de rizóbio, a serem utilizados em futuros testes de eficiência na fixação biológica de nitrogênio.

Tabela 3- Ocorrência da nodulação espontânea em espécies de *Inga* spp. em diferentes habitats.

<b><i>Inga</i> sp.</b>	<b>Habitat</b>	<b>Características</b>
<i>Inga</i> sp. (Inga canela)	Floreta primária de terra firme, área de pastagem e fragmento florestal.	Solos com alto acúmulo de matéria orgânica.
<i>Inga</i> sp. (Inga larga)	Floresta primária várzea.	
<i>Inga marginata</i> Kunth	Floresta primária de terra firme.	
<i>Inga edulis</i> Mart. (Inga rabo de macaco)	Área de capoeira, roçados e nas margens do Rio Juruá.	As margens do Rio, está sujeita a alagação em períodos de inverno da região.
<i>Inga laurina</i> (Sw.) (Inga ferro – IF)	Área em sucessão.	Pastagem/floresta.

Das duas espécies de *Inga* spp. selecionadas: *Inga* sp. (Inga canela – IC) e *Inga edulis* Mart. - (Inga rabo de macaco - IRM), ambas apresentaram a ocorrência da nodulação espontânea *in natura* em 100% das plântulas avaliadas. Em condições naturais, os nódulos se instalaram nas raízes secundárias próximas à base do tronco. Estudos realizados pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA e Instituto de Pesquisa da Amazônia – UTAM verificaram a ocorrência da capacidade de 100 leguminosas de apresentarem nódulos e possuir a propriedade de fixar nitrogênio, em diversos habitats (campo, savana, campinarana, igapó, várzea e mata ribeirinha) nos estados de Rondônia, Roraima, Amazonas e Pará (SOUZA, 1994), comprovando a habilidade das leguminosas apresentarem associação simbiótica (presença dos nódulos) em diversos habitats.

## **5.2. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS NÓDULOS DE DUAS ESPÉCIES DE *INGA* SPP.**

De acordo com a tabela 4, observa-se que os nódulos do *Inga edulis* Mart., (Inga rabo de macaco - IRM) apresentaram coloração marrom, forma irregular com ramificações (Figura 13), com média de 6,04 nódulos por plântula, 2, 23 mm de

diâmetro e peso seco dos nódulos 0,862 g. Os nódulos das plântulas de *Inga sp.* (Inga canela-IC), apresentaram coloração marrom escuro, entretanto, predominaram as estruturas circulares (Figura 14) com médias de: 10 nódulos por plântulas, diâmetros de 2,1 mm e peso seco dos nódulos de 1,94 g. Para ambas as espécies, não houve correlação entre a quantidade e o peso seco dos nódulos, tal fato é explicado em função da variação entre o número e o tamanho dos nódulos por plântulas.

Tabela 4- Caracterização dos nódulos encontrados em regenerantes de *Inga spp.*

	<b>ESPÉCIE</b>	<b>IRM</b>	<b>IC</b>
COR	Amplitude	bege - marrom	marrom claro - marrom escuro
	Média		
FORMA	Amplitude	Irregular- ramificado	ovoide - circular
	média		
NN	Amplitude	1 a 53	1 a 40
	média	6	10
DN	Amplitude		
	média	2,23 mm	2,1 mm
PSN	Amplitude		
	média	0,862 (g)	1,94 (g)

NN: número de nódulos; DN: diâmetro dos nódulos; PSN: peso seco dos nódulos; (*Inga Inga edulis* Mart.) (Inga rabo de macaco - IRM); IC= *Inga sp.*(Inga canela).

Na espécie *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco), 72,47% das plântulas apresentaram nódulos com coloração bege e 27,53% marrom. Já na espécie *Inga sp.* (*Inga canela*), as plântulas continham nódulos com coloração variando de marrom escuro a claro, representando 90,9% e 9,01% respectivamente.



Figura 13. Nódulos encontrados em raízes de regenerantes de *Inga edulis* Mart (Inga rabo de macaco).



Figura 14. Nódulos encontrados em raízes de regenerantes de *Inga* sp. (Inga canela).

A forma dos nódulos é uma propriedade estável de cada hospedeiro. Inicialmente, formam-se nódulos jovens, esféricos a arredondados e estes evoluem até a sua forma no estágio adulto que implica em alterações progressivas de seu alongamento ou ramificações. Desse modo, para todas as espécies, nódulos jovens são pouco representativos com fins de classificação da tipologia, existindo a necessidade de obter nódulos maduros em seu formato adulto, que definem a classificação morfológica a ser adotada para cada espécie. A formação de nódulos radiculares é uma propriedade das leguminosas fixadoras de N<sub>2</sub> em simbiose com rizóbios. Considerando aspectos evolutivos da nodulação, nódulos tipicamente esféricos têm somente um sítio fixador e são mais evoluídos que nódulos ramificados (vários sítios) (HANNA et. al., 2010). A Tabela 3, mostra a variedade na tipologia dos nódulos, bem como suas características morfológicas, permitindo concluir que os nódulos de *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco), apresentam forma Astragalóides e os nódulos de *Inga* sp. (Inga canela) são desmodióides.

Tabela 5- Morfologia tipológica de nódulos, conforme classificação adaptada da proposta de Corby (1984). Fonte: HANNA, et.a l., (2010).

<b>Nódulos potencialmente ramificados</b>	
<b>Tipo de nódulo</b>	<b>Características</b>
Astragalóides	É o maior de todos, algumas vezes com mais de 10 mm de diâmetro. É tipicamente ramificado, mas quando jovem pode ser ovóide, alongado ou lobado. As ramificações são onduladas e os meristemas apicais. Normalmente não tem lenticela
Crotarióides	São tipicamente ramificados, mas com ramificações lateralmente planas, não rugosas, com duas ou mais ramificações em forma de leque ou espalmadas ou lobadas com um ou mais lóbulos, com cerca de 5 mm, constituindo o nódulo total. Os meristemas são apicais e não tem lenticela.
Lupinóides	São nódulos típicos em tufo, em formas solteiras, irregularmente esférica ou em cachos, não sendo nódulos individuais ramificados. Cada componente do cacho tem a sua própria e separada conexão com as raízes. Sem lenticelas Tem crescimento apical e crescimento indeterminado.
<b>Nódulos não ramificados</b>	
Aeschynomenoides	Geralmente com 3 mm de diâmetro, com formado ovóide, usualmente encontrado bem próximo da raiz. Não tem lenticelas e o meristema é esférico. Cada nódulo ocorre usualmente no eixo de uma raiz fina. São numerosos, muitas vezes próximos, pequenos, curtos, lisos e arredondados.
Desmodióides	São esféricos ou globosos, possuindo lenticelas evidentes externamente em seu entorno. Tendem a ser grandes, mas raramente excedem 4,5 mm de diâmetro transversal.
Mucunóides	É uma forma distinta e grande de nódulos, volumoso, simples ou lobado, com pelo menos 5 mm de diâmetro transverso. A forma pode ser ovóide, cilíndrica ou lobada ou mesmo irregular na mesma espécie. Geralmente sem lenticelas.
Dimórfico	Pode ser ramificados ou não ramificados. Compreende uma classe de nódulos que não se enquadra em nenhum dos tipos anteriormente descrito.



### 5.3. A OCORRÊNCIA DA NODULAÇÃO E O DESENVOLVIMENTO DAS PLÂNTULAS NO CAMPO.

O número de nódulos encontrados para as duas classes de altura avaliadas (plântulas maiores e menores que 25 cm de altura), estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6- Número de nódulos encontrados por classe de altura em regenerantes de *Inga* spp.

<i>Inga edulis</i> Mart. (Inga rabo de macaco)			
Altura dos regenerantes		Número de nódulos dos regenerantes	
H > 25 cm	H < 25 cm	H > 25 cm	H < 25 cm
36%	64%	251 (36,07%)	445 (63,92%)
<i>Inga</i> sp. (Inga canela)			
Altura dos regenerantes		Número de nódulos dos regenerantes	
H < 25 cm	H > 25 cm	H < 25 cm	H > 25 cm
27%	73%	207 (33,33%)	415 (66,66%)

H: altura; > maior; < menor.

Para o *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco) foi encontrado nos regenerantes amostrados 696 nódulos, estes distribuídos 36% nos regenerantes menores que 25 cm, e 64% nos maiores. Também para esta espécie, foi encontrado nos 100 regenerantes, 36 indivíduos com altura superior a 25 cm e 64 com altura inferior. Para o *Inga* sp. (Inga canela) foi encontrado 27 regenerantes com altura inferior a 25 cm e 73 com altura superior. O número de nódulos foi de 622, sendo 207 para regenerantes com altura inferior a 25 cm e 415 para com altura superior.

Relação diretamente proporcional foi encontrada entre o peso seco da parte aérea (PSPA), o peso seco da raiz (PSR) e o peso seco dos nódulos, isto para as duas espécies (Figuras 15 e 16). O aumento do peso seco dos nódulos apresentou correlação de Pearson de 0,84% e 0,92% com o aumento do peso seco da parte aérea e correlações de 0,82% e 0,5% com o aumento no peso seco das raízes em plântulas de *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco) e *Inga* sp. (Inga canela) respectivamente.

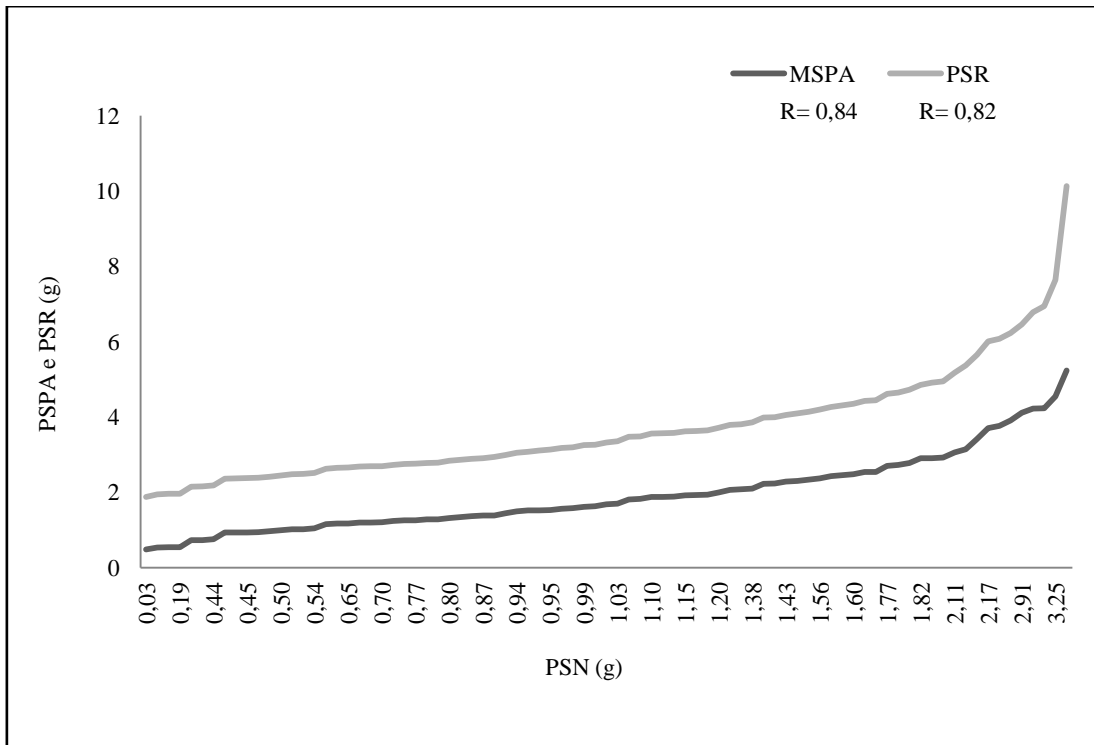


Figura 15. Proporcionalidade existente entre o peso dos nódulos (PSN) e o peso seco da parte aérea (PSPA) e peso seco da raiz (PSR) em plântulas de *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco).

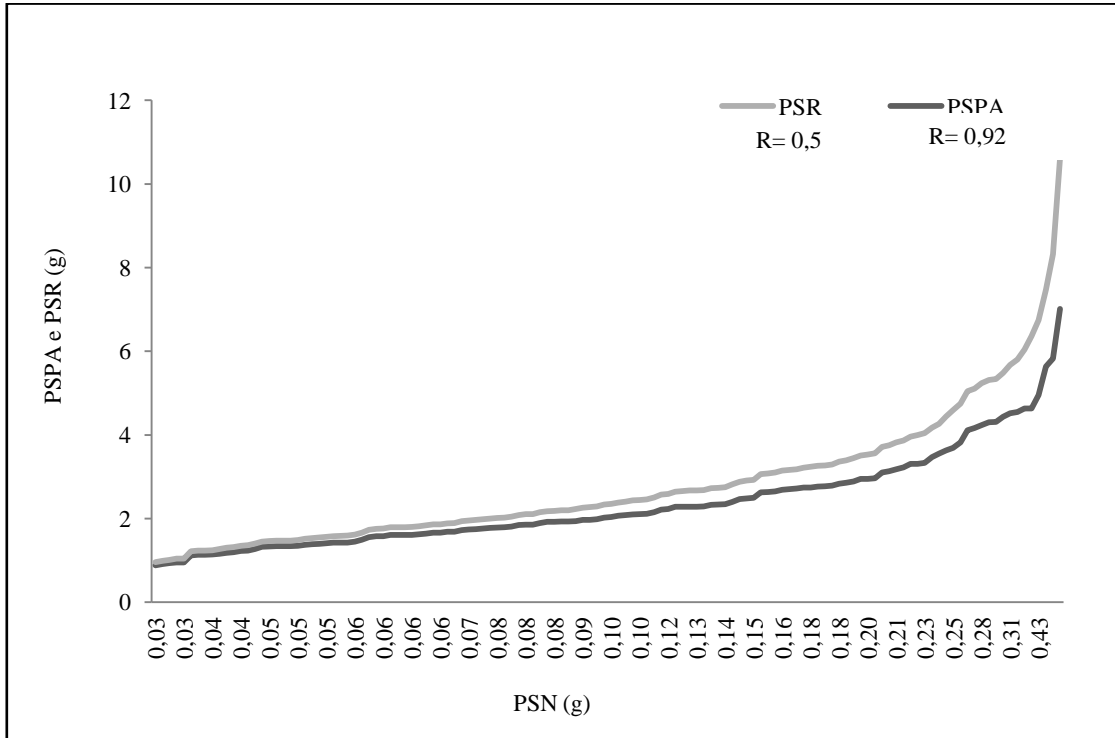


Figura 16. Proporcionalidade existente entre o peso dos nódulos (PSN) e o peso seco da parte aérea (PSPA) e peso seco da raiz (PSR) em plântulas de *Inga* sp. (Inga canela).

O peso seco dos nódulos favoreceu o aumento na produção de biomassa nas duas espécies, segundo Nogueira et al. (2012), as plantas que fixam carbono (C) formam mais biomassa vegetal, o que durante o seu crescimento, parte desta biomassa produzida formada pelas folhas, galhos e estruturas reprodutivas, retornam ao solo. Isto por sua vez, através da decomposição da serapilheira, proporciona a ciclagem de nutrientes, que exerce importante papel na reabilitação de áreas degradadas. Portanto, espécies arbóreas que produzem elevada quantidade de fitomassa, principalmente as leguminosas simbiontes, constituem-se em espécies chaves no processo de recuperação florestal.

Resultados sobre avaliação da sucessão em reflorestamentos com 12 anos, em áreas de solo arenoso degradado em Porto Trombetas, PA, mostram que sob as parcelas onde foi implantada uma leguminosa fixadora exótica *Racosperma* (ex. *Acacia mangium*), uma leguminosa fixadora nativa (*Sclerolobium paniculatum*), duas mirtáceas exóticas (*Eucalyptus pellitae* e *Eucalyptus citriodora*) e uma celastracea nativa (*Goupia glabra*), a maior riqueza de espécies nativas oriundas da regeneração natural e a maior biomassa vegetal foram encontradas sob os reflorestamentos com leguminosas fixadoras de nitrogênio (NOGUEIRA, 2012).

#### **5.4. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE BACTÉRIAS IAZOTRÓFICAS ISOLADAS**

Os dados apresentados na Tabela 7 mostram que os isolados provenientes da mesma espécie arbórea, apresentaram diversidade em suas características morfológicas das colônias.

Tabela 7- Características morfológicas de bactérias diazotróficas isoladas de nódulos retirados de regenerantes de *Inga* spp.

<b>Isolado</b>	<b>Cor do pH</b>	<b>DC (cm)</b>	<b>TC (dias)</b>	<b>Aparência do Muco</b>
IRM	Amarelo	3	8	Gelatinosa, Gomosa
IRM P2	Amarelo escuro	5	7	Claro nas bordas, com um ponto amarelo escuro no centro da colônia.
IRM P3	Amarelo	4,5	8	Claro nas bordas, com um ponto amarelo escuro no centro da colônia.
IRM P4	Amarelo escuro	4	10	Claro nas bordas, com um ponto amarelo escuro no centro da colônia.
IP	Azul	5	3	Gomoso
IP P1	Azul	3	7	Gomoso, gelatinoso.
IC	Azul	3,5	5	Gomoso, oleosa.
IC P1	Verde	3	7	Gomosa, gelatinosa.
IC P2	Verde	3,2	7	Gomosa, oleosa
IF	Amarelo claro	5	7	Claro nas bordas, com um ponto amarelo escuro no centro da colônia.
IF P1	Verde	2,5	6	Claro nas bordas, com um ponto amarelo escuro no centro da colônia.
IL	Verde	3	4	Oleosa

Diâmetro da colônia (DC mm), Tempo de Crescimento (TC em dias). *Inga edulis* Mart. (IRM), *Inga marginata* Kunth (IP), *Inga* sp. (Inga canela - IC), *Inga laurina* (Sw.) Willd. (IF) e *Inga* sp. (Inga larga - IL).

Foram isolados 4 estirpes provenientes do *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco) – IRM, as quais modificaram o pH do meio de cultura para ácido (coloração amarela), o tempo de crescimento destas colônias foi lento, levando de 7 a 8 dias para apresentar 1mm de diâmetro da colônia no meio de cultura. Após 14 dias de incubação, a colônia apresentou uma média de 4,12 mm de diâmetro, o que a caracteriza como produtora de muito muco. Quanto à aparência do muco, estas variaram de gelatinosa a gomosa, com superfície lisa, e às vezes apresentando um ponto amarelo no centro da colônia (Figura 17). De modo geral, as colônias isoladas destas estirpes apresentaram forma circular e de acordo com a classificação quanto a elevação da colônia, foi considerado plana, com bordas inteiras.



Figura 17. Bactérias diazotróficas isoladas de estirpes de *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco) em meio de cultura 79<sup>o</sup>.

As estirpes provenientes do *Inga* sp. (*Inga* larga – IL), apresentaram o pH neutro, ou seja, não causou alterações na coloração do meio de cultura. O tempo de crescimento da colônia proveniente de estirpes de IL é considerado intermediário, levando 4 dias para apresentar 1mm de diâmetro da colônia, e até 7 dias para atingir 4mm, caracterizando-a como produtora de muito muco, cuja a aparência é oleosa, coalescente (Figura 18), de superfície lisa. Após 14 dias de incubação a colônia unificou-se tomando toda a região da placa de petri, as colônias deste isolados apresentou forma irregular, com elevação convexa, borda inteira.

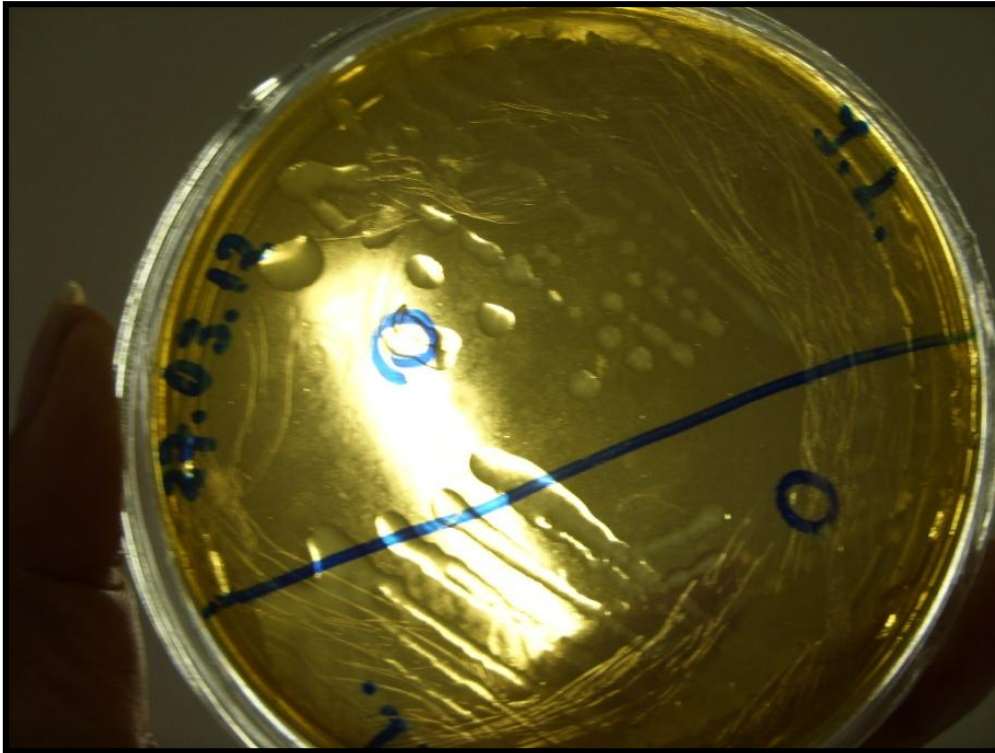


Figura 18. Aparência oleosa do muco da estirpe isolada de nódulos de *Inga* sp. (*Inga larga*) em meio de cultura 79'.

Foram isoladas duas estirpes provenientes de nódulos originários *Inga marginata* Kunth (*Inga piula*-IP), ambas apresentaram alteração do pH para ácido (coloração amarela), sendo o tempo de crescimento das colônias considerado intermediário para a estirpe IP e crescimento rápido para a colônia isolada da estirpe IP1, pois tiveram uma média de 5 e 3 dias para serem visualizadas (1 mm do seu diâmetro) respectivamente, As duas estirpes de IP são produtoras de muito muco, suas colônias apresentaram formas irregulares, com elevação do muco plana e borda filamentosa, com superfície rugosa e seca. (Figura 19).

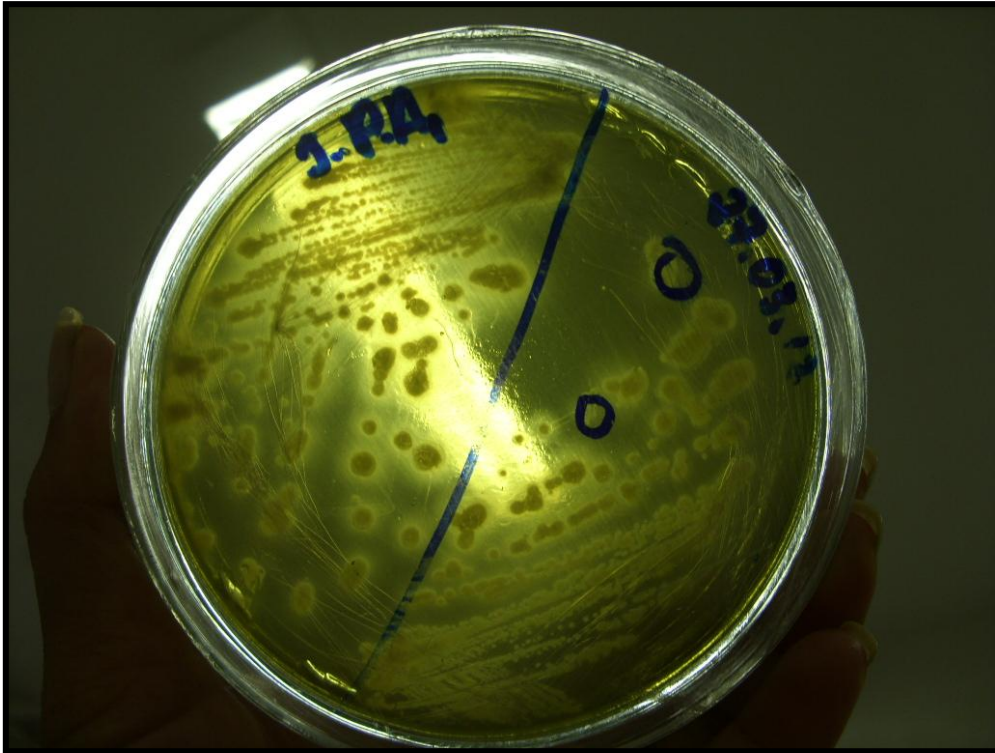


Figura 19. Aparência do muco rugoso e seco de colônias isoladas de estirpes de *Inga marginata* Kunth (Inga piula-IP) em meio de cultura 79'.

Duas estirpes de *Inga laurina* (Sw.) (Inga ferro- IF) foram isoladas, a estirpe IF apresentou alteração do pH para ácido e a estirpe IF1, manteve o pH do meio neutro, coloração verde. O tempo de crescimento foi considerado lento, levando em média de 6,5 dias para a visualização da colônia (1mm de diâmetro), e uma média de 10 dias para a apresentar 5 mm de diâmetro, as mesmas produzem grande quantidade de muco, cuja aparência é semelhante a das colônias isoladas das estirpes *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco – IRM), claro nas bordas com um ponto amarelo escuro no centro da colônia. Embora a colônia apresente formas irregulares, predominou na placa de petri, a forma circular, com elevação convexa, borda inteira e superfície lisa (Figura 20).

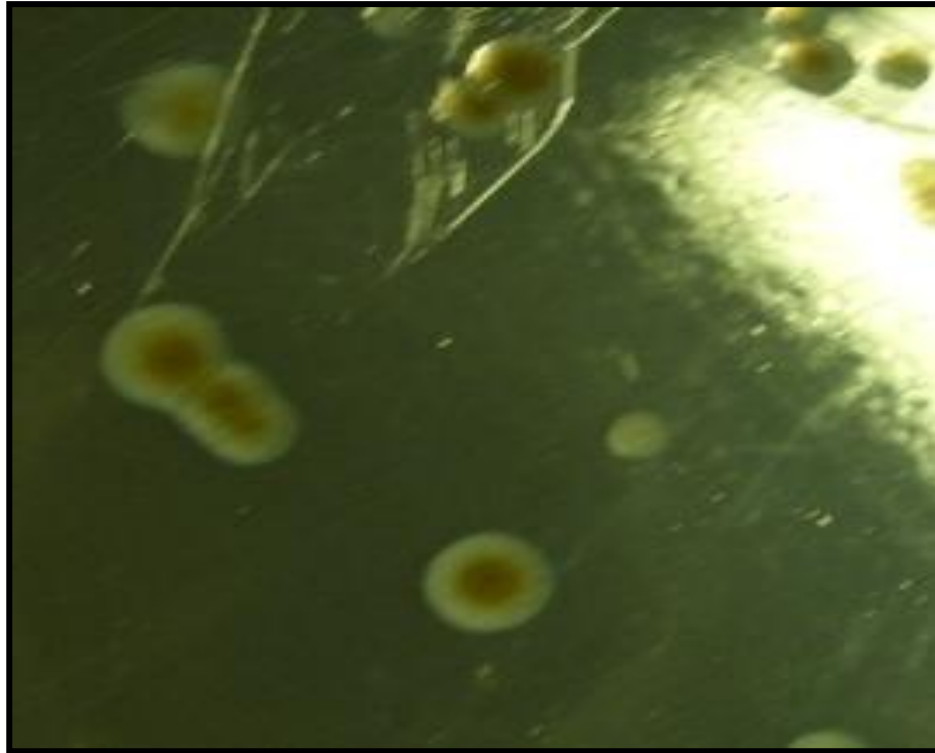


Figura 20. Colônias de estirpes de *Inga laurina* (Sw.) (*Inga ferro-IF*), em meio de cultura 79'.

Das estirpes de *Inga* sp. (*Inga canela* – IC) (Figura 21), foram isoladas: IC, IC1 e IC2. O crescimento foi intermediário (5 dias) e lento (7 dias) para as colônias IC e IC1 e IC2 respectivamente. As colônias também divergiram em relação a alteração do pH, que variou de neutro a alcalino (meio de cultura variou a cor de verde a azul), conforme pode ser observado na tabela 7. De modo geral, apresentou diâmetro médio da colônia de 3,23 cm, caracterizando-a como produtora de muito muco. Sua forma é circular, com elevação do muco plana e borda e superfície lisas.



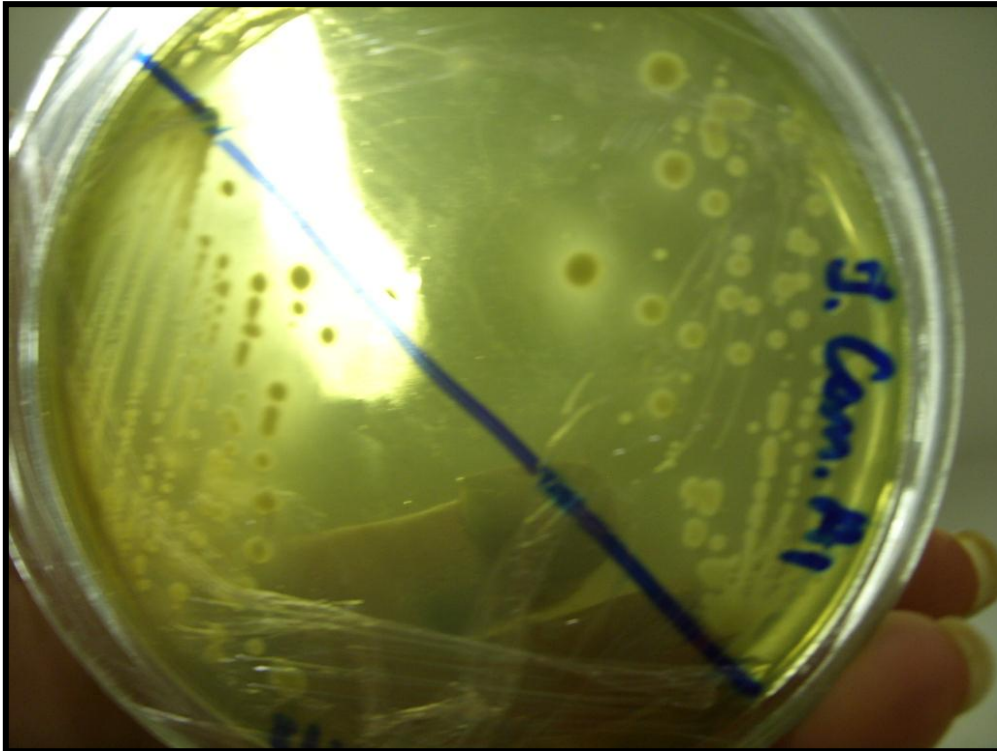


Figura 21. Colônias de bactérias diazotróficas de estirpes de *Inga* sp (Inga canela-IC).

As estirpes isoladas de leguminosas das espécies *Inga marginata* Kunth, (Inga piula - IP) e *Inga* sp. (Inga canela), apresentaram média de 5,4 dias para a visualização da colônia no meio de cultura, quando incubadas em condição ambiente (Figura 22). Estas estirpes foram as que apresentaram maior velocidade de crescimento, embora não exista correlação entre o tempo de crescimento e o diâmetro da colônia. De modo geral, todas as estirpes isoladas apresentaram diâmetro médio das colônias de 3,77 mm, o que as caracterizam como produtoras de muito muco.

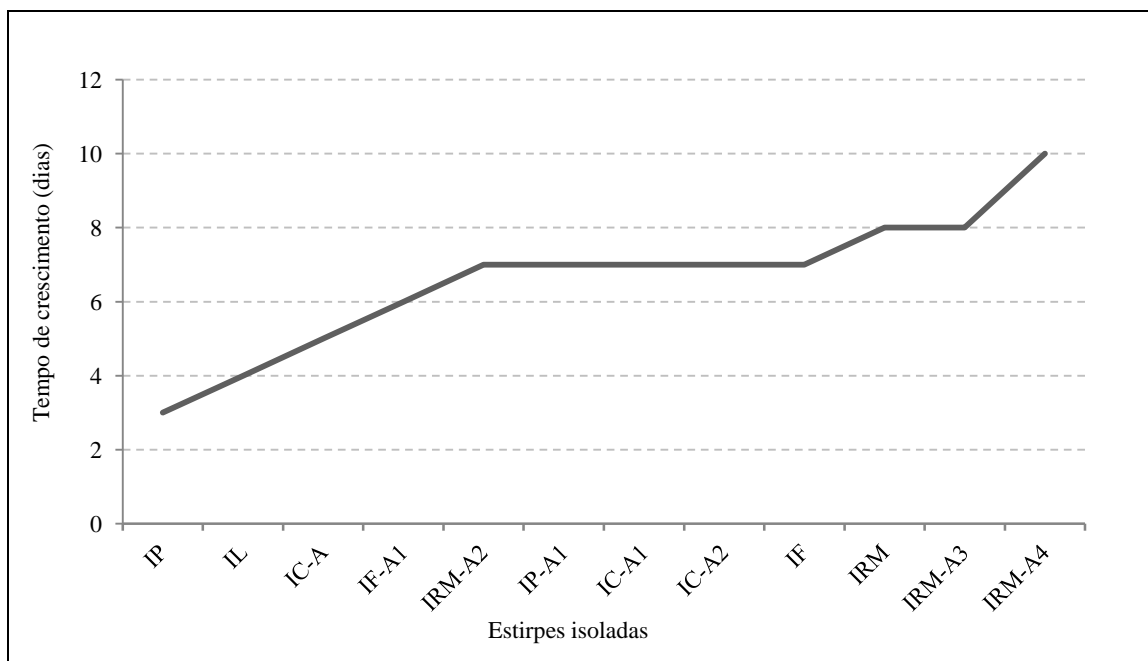


Figura 22. Tempo de crescimento das colônias de bactérias diazotróficas de estirpes de *Inga* spp.

As características morfológicas das colônias de bactérias diazotróficas são importantes porque fornecem informações tanto para a identificação parcial quanto para o agrupamento destes microorganismos (FERNANDES et al., 2003). Além disso, os dados emitidos serão úteis para futuros trabalhos realizarem a classificação taxonômica, tendo em vista, a seleção de estirpes mais eficientes e adaptadas as condições edafoclimáticas específicas do seu ambiente, favorecendo desta forma o desenvolvimento da planta.

Consoante Barbieri et al., (1998), são típicas de *Rhizobium* características como crescimento rápido e acidificante enquanto crescimento lento e que alcalinizam o meio de cultura, são típicas de *Azorhizobium*. Entretanto, nota-se que algumas estirpes apresentaram comportamento contraditório. Segundo Martins (1997), as maiores diferenças encontradas são relativas ao tempo de crescimento associadas a modificação do pH do meio promovida pelas estirpes, a diversidade da morfologia da colônia é uma indicação das diferenças fundamentais entre isolados e pode ser um indicio da diversidade genética, logo, fazem-se necessários, estudos mais avançados relacionados a nível de DNA para a identificação do gênero.

A tabela 8 mostra os padrões morfológicos característicos, utilizados para a construção da matriz de similaridade entre as diferentes estirpes de *Inga* spp.

Tabela 8- Padrões morfológicos encontrados para estirpes isoladas de nódulos de regenerantes de *Inga* spp.

Estirpe	Alteração do pH	Forma	Tempo de Crescimento	Produção de muco	Elevação da colônia	Borda da colônia	Aspecto da superfície
IRM1	Amarelo	Circular	Lento	Abundante	Plana	Inteira	Lisa
IRM2	Amarelo	Circular	Lento	Abundante	Plana	Inteira	Lisa
IRM3	Amarelo	Circular	Lento	Abundante	Plana	Inteira	Lisa
IRM4	Amarelo	Circular	Lento	Abundante	Plana	Inteira	Lisa
I.P	Azul	Irregular	Intermediário	Abundante	Plana	Filamentosa	Rugosa
I.P1	Azul	Irregular	Rápido	Muito	Plana	Filamentosa	Rugosa
I.C.	Azul	Circular	Intermediário	Muito	Plana	Filamentosa	Lisa
I.C1	Azul	Circular	Lento	Muito	Plana	Filamentosa	Lisa
I.C2	Verde	Circular	Intermediário	Muito	Plana	Filamentosa	Lisa
I.F	Amarelo	Circular	Lento	Muito	Convexa	Inteira	Lisa
I.F1	Verde	Irregular	Lento	Muito	Convexa	Inteira	Lisa
I. L	Verde	Irregular	Intermediário	Muito	Convexa	Inteira	Lisa

*Inga edulis* Mart. (IRM), *Inga marginata* Kunth (IP), *Inga* sp. (Inga canela - IC), *Inga laurina* (Sw.) Willd. (IF), *Inga* sp. (Inga larga - IL).

Tabela 9- Matriz de similaridade da caracterização morfológica de estirpes de bactérias diazotróficas de *Inga* spp.

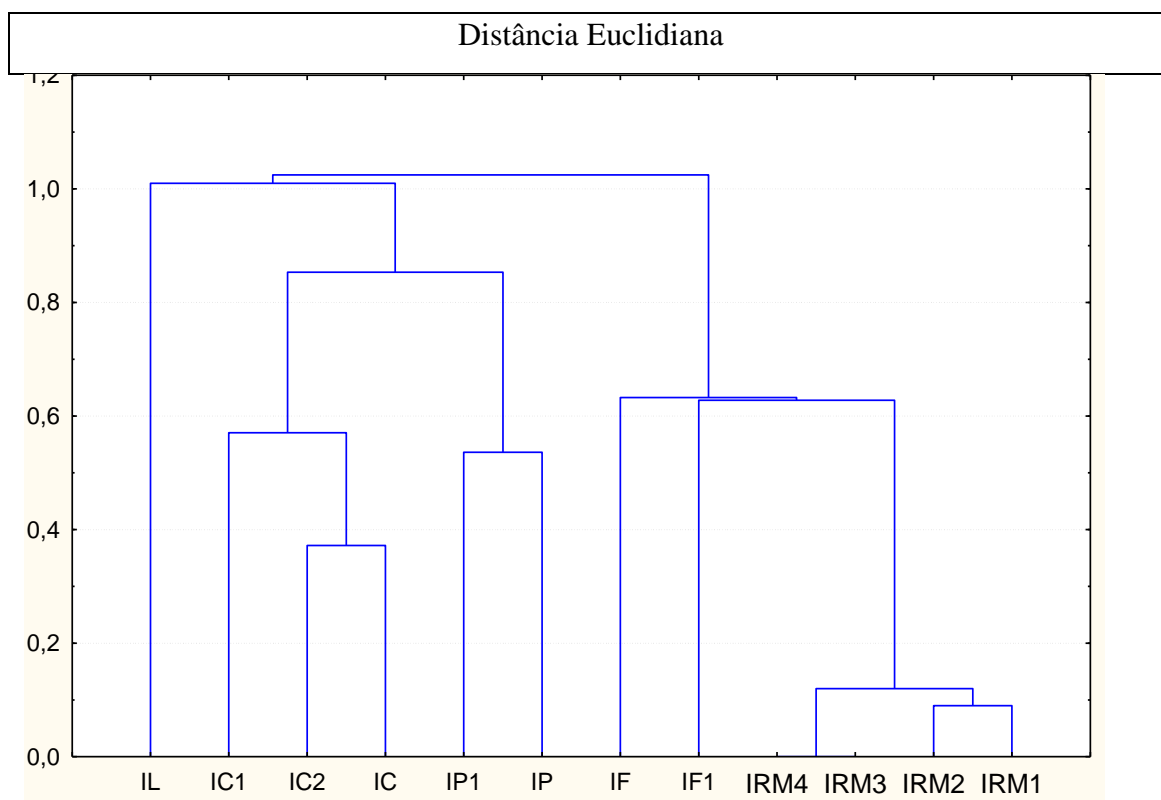
	IRM1	IRM2	IRM3	IRM4	I.P	I.P1	I.C.	I.C1	I.C2	I.F	I.F1	I. L
IRM1	-											
IRM2	1	-										
IRM3	1	1	-									
IRM4	1	1	1	-								
I.P	0,14	0,14	0,14	0,14	-							
I.P1	0,28	0,28	0,28	0,28	0,71	-						
I.C.	0,42	0,42	0,42	0,42	0,57	0,57	-					
I.C1	0,57	0,57	0,57	0,57	0,57	0,71	0,71	-				
I.C2	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,85	0,71	-			
I.F	0,57	0,66	0,57	0,57	0	0,14	0,42	0,57	0,42	-		
I.F1	0,71	0,71	0,83	0,83	0,14	0,28	0,28	0,42	0,42	0,71	-	
I. L	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,42	0,28	0,57	0,57	0,71	-

*Inga edulis* Mart. (IRM), *Inga marginata* Kunth (IP), *Inga* sp. (Inga canela - IC), *Inga laurina* (Sw.) Willd. (IF), *Inga* sp. (Inga larga - IL).

Maior similaridade foi encontrada entre as estirpes de *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco), as quais não apresentaram diferenças quanto aos padrões morfológicos. Similaridade acima de 70% foi encontrada entre as estirpes de *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco) e *Inga laurina* (Sw.) (Inga ferro- IF). Por outro lado, menor similaridade foi encontrada quando se comparou os padrões morfológicos das

estirpes de *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco) com a *Inga marginata* Kunth (Inga piula – IP) (14%). Outro destaque foi a baixa similaridade encontrada entre as estirpes de *Inga marginata* Kunth ( Inga piula-IP) e *Inga laurina* (Sw.) (Inga ferro-IF) - IF, que foi 0 e 14%, respectivamente.

A análise de agrupamento (Figura 23), realizada com base nos padrões morfológicos obtidos, mostra a divisão das estirpes em três grupos distintos. Sendo o grupo mais divergente composto pelas estirpes de *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco) e *Inga laurina* (Sw.) –(Inga ferro- IF) . O segundo grupo foi composto apenas pela estirpe de *Inga* sp. (Inga larga), e o terceiro composto pelas estirpes de *Inga marginata* Kunth (Inga piula – IP) e *Inga* sp. (Inga canela). Dentro do grupo 1, as estirpes de *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco) e *Inga laurina* (Sw.) (Inga ferro – IF) apresentaram uma distância de 63% e dentro do grupo 3, as estirpes de *Inga marginata* Kunth (Inga piula – IP) e canela uma distância de 85%. A distância entre a estirpe de *Inga* sp. (Inga larga) em relação ao grupo 2, foi de 98% e em relação ao grupo 1, foi de 100%.



Estirpes de *Inga* spp.

Figura 23: Análise de agrupamento de padrões morfológicos de estirpes de bactérias diazotróficas de *Inga* spp. *Inga edulis* Mart. (IRM), *Inga marginata* Kunth (IP), *Inga* sp. (Inga canela -IC), *Inga laurina* (Sw.) Willd. (IF), *Inga* sp. (Inga larga-IL).

## 5.5. Resposta de mudas de *Inga* spp. à inoculação com bactérias diazotróficas

A análise de variância (Tabela 10) mostra a ocorrência de significância tanto para *Inga edulis* Mart. (*Inga* rabo de macaco) quanto para *Inga* sp. (*Inga* canela) em todas as variáveis analisadas, demonstrando que houve diferença da resposta das mudas das duas espécies entre os tratamentos testados para a inoculação com bactérias diazotróficas.

Tabela 10- Análise de variância da resposta de mudas de *Inga* spp., à inoculação com bactérias diazotróficas.

Espécie – <i>Inga edulis</i> Mart. ( <i>Inga</i> rabo de macaco)							
FV	GL	CSR (cm)	DC (mm)	HPA (cm)	MST (g)	PSPA (g)	PSR (g)
Tratamentos	13	36,10**	3,85**	24,73**	38,26**	38,26**	38,25**
Resíduo	42	1,89	0,23	2,18	0,31	0,12	0,042
Média		14,14	1,89	31,89	3,92	2,43	1,48
C.V (%)		9,73	25,68	4,63	14,31	14,56	13,91
Espécie – <i>Inga</i> sp. ( <i>Inga</i> canela).							
FV	GL	CSR (cm)	DC (mm)	HPA (cm)	MST (g)	PSPA (g)	PSR (g)
Tratamentos	13	265,99**	16,11**	149,74**	342,43**	360,2**	278,9**
Resíduo	42	0,27	0,09	4,64	0,04	0,01	0,05
Média		14,13	2,39	35,62	5,25	3,49	1,76
C.V (%)		3,69	12,95	6,05	11,64	3,3	4,17

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ); \*Significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ); ns não significativo; CSR, diâmetro do coleto - DC, altura da parte aérea - HPA, altura total - HT, matéria seca total - MST, peso seco da parte aérea - PSPA e peso seco da raiz -PSR.

Aos 120 dias após a instalação do experimento, os maiores valores médios foram obtidos para as mudas de *Inga* sp. (*Inga* canela) nas variáveis: diâmetro de coleto; altura da parte aérea; massa seca total; peso seco da parte aérea; e peso seco do sistema radicular. Isto por sua vez, mostra uma resposta superior desta espécie quanto à inoculação com bactérias diazotróficas em 0,5mm em diâmetro, 3,73cm em altura da parte aérea, 1,33g na matéria seca total, 1,06g no peso seco da parte aérea, e 0,27g no peso seco da raiz, em relação à espécie *Inga edulis* Mart. (*Inga* rabo de macaco)

Para as variáveis mensuradas no experimento, os maiores valores de coeficiente de variação foram encontrados nos tratamentos para a espécie *Inga edulis* Mart., (*Inga*

rabo de macaco) variando de 4,63 a 25,68%. Para a espécie *Inga* sp. (Inga canela) estes valores variaram de 3,69 a 12,95%, o que demonstra a superioridade da resposta da mudas desta espécie à inoculação com bactérias diazotróficas.

A Figura 24 mostra a resposta das mudas de *Inga* spp., à inoculação com bactérias diazotróficas, em relação aos tratamentos sem inoculação e adubação (Testemunha) e ao tratamento sem inoculação e com adubação nitrogenada.

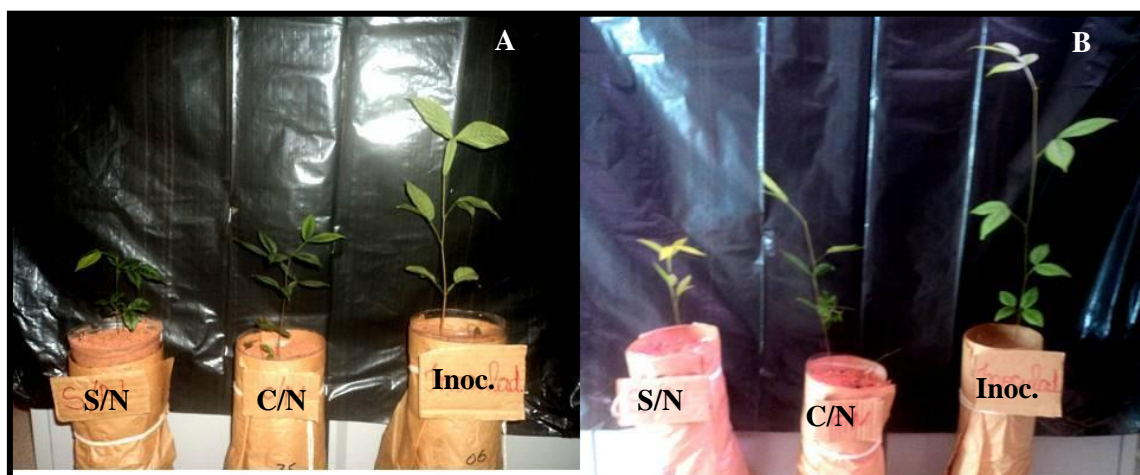


Figura 24. Resposta de mudas de *Inga* spp., à inoculação com bactérias diazotróficas. A) mudas de *Inga edulis* Mart. - IRM. B) mudas de *Inga* sp. (Inga canela). Sem nitrogênio (S/N), com nitrogênio (C/N), Inoc. (inoculada).

Efeitos positivos no desenvolvimento de plantas mediante o uso de inoculantes foram constatados em trabalho realizados por Burity (2000) em mudas de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth); por Bent et. al. (2001) em mudas de *Pinus contorta*; por Mafia et. al. (2005) em mudas de Eucalipto; por Santos (2005) em mudas de *Heliconia psittacorum* L. f.; e por Bruneta (2007; 2010) em mudas de *Pinus taeda*.

As maiores médias para comprimento do sistema radicular (Figura 25 A), foram obtidas para o *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco) em seis estirpes (IRM; IRM3; IC2; IP1; IF; IL), como também nos tratamentos testemunha e sem inoculação com adubação nitrogenada. As mudas com maior valor de comprimento radicular foram obtidas quando se inoculou a estirpe IRM1, isto para as duas espécies, 22 cm para *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco) e 20 cm para *Inga* sp. (Inga canela). Nesta variável todos os tratamentos os quais foi realizada a inoculação com as estirpes, produziram mudas superiores em relação aos tratamentos sem inoculação. Mudas com menores comprimento de sistema radicular foram encontradas no tratamento sem adubação

nitrogenada e sem inoculação (Testemunha), 5 cm para *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco) e 2,5 cm para o *Inga* sp. (Inga canela). O tratamento com adubação nitrogenada sem inoculação, foi o segundo a apresentar as menores médias, 8 cm para *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco) e 6,5 cm para *Inga* sp. (Inga canela).

Para as duas espécies foram encontrados altos valores de incremento para comprimento do sistema radicular. Para o *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco) foi encontrado um incremento de 400% quando comparado ao tratamento com inoculação usando a estirpe IRM, em relação à testemunha (sem inoculação e adubação nitrogenada) e de 800% para o *Inga* sp. (Inga canela). Comparando a testemunha com o tratamento sem inoculação com adubação nitrogenada, foi encontrado um incremento de 275% para o *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco) e de 307% para o *Inga* sp. (Inga canela).

Resultados referentes ao crescimento do sistema radicular em mudas de *Inga* spp, Oliveira et al., (2010) ao realizar estudos para avaliar o efeito do rizóbio no crescimento inicial de *Acacia mangium* Willd, constataram que o CSR, foi incrementado (cerca de 110%) por todos os tratamentos de inoculação, comparados ao controle.

Mudas com maiores alturas foram obtidas para o *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco) em sete tratamentos utilizando-se inoculação com estirpes (IRM1; IRM2; IRM3; IRM4; IC1; IC2; IF) (FIGURA 25 B), sendo o tratamento com a inoculação da estirpe IRM1 superior em relação aos demais, 42 cm para *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco) e 37 cm para o *Inga* sp. (Inga canela). Também para a testemunha e o tratamento com adubação nitrogenada sem inoculação foram obtidos maiores valores de altura para o *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco), embora estes tratamentos quando comparados com os de inoculação tenham apresentado valores inferiores: testemunha 7,5 cm para *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco) e 6 cm para *Inga* sp. (Inga canela); adubação nitrogenada sem inoculação 19 cm para *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco) e 11 cm para *Inga* sp. (Inga canela).

Para a variável altura, os valores de incremento obtidos da comparação do tratamento de maior valor (inoculação com estirpe IRM) com os de menores valores (testemunha; e sem inoculação com adubação nitrogenada) foram de 560 e 221% para *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco) e 616 e 336% para *Inga* sp. (Inga canela).

Sottero (2003), ao estudar colonização radicular e promoção de crescimento vegetal por rizobactérias, constatou que algumas bactérias fixadoras de nitrogênio

comportaram-se como promotoras de crescimento, podendo ser incluídas entre as RPCPs e o crescimento das plantas pode ser aumentado pela supressão dos microrganismos do solo que são deletérios para o seu desenvolvimento.

De acordo com a Figura 25 (C), para a variável diâmetro de coleto, os maiores valores médios foram obtidos para o *Inga* sp. (Inga canela) em onze tratamentos os quais se utilizaram a inoculação (IRM1; IRM2; IRM3; IRM4; IC; IC2; IP; IP1; IF; IF1; IL) (FIGURA 25 C). Mesmo comportamento foi obtido no tratamento com adubação nitrogenada e sem inoculação. Já na testemunha o *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco) apresentou média superior ao *Inga* sp. (Inga canela), 0,8 e 0,6 mm respectivamente. Entre os tratamentos com inoculação de estirpes, o IRM1 também foi superior aos demais, 3,2 mm para *Inga* sp. (Inga canela) e 2,3 mm para *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco).

Em trabalho realizado por Souza et al., (2011), foi constatado que a inoculação com rizóbios favoreceu o crescimento diamétrico em mudas de acapu do igapó (*Swartzia argentea*) e de saboarana (*Swartzia laevi-carpa*).



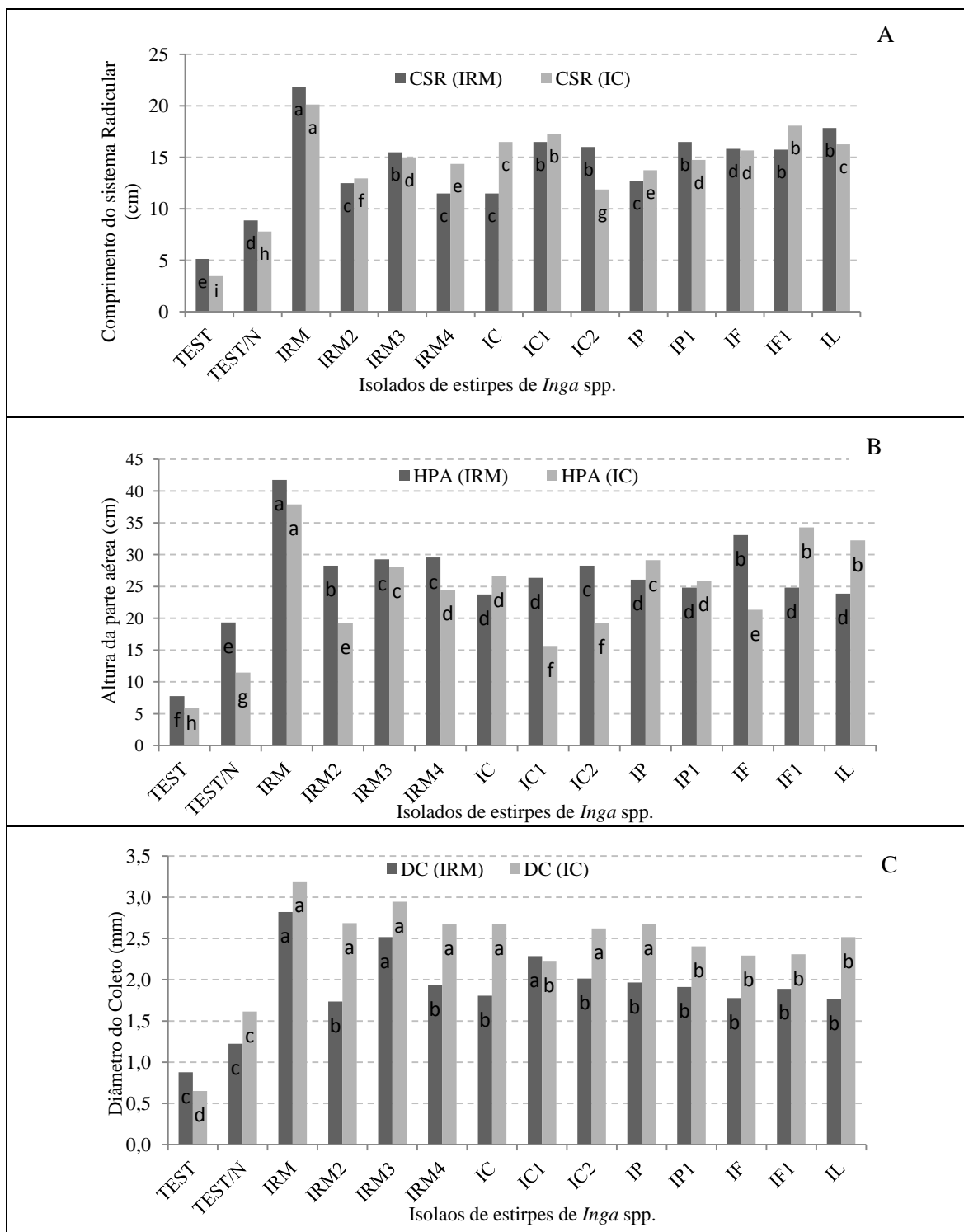


Figura 25. Resposta de mudas de *Inga* spp. à inoculação com estirpes de bactérias diazotróficas. *Inga edulis* Mart. (IRM), *Inga marginata* Kunth (IP), *Inga* sp. (Inga canela - IC), *Inga laurina* (Sw.) Willd. (IF), *Inga* sp. (Inga larga-IL). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Com relação à biomassa ou peso seco da parte aérea, o *Inga* sp. (Inga canela) obteve os maiores valores médios em relação ao *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco), em todos os tratamentos testados. O tratamento com a inoculação da estirpe

IRM foi o que obteve os maiores pesos, 8 g para *Inga* sp. (Inga canela) e 5,4 g para *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco) (FIGURA 26). Os menores valores foram obtidos para o tratamento sem inoculação e sem adubação (testemunha) 0,5 e 0,3 g, seguido do tratamento com adubação nitrogenada e sem inoculação, 2,4 e 1,3 g respectivamente. Comparando-se o tratamento com os maiores pesos (IRM) em relação ao de menor peso (testemunha), observa-se para *Inga* sp. (Inga canela) um incremento de 1.600% no peso da parte aérea e para *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco) 1.800%. Em relação ao tratamento com adubação nitrogenada e sem inoculação foi obtido um incremento de 333% para o *Inga* sp. (Inga canela), e de 415% para o *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco).

Enebak (2005), ao inocular isolados obtidos de *P. taeda* em *P. taeda*, *P. elliotii* e *P. palustris*, constatou que a altura da parte aérea das mudas apresentou incremento por cinco de oito isolados testados em mudas de *P. taeda* e em três nas de *P. elliotii*. Brunetta (2007), constatou a interação significativa entre isolados de rizobactérias e espécies de *Pinus* sp., resultando em estímulo ao crescimento e aumento na qualidade de mudas de *P.taeda*.

Souza et. al. (2011), observaram que a prática de inoculação foi significativa ( $p < 0,05$ ), de modo que favoreceu o desenvolvimento da biomassa em raízes e parte aérea em mudas de saborana (*Swartzia laevi-carpa*) evidenciando o efeito benéfico do uso de inoculantes no crescimento e desenvolvimento de plantas.

Observou-se que os isolados provenientes de outras plantas também promoveram o desenvolvimento das plântulas, evidenciando a não especificidade. Juniór et. al. (1986) ao realizar testes preliminares de inoculação cruzada em leguminosas arbóreas, concluiu que nem todas as estirpes de rizóbios são específicas apenas para uma determinada planta, podendo algumas delas, nodularem também outras plantas.

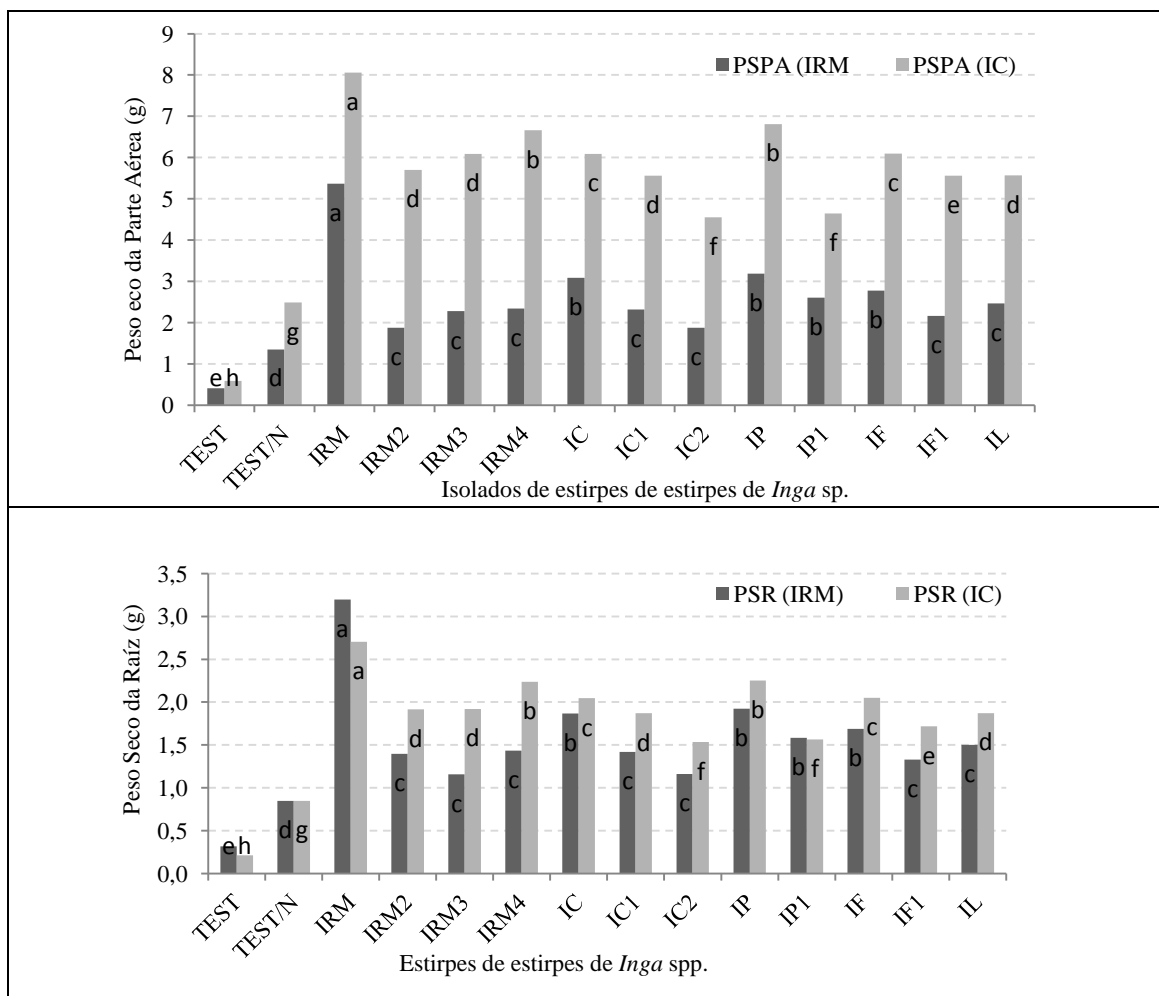


Figura 26. Valores médios referentes à biomassa (Peso seco de raiz e parte aérea) obtida de mudas de *Inga* spp., inoculadas com estirpes de bactérias diazotróficas. *Inga edulis* Mart. (IRM), *Inga marginata* Kunth (IP), *Inga* sp. (Inga canela - IC), *Inga laurina* (Sw.) Willd. (IF), *Inga* sp. (Inga larga-IL). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

### 5.6. INFLUÊNCIA DA INOCULAÇÃO SOBRE PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE MUDAS DE *INGA* SPP.

Para as espécies de *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco) e *Inga* sp. (Inga canela), foi detectado significância para os parâmetros de avaliação da qualidade das mudas (Tabela 11), indicando que houve uma diferença da qualidade das mudas entre os diferentes tratamentos testados no experimento.

Tabela 11- Efeito da inoculação com bactérias diazotróficas nos parâmetros de qualidade de mudas de *Inga* spp.

Espécie – <i>Inga edulis</i> Mart. (Inga rabo de macaco)					
FV	GL	RHDC	RHPSPA	RMSPAR	IQD
Tratamentos	13	8.64**	0,35**	239.64**	2.36*
Resíduo	42	2,56	0,03	0,0001	0,015
Média Geral		4,82	1,27	1,61	0,61
C.V (%)		33.20	15,65	0.62	20.69
Espécie – <i>Inga</i> sp. (Inga canela)					
FV	GL	RAD	RHPSPA	RPSPAPSR	IQD
Tratamentos	13	7.96**	6,11**	17.41**	37.99**
Resíduo	42	3,16	0,01	0,0008	0,002
Média Geral		10,25	3,49	1,96	0,44
C.V (%)		17.34	3,73	1.46	11.64

Relação altura e Diâmetro de coleto (RHDC); Relação altura da parte aérea com peso seco da parte aérea; Relação peso seco da parte aérea e peso seco da raiz (RSPAPSR); Índice de Qualidade de Dickson (IQD); \*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ ), \*Significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ ); <sup>ns</sup> não significativo.

Os índices RDHC e RHPSPA foram inferiores para a espécie *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco), demonstrando uma melhor proporção da altura com o diâmetro de coleto e também com o peso seco da parte aérea, o que indica uma melhor capacidade de sobrevivência e estabelecimento destas mudas, caso fossem levadas para o campo. Para a espécie *Inga* sp. (Inga canela), os valores desses índices foram superiores, demonstrando a ocorrência de uma maior desproporção entre as características utilizadas para calcular esses referidos índices.

Os valores médios obtidos para o índice RHDC para o *Inga* sp. (Inga canela) (Figura 27), mostram que a inoculação com as estirpes IF1, IL e IC1 proporcionaram uma maior desproporcionalidade entre a altura e o diâmetro de coleto, podendo caso estas mudas fossem plantadas no campo influenciar no seu desenvolvimento e estabelecimento, como por exemplo, a ocorrência de tombamento ou até mesmo aumentar a sua tortuosidade, o que influenciaria no seu crescimento.

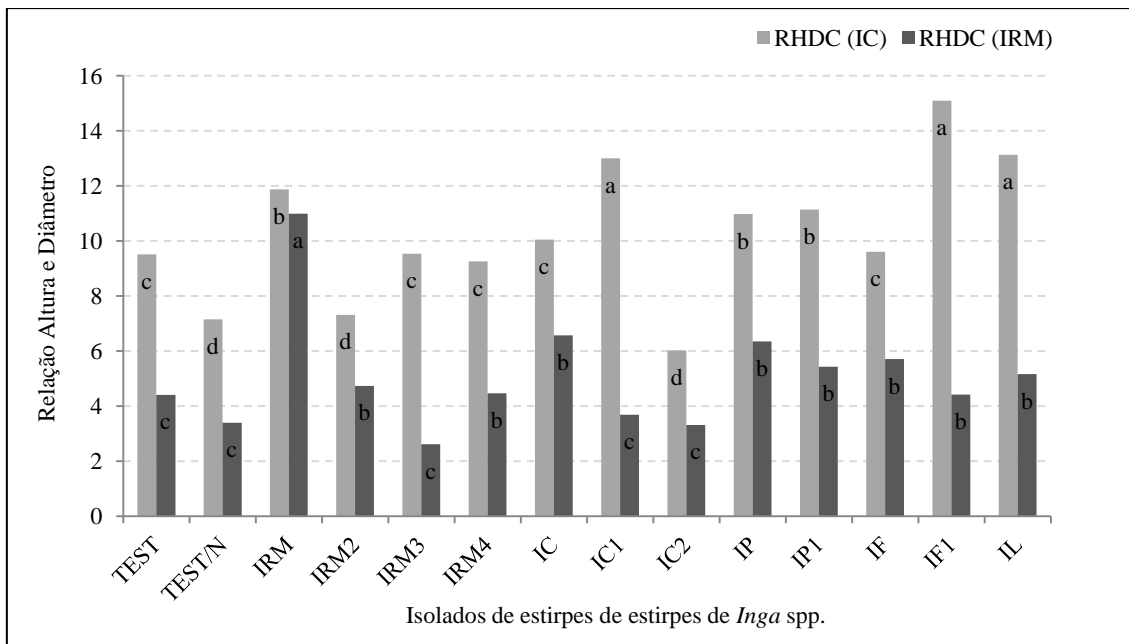


Figura 27. Relação entre altura da parte aérea e diâmetro de coleto de mudas de *Inga* spp., inoculadas com estirpes de bactérias diazotróficas. *Inga edulis* Mart. (IRM), *Inga marginata* Kunth (IP), *Inga* sp. (Inga canela - IC), *Inga laurina* (Sw.) Willd. (IF), *Inga* sp. (Inga larga-IL). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Para a espécie *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco), as maiores desproporcionalidades entre altura e diâmetro de coleto foram encontradas quando se realizou a inoculação com a estirpe IRM, o que demonstra que embora as mudas inoculadas com esta estirpe tenham ganhado uma maior altura, o diâmetro de coleto pode não ser suficiente para a sua sustentação quando levada para o campo. Porém, para as demais estirpes inoculadas foram obtidos valores menores para este índice (RHDC), indicando a influência da absorção de nitrogênio sobre a proporcionalidade entre altura e diâmetro e a capacidade de melhor estabelecimento e desenvolvimento das mudas desta espécie quando inoculadas e levadas para o plantio.

Estudo como o de Caneiro (1995), discute que quando se tem maior absorção de nitrogênio e por consequência maior altura, como é o caso da inoculação com a estirpe IRM, há um desequilíbrio entre as características envolvidas na determinação desse índice, devido aos altos níveis de N que tendem a promover maior crescimento em altura e menor em diâmetro de coleto.

A relação da altura com a massa seca da parte aérea (RHPSA) está apresentada na Figura 28.

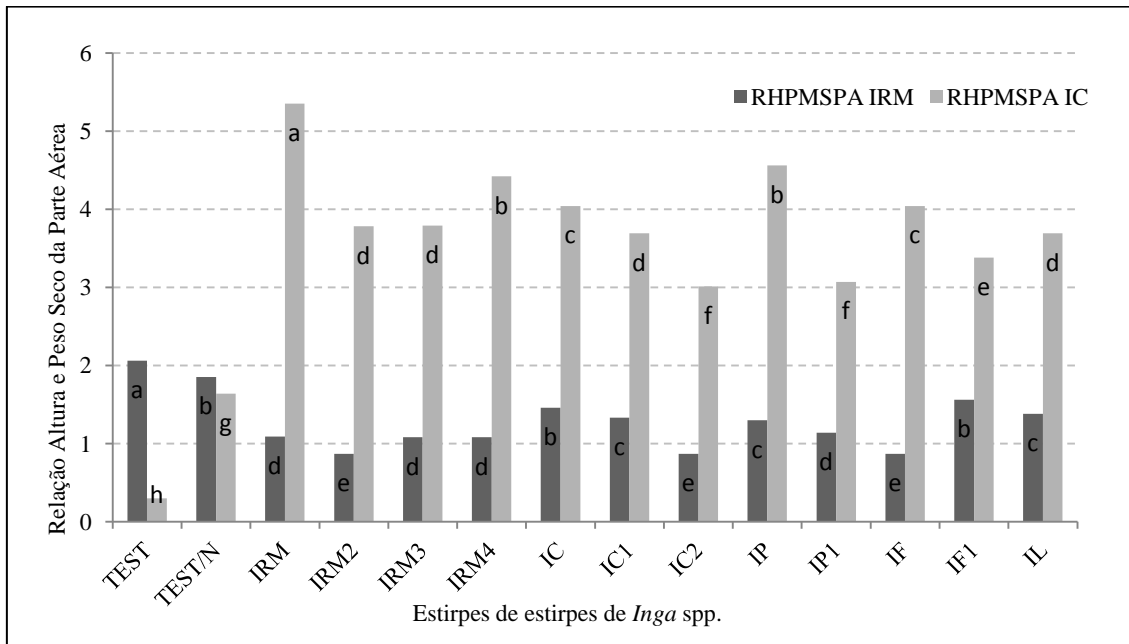


Figura 28. Relação entre altura da parte aérea e massa seca da parte aérea de mudas de *Inga* spp., inoculadas com estirpes de bactérias diazotróficas. *Inga edulis* Mart. (IRM), *Inga marginata* Kunth (IP), *Inga* sp. (Inga canela -IC), *Inga laurina* (Sw.) Willd. (IF), *Inga* sp. (Inga larga -IL). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Os maiores valores para este índice foram obtidos para a espécie *Inga* sp. (Inga canela), quando comparado com o *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco), indicando que as mudas desta espécie podem não estar bem lenhificadas, o que em condição de estresse pode levar a uma maior perda de evapotranspiração e por consequência seu dessecação, o que também pode comprometer o seu desenvolvimento quando levada para o plantio no campo.

Segundo Gomes (2001), normalmente essa relação não é utilizada como índice para avaliar o padrão de qualidade das mudas, mas pode ser de grande interesse para prever o potencial de sobrevivência das mudas no campo, e quanto menores os quocientes obtidos, maior sua capacidade de sobrevivência.

Desta forma, fica evidenciado a obtenção de menores valores para as mudas de *Inga edulis* Mart. (Inga rabo de macaco) quando inoculadas com bactérias diazotróficas, quando comparadas com os tratamentos que não utilizaram inoculação (testemunha e adubação nitrogenada sem inoculação).

Os dados da relação entre o peso da massa seca da parte aérea e da raiz, mostram que as mudas de *Inga* sp. (*Inga* canela) obtiveram relação próximo a dois na maioria dos tratamentos utilizados, o que implica em uma boa relação. Os menores valores desta relação para esta espécie foram obtidos nos tratamentos testemunha, *Inga edulis* Mart. (*Inga* rabo de macaco), embora os valores desta relação tenham ficado acima de 1,5, não foi detectado um assincronismo entre os tratamentos com inoculação de estirpes, também os menores valores foram obtidos para os tratamentos os quais não se realizaram a inoculação, mais evidenciado na testemunha.

Brissete (1984), citado por Gomes (2001), relatou, após um consenso de pesquisadores, que o índice “2,0”, expressa a melhor relação entre o peso de matéria seca da parte aérea e o peso de matéria seca do sistema radicular.

O índice de qualidade de Dickson- IDQ é um bom indicador da qualidade das mudas, pois considera o vigor e o equilíbrio da distribuição da biomassa na planta (AZEVEDO, 2010) antes do seu plantio definitivo em campo. O índice é uma combinação de variáveis morfológicas e quanto maior o seu valor, melhor a qualidade das mudas. Hunt (1990) estabeleceu o valor mínimo de 0,20, como um bom indicador de qualidade das mudas com base nos seus trabalhos de pesquisa.

Para ambas as espécies na maior parte dos tratamentos testados, o IQD foi superior a “0,20”, apenas para o *Inga* sp. (*Inga* canela) no tratamento testemunha (sem adubação nitrogenada e sem inoculação) foi obtido um valor inferior. Os maiores valores foram obtidos para o *Inga edulis* Mart. (*Inga* rabo de macaco) em todos os tratamentos, sendo superior nos tratamentos com inoculação das estirpes IRM3, IC1, IRM e IP, porém não diferente estatisticamente. Confirmando a eficiência da inoculação com bactérias diazotróficas para a produção de mudas, tendo como propósito a obtenção de melhores padrões de qualidade, e por consequência melhor desenvolvimento destas no campo. Também para o *Inga* sp. (*Inga* canela), houve uma superioridade dos valores obtidos para este índice nos tratamentos com inoculação, isto quando se utilizou as estirpes: IRM2, IRM4, IC2 e IRM.

## 6. CONCLUSÕES

À partir da seleção de regenerantes de *Inga* spp. em campo, foi possível caracterizar a nodulação bem como obter estirpes a serem utilizadas como inoculantes em viveiro;

Com base na análise morfológica das estirpes foi possível realizar o seu agrupamento e verificar a diversidade de microrganismos diazotróficos que colonizam as raízes de *Inga* sp;

Não foi detectado efeito de especificidade das estirpes para com espécies, no que se refere ao desenvolvimento e estabelecimento das mudas quando inoculadas;

As mudas de *Inga* sp. (Inga canela) inoculadas com estirpe de IRM apresentaram os maiores valores médios em relação às mudas de *Inga edulis* nos parâmetros: altura, diâmetro de coleto e comprimento de raiz, e por consequência também nos pesos secos;

Os parâmetros de qualidade de mudas, tanto para *Inga edulis* (Inga rabo de macaco) quanto para *Inga* sp. (Inga canela) apresentaram resultados positivos em relação a testemunha quando inoculados com estirpes de bactérias diazotróficas, o que denota a eficiência do uso de inoculantes para a melhoria dos padrões de qualidade das mudas de *Inga* sp.;

A inoculação com bactérias diazotróficas possibilitaram melhores valores nos parâmetros de qualidade de mudas RHDC, RHPMSPA, RPMSPAR e IDQ's, conseqüentemente, para a produção de mudas mais resistentes e com maior capacidade de sobrevivência quando levadas a campo;

Considerando os parâmetros de qualidade das mudas, o *Inga edulis*, quando inoculados com estirpes de IC1, IF1 e IL apresentou melhor qualidade para adaptação em campo. Entretanto, em termos de produção de biomassa ou peso da matéria seca, as mudas de *Inga* sp. (Inga canela) quando inoculadas com estirpes de IRM, é a espécie mais recomendada para projetos de recuperação de área degradada, devido maior deposição de matéria orgânica, o que coopera para a melhoria das características do solo, o que contribui para acelerar o processo de recuperação de solos degradados.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACRE, Governo do Estado do Acre. **Programa Estadual de Zoneamento Ecológico-Econômico do Estado do Acre. Fase II, Escala 1:250.000.** Documento Síntese. SEMA, Rio Branco. p. 60, 2006.

ALLEN, O.N.; ALLEN, E. K. **The leguminosae: a source Book of characteristics, uses, and nodulation.** USA: The university of Winsconsin, 1981. 812p.

ARAÚJO FILHO, J. A.; CARVALHO, F. C. **Desenvolvimento sustentado da caatinga.** Sobral: EMBRAPA-CNPC, 1997. 19p. (EMBRAPA-CNPC. Circular Técnica, 13).

ARAÚJO, J. A. A. Avaliação de leguminosas arbóreas, para recuperação de solos e repovoamento em áreas degradadas, Quixeramobim-CE. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Vol.2 No.2. p.1592, 2007.

AZEVEDO, I. M. G. et al., Estudo do crescimento e qualidade de mudas de marupá (Simarouba amara Aubl.) em viveiro. **Acta Amazônia**. v. 40, p. 157-160, 2010.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.77, p.549-579, 2005

BARBERI, A.; CARNEIRO, M. A. C.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J.O. Nodulação em leguminosas florestais em viveiros no sul de Minas Gerais. **Revista Cerne**, v.4, n.1, p.145-153, 1998.

BENT, E.; TUZUN, CHANWAY, C.P.; ENEBAK, S. Alterations in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.47, p.793-800, 2001.

BLOEMBERG, G.V.; LUGTENBEG, B.J.J. Molecular basis of plant growth promotion e biocotrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biolgy**. V.4, p. 343-354, 2001.

BOWEN, G.D.; ROVIR, A. A. D. The rhizosphere e its management to improve plant growth. **Advances in Gagronomy**, v.66, p.1-102, 1999.

BRASIL. **Lei 9.985**, de 18 de julho de 2000. Institui o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza – SNUC, estabelece critérios e normas para a criação, implantação e gestão das unidades de conservação. Brasília, DF, 2000. Disponível em: <<http://www.fundoambientalmacae.rj.gov.br/adm/pdfs/SNUC.pdf>>. Acesso em: 20 de agosto de 2011.

BRASIL. **Decreto nº 97.839**, de 16 de junho de 1989. Cria o Parque Nacional da Serra do Divisor. Brasília, DF, 1989. Disponível em: <[http://www.acordoscarf.com.br/acordaos/3cc/1camara/acordaos/30131790\\_128773\\_11522000066200388\\_009.PDF](http://www.acordoscarf.com.br/acordaos/3cc/1camara/acordaos/30131790_128773_11522000066200388_009.PDF)>. Acesso em: 20 de agosto de 2011.

- BRANDON, K. et al., Conservação brasileira: desafios e oportunidades. **Megadiversidade**. V.1, n.1, p. 1-13, 2005.
- BRUNETTA, J. M. F. C. Avaliação da especificidade de rizobactérias isoladas de Diferentes espécies de *Pinus sp.* **Árvore**, Viçosa-MG, v.31, n.6, p.1027-1033, 2007.
- BURITY, H.A. *et.al.*; Efetividade da inoculação com rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares em mudas de sabiá submetidas a diferentes níveis de fósforo. **Pesq.agropec.**, Brasília, v.4, p.801-807, abr. 2000.
- CARNEIRO, J. G. A. **Produção e controle de qualidade de mudas florestais**. Curitiba: UFPR/FUPEF, 1995. 451p.
- DICKSON, A.; LEAF, A. L.; HOSNER, J. F. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. **Forestry Chronicle**, v. 36, p.10-13, 1960.
- DOBEREINER, J. Nodulação e fixação de nitrogênio em leguminosas florestais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.19, p.83-90, 1984. Edição Especial.
- DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHES, A. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, v.36, p.284-297, 2002
- DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**. V. 22, p. 107-149, 2003.
- WNWBAK, A. A. Rhizobacteria Isolated from loblolly pine seedlings meiate growth-promotion of greenhouse-grown loblolly, slash, and longleaf pine seedlings. **Forest Science**, v.51, n.6, p. 541-545, 2005.
- EMPRESA BRASIL DE COMUNICAÇÃO, EBC. 2011. Disponível em: <http://agenciabrasil.ebc.com.br/noticia/2011-06-16/em-dez-anos-governo-espera-que-sejam-recuperados-15-milhoes-de-hectares-em-areas-degradadas>. Acesso dia 14 de fevereiro, 2012.
- ESPINDOLA, J. A. A, et al. **Uso de leguminosas herbáceas para adubação verde: Agroecologia: Princípios e técnicas para uma agricultura orgânica sustentável**. Brasília, DF: Embrapa informação tecnologia, 2005. 517 p.
- EVANS, H.J.; BURRIS, R.H. Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J eds. *Biological Nitrogen Fixation*. New York: Chapman and Hall, 1992, p.1-42.
- FRED, E. B.; WAKSMAN, S. **Yeast extract-mannitol agar for laboratory manual of general microbiology** . New York: McGraw Hill, 1928. 145 p.

FARIA, S.M. de & FRANCO, A.A. **Identificação de bactérias eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies leguminosas arbóreas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 2002. 16 p. (Embrapa Agrobiologia Documentos, 158).

FARIA, S. M.; LIMA, H. C.; **Levantamento de nodulação em leguminosas arbóreas e arbustivas em áreas de influência da mineração Rio do Norte – Porto Trombetas/PA**. Seropédica -RJ, Dez. 2002.

FARIA, S. M. de. **Obtenção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação de nitrogênio para espécies florestais (aproximação 2000)**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia 2000,10 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 116), 2000.

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

FARIAS, S. M. de; LEWIS, G.P.; SPRENT, J.I. ; SUTHERLAND, J. M. Occurrence of nodulation in the Leguminosae. **New Phytologist**, Oxford, v. 111, p. 607-619; 1989.

FERNANDES, M.F., FERNANDES, R.P.M.; HUNGRIA, M. Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Vol.38, n.7. 2003.

FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S. (Eds). **Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: Agrolivros, 2008. 568p.

FRANCO, A. A.; CAMPELLO, E. F.; MONTEIRO, E. M. da S.; FARIA, S. M. **Revegetação de solos degradados**. Seropédica: EMBRAPA-CNPBS, 1992. 11p.(EMBRAPA-CNPBS. Comunicado Técnico, 9).

FRANCO, A. A.; CAMPELLO, E. F. C.; FARIA, S. M. de; DIAS, L. E. The Importance of biological nitrogen fixation on land rehabilitation. In: PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NEWTON, W. E., (Ed.). **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 569-570.

FRANCO, A.A.; DÖBEREINER, J. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopathológica**, São Paulo, v.20, n.1, p.68-74, 1994.

FRANCO, A. A.; FARIA, S. M. The contribution of N<sub>2</sub>-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5/6, p. 897- 903, 1997.

FRANCO, A.A.; RESENDE, A.S. de; CAMPELLO, E.F.C. **Importância das leguminosas arbóreas na recuperação de áreas degradadas e na sustentabilidade de sistemas agroflorestais**. In: **Sistemas Agroflorestais e Desenvolvimento Sustentável**, Mato Grosso do Sul, p.1-24, 2003.

FRANCO, M.S. M.; PRATES, M. (1977) Geomorfologia. In: BRASIL, Departamento Nacional da Produção Mineral. Projeto RADAMBRASIL. Folha SB/SC.18 Javari/Contmana. Rio de Janeiro (Levantamento de Recursos Naturais, Volume 13).

FREIRE, J. R. J. **Fixação do nitrogênio pela simbiose rizobio/leguminosas**. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. (eds.), Microbiologia do solo. Campinas: SBCS, 1992 p. 121-140.

GLIESSMAN, S. R. **Agroecology: ecological processes in sustainable agriculture**. Boca Raton: Lewis Publishers, 2000. 357 p.

GLICK, B.R., BASHAN, Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. **Biotechnology Advances**, v.15, n.02, p.353-378, 1997.

GRAY, E.J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology And Biochemistry**, v. 37, p. 395-412, 2005.

GOMES, J. M. **Parâmetros morfológicos na avaliação da qualidade de mudas de *Eucalyptus grandis*, produzidas em diferentes tamanhos de tubete e de dosagens de N-P-K**. 2001. 126f. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.

HANNA, A. C. S., et. al., Caracterização morfológica de nódulos radiculares fixadores de nitrogênio em espécies de fabaceae da Amazônia. XIX Jornada de Iniciação Científica PIBIC INPA - CNPq/FAPEAM. Manaus, 2010.

HERRERA, M. A.; SALAMANCA, C. P.; BAREA, J. M. Inoculation of woody legumes with selected arbuscularmycorrhizal fungi and rhizobia to recover desertified Mediterranean ecosystems. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 129-133, 1993.

HUNT, R. Basic growth analysis. London:Unwin Hyman, 1990. 112p

JÚNIOR, R. N. A.; ALMEIDA, R. T. A.; VASCONCELOS, V. Testes preliminares de inoculação cruzada em leguminosas arbóreas do Ceará. **Ciência Agrônômica.**, v. 17, n.2, p. 107-111, 1986.

KLOPPER, J. W. Host specificity in microbe-microbe interactions. **Bio Science**, v.46, n.6, p.406-409, 1996.

KOKALIS-BURELLE et al. Plant growth promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous microorganisms. **Applied Soil Ecology**. v. 31, p. 91-100, 2006.

LASSUS, C. de. Composição dos resíduos vegetais com um solo manejado com nove sistemas de culturas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 14, p. 375-380, 1990.

MAFIA, R. G. M. *et. al.*, Indução do enraizamento e crescimento do eucalipto por rizobactérias: efeito da adição de fonte alimentar e da composição do substrato de enraizamento. **R. Árvore**, Viçosa-MG , v.31, n.4, p.589-597, 2007.

MARTINS, L.M.V. et al. **Características Relativas ao Crescimento em Meio de Cultura e a Morfologia de Colônias de “Rizóbio”**. Rio de Janeiro, RJ: Embrapa Agrobiologia, CT/19, CNPAB, dez, 1997, p.1

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, MAPA. 2013. Disponível em:<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/convencao-da-diversidade-biologica>. Acesso dia 14 de fevereiro de 2013.

MONTAGNINI, E. M.; SANCHO, F. Impacts of native trees on tropical soils: a study in the Atlantic lowlands of Costa Rica. Central America. **Ambio**. v.19, p.386-390, 1990.

MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. 1º ed., Editora UFLA. 626p. 2002.

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

MOREIRA, F. M. S. et al., Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae** 1(2): 74-99, 2010.

MOREIRA, L. de L. F. F. de A. Produção de fosfatases, enzimaacc desaminase e antagonismo a fitopatógeno por rizobactérias. *Colloquium Agrariae*, v.7, p.94–99, 2011.

NASCIMENTO, J.T. et al. Effect of leguminous crops on the chemical characteristics and organic matter of a degraded soil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 7, n. 3, 2003.

NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., V. H.; BARROS, N. F. de; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. Editores. **Fertilidade do Solo**. Viçosa, MG; Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. 1017p.

NOGUEIRA, N.O. Utilização de leguminosas para recuperação de áreas degradadas. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.8, N.14; p. – 2012.

OLIVEIRA, E. de; COSTA, F. S.; ZUMBA Jr., F. P. & SILVA, E. P. **Mucuna-preta: estudo da nodulação espontânea na Amazônia Ocidental**. In: **XVII Reunião Brasileira de Manejo e Conservação de Solo e Água**. Rio de Janeiro, 2008.

OLIVEIRA, D. E. *et.al.*; Fungos micorrízicos arbusculares e rizóbio no crescimento inicial de *Acacia mangium* willd. Em solo de mineração da região sudoeste do estado de Goiás. **Gl. Sic. Technol.**, v. 03, n. 01, p.01 – 10, jan/abr. 2010.

PEREIRA, Julio César R. **Análise de Dados Qualitativos – Estratégias Mercadológicas para as Ciências da Saúde, Humanas e Sociais**. 3ª ed. – São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2001

POLHILL, R. M.; RAVEN P.H., STIRTON, C. H. **Evolution and systematics of the Leguminosae**. In; Advances in Legume Systematics, ed. Polhil L.M. e Raven, P.H. 1-26p. 1981.

RAVEN, P.; EVETR, R.R; EICHHORN,S.E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p.307-311.

REIS, A. R.; FURLANI JUNIOR, E.; BUZETTI, S.; ANDREOTTI, M. Diagnóstico da exigência do cafeeiro em nitrogênio pela utilização do medidor portátil de clorofila. **Bragantia**, Campinas, v. 65, n. 1, p. 163-171, 2006.

RESENDE, A. S., XAVIER, R. P., QUESADA, D. M., URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Use of Green manures in Increase inputs of Biological nitrogen fixation 24 to sugar cane. **Biology and Fertility of Soils**, v. 37, p. 215-220, 2003.

SANTOS, H. L. C. S. *et.al.*; Bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento de *Heliconia psittacorum* L.f. **Hoehnea** v.32, n.2, p. 1-8, 2, 2005.

SHISHIDO, M.; CHANW AY, C. P. Colonization and growth promotion of out planted spruce seedlings pre-inoculated with plant growth-promoting rhizobacteria in the greenhouse. **Canadian Journal of Forest Research**, v.30, p.845-854, 2000.

SILVA, F. DE A. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.4,n.1, p71-78,2002.

SILVA, M. F.; **As leguminosas da Amazônia Brasileira –Lista Prévia**. Acta Bot. Bras., pag 237. 1989.

SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. **Biotecnologia do solo: Fundamentos e perspectivas**. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE/ABEAS, 1988. 236p.

SOS AMAZÔNIA. **Plano de Manejo do Parque Nacional da Serra do Divisor (PNSD)**. Rio Branco: SOS Amazônia/ the nature conservancy/ USAID. 1998. 600 p.

SOTTERO, A. N. **Colonização Radicular e Promoção de Crescimento Vegetal por Rizobactérias**. Dissertação (Mestrado Agricultura Tropical e Subtropical). 2003. 62 f.. Campinas, São Paulo, 2003.

SOUZA, L. A.G., et. al., Capacidade de nodulação de cem espécies de leguminosas da Amazônia. **Acta Amazônica**, v. 24, p.9-18, 1994

Souza et al., Inoculação com rizóbios em mudas de acapu do igapó e saboarana / **Rev. Ciências Agrárias**, v.54, n.1, p.52-60, Jan/Abr 2011.

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

Weir BS (2006) The current taxonomy of rhizobia, New Zealand rhizobia website, <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>. html. Last update: 18th August, 2007.

WINCKLER .M. V, et al. Crescimento de Leguminosas Arbóreas em Respostas a Inoculação com Fungos Micorrízicos Arbusculares. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.7, n.1, p. 1-10, 1997.

URQUIAGA, S.; ZAPATA, F. 2000. **Manejo eficiente de la fertilización nitrogenada de cultivos anuales en América Latina y el Caribe**. Porto Alegre: Ed. Gênese. 110p. v. 29, p. 897-903, 1997.

WHIPPS, J. M. Developments in the biological control of soil-borne plant pathogens. **Advances in Botanical Research**, v.26, p.1-133, 1997.

WHIPPS, P. M. Microbial interaction e biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**. v.52, p. 487-511, 2001.

VINCENT, J. M. A Manual for the practical Study of Root Nodule Bacteria. Oxford: Blackwell, 1970. 164 p. (International Biological Programme, 15).