

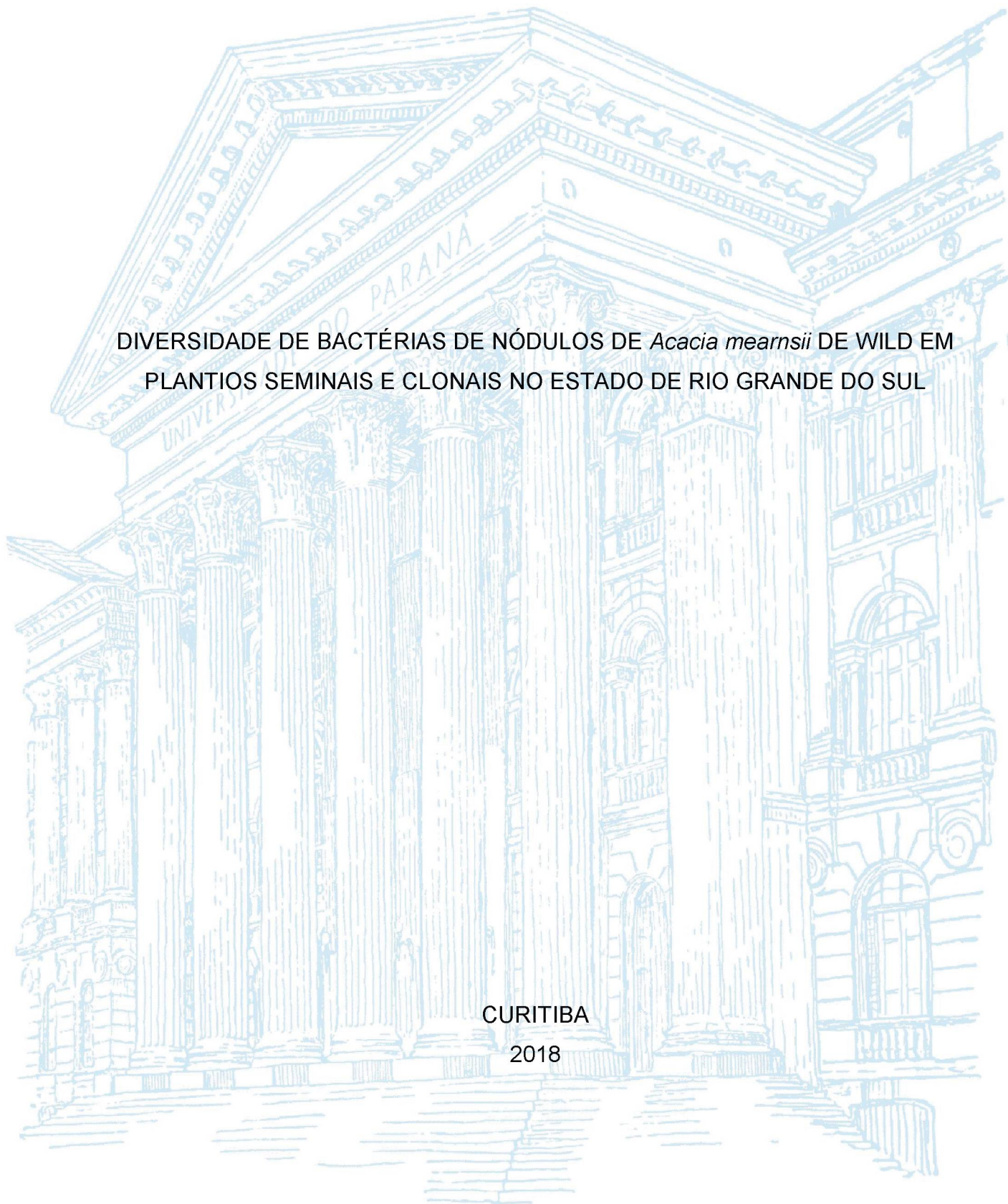
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PEDRO HENRIQUE RIBOLDI MONTEIRO

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DE NÓDULOS DE *Acacia mearnsii* DE WILD EM  
PLANTIOS SEMINAIS E CLONAIS NO ESTADO DE RIO GRANDE DO SUL

CURITIBA

2018



PEDRO HENRIQUE RIBOLDI MONTEIRO

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DE NÓDULOS DE *Acacia mearnsii* DE WILD EM  
PLANTIOS SEMINAIS E CLONAIIS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Florestal.

Orientador: Prof. Dr. Celso Garcia Auer  
Coorientadores: Profa. Dra. Glaciela Kaschuk  
Prof. Dr. Antonio Rioyei Higa

CURITIBA

2018

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Florestais e da Madeira - UFPR

Monteiro, Pedro Henrique Riboldi

Diversidade de bactérias de nódulos de *Acacia mearnsii* De Wild em  
plantios seminais e clonais no estado de Rio Grande do Sul / Pedro  
Henrique Riboldi Monteiro. – Curitiba, 2018.

128 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Celso Garcia Auer

Coorientadores: Profa. Dra. Glaciela Kaschuk

Prof. Dr. Antonio Rioyei Higa

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de  
Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia  
Florestal. Defesa: Curitiba, 24/09/2018.

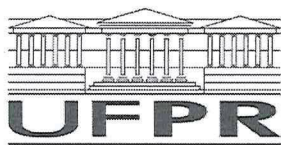
Área de concentração: Silvicultura.

1. Acácia – Rio Grande do Sul. 2. Microbiologia do solo. 3. Rizóbio. 4.  
Nitrogênio – Fixação. 5. Leguminosa – Inoculação. 6. Teses. I. Auer,  
Celso Garcia. II. Kaschuk, Glaciela. III. Higa, Antonio Rioyei. IV.  
Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias. V. Título.

CDD – 631.847

CDU – 634.0.114(816.5)

Bibliotecária: Berenice Rodrigues Ferreira – CRB 9/1160



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA  
FLORESTAL

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA FLORESTAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **PEDRO HENRIQUE RIBOLDI MONTEIRO** intitulada: **DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DE NÓDULOS DE *Acacia mearnsii* De Wild. EM PLANTIOS SEMINAIS E CLONAIS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 24 de Setembro de 2018.

GELSO GARCIA AUER

Presidente da Banca Examinadora

KRISLE DA SILVA  
Avaliador Externo

SANDRA REGINA CABEL  
Avaliador Externo

ALESSANDRO CAMARGO ANGELO  
Avaliador Interno

PAULA RACHEL RABELO CORREA BASILIO  
Avaliador Externo



À razão de minha vida meu filho, João Pedro  
Aos meus amados pais, Luciana e Moacyr  
Aos meus queridos avós, Odilla e Avelino  
Aos meus avós que estão sempre comigo Catarina e João Maria (*In memoriam*)  
Aos meus irmãos Eduardo, Paula e Vitor.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Ao desenvolver este trabalho durante os quatro anos e meio a palavra GRATIDÃO devo usar para diversas pessoas. Quero dizer de início que caso me esqueça de alguém que me PERDOE porque foram tantas pessoas importantes que colaboraram para o meu crescimento profissional, pessoal e espiritual, logo não gostaria de ser injusto com ninguém.

Primeiramente gratidão ao Pai Maior, por sempre me abençoar em todas as minhas conquistas, sejam nos momentos de felicidade e alegria ou de tristeza.

Gratidão pela força que Pai Ogum me dá no dia-a-dia para continuar a lutar e superar todos os obstáculos, porque desistir não é uma opção. A proteção e carinho da Mãe Oxum, que sempre está meu lado.

Espiritualmente ainda sou grato aos demais Orixás, aos guias que sempre estão comigo assim como meu anjo da guarda, pois minha fé e devoção a eles são os pilares que sustentam o equilíbrio em minha vida para que tudo seja.

Os mais sábios dizem que só sabem para onde vai quem sabe de onde vem, por isso, a GRATIDÃO se torna uma simples palavra que não basta para descrever o quanto valorizo a família que tenho.

Aos meus queridos avós Odilla Catarina Brandalise Riboldi e Avelino Riboldi, por sempre me tratarem não como um neto, mas sim um filho, com muita paciência, carinho e sempre depositando sua fé em me ajudar a chegar a este momento. Aos meus avós Catharina Vitória Kaminski e João Maria Alves Monteiro, que mesmo não estando presentes, estão certamente em espírito guiando e iluminando meus passos.

Aos meus pais Luciana Regina Riboldi Monteiro e Moacyr Monteiro, por todo apoio, carinho, amor, dedicação, paciência e compreensão, durante esses 4 anos e meio de caminhada, sempre cientes de que minha ausência foi necessária para conquistar mais um degrau na escadaria da evolução em sentido ao sol. Aos meus irmãos Eduardo Riboldi Monteiro, Paula Vitória Wachholz Monteiro e Vitor Gustavo Wachholz Monteiro que amo muito e que mesmo sentindo que falhei com vocês devido a minha falta como “irmão mais velho”, sei que sempre desejaram meu bem.

GRATIDÃO por colocar em meu caminho esse presente em forma de vida, minha benção que o Pai Maior me deu o meu filho João Pedro Bellon Riboldi Monteiro, que com sua doçura, encanto, educação e inocência alegra os meus dias mais tristes. Sua existência e parceria por conviver diariamente comigo, me dá força e garra, para que todos os dias eu levante e continue lutando, persistindo e conquistando os meus objetivos.

GRATIDÃO aos meus demais familiares, tios, primos, até os mais distantes, que sentiram falta com minha ausência em diversos momentos, sabem que sempre foram fonte de inspiração e força, demonstrando através do carinho, das palavras, da ajuda em todos os sentidos, sempre apoiando por saberem que estou seguindo no caminho certo.

GRATIDÃO especial a minha amiga, prima, irmã e madrinha Juliana Cristina Riboldi, que mesmo sabendo que não são necessárias palavras para descrever o quanto sou grato por sua presença em meu caminho, sempre esteve ao meu lado em todos os momentos de alegria e tristeza. Como você me ensinou “a verdade com amor, sempre é melhor” eu te digo que minha GRATIDÃO a você é pouca, porque você sempre me auxiliou no processo de evolução pessoal, profissional e espiritual. Sempre soube como lidar comigo da forma que precisava, por meio de palavras doces e queridas assim como palavras diretas e firmes que necessitavam ser ditas.

Aos meus amigos, não nomearei nenhum para não ser injusto caso esqueça de alguém nesse momento, mas que sempre apoiaram mesmo quando eu estive ausente da presença deles por causa do trabalho. Sempre colaboraram e me incentivaram para que continue minha jornada, torcendo para que eu conquiste mais essa etapa e compreendendo que tal trabalho foi realizado com a finalidade de crescer na vida acadêmica, profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Celso Garcia Auer, desde o início de minha jornada acadêmica me orientou, me ensinou que a vida não se resume ao trabalho, agindo muitas vezes não somente um orientador, mais sim como um amigo, um colega e repito as palavras que escrevi em meu mestrado “principalmente como um pai” (com a licença do meu dedico essas singelas palavras), nos ajudando a crescer na área profissional e por fim como ser literalmente uma pessoa melhor.

A Profa. Dra. Glaciela Kaschuk, pela amizade, coorientação, cobrança e ensinamento. Sou muito grato, pois sua colaboração e experiência na área foi importante para minha vida profissional.

Ao Prof. Dr. Antonio Rioyei Higa, pela amizade, coorientação, colaborando com seu conhecimento e visão de pesquisador e gestor, afim de enriquecer o desenvolvimento desta pesquisa.

À Ma. Etienne Winagraski, que com o tempo passou a barreira da amizade e se tornou uma irmã. Sempre colaborando em meu desenvolvimento profissional, em todos os trabalhos que desenvolvemos, no desenvolvimento pessoal com conselhos e força motivacional para continuar nessa nossa caminhada, por fim na vida espiritual, sempre se colocando à disposição para conversar e colaborando para o entendimento de todos os ensinamentos que devia tirar proveito frente as situações positivas ou negativas. Contigo aprendi muito e o desenvolvimento deste trabalho só foi possível a essa ajuda, a qual sempre pude contar, não tenho palavras para descrever tamanha minha GRATIDÃO a você minha irmã.

Aos Professores e Funcionários do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, da Universidade Federal do Paraná, em especial das linhas de Silvicultura e Tecnologia da Madeira, com quem tive prazer de aprender e receber um conhecimento tão rico para meu desenvolvimento profissional.

Aos Professores de Pós-Graduação em Ciências do Solo, da Universidade Federal do Paraná, em especial aos que sempre estavam colaborando para o crescimento pessoal e profissional, não posso deixar de citar a Profa. Dra. Fabiane Machado Vezzani, o Prof. Dr. Renato Marques, o Prof. Dr. Antonio Carlos Vargas Motta, o Prof. Dr. Volnei Pauletti. A GRATIDÃO a vocês é enorme por acolher um aluno de outro programa da forma que nos acolheram.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas, Davi Veiga, o qual sempre está animado e de pronto para ajudar e a Caroline Bühner por tamanha dedicação e empenho para manter o desenvolvimento das atividades.

À todos os funcionários do Departamento de Solos e Engenharia Agrícola da Universidade Federal do Paraná, minha gratidão pelo carinho, paciência e principalmente por nos acolher como se fossemos alunos do programa de Pós-graduação dos solos.

As técnicas de laboratório Heila Araújo e Letícia Gonçalves Maduro do Laboratório de Biologia do Solo; à Carla Gomes Albuquerque do Laboratório de Química e Fertilidade do Solo; à Fabiana Gavelaki do Laboratório de Biogeoquímica o Laboratório de Nutrição; à Maria Aparecida de Carvalho Santos do Laboratório de Mineralogia do Solo; à Josianne Meyer do Laboratório de Física do Solo, por sempre estarem disponíveis a ajudar e me ensinarem durante o processo de desenvolvimento deste trabalho, sou ainda grato as palavras de incentivo e carinho.

Às secretárias Denise De Conti e a Marla Cristina Becker Motta que sempre estavam disponíveis colaborando e incentivando meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos colegas e amigos da Pós-graduação em Ciências do Solo e graduação de Agronomia que sempre me auxiliaram de maneira direta ou indireta, através da amizade e com seus conselhos, esclarecimentos e ajuda sobre as situações do dia-a-dia. GRATIDÃO a todos vocês: Ma. Aline Fachin Martíni, Ma. Bruna Ramalho, Me. Bruno Tsujigushi; Ma. Caroline Amadori, Ma. Carolina Conrado, Ma. Carolina Benghi Pinto Me. Carlos Vilcatoma Medina, Me. Daniel Malheiros, Ma. Dione Aguiar, Dr. Hilbert Blum, Ma. Jéssica Cavalcante, Ma. Jessica Perreira, Ma. Liliane Maia, Ma. Mariana Alves Ibarra, Me. Raphael Antoine Anzalone, Ma. Regiane Salata, Me. Ricardo Ribeiro, Ma. Tatiana Lazeris, aos Eng. Agrônomo Kayo Kennedy Albernaz e Gustavo Valani, de graduação as estudantes Caroline Matos e Marilise Cristine Morona.

À colega Ma. Franquiéle Bonilha da Silva, por todo o auxílio a pesquisa além de sempre sem relutar fosse a hora que fosse colaborava com ensinamento e conselhos, por fim GRATIDÃO a sua amizade.

Ao pesquisador Dr. Sergio Miana de Faria por disponibilizar as cepas indicadas a cultura.

À empresa Tanac S. A. que colaborou para o desenvolvimento deste trabalho através de apoio financeiro e logístico para obter o sucesso projeto.

À Embrapa Florestas, pelo suporte para desenvolvimento do meu projeto.

À CAPES, pela concessão da bolsa.

GRATIDÃO!

**“Força, Foco, Fé e DETERMINAÇÃO”.**  
**(Seu Curumataí)**

## BIOGRAFIA

**Pedro Henrique Riboldi Monteiro** nasceu em Curitiba - PR, em 31 de março de 1988. De uma família de médicos veterinários, estudou na cidade de Irati-PR e com 22 anos obteve o título de Engenheiro Florestal pela Universidade Estadual do Centro Oeste (UNICENTRO). Obteve o título de Mestre em Engenharia Florestal pela Universidade Federal do Paraná em 2013, desenvolvendo pesquisas na área da Microbiologia Florestal, com uso de biotecnologias à base de bactérias promotoras do crescimento de plantas e ectomicorrizas, aplicadas ao sistema produtivo de mudas de *Eucalyptus benthamii*, *E. dunnii* e *Pinus taeda*. Em março de 2014, ingressou como doutorando na mesma instituição sobre a proposta de trabalhar com bactérias isoladas dos nódulos de *Acacia mearnsii* provenientes de indivíduos que compõem dois testes combinados de procedência e progênes que fazem parte do programa de melhoramento genético da empresa TANAC S. A. A finalidade do projeto é indicar microrganismos com capacidade de melhorar o sistema produtivo resultando em maior volume e maior sustentabilidade.

## RESUMO

A *Acacia mearnsii* De Wild (acácia negra) é uma leguminosa exótica, cultivada com a finalidade de produção de tanino, entretanto é empregada em múltiplos usos. Outro fator que a torna importante é a capacidade de realizar a simbiose com os rizóbios, os quais são responsáveis pelo processo de fixação biológica de nitrogênio. O presente trabalho abordou aspectos relacionados com os sistemas produtivos com acácia negra e a fixação biológica de nitrogênio, bem como determinou a diversidade de bactérias isoladas de nódulos coletados das raízes de plantios seminais e clonais de acácia negra. Um dos desafios do trabalho foi utilizar a microbiologia como uma ferramenta de auxílio para buscar informações sobre o aumento produtivo com sustentabilidade. Independente do sistema de produção de acácia negra, a FBN promove incrementos do nitrogênio no ecossistema e todos os componentes em sistemas de integração apresentaram maiores produtividades do que quando em monocultivo. Para o estudo da diversidade, foram coletados nódulos de indivíduos de três clones (clone 1, 2 e 3) além de duas procedências de semente a APS Geada e APS Camboatá que compõem os testes de procedência e progênies implantados nos municípios de Cristal e Jaguarão – RS. As informações sobre diversidade de espécies bacterianas foram obtidas através das características morfofisiológicas. Como o processo de caracterização fisiológica das culturas foi prejudicado pela alta taxa de contaminação fúngica nas placas, foi necessário criar um protocolo específico para o controle dos fungos e visualização da formação de halos durante o processo de solubilização de fosfato. Os isolados que foram caracterizados com base na morfofisiologia e na capacidade de produzir metabólitos secundários serviram como base para a criação de agrupamentos, por análise multivariada, demonstrando a existência de diversidade de bactérias entre materiais genéticos e locais de coleta. Os testes de autenticação em feijão (*Phaseolus vulgaris*) L. comprovaram que dentro dos grupos de isolados existiam rizóbios.

Palavras chave: rizóbios. fixação biológica de nitrogênio. acácia negra.

## ABSTRACT

*Acacia mearnsii* De Wild (black wattle) is an exotic legume grown for the purpose of tannin production, however it is used in multiple uses. Another factor that makes it important is the ability to symbiosis with rhizobia, which are responsible for the biological nitrogen fixation process. The present work addressed aspects related to black wattle production systems and biological nitrogen fixation, as well as determined the diversity of bacteria isolated from nodules collected from the roots of black wattle seminal and clonal plantings. One of the challenges of the work was to use microbiology as an aid tool to seek information on sustainable productive increase. Regardless of the black wattle production system, FBN promotes nitrogen increases in the ecosystem and all components in integration systems showed higher yields than when in monoculture. For the study of diversity, nodules from individuals of three clones (clone 1, 2 and 3) were collected, as well as two seed origins from APS Geada and APS Camboata that make up the provenance and progeny tests implanted in the municipalities of Cristal and Jaguarão - RS. Information on diversity of bacterial species was obtained through morphophysiological characteristics. As the physiological characterization process of the cultures was hindered by the high rate of fungal contamination in the plates, it was necessary to create a specific protocol for fungal control and visualization of halo formation during the phosphate solubilization process. Isolates that were characterized based on morphophysiology and ability to produce secondary metabolites served as the basis for clustering by multivariate analysis, demonstrating the existence of bacterial diversity between genetic materials and collection sites. Authentication tests on beans (*Phaseolus vulgaris*) L. proved that rhizobia existed within the isolate groups.

Keywords: rhizobia. biological nitrogen fixation. black acacia.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPITULO 2

FIGURA 1 - ESCALA VISUAL DO GRAU DE CONTAMINAÇÃO FÚNGICA EM MEIO DE CULTURA .....	65
FIGURA 2 - A) FREQUÊNCIA FÚNGICA; B) GRAU DE CONTAMINAÇÃO NAS DIFERENTES APLICAÇÕES DE CICLOHEXIMIDA NO MEIO DE CULTURA DE SYLVESTER-BRADLEY ET AL. (1982) .....	67
FIGURA 3 - A) FREQUÊNCIA FÚNGICA; B) GRAU DE CONTAMINAÇÃO NAS DIFERENTES APLICAÇÕES DE CICLOHEXIMIDA NO MEIO DE CULTURA DE VERMA ET AL. (2001) .....	68

### CAPITULO 3

FIGURA 1 – MAPA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL COM DELIMITAÇÃO DAS ÁREAS DE COLETA NOS MUNICÍPIOS DE CRISTAL E JAGUARÃO – RS .....	82
FIGURA 2 – FORMA E DIMENSÃO DOS NÓDULOS COLETADOS DE RAÍZES <i>Acacia mearnsii</i> .....	84
FIGURA 3 – ALTERAÇÃO DE COLORAÇÃO DO MEIO DE CULTURA YMA COM A PRESENÇA DO AZUL BROMOTIMOL INOCULADAS COM BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE <i>Acacia mearnsii</i> DE WILD .....	96
FIGURA 4 – SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO COM FORMAÇÃO DE HALO PELO MÉTODO DE VERMA ET AL. (2001) ADAPTADO .....	97
FIGURA 5 - TESTE DE AUTENTICAÇÃO EM FEIJÃO ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) SEGUNDO MÉTODO DE ANDRADE E HAMAKAWA (1994), EM CASA DE VEGETAÇÃO. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, CURITIBA-PR .....	99
GRÁFICO 1 - AGRUPAMENTO DE ISOLADOS BACTERIANOS DO NÓDULO DE <i>Acacia mearnsii</i> DE WILD SUBMETIDOS A UMA ANÁLISE MULTIVARIADA POR DISTÂNCIA EUCLIDIANA SOBRE OS PARÂMETROS MORFOFISIOLÓGICOS: TIPO DE GRAM, MUDANÇA DE PH, TAXA DE CRESCIMENTO, PRODUÇÃO DE EPS, ABSORÇÃO DE VERMELHO CONGO E SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO .....	101

GRÁFICO 2 – AGRUPAMENTO DOS ISOLADOS OBTIDOS DO NÓDULO DE <i>Acacia mearnsii</i> DE WILD, DO CLONE 1, PARA JAGUARÃO/RS E CRISTAL/RS, SUBMETIDOS A UMA ANÁLISE MULTIVARIADA POR DISTÂNCIA EUCLIDIANA SOBRE OS PARÂMETROS MORFOFISIOLÓGICOS .....	102
GRÁFICO 3 - GRUPAMENTO DOS ISOLADOS OBTIDOS DO NÓDULO DE <i>Acacia mearnsii</i> DE WILD, DO CLONE 2, PARA OS LOCAIS DE JAGUARÃO/RS E CRISTAL/RS, SUBMETIDOS A UMA ANÁLISE MULTIVARIADA POR DISTÂNCIA EUCLIDIANA SOBRE OS PARÂMETROS MORFOFISIOLÓGICOS .....	102
GRÁFICO 4 - AGRUPAMENTO DOS ISOLADOS OBTIDOS DO NÓDULO DE <i>Acacia mearnsii</i> DE WILD, DO CLONE 3, PARA OS LOCAIS DE JAGUARÃO E CRISTAL, SUBMETIDOS A UMA ANÁLISE MULTIVARIADA POR DISTÂNCIA EUCLIDIANA SOBRE OS PARÂMETROS MORFOFISIOLÓGICOS .....	103
GRÁFICO 5 - AGRUPAMENTO DOS ISOLADOS OBTIDOS DO NÓDULO DE <i>Acacia mearnsii</i> DE WILD, DO MATERIAL SEMINAL APS CAMBOATÁ, PARA OS LOCAIS DE JAGUARÃO E CRISTAL, SUBMETIDOS A UMA ANÁLISE MULTIVARIADA POR DISTÂNCIA EUCLIDIANA SOBRE OS PARÂMETROS MORFOFISIOLÓGICOS .....	103
GRÁFICO 6 - AGRUPAMENTO DOS ISOLADOS OBTIDOS DO NÓDULO DE <i>Acacia mearnsii</i> DE WILD, DO MATERIAL SEMINAL APS GEADA, PARA OS LOCAIS DE JAGUARÃO E CRISTAL, SUBMETIDOS A UMA ANÁLISE MULTIVARIADA POR DISTÂNCIA EUCLIDIANA SOBRE OS PARÂMETROS MORFOFISIOLÓGICOS .....	104

## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO 1

TABELA 1 - VANTAGENS E DESVANTAGENS DA ACÁCIA NEGRA EM MONOCULTURAS, PLANTIOS MISTOS E SISTEMAS AGROFLORESTAIS . 29

TABELA 2 - PRODUTIVIDADE DA *ACACIA MEARNsii* E VALORES DE FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO ..... 41

TABELA 3 - FORÇAS, FRAQUEZAS, AMEAÇAS E OPORTUNIDADES EM RELAÇÃO À FIXAÇÃO DE N<sub>2</sub> A PARTIR DA APLICAÇÃO DE RIZÓBIOS EM SISTEMAS PRODUTIVOS ..... 43

### CAPITULO 2

TABELA 1 - ANÁLISE ESTATÍSTICA SOBRE O ÍNDICE DE SOLUBILIZAÇÃO MÉDIO (ISM) SOBRE A INTERAÇÃO E A INDIVIDUALIDADE DOS MEIOS DE CULTURA DE SYLVESTER-BRADLEY ET AL. (1982) (SB) E VERMA ET AL. (2001) (V) PARA OS FATORES ISOLADO, TEMPO DE CULTIVO, DOSE E MÉTODO E AS INTERAÇÕES ENTRE OS FATORES ..... 71

### CAPITULO 3

TABELA 1 - NÚMERO DE NÓDULOS, PESO DE NÓDULOS E MORFOLOGIA DE NÓDULOS COLETADOS NOS TESTES DE PROCEDÊNCIA E PROGÊNIES DE *Acacia mearnsii*, EM NOVEMBRO DE 2014, NOS MUNICÍPIOS DE CRISTAL E JAGUARÃO – RS ..... 86

TABELA 2 - NÚMERO DE NÓDULOS, PESO DE NÓDULOS E MORFOLOGIA DE NÓDULOS COLETADOS NOS TESTES DE PROCEDÊNCIA E PROGÊNIES DE *Acacia mearnsii*, EM FEVEREIRO DE 2015, NOS MUNICÍPIOS DE CRISTAL E JAGUARÃO – RS ..... 88

TABELA 3 - VALOR RELATIVO AS CARACTERÍSTICAS CULTURAIS E MORFOLÓGICAS DOS ISOLADOS BACTERIANOS DOS ISOLADOS DE <i>Acacia mearnsii</i> .....	93
TABELA 4 – CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DE ISOLADOS BACTERIANOS DO NÓDULO DE <i>Acacia mearnsii</i> .....	96

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

### LISTA DE ABREVIATURAS

- $\text{Al}^{+3}$  – Alumínio na forma aniônica
- $\text{Ca}^{+2}$  – Cálcio na forma aniônica
- $\text{CaCl}_2$  – Cloreto de Cálcio
- $\text{CaHPO}_4$  – Fosfato Bicálcico
- $\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$  – Sulfato de Cobre penta hidratado
- C/N – Relação Carbono e Nitrogênio
- Dcolônia – Diâmetro da colônia (mm)
- DMcolônia – Diâmetro médio da colônia (mm)
- DMhalo – Diâmetro médio do halo (mm)
- $\text{Fe}^{+3}$  – Ferro na forma aniônica
- Fe-EDTA – Íon Ferro com ácido etilenodiamino tetra-acético
- $\text{FeCl}_3$  – Cloreto Férrico
- $\text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$  – Sulfato Ferroso hepta hidratado
- $\text{H}_3\text{BO}_3$  – Ácido Bórico
- $\text{H}_2\text{SO}_4$  – Ácido Sulfúrico
- ha – Hectare
- K - Potássio
- Kg – Quilograma
- $\text{KNO}_3$  – Nitrato de Potássio
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – Fosfato Dipotássio
- L - Litro
- N – Nitrogênio
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4.2\text{H}_2\text{O}$  – Molibdato de sódio di hidratado
- $\text{N}_2$  – Diazoto, Dinitrogênio ou Nitrogênio gasoso
- $\text{NH}_3$  – Amônia ou Gás Amoníaco
- $\text{NH}_4\text{Cl}$  – Cloreto de Amônio
- $^{15}\text{N}$  – Isótopo de  $^{15}\text{N}$
- nm – Nanômetros
- $\text{m}^3$  – Metro cúbico
- $\mu\text{L}$  – Microlitro

mg – Miligrama  
Mg – Magnésio  
Mg<sup>+2</sup> – Magnésio na forma aniônica  
MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – Sulfato de magnésio hepta hidratado  
mL – Mililitro  
mm – Milímetros  
MnSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O – Sulfato de manganês di hidratado  
P – Fósforo  
pH – Potencial hidrogeniônico  
rpm – rotações por minuto  
ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – Sulfato de Zinco hepta hidratado  
% – Percentagem  
° C – Graus Celsius

### **LISTA DE SIGLAS**

ABRAF – Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas  
AGEFLOR – Associação Gaúcha de Empresas Florestais  
APS – Área de Produção de Sementes  
BOD – Câmara de crescimento - Demanda Bioquímica de Oxigênio  
CNPQ – Centro Nacional de Pesquisa Florestal  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
EPS – Polissacarídeos extracelulares  
FBN – Fixação Biológica de Nitrogênio  
IBA – Indústria Brasileira de Árvores  
ISM – Índice de Solubilização Médio  
PAST – Paleontological Statistic  
rRNA – Ácido ribonucleico ribossômico  
SB – Sylvester-Bradley  
SEMIA –Seção de Microbiologia Agrícola – a nomenclatura representa uma estirpe bacteriana pertencente da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (Fepagro)  
SETA – Sociedade Extrativa Tanino de Acácia

SIMEPAR – Sistema Meteorológico do Paraná

SWOT – Strengths (Forças), Weaknesses (Fraquezas), Opportunities (Oportunidades), Threats (Ameaças)

TPP – Teste combinado de Procedência e Progênie

V – Verma

YMA – Yest Mannitol Agar (Extrato de levedura, manitol e agar)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	23
<b>CAPÍTULO 1 - INOCULAÇÃO DE RIZÓBIOS EM ACÁCIA NEGRA (<i>Acacia mearnsii</i> De Wild.) COM ÊNFASE EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO NO SUL DO BRASIL – UMA REVISÃO</b> .....	24
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	26
<b>2. SISTEMAS DE PRODUÇÃO COM <i>Acacia mearnsii</i> NO BRASIL</b> .....	28
2.1. Monocultura.....	30
2.2. Plantio Misto.....	31
2.3. Sistemas Agrossilvipastoris.....	34
<b>3. DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS NO GÊNERO ACACIA</b> .....	37
<b>4. PONTOS FORTES, FRAQUEZAS, AMEAÇAS E OPORTUNIDADES EM RELAÇÃO À FIXAÇÃO DE N<sub>2</sub></b> .....	41
4.1. Se a inoculação com rizóbios boa para a silvicultura, por que não é realizada?.....	43
4.1.1. Promiscuidade de leguminosas, eficácia de nódulos e competitividade de rizóbios.....	43
4.1.2. Meios eficientes para produção e uso de inoculantes comerciais.....	45
4.1.3. Microbiologia Florestal.....	46
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	47
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	48
<b>CAPÍTULO 2 - PROTOCOLO PARA CRESCIMENTO DE ISOLADOS BACTERIANOS DE NÓDULOS DE <i>Acacia mearnsii</i> DE WILD E EFICIÊNCIA NA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO</b> .....	61
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	63
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	64
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	67
3.1. Ensaio 1 .....	67
3.2. Ensaio 2 .....	69
<b>4. PROTOCOLOS E SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO</b> .....	70
4.1. Ensaios 1 e 2 .....	70

<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>73</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>74</b>
<b>CAPÍTULO 3 - DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE <i>Acacia mearnsii</i> DE WILD.</b> .....	<b>76</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>77</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>82</b>
2.1. Área Experimental e Coleta de Nódulos.....	82
2.2. Classificação do Nódulo, Isolamento, Purificação e Cultivo .....	84
2.3. Caracterização Morfológica e de Promoção de Crescimento.....	90
2.4. Caracterização da Atividade de Promoção do Crescimento .....	91
2.5. Análise e Agrupamento dos Isolados .....	92
2.6. Teste de Autenticação.....	93
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>94</b>
3.1. Classificação dos Nódulos .....	94
3.2. Caracterização Morfofisiológica .....	95
3.3. Teste de Autenticação.....	100
3.4. Análise e Agrupamento dos Isolados .....	100
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	<b>106</b>
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>106</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>112</b>
<b>REFERÊNCIAS GERAIS</b> .....	<b>113</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As florestas plantadas com *Acacia mearnsii* De Wild (acácia negra) no Brasil compreendem a quarta maior área produtiva em extensão, quando comparadas às espécies florestais (IBÁ, 2018). A espécie foi introduzida no país com a finalidade da produção de tanino, porém apresenta múltiplos usos, sendo que cada compartimento da planta possui uma finalidade: da casca é extraído o tanino, matérias primas para a curtição de couro além da confecção de adesivos, resinas, quelatos e conservantes (SIMON, 2005; RACHWAL et al., 2008; CHAN et al., 2015). A madeira serve como fonte de fibras (celulose), madeira sólida, pellets de madeira e carvão (SANTOS et al., 2001; CHAN et al., 2015).

A acácia negra é uma espécie leguminosa nativa da Austrália, porém está presente em todos os continentes. O cultivo da acácia movimenta 45 milhões de dólares por ano, o que garante o lucro das empresas e a subsistência de cerca de 40 mil famílias de pequenos e médios produtores no Estado do Rio Grande do Sul. Geralmente são produtores que participam de programas de fomento tornando-se parceiros das empresas garantindo por meio de contrato a venda da produção (AGEFLOR, 2018a).

A consolidação da espécie como cultura ocorreu devido a adaptação edafoclimática e ao avanço dos programas de melhoramento genético desenvolvidos nas empresas produtoras em parceria com empresas de pesquisas e universidades. O desenvolvimento técnico-científico no campo da silvicultura propiciou o aumento produtivo de florestas, a fim de atender à crescente demanda do mercado interno e externo por matérias primas. A produtividade de mudas seminais selecionadas e mudas clonais permitiu o aumento do incremento médio anual, com variação de 13 a 26 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> com ciclo de produção que pode variar de 6 a 8 anos (CHAN et al., 2015). Esses valores, são curtos quando comparados com tempo de cultivo de 10 a 12 anos na África do Sul e produtividades variáveis de 5 a 19 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> (CHAN et al., 2015). Porém quando comparada às outras espécies florestais já consolidadas no mercado nacional, como *Eucalyptus spp.* e *Pinus spp.*, os ciclos são curtos mas com menor produtividade.

Com ciclos de produção curto, os monocultivos tendem a exaurir os recursos naturais do solo, logo o solo tende a reduzir a quantidade de nutrientes tornando-se um fator limitante a produtividade. A sustentabilidade do solo é uma necessidade para dar continuidade ao processo de produção, tornando o meio ambiente mais equilibrado, reduzindo perdas energéticas e de nutrientes.

A nutrição mineral de plantas garante o aumento da produtividade dos sistemas agrícolas e florestais. No entanto, o uso de fertilizantes industriais geralmente aplicado em quantidades superiores às utilizadas pelas plantas, causa excesso de nutrientes que são desperdiçados afetando todo o ecossistema.

Por ser uma espécie florestal da família das Leguminosas, apresenta a capacidade de realizar a simbiose com bactérias diazotróficas também conhecidas como rizóbios e a consequência dessa relação é o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN). Além de realizar este processo, alguns rizóbios apresentam a capacidade de promover o crescimento de plantas devido a mecanismos de metabolismo secundário que conseguem solubilizar fosfato e produzir fitormônios como o ácido indol acético (AIA), sendo, portanto, consideradas bactérias promotoras do crescimento das plantas.

A microbiologia do solo tem sido utilizada como ferramenta auxiliar para melhorar a qualidade do solo, para as plantas e reduzir a agressão contra o meio ambiente. A técnica da inoculação de plantas leguminosas resulta no processo da FBN que é mais uma via de inserção do nitrogênio na ciclagem deste nutriente, aumentando a disponibilidade do elemento no solo e para a planta resultando em maior produtividade e reduzindo a quantidade de insumos no sistema de produção.

O estudo da diversidade de bactérias isoladas de nódulos de espécies leguminosas arbóreas tem por finalidade determinar estirpes eficientes na infecção, ou seja, a colonização das raízes e consequentemente no processo de FBN. A partir das estirpes eficientes pode-se desenvolver inoculantes específicos para aumentar a produtividade de mudas florestais e garantir melhor desenvolvimento em viveiro e posteriormente nas fases iniciais de estabelecimento no campo.

Como a acacicultura é consolidada no Rio Grande do Sul há uma necessidade de gerar informações sobre a diversidade de bactérias em especial

os rizóbios. Por isso, o presente trabalho avaliou a diversidade de isolados bacterianos obtidos de nódulos da acácia negra com base na caracterização morfofisiológica, na capacidade de solubilizar o fosfato e na produção de fitormônios.

## 2. OBJETIVOS

1. Descrever os sistemas de produção com a acácia negra e elencar seus pontos fortes e fracos quanto a FBN, a fim de estabelecer estratégias que permitam altas produtividades da cultura e menor impacto ambiental da atividade florestal.
2. Aperfeiçoar a metodologia para avaliação da solubilização de fosfato por bactérias isoladas de nódulo de *Acacia mearnsii* e determinar qual a dosagem mais adequada da cicloheximida para o controle de fungos contaminantes.
3. Determinar a diversidade de rizóbios isolados de nódulos de clones *Acacia mearnsii*, por meio de ensaios morfofisiológicos.
4. Determinar a capacidade dos isolados bacteriano na indução da simbiose em teste de autenticação com leguminosas.

## CAPÍTULO 1 - INOCULAÇÃO DE RIZÓBIOS EM ACÁCIA NEGRA (*Acacia mearnsii* De Wild.) COM ÊNFASE EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO NO SUL DO BRASIL – UMA REVISÃO

### RESUMO

A acácia negra (*Acacia mearnsii* De Wild.) é uma espécie leguminosa nativa do sudeste da Austrália, mas presente em todos os continentes. No Brasil, abrange cerca de 142.400 ha, com plantações concentradas na região Sul do país. A acácia negra pode formar nódulos e estabelecer uma simbiose com rizóbios, com capacidade de fixar o N<sub>2</sub>, mas a inoculação com rizóbios não é feita em plantios comerciais. São aplicados durante o plantio das mudas no campo até 40 kg ha<sup>-1</sup> de ureia. Nesta revisão, abordaram-se as evidências de que a inoculação com rizóbios afeta a monocultura, os sistemas de cultivo misto e com produção agroflorestal com a presença da acácia negra. Mensurações realizadas em florestas cultivadas indicaram que a fixação biológica de nitrogênio (FBN) na acácia negra pode fornecer até 200 kg de N ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> ao solo. Portanto, a inoculação com rizóbio pode trazer diversas oportunidades para melhorar os sistemas de produção de acácia negra. A acácia negra não é uma espécie muito seletiva para realizar a simbiose com rizóbios, mas o gênero *Bradyrhizobium* domina a diversidade em nódulos de acácia negra. A investigação sobre a diversidade de rizóbios em solos onde a cultura é cultivada pode representar uma oportunidade para encontrar cepas de rizóbios mais eficazes para uso como inoculantes. A história de sucesso da FBN em vegetais de grãos e das hortaliças devem inspirar a microbiologia aplicada à silvicultura, a qual deve superar os desafios da falta de profissionais capacitados e o desenvolvimento de novas tecnologias de aplicação.

**Palavras - chave:** sistemas agroflorestais, fixação biológica de nitrogênio, *Bradyrhizobium japonicum*; ciclagem de nutrientes, inoculante de rizóbio

## INOCULATION OF RHIZOBIA IN BLACK WATTLE (*Acacia mearnsii* De Wild.) WITH EMPHASIS ON PRODUCTION SYSTEMS IN SOUTHERN BRAZIL

### ABSTRACT

Black wattle (*Acacia mearnsii* De Wild) is a leguminous species native to southeastern Australia but present on all continents. In Brazil, it covers about 142,400 ha, with plantations concentrated in the southern region of the country. Black wattle can form nodules and establish a symbiosis with rhizobia, capable of fixing N<sub>2</sub>, but inoculation with rhizobia is not done in commercial crops. Up to 40 kg ha<sup>-1</sup> of urea is applied during field planting of seedlings. In this review, we addressed the evidence that rhizobial inoculation affects monoculture, mixed cultivation systems and agrosilvicultural production with the presence of black wattle. Measurements performed on cultivated forests indicated that biological nitrogen fixation (BNF) in black wattle can provide up to 200 kg N ha<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup> to the soil. Therefore, rhizobium inoculation may bring several opportunities to improve black wattle production systems. Black wattle is not a very selective species for symbiosis with rhizobia, but the *Bradyrhizobium* genus dominates diversity in black wattle nodules. Research into rhizobia diversity in soils where the crop is grown may present an opportunity to find more effective rhizobia strains for use as inoculants. FBN's success story in grain and vegetable crops should inspire applied microbiology in forestry, which must overcome the challenges of a lack of skilled professionals and the development of new application technologies.

**Key words:** agroforest systems; biological nitrogen fixation; *Bradyrhizobium japonicum*; nutrient cycling; rhizobia inoculant

## 1. INTRODUÇÃO

*Acacia mearnsii* De Wild, denominada popularmente como acácia negra é uma espécie leguminosa nativa da Austrália, mas que se encontra presente em todos os continentes. É a quarta espécie arbórea mais plantada no Brasil (IBA, 2017), com o primeiro plantio relatado no início do século XX para a produção de tanino, subproduto este utilizado na indústria do couro. Em 2016, o Brasil produziu 230 mil toneladas de casca de acácia negra para extração de tanino e recebeu cerca de 49,6 milhões de dólares derivados da exportação para a Índia, México e China (AGEFLOR, 2018a). A produção florestal comercial de acácia negra no Brasil começou com a importação de 30 kg de sementes provenientes da África do Sul destinadas à região Sul do Brasil (estado do Rio Grande do Sul) por meio da empresa SETA (OLIVEIRA, 1968). Em 2017, a produção das florestas de acácia negra que cobrem 142.400 hectares, é administrada principalmente por duas empresas: SETA e TANAC S. A. (AGEFLOR, 2018a). No entanto, essa área pode ser muito maior, uma vez que o cultivo da espécie por pequenos produtores não é mensurado com precisão (AGEFLOR, 2018b).

Esta espécie que é cultivada em grandes áreas sob o sistema de monocultura em que a produção é voltada a demanda da empresa. Pode também servir como fonte de renda na agricultura familiar, que em 1980 chegou a sustentar 4.400 famílias de pequenos agricultores familiares, os quais sobreviviam da renda proveniente do cultivo desta espécie e que em 2015 contabilizou cerca de 35.000 famílias que dependiam desta fonte de renda (FLEIG et al., 1993; AGEFLOR, 2018b). A produção de acácia negra em pequenas propriedades rurais é em grande parte, possível pela integração de objetivos entre os pequenos agricultores e da indústria de extração de taninos. Em geral, a integração é boa para todos os envolvidos. De um lado, a indústria recebe um fluxo constante de matéria-prima e pode controlar melhor a qualidade dela. Por outro lado, o pequeno agricultor é assegurado com trabalho e renda. Por essas razões, o manejo da produção de acácia negra tem sido considerado o fator determinante para a sustentabilidade dos agroecossistemas locais no sul do Brasil, desempenhando papéis na redução do êxodo rural e nas taxas de erosão do solo (FORRESTER et al., 2006c).

Na África do Sul, a acácia negra colocou em risco a biodiversidade das reservas naturais porque, apesar de ser uma cultura importante, tornou-se uma agressiva espécie invasora. No Brasil, a acácia negra (cultivada principalmente no estado do Rio Grande do Sul) tem sido encontrada em ecossistemas nativos degradados e áreas marginais (MOCHIUTTI et al., 2007) nos estados de Santa Catarina, Paraná, Rio de Janeiro e Paraíba (aproximadamente 3.900 km distante), mas não afetou o funcionamento dos ecossistemas (ATTIA et al., 2013).

Embora a acácia negra tenha sido introduzida no Brasil para produzir tanino, tem sido cultivada e empregada em múltiplos usos. A casca de acácia negra é matéria-prima para curtimento de couro, adesivos, resinas, quelatos e conservantes (SIMON, 2005; RACHWAL et al., 2008; CHAN et al., 2015). A madeira é fonte de fibras (celulose), madeira sólida, pellets de madeira e carvão (SANTOS et al., 2001; CHAN et al., 2015). Além disso, após a colheita, resíduos de raízes e partes aéreas adicionam C, N e outros nutrientes ao solo, que através do processo de decomposição orgânica, melhoram o ciclo de nutrientes e a fertilidade do solo (LI et al., 2001; FORRESTER et al., 2006c).

Por se uma planta leguminosa, a acácia negra podem estabelecer uma associação simbiótica com bactérias diazotróficas, comumente conhecidas como rizóbios. Os rizóbios compreendem vários gêneros de bactérias que induzem a formação de nódulos em leguminosas e reduzem o  $N_2$  em  $NH_3$  em troca de fotossintato de plantas, por possuírem e expressarem os genes *nod* e *nif*, respectivamente. A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo que permite que o nitrogênio (N) entre no sistema, de modo que o N fica na forma disponível no solo, beneficiando plantas, animais e biomassa microbiana do solo (OLDROYD et al., 2011). De fato, a simbiose entre leguminosas e rizóbios é responsável por cerca de 20-25% da taxa de entrada do N no ciclo de um ecossistema (GRUBER e GALLOWAY, 2008). Mesmo longe do ecossistema original, a acácia negra pode formar nódulos simbióticos com cepas indígenas de rizóbios do solo. No entanto, ainda é uma questão se a nodulação com rizóbios nativos asseguraria a eficiência simbiótica (ou seja, altas taxas de fixação de  $N_2$ ).

Mensurações em plantios florestais com mais de 30 anos de idade na África do Sul indicaram que a FBN pode fornecer até 200 kg de N  $ha^{-1}$   $ano^{-1}$  da acácia negra para o solo (ORCHARD e DARBY, 1956). No entanto, a eficiência no

processo varia de 10 a 100%, de acordo com o ambiente e as idades da planta. Por exemplo, Khanna (1998) verificou que os nódulos foram eficientes na acácia negra no primeiro ciclo, com redução na eficiência no segundo e terceiro ciclos de produção. Outro fator ainda não compreendido é se o desempenho simbiótico entre rizóbios não co-evoluídos, ou seja, nativos do local em que a planta foi introduzida, seriam similares aos rizóbios co-evoluídos (ou seja, os quais apresentam altas taxas de fixação de N<sub>2</sub>) (DWIVEDI et al., 2015). O isolamento de rizóbios, a partir dos nódulos e crescidos em laboratório podem ser uma oportunidade para encontrar cepas mais eficientes (VARGAS et al., 2007).

Essa revisão teve como objetivo investigar se a inoculação com rizóbios aumentaria a produtividade de acácia negra e garantiria a sustentabilidade das culturas através da maior eficiência na FBN.

## **2. SISTEMAS DE PRODUÇÃO COM *Acacia mearnsii* NO BRASIL**

A TANAC S. A. adota recomendações técnicas nas áreas de plantio comercial de acácia negra mudas de 15 a 30 cm, as quais levam cerca de dezoito meses para iniciar a floração e a frutificação. Aos sete anos atingem a altura de colheita, ou seja, até 25 m. A cultura pode ser plantada como monocultura, combinada com outras espécies florestais (sistemas de plantio mistos), ou em combinação com culturas anuais e/ou com pastagens (sistemas agrossilviculturais). No caso do Brasil, a maioria das plantações de acácia negra é manejada sob monocultura (por exemplo, 70-85%) e o restante é manejado em sistemas mistos ou agroflorestais (principalmente em pequenas propriedades) (TANAC S. A., 2018).

A Tabela 1 mostra uma série de vantagens e desvantagens dos três principais sistemas no Brasil. Essas vantagens e desvantagens dependem da complexidade dos sistemas, resultante da soma e da interação das espécies que as compõem (EHRENBERGEROVÁ et al., 2015, COSTA et al., 2016), das tecnologias disponíveis e da mão de obra treinada (particularmente no caso de sistemas agroflorestais) (FROUFE et al., 2011; ATAGANA et al., 2014).

TABELA 1 - VANTAGENS E DESVANTAGENS DA ACÁCIA NEGRA EM MONOCULTURAS, PLANTIOS MISTOS E SISTEMAS AGROFLORESTAIS

<b>Sistemas de Produção com Acácia negra</b>	
<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>Monocultura</b>	
Apenas uma espécie	Menor uso da terra
Alta disponibilidade tecnológica bem desenvolvida	Retorno financeiro de longo prazo
Maior acesso a linhas de crédito	Inviável para pequenos e médios produtores
Maior quantidade de informações e suporte técnico	Alta dependência de recursos externos
Menor quantidade de intervenções com práticas silviculturais	Maior uso de produtos agroquímicos
Redução na aplicação de recursos	Alta exportação de nutrientes do solo
Menor necessidade de mão de obra qualificada	Redução da qualidade do solo durante os ciclos
<b>Plantio Misto</b>	
Mais produtivo que a monocultura	Não é adequado para produção em larga escala
Taxas mais altas da ciclagem e disponibilidade de nutrientes	Mais exigente quanto ao manejo e intervenções com práticas silviculturais
Otimização do uso do solo por espécies de diferentes sistemas radiculares	Retorno de rendimento não imediato;
Mais fontes de renda	Maior custo de implantação por área
	Escassez de tecnologias
	Menos acesso a programas de linha de crédito
	Falta de informação ou suporte técnico aos produtores
<b>Sistemas Agroflorestais</b>	
Maior qualidade do solo e da água	Precisa de mão de obra qualificada
Maior biodiversidade	Maior número de estágios de manejo e práticas culturais (silvicultura, agricultura, pastagem e pecuária)
Maior diversificação na produção	Não adequado em produção em larga escala de madeira
Manutenção e retenção da ciclagem de matéria orgânica	Maior custo de implantação área
Manutenção e retenção da matéria orgânica e a ciclagem de nutrientes;	Escassez de tecnologias
Qualidade ambiental	Poucos programas de linha de crédito
Bom conforto e bem-estar animal;	Falta de informação ou suporte técnico / científico
Mais fontes de renda (curto-médio-longo prazo)	Baseado no conhecimento ancestral
Amortização de custos de produção	
Redução da dependência de fertilizantes externos	
Otimização do uso do solo por espécies de diferentes sistemas radiculares	
Enriquecimento nutricional do solo	
Melhor condição das propriedades físicas do solo	
Maior sustentabilidade	
Suplementação animal com fontes alimentares alternativas derivadas de plantas que compõem o sistema	
Maior eficiência no uso de N por componentes do sistema	
Maior produtividade	
Redução do risco de perda de produtividade	
Segurança alimentar e auto-suficiência;	
Conservação de recursos genéticos naturais	

Fonte: O Autor, 2018.

Baseado em: Nair, Fernandes e Wambugu (1984); Berenschot, Filius e Hardjosoediro (1988); Fleig, Scheneider e Brum (1993); Khanna (1998); Bauhaus, Khanna e Menden (2000); Nichols et al. (2001); Vezzani et al. (2001); Altieri (2002); Dalgaard, Hutchings e Porter (2003); Forrester et

al. (2005); Forrester, Bauhus e Cowie (2005); Forrester et al. (2006a e b); Alves, 2007; Forrester et al (2007); Freitas Coelho et al. (2007); Kleinpaul (2008), Siddiqui et al. (2008); Kleinpaul et al. (2010); Balbino et al. (2011); Froufe, Rachwall e Seoane (2011); Forrester, Vanclay e Forrester (2011); Nygren et al., (2012); Epron et al. (2013); Silva (2013); Francis et al. (2013); Sampaio de Freitas, Neto e Leite (2013); Huang et al. (2014); Rosenstock et al. (2014); Chan et al. (2015); Forrester e Pretzsch (2015); Forrester (2015); Riofrío (2016); Forrester (2017); Pretzsch e Forrester (2017); Tchichelle et al. (2017).

## 2.1. Monocultura

A monocultura consiste em um sistema de uso da terra em que apenas uma cultura é produzida. Este sistema é geralmente associado à produção em larga escala, impulsionada pela alta demanda de matérias prima (madeira e extrativos). A expansão dos plantios florestais em sistema de monocultura da acácia negra é resultado do desenvolvimento do melhoramento genético, manejo adequado da fertilidade do solo, métodos silviculturais, irrigação e colheita mecanizada. A principal vantagem da monocultura é que as árvores crescem com uma arquitetura uniforme, o que facilita o processamento e melhora as taxas de produtividade do uso intensivo da terra (GALLOWAY et al., 2008; BALBINO et al., 2011; HENTZ et al., 2014).

No Brasil, a acacicultura obteve, em 2015, índices de produtividade que variaram entre 13 - 26 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> produzidas em ciclos que variavam de 6 a 8 anos, sendo essa variação determinada principalmente pelo material genético utilizado no sistema produtivo, comparada a produção da mesma espécie na África do Sul os dados de produtividade caem para uma variação de 5 - 19 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> e com um ciclo produtivo maior variando de 10 a 12 anos (CHAN et al. 2015).

Para compensar uma maior produtividade, a monocultura exige níveis elevados de nutrientes do solo, considerados como essenciais para a cultura, por meio da adição de fertilizantes químicos durante o plantio. Por exemplo, Schumacher et al. (2013) utilizaram 40 kg ha<sup>-1</sup> de ureia e 80 kg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup> durante a implantação da floresta de acácia negra. Isto redundava em consumo de mais energia proveniente de combustíveis fósseis para a produção destes fertilizantes químicos, somados ainda ao consumo dos recursos naturais disponíveis no solo.

O uso de fertilizantes nitrogenados industriais interfere diretamente no ciclo do N, pois é responsável por cerca de 40% do N total que circula no planeta

(GRUBER e GALLOWAY, 2008). Além dos custos monetários, o excesso de N, fornecido por fertilizantes, pode causar poluição ambiental por meio de lixiviação e volatilização (BOUDIAF et al., 2014). Além disso, a produção agrícola convencional baseada nas aplicações de fertilizantes industriais afeta as espécies, a diversidade, a dinâmica e a funcionalidade dos agroecossistemas (VITOUSEK et al., 1997).

Um sistema para ser sustentável, deve obrigatoriamente ser uma atividade que contemple os pilares da sustentabilidade: ser economicamente viável, socialmente justo e ambientalmente correto (RASMUSSEN et al., 2017). Com base na literatura, é possível determinar que o modelo convencional de produção de acácia negra é insustentável, pois a monocultura de acácia negra pode afetar negativamente a sustentabilidade. Porém, uma mudança da fertilização química total ou parcial para a FBN natural melhoraria a sustentabilidade da agricultura (FARRAR et al., 2014), porque uma vez que a simbiose é estabelecida com cepas eficientes, as plantas têm melhor nutrição nitrogenada e, portanto, contribuem para aumentar o nível de N no ciclo do sistema planta-solo. Como a colheita deposita uma quantidade substancial de matéria orgânica e resíduos frescos, promove a biomassa microbiana do solo e o ciclo de nutrientes.

## **2.2. Plantio Misto**

Os sistemas de plantio misto compreendem povoamentos cultivados com duas ou mais de espécies florestais sob consórcio, ao mesmo tempo e na mesma área. O sucesso desse sistema de produção depende do arranjo de componentes da planta que diminui a competição entre eles (FORRESTER, 2014b).

Esses sistemas, são muito dinâmicos à medida que mudam de escala, em que os componentes crescem e se desenvolvem, com respostas de acordo com as relações entre as espécies envolvidas e à disponibilidade de recursos (FORRESTER et al., 2017). Portanto, sistemas mistos tendem a ser mais produtivos do que os sistemas de monocultura. Até o momento, uma meta-análise considerando a resposta geral da biomassa florestal indicou que os sistemas mistos produziram 24% mais biomassa do que a monocultura (FORRESTER e

BAUHUS, 2016). Os fatores que afetam a produtividade das espécies em sistemas mistos são densidade populacional e idade, disponibilidade de recursos, condições climáticas e perturbações ambientais (FORRESTER e BAUHUS, 2016). Além disso, o sucesso dos sistemas de plantio misto é determinado pela ciclagem de nutrientes e decomposição da matéria orgânica do solo, que é construída a partir da deposição de biomassa vegetal (particularmente raízes) e liberação de compostos orgânicos pelas raízes no solo (FORRESTER et al., 2006c; FORRESTER et al., 2007; PIOTTO, 2008).

A adoção de um consórcio de espécies florestais, em princípio, é resultado da redução competitiva entre os componentes florestais na produção (FORRESTER 2014a; FORRESTER 2014b), tornando-a complementar ou suplementar. O padrão do princípio tende a mudar de acordo com o seu desenvolvimento, as relações entre as espécies e a disponibilidade de elementos (FORRESTER et al., 2017). A relação C/N presente no solo é influenciada pela taxa de decomposição da matéria orgânica (FREITAS et al., 2013, SANTOS et al., 2016).

Entre os sistemas florestais mistos, um dos exemplos aplicados no Brasil é por meio de consórcio de acácia negra e eucalipto. O eucalipto otimiza o uso de recursos do solo, uma vez que as duas espécies florestais possuem sistemas radiculares distintos, ocupando diferentes espaços do solo, logo as culturas exploram diferentes nichos do solo (FREITAS COELHO et al., 2007). Além disso, o eucalipto cresce rapidamente e requer uma maior quantidade de luz solar do que a acácia negra, que ocorre naturalmente como uma espécie de sub-bosque e é mais tolerante a sombra (VEZZANI et al., 2001; FORRESTER et al., 2006a).

Após 10 anos, um plantio misto com acácia negra e *Eucalyptus globulus* Labill., localizado em solos temperados da Austrália, obteve maior crescimento e produtividade em sistema misto de plantio do que a produtividade na monocultura (FORRESTER et al., 2007). Isso pode ser explicado pelo aumento da produtividade causada pela transferência do nitrogênio fixado pelos rizóbios nativos para o solo e posteriormente para as raízes de eucalipto. No entanto, houve menor fixação de nitrogênio ( $38,3 \text{ Kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ ) do que na monocultura ( $86,2 \text{ Kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ ) (FORRESTER et al., 2007).

Em solos tropicais, a inclusão de leguminosas em plantios mistos com consórcios de *Acacia mangium* Willd. com híbridos do *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake X *E. grandis* W. Hill ex Maiden, denominado híbrido urograndis, contribui para a reciclagem de nutrientes no solo. Esse plantio realizado no estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil, após um período de 30 meses, resultou em efeito positivo com maiores taxas de nutrientes disponíveis no solo dos plantios mistos frente a monocultura com o híbrido urograndis (SANTOS et al., 2016). Os fatores que influenciaram a monocultura e os plantios mistos e que afetaram a qualidade da produtividade, foram resultantes dos diferentes tipos de arranjos e taxas de densidade de plantas por área. Isso ficou evidente aos 60 meses de idade, quando a translocação de N e a extração/absorção de N, P, K e Mg foram menores nos plantios mistos quando comparado aos monocultivos do híbrido urograndis. Os sistemas mistos provavelmente foram beneficiados pela simbiose *A. mangium* - rizóbios, que tem o potencial de aumentar os níveis de N na serapilheira, raízes mortas e exsudatos de plantas (SANTOS et al., 2016).

No entanto, a produtividade do sistema misto não deve ser avaliada individualmente, mas como um todo. Se a produção de cada componente agroflorestal ou uma composição mista for avaliada isoladamente, a produtividade parecerá inviável, uma vez que o aumento da diversidade de plantas pode não aumentar a produtividade de espécies arbóreas específicas (FORRESTER e BAUHUS, 2016). No entanto, as plantações mistas implicam em mais fontes de renda por meio de rotações variadas, resultando em satisfação econômica para pequenas e médias explorações agrícolas, se não dependerem de retornos imediatos. Além disso, quando o manejo com rizóbios é bem aplicado, há benefícios ecológicos, pois aumenta a capacidade de ciclagem de nutrientes no solo, o que pode diminuir os insumos agrícolas no sistema.

O plantio misto de espécies florestais também apresentou resultados positivos, verificado em estudo baseado na dinâmica de invasão de acácia negra - espécie exótica - em matas nativas com sombra (*Quercus suber* L.). Ambientes compostos de quantidade parcial de espécies exóticas e nativas apresentaram maior concentração de carbono total, matéria orgânica, N total e P, bem como menor relação C/N, quando comparados às áreas formadas apenas de sombra ou elevada invasão de acácia negra. (BOUDIAF et al., 2013). Os mesmos autores,

determinaram valores mais baixos na relação C/N em áreas onde a invasão de acácia negra ainda era parcial. O aumento da concentração de nitrogênio, em relação à quantidade de carbono, potencializou o volume de bactérias ativas sob a matéria orgânica do solo, aumentando a taxa de decomposição do material depositado no solo e, conseqüentemente, a concentração de nutrientes no solo até que os elementos possam alcançar um equilíbrio.

A biomassa de espécies de leguminosas pode ser depositada sob o solo através da serapilheira. A presente revisão demonstrou que o teor de nutrientes do sistema de produção mista foi significativamente maior do que o do sistema de monocultura (Tabela 1).

Cepas nativas de rizóbios podem ser associadas a espécies invasoras como uma adaptação ao meio ambiente, indicando o potencial de usar cepas pré-selecionadas para serem aplicadas em sistemas de produção com estas espécies, como é o caso da acácia negra (BOUDIAF et al., 2014).

### **2.3. Sistemas Agrossilvipastoris**

A agrossilvicultura ou sistemas agrossilvipastoris são os sistemas de produção mais sustentáveis, porque a produtividade é resultado da interação entre componentes florestais, agrícolas e pecuários cultivados em mesma área, ao mesmo tempo (RAMACHANDRAN NAIR et al., 2009; COSTA et al., 2016). Ou seja, esses sistemas de integração consistem em plantios florestal em consórcio com culturas anuais e, ocasionalmente, pastagens, que servem como fonte de alimento para os animais. Como os sistemas florestais (monoculturas ou sistemas mistos) não produzem retorno financeiro rápido, os sistemas agroflorestais podem ser uma alternativa viável para gerar renda extra (como a produção pecuária, por exemplo) dentro de um curto período de tempo, antes da derrubada, reduzindo os custos gerais de produção de produtos florestais. Além disso, a inclusão da floresta nos sistemas de produção agrícola e pecuária promove a biodiversidade, estimula a ciclagem de nutrientes, aumenta o lucro agrícola e diminui a dependência de insumos externos (SOUZA CASTILHOS et al., 2009; OREFICE et al., 2016).

As culturas agrícolas são beneficiadas pela disponibilidade de nutrientes das árvores, via ciclagem de nutrientes e fixação de nitrogênio pelas leguminosas (KLEINPAUL, 2008; ROSENSTOCK et al., 2014). O uso da pecuária geralmente é adotado quando as culturas agrícolas não conseguem se desenvolver devido ao sombreamento causado pelas árvores. O sombreamento pode ser um fator limitante para o desenvolvimento de pastagens dependendo da espécie e do grau de sombreamento. No entanto, pastagens naturais ou exóticas plantadas desenvolvem-se bem em consórcio com acácia negra em sistemas silvipastoris do estado do Rio Grande do Sul (SOUZA CASTILHOS et al., 2009).

Em 1980, os produtores de acácia negra haviam implementado sistemas agroflorestais, incluindo culturas como mandioca, melão, feijão, melancia, milho, batata e gado (bovinos e ovinos). Sistemas agroflorestais têm maior retorno do que sistemas de monocultura, devido à produção diversificada de componentes em consórcio (FLEIG, SCHNEIDER e BRUN, 1993; SILVA e FARIAS, 2015; RIRA et al., 2015; ATTIA et al., 2016). Exemplos dos benefícios que vêm com essa interação são maiores volumes de madeira e maior ganho de peso dos animais. Estes são resultados da disponibilidade de alimentos e o conforto térmico animal (SOUZA CASTILHOS et al., 2009).

O consórcio entre a acácia negra e o milho precisa ser mais estudado, pois a produtividade do milho é influenciada pela pluviosidade, ou seja, apresenta redução de produtividade quando existe baixa disponibilidade de água, fator limitante pois ambas as espécies competem pela água (LEYRER, 1987). Entretanto, os plantios mistos de acácia negra, milho e o eucalipto apresentaram um resultado diferente, pois não houve redução da produtividade do milho e dos componentes arbóreos (LEYRER, 1987). Resultados semelhantes foram obtidos em plantios mistos com produtividade de biomassa florestal, obtendo melhores resultados com o tratamento de 25% de eucalipto e 75% de acácia negra - não levando em consideração as linhagens de plantio de milho entre as espécies florestais (KLEINPAUL et al., 2010).

A adoção de sistemas silvipastoris, que são compostos exclusivamente por espécies florestais consorciadas com animais, implica na formação de plantações, onde os animais necessitam de espaço para circulação, sem causar danos às plantas. Esse arranjo de produção pode ser derivado dos sistemas

agroflorestais, compostos exclusivamente de consórcios florestais e culturas anuais. Quando as árvores fecham o dossel e começam a interferir nas espécies agrícolas, geralmente, quando as árvores de acácia negra atingem 7 a 10 metros de altura, ocorre a substituição das culturas agrícolas por pasto e animais (LEYRER, 1987; COSTA et al., 2016) .

Em áreas consorciadas de pecuária e floresta, o manejo do componente animal em áreas compostas por leguminosa e pastagem resultam em mesma produtividade em peso dos animais quando comparadas a áreas de pastagem sem o componente arbóreo (COSTA et al., 2016). No entanto, nas áreas onde o componente florestal estava inserido, houve maior retorno em renda devido à diversificação da produção, com a adoção de mais um valor de *commodity* adicionado por um maior ciclagem de nutrientes, principalmente nitrogênio. Deve-se ter em mente que existem discrepâncias nos estoques de carbono armazenados (GODOI et al., 2016).

Os sistemas silvipastoris permitem uma melhor utilização dos recursos naturais e são uma das melhores alternativas para alcançar maior produtividade, através de um uso mais sustentável da terra. A sustentabilidade garante menos exploração da floresta, especialmente com o uso de densidades de árvores menores, um fator-chave no planejamento e na aplicação desses sistemas. A atividade florestal não representa um retorno financeiro rápido, portanto os sistemas integracionais podem ser uma alternativa viável para gerar uma renda extra (com a pecuária) em um período menor, antes da extração, reduzindo os custos de produção (SOUZA CASTILHOS et al., 2009).

O uso da produção integrada de acácia negra e pecuária, independentemente da densidade inicial de plantio, não apresenta diferença na produtividade geral da floresta até o quinto ano (SOUZA CASTILHO et al., 2009). A partir do quinto ano, a produtividade diminuiu devido ao fechamento da copa, a redução na taxa de iluminação e, conseqüentemente, reduz-se o nível de fotossíntese da pastagem, assim como a taxa de armazenamento de carbono e rendimento de peso dos animais. Essa perda pode ser compensada pela produção de madeira (COSTA et al., 2016).

O desbaste da floresta ocorre na fase estacionária da produtividade florestal, que consiste na remoção de indivíduos bifurcados, tortos, infestados,

doentes ou simplesmente aumentar o espaçamento, ou seja, potencializar o desenvolvimento das árvores que permaneceram no plantio. O equilíbrio adequado entre a produção de madeira e o peso dos animais em áreas com gado e acácia negra ocorre após o sétimo ano. O equilíbrio de produção ocorre pela quantidade de iluminação da área em densidades de árvores consideradas ótimas. Densidades de árvores inferiores a 833 árvores ha<sup>-1</sup> resultam em menor produtividade florestal, no entanto densidades entre 833 e 500 árvores ha<sup>-1</sup> tendem a aumentar a produção por área (SOUZA CASTILHO et al., 2009). Estes resultados confirmam a hipótese de que quanto maior a disponibilidade alimentar - obtida pela conversão do nitrogênio fixado no solo por rizóbios (na biomassa de pastagem verde) - bem como maior conforto térmico animal, maior eficiência de utilização de nitrogênio no ganho de peso dos animais.

O uso de nitrogênio em carne e gado leiteiro tem baixa eficiência, com aproximadamente 77-84% do elemento sendo eliminado por excreção animal (WEI et al., 2016). A eficiência deste sistema está diretamente ligada à nutrição animal, ou seja, a absorção/utilização de nitrogênio. A aplicação de tanino como fonte alternativa de alimento (este tanino pode ser derivado das folhas da acácia negra) a uma fonte de alimento rica em nitrogênio resultou em produtividade máxima, com benefícios para a saúde animal, redução na velocidade de digestão e redução na emissão de gás metano em ruminantes (PILUZZA et al., 2014; ORLANDI et al. ., 2015; ATTIA et al., 2016).

### **3. DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS NO GÊNERO ACACIA**

O gênero *Acacia* compreende cerca de 1.350 espécies, distribuídas em todo o mundo (FAYE et al., 2007). A diversidade de rizóbios em espécies de *Acacia* é estudada com o objetivo de compreender os processos de interação dos microrganismos (simbiontes) com as plantas (hospedeiros) e a possibilidade de utilizar essas informações visando maior eficiência simbiótica.

O estudo da diversidade de rizóbios nas espécies australianas *Acacia dealbata* Link, *A. decurrens* Willd, *A. longifolia* (Andrews) Willd, *A. mangium*, *A. mearnsii*, *A. melanoxylon* R. BR. e *A. saligna* Lindley resultou em espécies pertencentes ao gênero *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*) e *Bradyrhizobium* (RODRIGUES-ECHERRÍA et al., 2011; CRISÓSTOMO,

RODRIGUES-ECHERRÍA e FREITAS, 2013). Foram identificados através de isolamentos em *Acacia stenophylla* A. Cunn ex Benth e *A. salicina* Lindley a presença de espécies pertencentes aos grupos alfa e beta-rizóbios, que compõem os gêneros *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Burkholderia*, *Phyllobacterium* e *Devosia*, porém existe uma falta de conhecimento sobre a interação entre os beta-rizóbios e as espécies vegetais, afinal essas espécies arbóreas são altamente promíscuas (HOQUE, BROADHURST e THRALL, 2011).

A associação simbiótica entre rizóbios e espécies de acácia nativas ou introduzidas no continente africano foi bem descrita, apresentando-se nos gêneros *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium* (AMRANI et al., 2010). No Senegal, estudos com *Acacia seyal* (Delile) P. J. H. Hurter resultaram na presença dos gêneros *Mesorhizobium* e *Ensifer* (*Sinorhizobium*), além de realizar nodulações com isolados de *Agrobacterium* e *Burkholderia* que foram ineficazes (DIOUF et al., 2007). Na Argélia, simbioses com espécies nativas e exóticas de acácia resultaram em nodulações com: *A. karroo* com *Ensifer* e *Rhizobium*; *A. ehrenbergiana* associada a *Ensifer* e *Mesorhizobium*; a espécie *A. tortilis* (Forssk.) Galasso & Banfi em simbiose com *Ensifer*, *A. seyal* com *Rhizobium* e *Ochrobactrum*; e *A. saligna* com *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (BOUKHATEM et al., 2012). Um estudo da diversidade de rizóbios no deserto de Merzouga (Marrocos) a partir das espécies *A. tortilis* e *A. gummifera* (Willd.) Kyal. & Boatwr. resultou em simbiontes do gênero *Ensifer* (SAKROUHI et al., 2016).

Em espécies de acácia nativas da América do Norte e Central como *A. angustissima* (Mill.) Britton & Rose, a preferência é dada à associação com o gênero *Ensifer* (LLORET et al., 2007). Na China, estudos de diversidade sobre *A. melanoxylon*, resultaram em isolados de *Bradyrhizobium* (LU et al., 2014). Isolados de nódulos de *A. mangium* cultivados na Tailândia e nas Filipinas resultaram em gêneros de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Ochrobactrum* (NGOM et al., 2004). No Brasil, Lammel et al. (2013) obteve apenas o gênero *Bradyrhizobium* a partir dos nódulos de *A. dealbata*.

Estudos de diversidade de rizóbios em *Acacia mearnsii* determinaram que as espécies obtidas e identificadas pertencem aos gêneros *Rhizobium* (RODRÍGUEZ-ECHEVERRÍA et al., 2011; FIKRI-BENBRAHIM et al, 2017) e

*Bradyrhizobium*, esses gêneros são considerados os simbióticos dominantes para esta espécie de leguminosa (DREYFUS e DOMMARGUES, 1981; VARGAS et al., 2007; BIRNBAUM et al., 2012; BOUDIAF et al., 2014; KASCHUK e HUNGRIA, 2017). Das associações simbióticas estudadas, as espécies descritas são *Bradyrhizobium japonicum* (Kirchner) Jordan, *B. Elkanii* Kuykendall et al., *Rhizobium leguminosarum* (Frank) Ramirez-Bahena et al. e *R. tropici* Martinez-Romero et al. (RODRÍGUES-ECHEVERRÍA et al., 2011). Recentemente, *Rhizobium radiobacter* (Beijerinck and van Delden) Pribram foi isolado de nódulos de acácia negra que crescem no Marrocos (FIKRI-BENBRAHIM et al., 2017). O gênero *Bradyrhizobium* foi extraído em 97% dos isolados obtidos de nódulos vegetais da Austrália (LAFAY e BURDON, 2001) e 100% dos isolados de nódulos extraídos de plantios florestais no Brasil (VARGAS et al., 2007) e florestas nativas invadidas por acácia negra na Argélia (BOUDIAF et al., 2014).

O uso de rizóbios na inoculação de leguminosas para agricultura é uma prática comum de manejo, mas para espécies florestais essa atividade é incomum (BROCKWELL et al., 2011). A determinação do sucesso da inoculação de plantas tem dois princípios básicos: a) a determinação da estirpe bacteriana mais eficiente na interação microrganismo-planta (simbiótica ou não) (VARGAS et al., 2007; BASHAN et al., 2014; FORRESTER 2017, FIKRI-BENBRAHIM et al., 2017); b) o uso de tecnologia mais adequada (BASHAN et al., 2014).

A aplicação de inoculantes com rizóbios pré-selecionados tende a garantir uma inoculação eficiente, ou seja, com uma infecção garantida das raízes e formação de nódulos. Solos com baixa densidade de rizóbio resultam em ameaça ao estabelecimento de simbiose e à ocorrência de FBN (THRALL et al., 2001; THRALL et al., 2005).

O potencial de acácia negra na fixação biológica de nitrogênio em solos tropicais é estimado em torno de 200 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>, mas há variações de 10-100% na eficiência desse processo (ORCAHRD e DARB, 1956; SILVA e DOBEREINER, 1982; AUER e SILVA, 1992; BINKLEY, 1992; BINKLEY e GIARDINA, 1997; KHANNA, 1998; FISHER e BINKLEY, 2000; MAY e ATTIWILL, 2003; FORRESTER et al., 2007; FORRESTER et al., 2017).

Mais pesquisas sobre a fixação biológica de nitrogênio em acácia negra são necessárias, pois 200 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> foram determinados em um solo onde a

floresta foi estabelecida por mais de 30 anos (ORCAHRD e DARB, 1956). A fixação biológica de nitrogênio é mais eficiente em solos no primeiro ciclo de produção de leguminosas, com diminuição do valor de nitrogênio fixado a partir do segundo e terceiro ciclo de produção (KHANNA, 1998).

A fixação biológica mensuradas na literatura pelos métodos: de adição de nitrogênio (SILVESTER, 1983), com abundância natural de  $^{15}\text{N}$  (BODDEY et al., 2000) ou redução de acetileno (LAWRIE, 1981), encontram-se na TABELA 2.

TABELA 2 - PRODUTIVIDADE DA *ACACIA MEARNSII* E VALORES DE FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO

Local	Idade	Produtividade (m <sup>3</sup> ha <sup>-1</sup> ano <sup>-1</sup> )	Valor de FBN (Kg ha <sup>-1</sup> ano <sup>-1</sup> )	Referências
MONOCULTURA				
			86.2*	
Austrália	10	5.4	131.5 (63%)**	FORRESTER et al. (2007)
PLANTIO MISTO				
			38.3*	
Austrália	10	7.8	16.2 (10%)**	FORRESTER et al. (2007)
FLORESTAS PLANTADAS				
África do Sul			(75%)**	TYE and DRAKE (2000)
FLORESTAS NATURAIS				
Austrália			0,75***	LAWRIE (1981)

Fonte: O Autor, 2018.

\* - Valores obtidos pelo método de Adição de N; \*\* - Valores obtidos pelo método do <sup>15</sup>N Method;

\*\*\* - Valores obtidos pelo método de Redução de Acetileno.

O conhecimento das bactérias nativas da diversidade e eficiência, através da infecção e da taxa real de fixação de nitrogênio, é de suma importância. Afinal, existem cepas bacterianas rizobiais autorizadas para uso em acácia negra pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA.

#### 4. PONTOS FORTES, FRAQUEZAS, AMEAÇAS E OPORTUNIDADES EM RELAÇÃO À FIXAÇÃO DE N<sub>2</sub>

O presente trabalho considerou os artigos que tratavam dos sistemas de produção de acácia negra (monocultivo, plantio misto e sistemas agroflorestais) em qualquer parte do mundo sob dois cenários: com e sem FBN efetiva (promovida pela inoculação rizobiana) em acácia negra. A revisão revelou que a inoculação da acácia negra com rizóbios promove o crescimento, a produtividade e a sustentabilidade das plantas nos sistemas de produção monocultora, mista e agroflorestal. A Tabela 3 destaca que a inoculação com rizóbios resulta em mais pontos de força do que pontos de fraqueza. Isso implica que a inoculação com rizóbios pode ser considerada como uma prática silvicultural que pode ser controlada, trazendo resultados diretos para o manejo. Uma das fraquezas da inoculação rizobial é a incerteza no conhecimento sobre a eficiência específica da diversidade rizobiana. Em solos com baixa densidade de rizóbios, o estabelecimento de simbiose e a ocorrência de FBN são incertos (THRALL et al.,

2001; THRALL et al., 2005). A aplicação de inoculantes com rizóbios pré-selecionados deve garantir uma infecção radicular eficiente e a formação de nódulos (Tabela 3) e, conseqüentemente, aumentar o crescimento e a produtividade das plantas. Portanto, o sucesso da inoculação de rizóbios como prática silvicultural depende da escolha de cepas de rizóbios que tenham bom desempenho na associação simbiótica e tenham maior potencial para a FBN. Além disso, essas cepas devem lidar com a competição com cepas nativas, já que elas podem ter melhores propriedades de infecção do que cepas inoculadas (DWIVEDI et al., 2015).

Uma vez que a inoculação com rizóbios estabelece uma simbiose garantida, as culturas são beneficiadas com nutrição melhorada e estimulam a fotossíntese e o crescimento (VEZZANI et al., 2001; KASCHUK et al., 2009; KASCHUK et al., 2012), promovendo a fertilidade do solo aumentando a quantidade de resíduos vegetais com menor relação C:N (FORRESTER et al., 2007). A matéria orgânica do solo com menores relações C:N pode beneficiar a biomassa microbiana do solo e aumentar a capacidade de ciclagem de nutrientes no solo (FORRESTER et al., 2007). A inoculação de rizóbios pode melhorar a qualidade do solo e aumentar a eficiência no uso da terra. Além disso, a adoção da inoculação rizobiana em sistemas de acácia negra traz grandes oportunidades, como: 1) Maior desenvolvimento técnico-científico da cultura; 2) Desenvolvimento de Microbiologia Florestal no setor florestal; 3) Certificação de produtos para uso de produtos biotecnológicos baseados em rizóbios.

TABELA 3 - FORÇAS, FRAQUEZAS, AMEAÇAS E OPORTUNIDADES EM RELAÇÃO À FIXAÇÃO DE N<sub>2</sub> A PARTIR DA APLICAÇÃO DE RIZÓBIOS EM SISTEMAS PRODUTIVOS

FORÇAS	FRAQUEZAS
Garantia do estabelecimento das simbioses	Incertezas no conhecimento sobre eficiência na associação entre rizóbios e espécies florestais
Maior crescimento e rendimento de plantas (produtividade)	Ausência de técnicas de inoculação
Melhor qualidade ambiental	Falta de competência profissional em Microbiologia no setor florestal
Melhor nutrição de plantas	
Estimulação da ciclagem de nutrientes no solo	
Redução da dependência de fertilizantes nitrogenados	
OPORTUNIDADES	AMEAÇAS
Maior desenvolvimento técnico e científico	Necessidade de investimentos para pesquisa e desenvolvimento tecnológico
Crescente desenvolvimento do setor Florestal	Concorrência desleal do mercado entre produtos biotecnológicos e fertilizantes industriais
Alto potencial de exploração da Microbiologia no setor florestal	
Certificação de produtos para uso de produtos biotecnológicos baseados em rizóbios	
Concentração da produção florestal em poucas espécies florestais	

Fonte: O Autor, 2018.

#### 4.1. Se a inoculação com rizóbios boa para a silvicultura, por que não é realizada?

##### 4.1.1 – Promiscuidade de leguminosas, eficácia de nódulos e competitividade de rizóbios

As leguminosas evoluíram com a característica de permitir que ocorra a simbiose, ou seja, a nodulação com diferentes tipos de cepas de rizóbios dentro de um espectro de espécies. Isso implica afirmar que uma planta consegue realizar a simbiose com espécies distintas de rizóbios, podendo até mesmo variar entre gêneros e domínios, a fim de garantir a nodulação sob ambientes estressantes oscilantes e severos (SPRENT, 2009). A maioria das leguminosas tropicais tem uma natureza "promíscua" e não restringe a nodulação a uma estirpe de rizóbio específica (SPRENT, 2009; BOUDIAT et al., 2013; LE ROUX et al., 2016), ou seja, não se pode esperar que a acácia negra forme nódulos com apenas um tipo de rizóbio. Além disso, a diversidade de rizóbios inclui a variabilidade na expressão de diferentes genes (fatores *nif* e *nod*, por exemplo) que estimulam ou restringem a atividade dos nódulos, aumentando ou diminuindo a eficácia dos nódulos (DWIVEDI et al., 2015). Se as leguminosas preferissem cepas específicas, isto é, aquelas com maiores taxas de FBN, então a infecção

seria avassaladora. Mas, devido à promiscuidade das leguminosas e à maior competitividade das cepas nativas em relação às cepas exóticas, a inoculação de plântulas seria vantajosa porque coloca as células rizobiais próximas ao sistema de enraizamento em desenvolvimento em um estágio inicial (DWIVEDI et al., 2015; KASCHUK e HUNGRIA, 2017).

Estudos da diversidade de rizóbios em nódulos de acácia negra, em plantios pelo mundo resultam na dominância do gênero *Bradyrhizobium* como as cepas mais eficientes para a simbiose FBN. De fato, a inoculação de três espécies de *Bradyrhizobium* em acácia negra resultou em plântulas mais vigorosas que as plântulas não inoculadas (BROCKWELL et al., 2011). Quando essas mesmas plântulas inoculadas e vigorosas foram transplantadas para o campo em uma área experimental da Austrália sob monocultivo ou sistemas de plantio mistos em consórcio com *Eucalyptus nitens* (Deane & Maiden) Maiden, resultaram em árvores maiores tanto na acácia negra quanto no eucalipto (BROCKWELL et al., 2011).

No Brasil, a Instrução Normativa 13/2011 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2011) autorizou duas estirpes, *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 6163 = AY904764 = BR 3607) e *B. japonicum* (SEMIA 6164 = AY904765 = BR 3608), isolado em Seropédica, estado do Rio de Janeiro, Brasil, para uso em inoculantes para acácia negra. Essas cepas autorizadas estão disponíveis na Coleção Brasileira de Culturas de *Rhizobium* SEMIA na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-Soja, Londrina, Paraná, Brasil) e na FEPAGRO-MIRCEN (Fundação Centro de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul) - Centro de Recursos Microbiológicos (Catálogo Mundial de Coleções *Rhizobium* IBP nº 443 na Federação Mundial de Cultura) (MENNA e HUNGRIA, 2011).

Os regulamentos oficiais consideram que somente cepas com excelentes resultados de promoção de crescimento de plantas são autorizadas para uso como inoculantes segundo as Instrução Normativa Brasileira. As cepas de rizóbios, autorizadas para acácia negra e outras espécies de leguminosas florestais não estão disponíveis no mercado como inoculantes, razão pela qual a indústria de inoculantes prefere ter apenas uma cepa para todas as espécies de plântulas do que uma cepa de rizóbio para cada espécie. Além disso, os sistemas

de produção florestal comercial não adotam o uso da inoculação tanto quando os sistemas de cultivo anuais.

Com o entendimento de que a simbiose rizóbio-leguminosa é governada pela promiscuidade das leguminosas e pela competição entre cepas de rizóbios do solo, ou seja, existe uma competição entre os rizóbios do solo para realizarem a associação simbiótica, a investigação da diversidade rizobiana em solos onde a cultura é cultivada pode representar uma oportunidade para encontrar cepas de rizóbios mais eficazes para cultivos e espécies florestais (VARGAS et al., 2007; BOUDIAF et al., 2014). A história de sucesso da FBN em leguminosas de grão deve inspirar a história das leguminosas arbóreas. No caso da soja, a FBN é suficiente para suprir todas as exigências de N da cultura sem a necessidade de adubação nitrogenada (KASCHUK et al., 2016).

#### **4.1.2. Meios eficientes para produção e uso de inoculantes comerciais**

Inoculantes comerciais são disponibilizados pela indústria de inoculantes em formulações sólidas (turfa) e (semi) líquidas (ANPII, 2018). A turfa é o melhor veículo de uso para aplicação de inoculantes, pois preserva as células do microrganismo, sendo utilizadas em formulações sólidas e semilíquidas. Independentemente das formulações, os inoculantes para as leguminosas para grão, e particularmente para a soja, dominam o mercado, com mais de 50 milhões de doses (1 dose por hectare) vendidas em 2016 (ANPII, 2018) enquanto que as doses para espécies florestais dificilmente são produzidas e utilizadas.

De fato, apesar de vários institutos terem pesquisado a diversidade de rizóbios de leguminosas arbóreas (VARGAS et al., 2007) e diferentes técnicas de inoculação de microrganismos em plântulas (MONTEIRO et al., 2017), poucas pesquisas resultaram em inoculantes comerciais para espécies florestais. Um exemplo foi o estudo de Brockwell et al., (2011) que inocularam mudas de acácia negra com cepas de *Bradyrhizobium*, as quais conseguiram realizar associação simbiótica, fixar o nitrogênio e promover o crescimento das mudas, na fase inicial ou de arranque após o plantio ao campo. Alguns inoculantes para espécies florestais são disponibilizados no mercado como “fertilizantes orgânicos” e, quando usados em mudas de viveiros ou transplantes (MONTEIRO et al. 2017),

eles não são tratados como um produto vivo como deveriam (HUNGRIA et al. al., 2005).

A pesquisa, portanto é desafiada a melhorar o conhecimento sobre a tecnologia de inoculação como um todo. Considerando as taxas de crescimento iniciais mais lentas das espécies florestais, comparadas com as taxas de crescimento das culturas anuais, os inoculantes florestais devem fornecer condições mais adequadas para a sobrevivência de microrganismos do que os inoculantes para as espécies de culturas anuais.

Uma possível alternativa a ser desenvolvida seria a presença de formulações que sirvam como veículo para os inoculantes que preservem as células microbianas por mais tempo e as liberem lentamente à medida que a plântula da cultura se desenvolve. Além disso, em relação ao tempo de inoculação, uma pergunta a ser respondida é se seria mais eficiente aplicar inoculantes no momento da muda, por exemplo, nas sementes ou no substrato, ou durante o transplante, por exemplo nas covas de plantio e, mesmo então, após o transplante via inoculação de cobertura. Estes são aspectos tecnológicos que não foram abordados na literatura relacionada com a acácia negra e outras espécies de acácia.

#### **4.1.3. Microbiologia Florestal**

A presente revisão demonstrou que a FBN não é totalmente explorada em sistemas de produção de acácia negra no Brasil, embora seja uma tecnologia promissora para aumentar o crescimento das plantas, a produtividade e a sustentabilidade das culturas. Portanto, há um desejo e necessidade de promover projetos e programas no tema. Além dos inoculantes de rizóbios, a situação se estende a outros microrganismos que promovem o crescimento das plantas, auxiliam no controle biológico, na solubilização dos fosfatos, com fungos micorrízicos, entre outros.

Embora o setor florestal tenha grande escala no país e no mundo, ele se concentra apenas em algumas espécies. A Microbiologia aplicada à silvicultura deve superar alguns desafios, como a falta de profissionais capacitados para desenvolver pesquisas, bem como o desenvolvimento de novas tecnologias de

aplicação. Pode trazer maiores oportunidades para a pesquisa científica e tecnológica, através da produção de novos inoculantes, de uma maneira nova e com maior eficiência de inoculação.

## 5. CONCLUSÕES

Os sistemas de produção de acácia negra adotados na região Sul do Brasil são monocultura, plantio misto e agrossilvicultura, geralmente utilizados por empresas e por pequenos e médios produtores. Em todos os sistemas, percebe-se que o potencial de inoculação com rizóbios em promover melhorias na FBN e conseqüentemente no nitrogênio disponível às espécies cultivadas. A Microbiologia Florestal é uma ciência fundamental a ser explorada para gerar práticas silviculturais para uso no sistema de produção florestal. As inovações biotecnológicas decorrentes dos resultados da pesquisa sobre a diversidade de microrganismos, o desempenho como inoculantes e a maior produção ainda garantiriam maior sustentabilidade.

Com o uso de cepas específicas para acácia negra, há uma garantia no aumento da disponibilidade de nitrogênio, pela FBN, conseqüentemente, potencializando a eficiência do uso de nutrientes. Evita, assim, o uso de outras fontes de nitrogênio no sistema, especialmente fertilizantes químicos (industrializados).

Por fim, com benefícios comprovados, a inoculação potencializa o desenvolvimento e uso da Microbiologia na cadeia produtiva florestal. É necessário um maior conhecimento sobre a diversidade de rizóbios, avaliar e determinar linhagens bacterianas que apresentem maior capacidade de real fixação biológica de nitrogênio. Quanto maior o potencial de fixação de nitrogênio obtido por uma cepa pré-selecionada, maior a chance de desenvolver um bom inoculante.

Teoricamente, o potencial para a aplicação de rizóbios como uma prática de silvicultura é comprovado através da literatura e aplicação de informações, em pontos - chave atuais (pontos fortes e fracos) e pontos - chave futuros (oportunidades e ameaças).

A maior ameaça ao desenvolvimento de inoculantes na Microbiologia Florestal é a necessidade de altos investimentos em pesquisa. Outra ameaça é a maneira injusta como funciona o mercado de fertilizantes biológicos e sintéticos. Fertilizantes têm nichos industriais bem estabelecidos e dominam o mercado quando comparados a outros produtos biológicos.

A necessidade de desenvolver a Microbiologia Florestal por meio das inovações biotecnológicas resultantes de pesquisa sobre diversidade microbiana e ecologia trarão novas oportunidades em práticas de silvicultura e produção florestal.

## 6. REFERÊNCIAS

ALTIERI, M. A. Agroecology: the science of natural resource management for poor farmers in marginal environments. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 93, n. 1, p. 1-24, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(02\)00085-3](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(02)00085-3)

ALVES, F. D. As faces do desenvolvimento rural no sul gaúcho: produção agroecológica familiar e monoculturas empresariais. **Agrária**, n. 7, p. 37-60, 2007. <http://dx.doi.org/10.11606/issn.1808-1150.v0i7p37-60>

AGEFLOR - Associação Gaúcha de Empresas Florestais (2018a) A Indústria de Base Florestal no Rio Grande do Sul – Ano Base 2016. Retrieved from <http://www.ageflor.com.br/noticias/wp-content/uploads/2017/08/A-INDUSTRIA-DE-BASE-FLORESTAL-NO-RS-2017.pdf>. Available in 16<sup>th</sup> May 2018.

AGEFLOR - Associação Gaúcha de Empresas Florestais (2018b) A Indústria de Base Florestal no Rio Grande do Sul – Ano Base 2015. Retrieved from <http://www.ageflor.com.br/noticias/wp-content/uploads/2016/09/AGEFLOR-DADOS-E-FATOS-2016.pdf>. Available in 16<sup>th</sup> May 2018

AMRANI, S.; NOUREDDINE, N. E.; BHATNAGAR, T.; ARGANDONA, M.; NIETO, J. J.; VARGAS, C. Phenotypic and genotypic characterization of rhizobia associated with *Acacia saligna* (Labill.) Wendl. in nurseries from Algeria. **Systematic and applied microbiology**, v. 33, n. 1, p. 44-51, 2010.

ANPII -Associação Nacional de Produtores e Importadores de Inoculantes - Estatísticas. 2018. Retrieved from <http://www.anpii.org.br/> Available in: 15<sup>th</sup> May 2018.

ATANGANA, A.; KHASA, D.; CHANG, S.; DEGRANDE, A. Definitions and classification of agroforestry systems. In: **Tropical Agroforestry**. Springer Dordrecht, p. 35-47, 2014. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-7723-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-007-7723-1_3)

ATTIA, M. F.; EL-DIN, A. N. N.; EL-ZARKOUNY, S. Z.; EL-ZAIAT, H. M.; ZEITOUN, M. M.; SALLAM, S. M. Impact of Quebracho Tannins Supplementation on Productive and Reproductive Efficiency of Dairy Cows. **Open Journal of Animal Sciences**, v. 6, n. 4, p. 269, 2016. 10.4236/ojas.2016.64032

AUER, C. G.; SILVA, R. Fixação de nitrogênio em espécies arbóreas. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSI, M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Universidade Estadual de São Paulo, 1992. p. 160-167.

BALBINO, L. C.; CORDEIRO, L. A. M.; PORFÍRIO-DA-SILVA, V.; MORAES, A. D.; MARTÍNEZ, G. B.; ALVARENGA, R. C.; KICHEL, A. N.; FONTANELI, R. S.; SANTOS, H. P.; FRANCHINI, J. C.; GALERANI, P. R. Evolução tecnológica e arranjos produtivos de sistemas de integração lavoura-pecuária-floresta no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 10, p. 1-12, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2011001000001>

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, J. P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant and Soil**, v. 378, n. 1-2, p. 1-33, 2014.

BAUHUS, J.; KHANNA, P. K.; MENDEN, N. Aboveground and belowground interactions in mixed plantations of *Eucalyptus globulus* and *Acacia mearnsii*. **Canadian Journal Forestry Research**, Montreal, v. 30, n. 12, p. 1886-1894, 2000. <https://doi.org/10.1139/x00-141>

BERENSCHOT, L. M.; FILIUS, B. M.; HARDJOSOEDIRO, S. Factors determining the occurrence of the agroforestry system with *Acacia mearnsii* in Central Java. **Agroforestry Systems**, v. 6, n. 1-3, p. 119-135, 1988. <https://doi.org/10.1007/BF02344749>

BINKLEY, D. Mixtures of nitrogen-fixing and non-nitrogen-fixing tree species. In: Cannell, M. G. R., Malcolm, D. C., Robertson, P. A. (Eds.), *The ecology of mixed species stands of trees*. Blackwell Scientific, London, pp. 99-123, 1992.

BINKLEY, D.; GIARDINA, C. Nitrogen fixation in tropical forest plantations. In: Nambiar, E. K. S.; Brown, A. G. (Eds.), **Management of Soil, Nutrients and Water in Tropical Plantation Forests**. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, pp. 297-337, 1997.

BIRNBAUM, C.; BARRETT, L. G.; THRALL, P. H.; LEISHMAN, M. R. Mutualisms are not constraining cross-continental invasion success of *Acacia* species within Australia. **Diversity and Distributions**, v. 18, n. 10, p. 962-976. 2012. 10.1111/j.1472-4642.2012.00920.x

BODDEY, R. M.; PEOPLES, M. B.; PALMER, B.; DART, P. J. Use of the <sup>15</sup>N natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 57, n. 3, p. 235-270, 2000.

BOUDIAF, I.; BAUDOIN, E.; SANGUIN, H.; BEDDIAR, A.; THIOULOUSE, J.; GALIANA, A.; PRIN, Y.; LE ROUX, C.; LEBRUN, M.; DUPONNOIS, R. The exotic legume tree species, *Acacia mearnsii*, alters microbial soil functionalities and the early development of a native tree species, *Quercus suber*, in North Africa. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 65, p. 172-179, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.05.003>

BOUDIAF, I.; LE ROUX, C.; BAUDOIN, E.; GALIANA, A.; BEDDIAR, A.; PRIN, Y.; DUPONNOIS, R. Soil Bradyrhizobium population response to invasion of a natural *Quercus suber* forest by the introduced nitrogen-fixing tree *Acacia mearnsii* in El Kala National Park, Algeria. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 70, p. 162-165, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.12.030>

BOUKHATEM, Z. F.; DOMERGUE, O.; BEKKI, A.; MERABET, C.; SEKKOUR, S.; BOUAZZA, F.; GALIANA, A. Symbiotic characterization and diversity of rhizobia associated with native and introduced acacias in arid and semi-arid regions in Algeria. **FEMS microbiology ecology**, v. 80, n. 3, p. 534-547, 2012.

BRASIL. Instrução normativa nº 13, de 24 de março de 2011. Aprova as normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura, bem como as relações dos micro-organismos autorizados e recomendados para produção de inoculantes no Brasil, na forma dos Anexos I, II e III, desta Instrução. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 25 mar. 2011. Seção 1, p. 3-7.

BROCKWELL, J.; MITCHELL, P. A.; SEARLE, S. D.; LEACH, M. A.; CREWS, T. E. Direct benefits of rhizobial inoculation to *Acacia mearnsii* De Wild, as tubed stock and in a plantation, and synergistic benefits to interplanted *Eucalyptus nitens* (Deane & Maiden) Maiden. **Australian forestry**, v. 74, n. 2, p. 120-132, 2011. <https://doi.org/10.1080/00049158.2011.10676354>

CHAN, J. M.; DAY, P.; FEELY, J.; THOMPSON, R.; LITTLE, K. M.; NORRIS, C. H. *Acacia mearnsii* industry overview: current status, key research and development issues. **Southern Forests: a Journal of Forest Science**, v. 77, n. 1, p. 19-30, 2015. <https://doi.org/10.2989/20702620.2015.1006907>

COSTA, R. B.; DE ARRUDA, E. J.; DE OLIVEIRA, L. C. S. Sistemas agrossilvipastoris como alternativa sustentável para a agricultura familiar. **Interações**, Campo Grande, v. 3, n. 5, p. 25-32, 2016. <http://dx.doi.org/10.20435/interações.v3i5.567>

CRISÓSTOMO, J. A.; RODRÍGUEZ-ECHEVERRÍA, S.; FREITAS, H. Co-introduction of exotic rhizobia to the rhizosphere of the invasive legume *Acacia saligna*, an intercontinental study. **Applied Soil Ecology**, v. 64, p. 118-126, 2013.

DALGAARD, T.; HUTCHINGS, N. J.; PORTER, J. R. Agroecology, scaling and interdisciplinarity. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 100, n. 1, p. 39-51, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(03\)00152-X](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(03)00152-X)

DIOUF, D.; SAMBA-MBAYE, R.; LESUEUR, D.; BA, A. T.; DREYFUS, B.; DE LAJUDIE, P.; NEYRA, M. Genetic diversity of *Acacia seyal* Del. rhizobial populations indigenous to Senegalese soils in relation to salinity and pH of the sampling sites. **Microbial ecology**, v. 54, n. 3, p. 553-566, 2007.

DREYFUS, B. L.; DOMMERGUES, Y. R. Nodulation of *Acacia* species by fast-and slow-growing tropical strains of *Rhizobium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 97-99. 1981.

DWIVEDI, S. L.; SAHRAWAT, K. L.; UPADHYAYA, H. D.; MENGONI, A.; GALARDINI, M.; BAZZICALUPO, M.; BIONDI, E. G.; HUNGRIA, M.; KASCHUK, G.; BLAIR, M. W.; ORTIZ, R. Advances in host plant and *Rhizobium* genomics to enhance symbiotic nitrogen fixation in grain legumes. **Advances in Agronomy**, v. 129, p. 1-116, 2015. 10.1016/bs/agron.2014.09.001

EHRENBERGEROVÁ, L.; CIENCIALA, E.; KUČERA, A.; GUY, L.; HABROVÁ, H. Carbon stock in agroforestry coffee plantations with different shade trees in Villa Rica, Peru. **Agroforestry Systems**, v. 90, n. 3, p. 433-445, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10457-015-9865-z>

EPRON, D., NOUVELLON, Y., MARESCHAL, L., E MOREIRA, R. M., KOUTIKA, L. S., GENESTE, B., DELGADO-ROJAS, J. S., LACLAU, J. P., SOLA, G., GONÇALVES, J. L. M. & BOUILLET, J. P. Partitioning of net primary production in Eucalyptus and *Acacia* stands and in mixed-species plantations: two case-studies in contrasting tropical environments. **Forest ecology and management**, v. 301, p. 102-111, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2012.10.034>

FARRAR, K.; BRYANT, D.; COPE-SELBY, N. Understanding and engineering beneficial plant–microbe interactions: plant growth promotion in energy crops. **Plant biotechnology journal**, v. 12, n. 9, p. 1193-1206, 2014. 1193-1206. 10.1111/pbi.12279

FAYE, A.; SALL, S.; CHOTTE, J. L.; LESUEUR, D. Soil bio-functioning under *Acacia nilotica* var. *tomentosa* protected forest along the Senegal River. **Nutrient cycling in agroecosystems**, v. 79, n. 1, p. 35-44, 2007.

FISHER, R. F.; BINKLEY, D. **Ecology and Management of Forest Soils**. John Wiley & Sons. 10 New York; Chichester, 2000.

FLEIG, F. D.; SCHNEIDER, P. R.; BRUM, E. T. Análise econômica dos sistemas de produção com acácia-negra (*Acacia mearnsii* de Wild.) no Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, v. 3, n. 1, p. 203-240, 1993. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20140114>

FIKRI-BENBRAHIM, K.; CHRABI, M.; LEBRAZI, S.; MOUMNI, M.; ISMAILI, M. Phenotypic and Genotypic Diversity and Symbiotic Effectiveness of *Rhizobia* Isolated from *Acacia* sp. Grown in Morocco. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 19, n. 1, p. 201-216, 2017.

FORRESTER, D. I.; BAUHUS, J.; COWIE, A. L. Nutrient cycling in a mixed-species plantation of *Eucalyptus globulus* and *Acacia mearnsii*. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 35, n. 12, p. 2942-2950, 2005. <https://doi.org/10.1139/x05-214>

FORRESTER, D. I.; COWIE, A. L.; BAUHUS, J.; WOOD, J. T.; FORRESTER, R. I. Effects of Changing the Supply of Nitrogen and Phosphorus on Growth and Interactions between *Eucalyptus globulus* and *Acacia mearnsii* in a Pot trial. **Plant and soil**, v. 280, n. 1, p. 267-277, 2006a. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-3228-x>

FORRESTER, D. I.; BAUHUS, J.; COWIE, A. L. Carbon allocation in a mixed-species plantation of *Eucalyptus globulus* and *Acacia mearnsii*. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 233, n. 2/3, p. 275-284, 2006b. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2006.05.018>

FORRESTER, D. I.; BAUHUS, J.; COWIE, A. L.; VANCLAY, J. K. Mixed-species plantations of Eucalyptus with nitrogen-fixing trees: a review. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 233, n. 2/3, p. 211-230, 2006c. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2006.05.012>

FORRESTER, D. I.; SCHORTEMAYER, M.; STOCK, W. D.; BAUHUS, J., KHANNA, P. K.; COWIE, A. L. Assessing nitrogen fixation in mixed-and single-species plantations of *Eucalyptus globulus* and *Acacia mearnsii*. **Tree Physiology**, v. 27, n. 9, p. 1319-1328, 2007. <https://doi.org/10.1093/treephys/27.9.1319>

FORRESTER, D. I.; VANCLAY, J. K.; FORRESTER, R. I. The balance between facilitation and competition in mixtures of Eucalyptus and Acacia changes as stands develop. **Oecologia**, v. 166, n. 1, p. 265-272, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00442-011-1937-9>

FORRESTER, D. I.; ALBRECHT, A. T. Light absorption and light-use efficiency in mixtures of *Abies alba* and *Picea abies* along a productivity gradient. **Forest ecology and management**, v. 328, p. 94-102, 2014a. [10.1016/j.foreco.2014.05.026](https://doi.org/10.1016/j.foreco.2014.05.026)

FORRESTER, D. I. The spatial and temporal dynamics of species interactions in mixed-species forests: from pattern to process. **Forest Ecology and Management**, v. 312, p. 282-292, 2014b. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2013.10.003>

FORRESTER, D. I. Transpiration and water-use efficiency in mixed-species forests versus monocultures: effects of tree size, stand density and season. **Tree physiology**, v. 35, n. 3, p. 289-304, 2015. [10.1093/treephys/tpv011](https://doi.org/10.1093/treephys/tpv011)

FORRESTER, D. I.; PRETZSCH, H. Tamm review: on the strength of evidence when comparing ecosystem functions of mixtures with monocultures. **Forest Ecology and Management**, v. 356, p. 41-53, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2015.08.016>

FORRESTER, D. I.; BAUHUS, J. A review of processes behind diversity—productivity relationships in forests. **Current Forestry Reports**, v. 2, n. 1, p. 45-61, 2016. <https://doi.org/10.1007/s40725-016-0031-2>

FORRESTER, D. I. Ecological and Physiological Processes in Mixed Versus Monospecific Stands. **Mixed-Species Forests**. Springer Berlin Heidelberg. p. 73-115, 2017. [10.1007/978-3-662-54553-9](https://doi.org/10.1007/978-3-662-54553-9)

FORRESTER, D. I.; AMMER, C.; ANNIGHÖFER, P. J.; BARBEITO, I.; BIELAK, K.; BRAVO-OVIEDO, A.; COLL, L.; DEL RÍO, M.; DRÖSSLER, L.; HEYM, M.; HURT, V.; LÖF, M.; DEN OUDEN, J.; PACH, M.; PEREIRA, M. G.; PLAGA, B. N. E.; PONETTE, Q.; SKRZYSZEWSKI, J.; STERBA, H.; SVOBODA, M.; ZLATANOV, T. M.; PRETZSCH, H. Effects of crown architecture and stand structure on light absorption in mixed and monospecific *Fagus sylvatica* and *Pinus sylvestris* forests along a productivity and climate gradient through Europe. **Journal of Ecology**. p. 1-15. 2017. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12803>

FRANCIS, C.; LIEBLEIN, G.; GLIESSMAN, S.; BRELAND, T. A.; CREAMER, N.; HARWOOD, R.; SALOMONSSON, L.; HELENIUS, J.; RICKERL, D.; SALVADOR, R.; WIEDENHOEFT, M.; SIMMONS, S.; ALLEN, P.; ALTERI, M.; FLORA, C.; POINCELOT, R. Agroecology: the ecology of food systems. **Journal of sustainable agriculture**, v. 22, n. 3, p. 99-118, 2003. 99-118. [https://doi.org/10.1300/J064v22n03\\_10](https://doi.org/10.1300/J064v22n03_10)

FREITAS, E. C. S.; OLIVEIRA-NETO, S. N.; FONSECA, D. M.; SANTOS, M. V.; LEITE, H. G.; MACHADO, V. M. Deposição de serapilheira e de nutrientes no solo em sistema agrossilvipastoril com eucalipto e acácia. **Árvore**, v. 37, p. 409-417, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622013000300004>

FREITAS COELHO, S. R.; GONÇALVES, J. L. M.; MELLO, S. L. M.; MOREIRA, R. M.; SILVA, E. V.; LACLAU, J. P. Crescimento, nutrição e fixação biológica de nitrogênio em plantios mistos de eucalipto e leguminosas arbóreas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 6, p. 759-768, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2007000600001>

FROUFE, L. C. M.; RACHWAL, M. F. G.; SEOANE, C. E. S. Potencial de sistemas agroflorestais multiestrata para sequestro de carbono em áreas de ocorrência de Floresta Atlântica. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 31, n. 66, p. 143, 2011. [10.4336/2011.pfb.31.66.143](https://doi.org/10.4336/2011.pfb.31.66.143)

GALLOWAY, J. N.; TOWNSEND, A. R.; ERISMAN, J. W.; BEKUNDA, M.; CAI, Z.; FRENEY, J. R.; MARTINELLI, L. A.; SEITZINGER, S. P.; SUTTON, M. A. Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. **Science**, v. 320, n. 5878, p. 889-892, 2008. [10.1126/science.1136674](https://doi.org/10.1126/science.1136674)

GODOI, S. G.; NEUFELD, A. D. H.; IBARR, M. A.; FERRETO, D. O. C.; BAYER, C.; LORENTZ, L. H.; VIEIRA, F. C. B. The conversion of grassland to acacia forest as an effective option for net reduction in greenhouse gas emissions. **Journal of Environmental Management**, v. 169, p. 91-102, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.11.057>

GRUBER, N.; GALLOWAY, J. N. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. **Nature**, v. 451, n. 7176, p. 293-296, 2008. <https://doi.org/10.1038/nature06592>

HENTZ, P.; CARVALHO, N. L.; LUZ, L. V.; BARCELLOS, A. L. Ciclagem de nitrogênio em sistemas de integração lavoura-pecuária. **Ciência e Natura**, v. 36, p. 663, 2014. 10.5902/2179460X12629

HOQUE, M. S.; BROADHURST, L. M.; THRALL, P. H. Genetic characterization of root-nodule bacteria associated with *Acacia salicina* and *A. stenophylla* (Mimosaceae) across south-eastern Australia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 299-309, 2011.

HUANG, X.; LIU, S.; WANG, H.; HU, Z.; LI, Z.; YOU, Y. Changes of soil microbial biomass carbon and community composition through mixing nitrogen-fixing species with *Eucalyptus urophylla* in subtropical China. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 73, p. 42-48, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.01.021>

HUNGRIA, M.; LOUREIRO, M. F.; MENDES, I. C.; CAMPO, R. J.; GRAHAM, P. H. Inoculant preparation, production and application. In: WERNER, D.; NEWTON, W. E. (Org) **Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment**. Dordrecht, Amsterdam: pp. 223-253, 2005.

IBA- Indústria Brasileira de Árvores (IBA). Relatório 2017. Disponível em: [http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA\\_RelatorioAnual2017.pdf](http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2017.pdf). Acesso em: 29/08/2015.

KASCHUK, G.; KUYPER, T. W.; LEFFELAAR, P. A.; HUNGRIA, M.; GILLER, K. E. Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses? **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, p. 1233-1244, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.03.005>

KASCHUK, G.; YIN, X.; HUNGRIA, M.; LEFFELAAR, P. A.; GILLER, K. E.; KUYPER, T. W. Photosynthetic adaptation of soybean due to varying effectiveness of N<sub>2</sub> fixation by two distinct *Bradyrhizobium japonicum* strains. **Environmental and Experimental Botany**, v. 76, p. 1-6. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.10.002>

KASCHUK, G.; NOGUEIRA, M. A.; LUCA, M. J.; HUNGRIA, M. Response of determinate and indeterminate soybean cultivars to basal and topdressing N fertilization compared to sole inoculation with *Bradyrhizobium*. **Field Crops Research**, v. 195, p. 21-27, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2016.05.010>

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M. Diversity and Importance of Diazotrophic Bacteria to Agricultural Sustainability in the Tropics. In: **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**. Springer International Publishing. p. 269-292, 2017. 10.1007/978-3-319-55804-2\_12

KHANNA, P. K. Comparison of growth and nutrition of young monocultures and mixed stands of *Eucalyptus globulus* and *Acacia mearnsii*. **Forest Ecology and Management**, v. 94, n. 1/3, p. 105-113, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(96\)03971-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(96)03971-0)

KLEINPAUL, I. S. Plantio misto de *Eucalyptus urograndis* e *Acacia mearnsii* em sistema agroflorestal. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. p. 88, 2008.

KLEINPAUL, I. S.; SCHUMACHER, M. V.; VIERA, M.; NAVROSKI, M. C. Plantio misto de *Eucalyptus urograndis* e *Acacia mearnsii* em sistema agroflorestal: I- Produção de biomassa. **Ciência Florestal**, v. 20, n. 4, p. 621-627, 2010. <http://dx.doi.org/10.5902/198050982420>

LAFAY, B.; BURDON, J. J. Small-subunit rRNA genotyping of rhizobia nodulating Australian *Acacia* spp. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 1, p. 396-402, 2001. 10.1128/AEM.67.1.396-402.2001

LAWRIE, A. C. Nitrogen fixation by native Australian legumes. **Australian Journal of Botany**, v. 29, n. 2, p. 143-157, 1981.

LE ROUX, J. J.; MAVENGERE, N. R.; ELLIS, A. G. The structure of legume–rhizobium interaction networks and their response to tree invasions. **AoB Plants**, v. 8, p 1-14, 2016. 10.1093/aobpla/plw038

LEYRER, A. Akazienanbau in Rio Grande do Sul-Sudbrasilien. **Unveröffentlichte Diplomarbeit am Frachbereich Forstwirtschaft der Fachhochschule Weihenstephan**, p. 134. 1987.

LI, Z. A.; PENG, S. L.; RAE, D. J.; ZHOU, G. Y. Litter decomposition and nitrogen mineralization of soils in subtropical plantation forests of southern China, with special attention to comparisons between legumes and non-legumes. **Plant and Soil**, v. 229, n. 1, p. 105-116, 2001. <https://doi.org/10.1023/A:1004832013143>

LLORET, L.; ORMENO-ORRILLO, E.; RINCON, R.; MARTÍNEZ-ROMERO, J.; ROGEL-HERNÁNDEZ, M. A.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Ensifer mexicanus* sp. nov. a new species nodulating *Acacia angustissima* (Mill.) Kuntze in Mexico. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 30, n. 4, p. 280-290, 2007.

LU, J. K.; DOU, Y. J.; ZHU, Y. J.; WANG, S. K.; SUI, X. H.; KANG, L. H. *Bradyrhizobium ganzhouense* sp. nov., an effective symbiotic bacterium isolated from *Acacia melanoxylon* R. Br. nodules. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, pt. 6, p. 1900, 2014.

MAY, B. M.; ATTIWILL, P., M. Nitrogen-fixation by *Acacia dealbata* and changes in soil properties 5 years after mechanical disturbance or slash-burning following timber harvest. **Forest Ecology Management**. v. 181, p. 339-355, 2003.

MENNA, P; HUNGRIA, M. Phylogeny of nodulation and nitrogen-fixation genes in *Bradyrhizobium*: supporting evidence for the theory of monophyletic origin, and

spread and maintenance by both horizontal and vertical transfer. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 3052-3067, 2011. <http://dx.doi.org/10.1099/ijms.0.028803-0>

MOCHIUTTI, S.; HIGA, A. R.; SIMON, A. A. Susceptibilidade de ambientes campestres à invasão de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.) no Rio Grande do Sul. **Floresta**, v. 37, p. 239-253, 2007. <http://dx.doi.org/10.5380/rf.v37i2.8654>

MONTEIRO, P. E. R., WINAGRASKI, E., KASCHUK, G., GAIAD, S., MARQUES, R., AUER, C. G. Responses of *Eucalyptus benthamii* seedlings to the application of the organic fertilizer Bacsol. **Bosque**, v. 38, p. 507-513, 2017. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002017000300008>

NAIR, P. K. R.; FERNANDES, E. C. M.; WAMBUGU, P. N. Multipurpose leguminous trees and shrubs for agroforestry. **Agroforestry systems**, v. 2, n. 3, p. 145-163, 1984. <https://doi.org/10.1007/BF00147030>

NGOM, A.; NAKAGAWA, Y.; SAWADA, H.; TSUKAHARA, J.; WAKABAYASHI, S.; UCHIUMI, T.; ABE, M. A novel symbiotic nitrogen-fixing member of the Ochrobactrum clade isolated from root nodules of *Acacia mangium*. **The Journal of general and applied microbiology**, v. 50, n. 1, p. 17-27, 2004.

NICHOLS, J. D.; ROSEMEYER, M. E.; CARPENTER, F. L.; KETTLER, J. Intercropping legume trees with native timber trees rapidly restores cover to eroded tropical pasture without fertilization. **Forest Ecology and Management**, v. 152, n. 1, p. 195-209, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(00\)00603-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(00)00603-4)

NYGREN, P.; FERNÁNDEZ, M. P.; HARMAND, J. M.; LEBLANC, H. A. Symbiotic dinitrogen fixation by trees: an underestimated resource in agroforestry systems? **Nutrient cycling in agroecosystems**, v. 94, n. 2-3, p. 123-160, 2012. [10.1007/s10705-012-9542-9](https://doi.org/10.1007/s10705-012-9542-9)

OLDROYD, G. E.; MURRAY, J. M.; POOLE, P. S.; DOWNIE, J. A. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. **Annual Review of Genetics**, 154, p. 1541–1548, 2011. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132549>

OLIVEIRA, H. **A Acácia-negra e tanino no Rio Grande do Sul**. Associação Brasileira de Acacicultores. Canoas: La Salle. 1968.

ORCHARD, E. R.; DARBY, G. D. **Fertility changes under continued wattle culture with special reference to nitrogen fixation and base status of the soil**. In: Proceedings 6th International Soil Congress, Paris, 4, p. 305–310, 1956.

OREFICE, J.; SMITH, R. G.; CARROLL, J.; ASBJORNSEN, H.; KELTING, D. Soil and understory plant dynamics during conversion of forest to silvopasture, open pasture, and woodlot. **Agroforestry Systems**, v. 91, n. 4, p. 729-739, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10457-016-0040-y>

ORLANDI, T.; KOZLOSKI, G. V.; ALVES, T. P., MESQUITA, F. R.; ÁVILA, S. C. Digestibility, ruminal fermentation and duodenal flux of amino acids in steers fed

grass forage plus concentrate containing increasing levels of *Acacia mearnsii* tannin extract. **Animal Feed Science and Technology**, v. 210, p. 37-45, 2015.

PILUZZA, G.; SULAS, L.; BULLITTA, S. Tannins in forage plants and their role in animal husbandry and environmental sustainability: a review. **Grass and Forage Science**, v. 69, n. 1, p. 32-48, 2014.

PIOTTO, D. A Meta-analysis comparing tree growth in monocultures and mixed plantations. **Forest Ecology and Management**, v. 255, n. 3/4, p. 781-786, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2007.09.065>

PRETZSCH H.; FORRESTER D. I. Stand Dynamics of Mixed-Species Stands Compared with Monocultures. In: PRETZSCH H.; FORRESTER D.; BAUHUS J. (eds) **Mixed-Species Forests**. Springer, Berlin, Heidelberg. p. 117-209, 2017. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-54553-9\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-662-54553-9_4)

RACHWAL, M. F. G.; CURCIO, G. R.; DEDECEK, R. A. A influência das características pedológicas na produtividade de acácia-negra (*Acacia mearnsii*), Butiá, RS. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 56, p. 53-62, 2008.

RAMACHANDRAN NAIR, P. K.; MOHAN KUMAR, B.; NAIR, V. D. Agroforestry as a strategy for carbon sequestration. **Journal of plant nutrition and soil science**, v. 172, n. 1, p. 10-23, 2009. <https://doi.org/10.1002/jpln.200800030>

RASMUSSEN, L. V.; BIERBAUM, R.; OLDEKOP, J. A.; AGRAWAL, A. Bridging the practitioner-researcher divide: Indicators to track environmental, economic, and sociocultural sustainability of agricultural commodity production. **Global Environmental Change**, v. 42, p. 33-46, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2016.12.001>

RIOFRÍO, J.; DEL RÍO, M.; BRAVO, F. Mixing effects on growth efficiency in mixed pine forests. **Forestry: An International Journal of Forest Research**, v. 90, n. 3, p. 381-392, 2017. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpw056>

RIRA, M.; MORGAVI, D. P.; ARCHIMÈDE, H.; MARIE-MAGDELEINE, C.; POPOVA, M.; BOUSSEBOUA, H.; DOREAU, M. Potential of tannin-rich plants for modulating ruminal microbes and ruminal fermentation in sheep. **Journal of animal science**, v. 93, n. 1, p. 334-347, 2015. [10.2527/jas.2014-7961](https://doi.org/10.2527/jas.2014-7961)

RODRÍGUEZ-ECHEVERRÍA, S.; LE ROUX, J. J.; CRISÓSTOMO, J. A.; NDLOVU, J. Jack-of-all-trades and master of many? How does associated rhizobial diversity influence the colonization success of Australian *Acacia* species? **Diversity and Distributions**, v. 17, n. 5, p. 946-957, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2011.00787.x>

ROSENSTOCK, T. S.; TULLY, K. L.; ARIAS-NAVARRO, C.; NEUFELDT, H.; BUTTERBACH-BAHL, K.; VERCHOT, L. V. Agroforestry with N<sub>2</sub>-fixing trees: sustainable development's friend or foe? **Current Opinion in Environmental Sustainability**, v. 6, p. 15-21, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cosust.2013.09.001>

SAMPAIO DE FREITAS, E. C.; NOLASCO DE OLIVEIRA NETO, S.; MIRANDA DA FONSECA, D.; VITÓRIA SANTOS, M., GARCIA LEITE, H.; DINIZ MACHADO, V. Deposição de serapilheira e de nutrientes no solo em sistema agrossilvipastoril com eucalipto e acácia. **Revista Árvore**, v. 37, n. 3, p. 409-417, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622013000300004>

SANTOS, F. E. M.; SOBROSA, R. C.; COSTA, I. F. D.; CORDER, M. P. M. Detecção de fungos patogênicos em sementes de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild). **Ciência Florestal**, v. 11, n. 1, p. 13-20, 2001. <http://dx.doi.org/10.5902/19805098491>

SANTOS, F. M.; CHAER, G. M.; DINIZ, A. R.; DE CARVALHO BALIEIRO, F. Nutrient cycling over five years of mixed-species plantations of Eucalyptus and Acacia on a sandy tropical soil. **Forest Ecology and Management**, v. 384, p. 110-121, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2016.10.041>

SCHUMACHER, M. V.; VIERA, M.; LONDERO, E. K.; CALIL, F. N.; LOPES, V. G.; WITSCHORECK, R. Crescimento da acácia-negra em resposta à aplicação de nitrogênio, fósforo e potássio. **Cerne**, v. 19, p. 51-58, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-77602013000100007>

SAKROUHI, I.; BELFQUIH, M.; SBABOU, L.; MOULIN, P.; BENA, G.; FILALI-MALTOUF, A.; LE QUÉRÉ, A. Recovery of symbiotic nitrogen fixing acacia rhizobia from Merzouga Desert sand dunes in South East Morocco—Identification of a probable new species of Ensifer adapted to stressed environments. **Systematic and applied microbiology**, v. 39, n. 2, p. 122-131, 2016.

SIDDIQUE, I.; ENGEL, V. L.; PARROTTA, J. A.; LAMB, D.; NARDOTO, G. B.; OMETTO, J. P.; MARTINELLI, L. A.; SCHMIDT, S. Dominance of legume trees alters nutrient relations in mixed species forest restoration plantings within seven years. **Biogeochemistry**, v. 88, n. 1, p. 89-101, 2008. [10.1007/s10533-008-9196-5](https://doi.org/10.1007/s10533-008-9196-5)

SILVA, C. F.; MARTINS, M. A.; SILVA, E. M. R.; PEREIRA, M. G.; CORREIA, M. E. F. Influência do sistema de plantio sobre atributos dendrométricos e fauna edáfica, em área degradada pela extração de argila. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 37, n. 6, p. 1742-1751, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832013000600030>

SILVA, F. C. L.; DE FARIAS, J. A. Análise econômica da produção de *Acacia mearnsii* De Wild e carvão vegetal no Vale do Caí e Taquari, Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 45, n. 5, p. 927-932, 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20140114>

SILVA, E.M.R.; DÖBEREINER, J. O papel das leguminosas no reflorestamento. In: **SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS**, 7., Curitiba, 1982. Associações biológicas entre espécies florestais e microorganismos para aumento da produtividade econômica dos reflorestamentos; anais. Curitiba: EMBRAPA; URPFCs, 1982. p.33-52

SILVESTER, W. B. Analysis of N<sub>2</sub> fixation. In: GORDON, J. C.; WHEELER, C. T. (eds) **Biological Nitrogen Fixation in Forest Ecosystems: Foundations and Applications**, Martinus Nijhoff, Boston, p.172-212, 1983.

SIMON, A. A. A cadeia produtiva da acácia-negra, aspectos econômicos, sociais e ambientais. In: STROHSCHOEN, A. G.; REMPEL, C. **Reflorestamento e recuperação ambiental: Ambiente e tecnologia: desenvolvimento sustentável em foco**. Lajeado: Univates, p. 149 – 166, 2005.

SOUZA CASTILHOS, Z. M.; BARRO, R. S.; SAVIAN, J. F.; DO AMARAL, H. R. B. Produção Arbórea e Animal em Sistema Silvopastoril com Acácia-negra (*Acacia mearnsii*). **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 60, p. 39-47, 2009. 10.4336/2009.pfb.60.39

SPRENT, J. I. **Legume Nodulation: A global perspective**. Wiley-Blackell, pp. 183, 2009.

TANAC S. A. **Cultura da Acácia Negra: Cartilha de Recomendações Técnicas**. Disponível em: <  
[https://www.tanac.com.br/sites/default/files/certificados/Recomendacoes\\_tecnicas.pdf](https://www.tanac.com.br/sites/default/files/certificados/Recomendacoes_tecnicas.pdf)> Acessado em: 20/08/2018.

TCHICHELLE, S. V.; MARESCHAL, L.; KOUTIKA, L. S.; EPRON, D. Biomass production, nitrogen accumulation and symbiotic nitrogen fixation in a mixed-species plantation of eucalypt and acacia on a nutrient-poor tropical soil. **Forest Ecology and Management**, v. 403, p. 103-111, 2017. 10.1016/j.foreco.2017.07.041

THRALL, P. H.; MURRAY, B. R.; WATKIN, E. L. J.; WOODS, M. J.; BAKER, K.; BURDON, J. J.; BROCKWELL, J. Bacterial partnerships enhance the value of native legumes in rehabilitation of degraded agricultural lands. **Ecological Management and Restoration**, v. 2, p. 233-235, 2001.

THRALL, P. H.; MILLSOM, A. C.; JEAUVONS, A. C.; WAAYERS, M.; HARVEY, G. R.; BAGNALL, D. J.; BROCKWELL, J. Seed inoculation with effective root-nodule bacteria enhances revegetation success. **Journal of Applied Ecology**, v. 42, p. 740-751, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2005.01058.x>

TYE, D.R.C.; DRAKE, D.C. An exotic Australian Acacia fixes more N than a coexisting indigenous Acacia in South Africa riparian zone. **Plant Ecology**, v. 213, n. 2, p. 251-257, 2012. 10.1007/s11258-011-9971-6

VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; SCHOLLES, D.; SILVEIRA, J. R. P.; JUNG, G. C.; GRANADA, C. E.; NEVES, A. G.; BRAGA, M. M.; NEGREIROS, T. Genetic diversity and symbiotic efficiency of black wattle-nodulating rhizobia in soils of Rio Grande do Sul State, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, n. 4, p. 647-654, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832007000400005>

VEZZANI, F. M.; TEDESCO, M. J.; BARROS, N. F. Alterações dos nutrientes no solo e nas plantas em consórcio de eucalipto e acácia negra. **Revista Brasileira**

*de Ciencia do Solo*, v. 25, n. 1, p. 225-231, 2001.  
<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832001000100024>

VITOUSEK, P. M.; ABER, J. D.; HOWARTH, R. W.; LIKENS, G. E.; MATSON, P. A.; SCHINDLER, D. W.; SCHLESINGER, W. H.; TILMAN, D. Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. **Ecological Applications**, v. 7, n. 3, p. 737-750, 1997. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(1997\)007\[0737:HAOTGN\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(1997)007[0737:HAOTGN]2.0.CO;2)

WEI, C.; YANG, K.; ZHAO, G.; LIN, S.; XU, Z. Effect of dietary supplementation of gallic acid on nitrogen balance, nitrogen excretion pattern and urinary nitrogenous constituents in beef cattle. **Archives of Animal Nutrition**, v. 70, n. 5, p. 416-423, 2016.

## CAPÍTULO 2 - PROTOCOLO PARA CRESCIMENTO DE ISOLADOS BACTERIANOS DE NÓDULOS DE *Acacia mearnsii* DE WILD E EFICIÊNCIA NA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO

### RESUMO

Alguns grupos de bactérias rizosféricas apresentam capacidade de realizar a solubilização do fosfato no solo. Entretanto, a pesquisa com bactérias necessita de protocolos para prevenir a presença de fungos contaminantes, durante a fase de avaliação da capacidade de solubilização de fosfato *in vitro*, pois os tais fungos podem afetar a eficiência do protocolo adotado. Por esse motivo, o presente capítulo teve como objetivo: 1- estabelecer um protocolo para determinar um meio de cultura e a dosagem de cicloheximida para o crescimento de isolados bacterianos capazes de solubilizar o fosfato e reduzir a contaminação fúngica; e 2 – avaliar a eficiência de diferentes isolados bacterianos na solubilização de fosfato. Foram realizados três ensaios para avaliar a frequência fúngica, grau de contaminação e o índice de solubilização médio (ISM), durante o período de incubação. Os ensaios foram realizados em delineamento de blocos ao acaso. O primeiro em parcelas subdivididas no tempo, com o uso de dez isolados obtidos de nódulos de *Acacia mearnsii*, submetidos a cinco diferentes dosagens de cicloheximida (0; 25; 50; 75 e 100 mg.L<sup>-1</sup>). O segundo observando o crescimento dos mesmos isolados em cada meio de cultura e o terceiro para determinar o melhor isolado quanto a solubilização quando comparado aos isolados indicados para a cultura. As avaliações de contaminantes ocorreram diariamente, enquanto que as mensurações do crescimento ocorreram aos 3, 5 e 7 dias de incubação. O cálculo do índice de solubilização médio (ISM) resultou da razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia, os resultados foram submetidos ao teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). As melhores bactérias que promoveram maior solubilização foram CNPF01F, CNPF01G, CNPF10B1. A partir dos resultados, recomenda-se o meio adaptado de Verma et al. (2001) contendo entre 50 e 75mg.L<sup>-1</sup> de cicloheximida como protocolo para avaliação de bactérias solubilizadoras de fosfato.

**Palavras-chave:** Fósforo. Meio de cultura. Bactéria.

## PROTOCOL FOR GROWTH AND SOLUBILIZATION OF PHOSPHATE WITH BACTERIAL ISOLATES FROM NODULES OF *ACACIA MEARNsii*

### ABSTRACT

Some groups of rhizospheric bacteria have the capacity to perform phosphate solubilization in the soil. However, bacterial research requires protocols to prevent the presence of contaminating fungi, during the evaluation phase of phosphate solubilization *in vitro*, because fungi can affect the efficiency of the protocol adopted. The aim of this chapter was to establish a protocol for determining a culture medium and the dosage of cycloheximide for the growth of bacterial isolates capable of solubilizing phosphate and reducing fungal contamination; and 2 - to evaluate the efficiency of different bacterial isolates in phosphate solubilization. Three experiments were carried out to evaluate the fungal frequency, degree of contamination and the mean solubility index (ISM), during the incubation period. The tests were carried out in a randomized block design. The first was divided in time, using ten isolates obtained from nodules of *Acacia mearnsii*, submitted to five different doses of cycloheximide (0, 25, 50, 75 and 100 mg.L<sup>-1</sup>). The second observing the growth of the same isolates in each culture medium and the third to determine the best isolate for solubilization when compared to the isolates indicated for culture. Contaminant evaluations occurred daily, while growth measurements occurred at 3, 5 and 7 days of incubation. The calculation of the mean solubility index (ISM) resulted from the ratio between the diameter of the halo and the diameter of the colony, the results were submitted to the Tukey test ( $p < 0.05$ ). The best bacteria that promoted higher solubilization were CNPF01F, CNPF01G, CNPF10B1. From the results, the adapted medium of Verma et al. (2001) containing between 50 and 75mg.L<sup>-1</sup> cycloheximide as a protocol for the evaluation of phosphate solubilizing bacteria.

**Keywords:** Phosphorus, culture medium, bacteria;

## 1. INTRODUÇÃO

A disponibilidade de fósforo (P) na maioria dos solos brasileiros é baixa, tornando o elemento um fator limitante da produção agrícola e florestal (VALADARES et al., 2015; DIAS et al., 2015). Tal fato, leva por vezes ao uso excessivo de adubação ou mau planejamento da aplicação de fertilizantes químicos nas culturas florestais, à base deste elemento (MASSENSINI et al., 2008). A fertilização química com P quando realizada de forma inadequada eleva a taxa do nutriente no solo, mas as fontes fosfatadas encontram-se em formas indisponíveis geralmente imobilizada por cátions de  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$  e  $\text{Al}^{+3}$ , ou seja, esses fertilizantes são lentamente disponibilizados para as plantas (CHAGAS JUNIOR et al., 2010).

Os microrganismos do solo apresentam função-chave na relação entre solo-planta. Dentre as populações microbianas do solo, existem as bactérias capazes de solubilizar e mineralizar P, a partir de fontes orgânicas e inorgânicas em formas solúveis disponíveis para as plantas através da secreção de ácidos orgânicos ou de fosfatases (SOUCHIER, 2005; CHAGAS JUNIOR et al., 2010; MOREIRA e ARAUJO, 2013).

Entre os diferentes grupos de bactérias do solo, as espécies que tem capacidade comprovada na solubilização do fosfato pertencem aos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* e *Rhizobium*, além de fungos de solo pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (SOUCHIER, 2005; MOREIRA e ARAUJO, 2013).

Os isolados que possuem capacidade de solubilizar P de maneira eficiente podem ser identificados em laboratório. Os isolados obtidos do solo, rizosfera ou nódulo são submetidos a testes de crescimento em diferentes meios de cultura com fosfato (SOUCHIER, 2005; CHAGAS JUNIOR et al., 2010). Após o período de desenvolvimento ou incubação forma-se um halo em volta da colônia crescida considerando que a estirpe é capaz de solubilizar o fosfato de maneira positiva (BAHADIR; LIAQAT; ELTEM, 2018).

Os testes laboratoriais de solubilização de fosfato podem ser realizados por diversos métodos. O teste usual aplicado no Laboratório de Biologia do Solo da UFPR é uma adaptação do método de Sylvester-Bradley (1982), com o acréscimo

de extrato de levedura. Entretanto, esse meio pode apresentar altas taxas de contaminação por fungos (de 80 a 90% - dados não publicados), o que dificulta a avaliação da solubilização do fosfato pela bactéria. Por esse motivo, torna-se necessário buscar alternativas para controlar essa contaminação do meio através de adaptação metodológica.

A cicloheximida é um composto inibidor da síntese de proteínas em eucariotos produzidas por bactérias do gênero *Streptomyces*, geralmente aplicada para o controle de organismos contaminantes. Na microbiologia agrícola, a contagem de bactérias pelo método da semeadura em superfície utiliza o meio de cultivo de Thorton na dosagem de 40 mg.L<sup>-1</sup> para controlar o crescimento de fungos contaminantes (PARKINSON et al., 1971). Trabalhos desenvolvidos para a determinação de bactérias solubilizadoras na área das Ciências Agrárias também tem utilizado a metodologia de Verma et al. (2001) adaptada com o acréscimo de uma fonte de fosfato insolúvel na composição final.

O objetivo do presente capítulo foi determinar o crescimento e a eficiência na solubilização de fosfato de isolados bacterianos aplicados em dois métodos de cultivo e diferentes dosagens de cicloheximida para o controle de fungos contaminantes, afim de estabelecer um protocolo final.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Biologia do Solo, no Departamento de Solos e Engenharia Agrícola da Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR. Foram realizados três ensaios: os dois primeiros para avaliação de isolados bacterianos solubilizadores de fosfato e o controle de fungos contaminantes com diferentes dosagens de cicloheximida que variaram de 0; 25; 50; 75 e 100 mg.L<sup>-1</sup> de meio de cultura:

Ensaio 1 – constituído pelo meio de cultivo GES de Sylvester-Bradley et al. (1982) com adaptações: 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose; 0,5 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura; 0,1 g.L<sup>-1</sup> de KNO<sub>3</sub>; 15 g.L<sup>-1</sup> de ágar; 10 ml.L<sup>-1</sup> de Fe-EDTA (para obter esse composto foi realizada a dissolução de 3,72 g de Fe-EDTA e 3,78 g de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O em 900 mL de água destilada aquecida à 80 °C, quantidade suficiente para 1000 mL). Após a diluição foi adicionado 2 ml.L<sup>-1</sup> das soluções de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (10%), CaCl<sub>2</sub>

(1%), em água destilada, além de 2 mL.L<sup>-1</sup> de solução de micronutrientes composta pela diluição de 0,2 g de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,235 g de MnSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,28 g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,008 g de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O e 0,024 g de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O em 200 mL de água destilada; 1 mL.L<sup>-1</sup> de solução de NaCl (10%). O pH foi ajustado para 6,8, antes de verter o meio, com temperatura entre 45 e 50 °C e foram adicionadas mais duas soluções: 50 mL da solução de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (10%) e 100 mL de CaCl<sub>2</sub> (10%), esterilizadas separadamente em dois frascos de Erlenmeyer diferentes de 250 mL.

Ensaio 2 – o segundo meio de cultura foi uma adaptação da metodologia de Verma et al. (2001) com a seguinte composição: 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose; 5 g.L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>Cl; 1 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 15 g.L<sup>-1</sup> de ágar; 4 g.L<sup>-1</sup> de CaHPO<sub>4</sub>. Após todos os reagentes estarem dissolvidos o pH foi ajustado para 6,8.

Os meios de cultura foram preparados e esterilizados em autoclave (120 °C, 1 atm, 20 min), depois vertidos na câmara de fluxo contínuo em placas de Petri esterilizadas. A quantidade de meio variou 15 a 20 mL por placa. Com o objetivo de avaliar o melhor meio de cultivo e melhor dosagem do antibiótico, as placas permaneceram abertas até solidificar totalmente e permitir maior entrada de contaminantes.

Os isolados bacterianos testados foram obtidos a partir de nódulos de acácia negra (*Acacia mearnsii*) coletados em plantios clonais, no estado do Rio Grande do Sul. O isolamento foi realizado no Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas, obtendo-se dez isolados. Um teste preliminar de solubilização revelou que nove isolados solubilizavam fosfato (CNPFF01F; CNPF01G; CNPF01H; CNPF02A; CNPF04A; CNPF06C; CNPF08D; CNPF10B1 e CNPF13A) e um não (CNPFF04E).

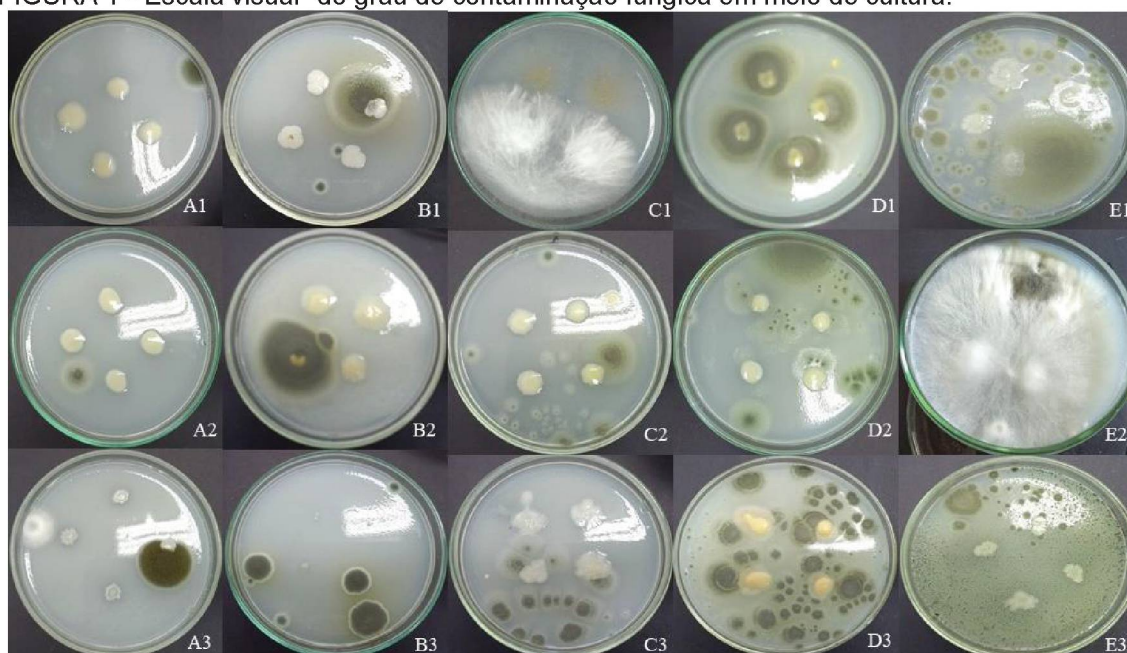
Em cada placa, cada isolado bacteriano foi inoculado em quatro pontos com auxílio de alça de platina, sendo realizadas três repetições/placas. As placas foram incubadas em câmara BOD, na temperatura de 28 ± 2 °C por 7 dias, durante esse período as avaliações ocorreram aos 3, 5 e 7 dias. O mesmo procedimento ocorreu para todos os ensaios (1, 2 e 3) do presente trabalho.

Ensaio 3 – Após determinar o melhor meio de cultivo, foram utilizados os dez isolados dos ensaios anteriores e mais duas estirpes SEMIA 1126 e SEMIA 1127 sem aplicação da cicloheximida.

A avaliação da frequência nos meios de cultura foi feita somente ao fim do ensaio (7 dias de cultivo), considerando a frequência como o número de colônias fúngicas presentes nas placas.

Determinou-se o grau de contaminação das placas, por meio de uma escala visual (Figura 1), e contabilizando-se o percentual equivalente a cada grau da escala conforme a ocupação das colônias fúngicas para cada tratamento.

FIGURA 1 - Escala visual\* do grau de contaminação fúngica em meio de cultura.



\*NOTA: Na escala, as letras A, B, C, D e E enumeradas de 1 a 3 representam exemplos do grau de contaminação em ordem crescente: grau 1 (+); 2 (++); 3 (+++); 4 (++++); 5 (+++++).

Fonte: O autor (2018)

A partir das estruturas reprodutivas dos fungos isolados, realizou-se a preparação de lâminas semipermanentes corando as estruturas fúngicas com líquido de Amann. Por meio da observação dos detalhes das estruturas ao microscópio estereoscópio (50x) e ótico (100x e 400x), foi realizada a identificação com base em descrições e chaves sistemáticas apresentadas por Barnett e Hunter (1972).

A solubilização de fosfato foi determinada com o uso do índice de solubilização médio (ISM). Esse parâmetro foi obtido pelo cálculo da razão entre o diâmetro do halo que circunda a colônia bacteriana (halo resultante da solubilização) pelo diâmetro da colônia (HARA; OLIVEIRA, 2004). A mensuração

dos diâmetros (mm) foi obtida com o uso de paquímetro digital. O índice de solubilização médio é calculado pelas fórmulas:

$$(1) \quad DM_{\text{colônia}} = (D1_{\text{colônia}} + D2_{\text{colônia}})/2$$

$$(2) \quad DM_{\text{halo}} = D1_{\text{halo}} + D2_{\text{halo}}/2$$

$$(3) \quad ISM = DM_{\text{halo}}/DM_{\text{colônia}}$$

Onde:

ISM = Índice de Solubilização Médio

DMhalo = diâmetro médio do halo (mm)

DMcolônia = diâmetro médio da colônia (mm)

Os ensaios 1 e 2 foram conduzidos em delineamento em blocos ao acaso, para cada um dos meios de cultura, com arranjo fatorial onde os parâmetros foram os dez isolados aplicados (CNPF01F; CNPF01G; CNPF01H; CNPF02A; CNPF04A; CNPF04E; CNPF06C; CNPF08D; CNPF10B1 e CNPF13A) a cinco diferentes dosagens (0; 25; 50; 75 e 100 mg/L), com três repetições mensuradas aos 3, 5 e 7 dias de incubação.

O ensaio 3 foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com avaliação sobre a solubilização de fosfato dos 12 isolados testados (CNPF01F; CNPF01G; CNPF01H; CNPF02A; CNPF04A; CNPF04E; CNPF06C; CNPF08D; CNPF10B1; CNPF13A; SEMIA 1126 e SEMIA 1127) sem aplicação da cicloheximida, com três repetições mensuradas aos 3, 5 e 7 dias de incubação.

Os dados foram submetidos ao teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) com o uso do programa estatístico R (RStudio Team, 2016).

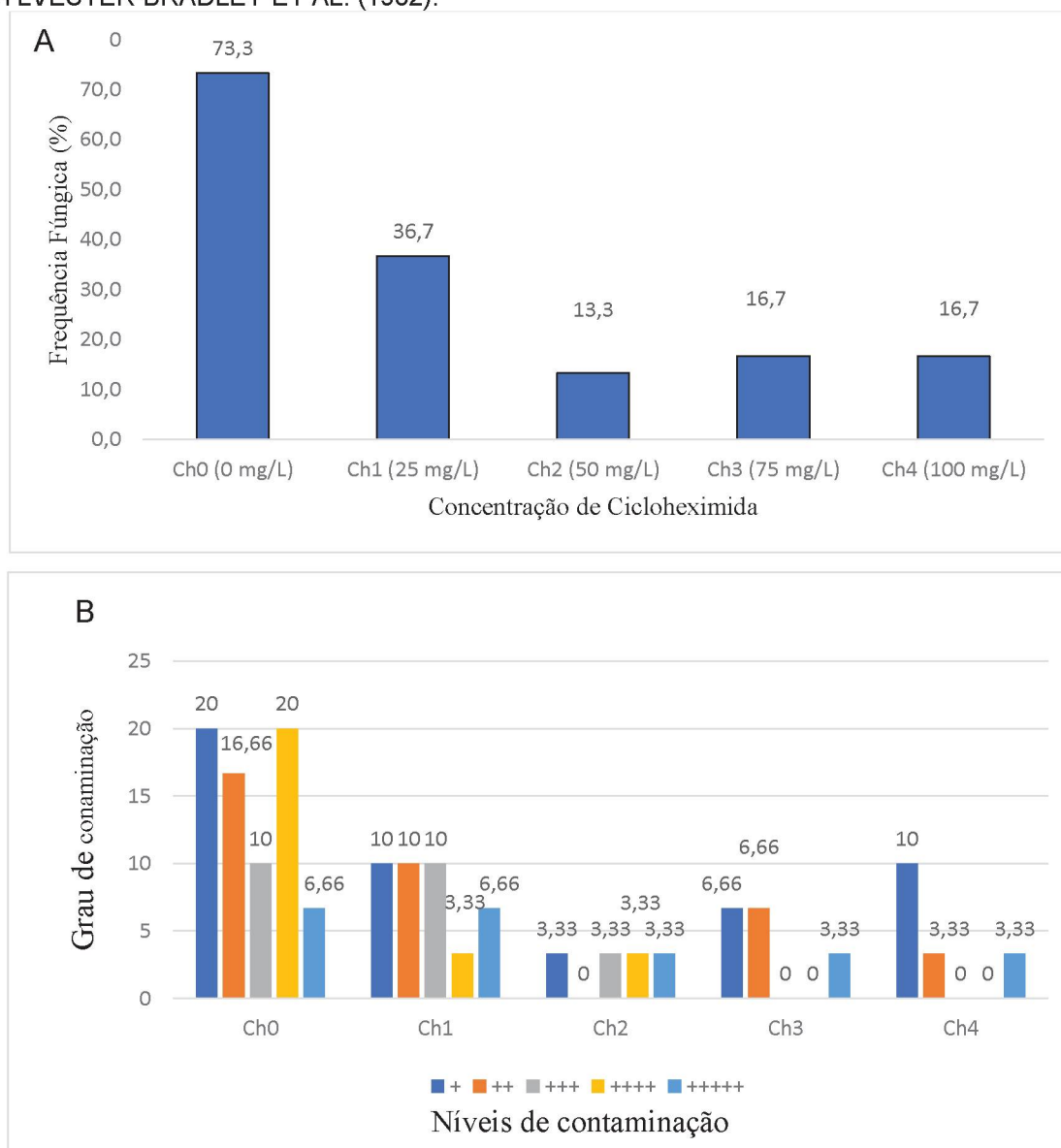
### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Ensaio 1**

O uso de cicloheximida apresentou efeito inibitório fúngico no meio de cultivo GES adaptado de Sylvester Bradley et al. (1982). A frequência de fungos contaminantes nas placas diminuiu de 73,33% na testemunha (sem aplicação) para 13,33% no tratamento 2 (50 mg.L<sup>-1</sup> de cicloheximida) (Figura 2A).

O grau de contaminação foi o nível de contaminação em que se encontrava cada tratamento de acordo com a frequência de fungos contaminantes (Figura 2B). Os resultados mostraram que o nível de contaminação não seguiu um padrão, mas permitiu observar qual a distribuição da contaminação entre as placas de cada tratamento. Os fungos contaminantes foram identificados e classificados em 11 morfotipos diferentes pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Rhizopus*.

FIGURA 2 - A) FREQUÊNCIA FÚNGICA (A) E GRAU DE CONTAMINAÇÃO (B) NAS DIFERENTES DOSAGENS DE CICLOHEXIMIDA NO MEIO DE CULTURA ADAPTADO DE SYLVESTER-BRADLEY ET AL. (1982).

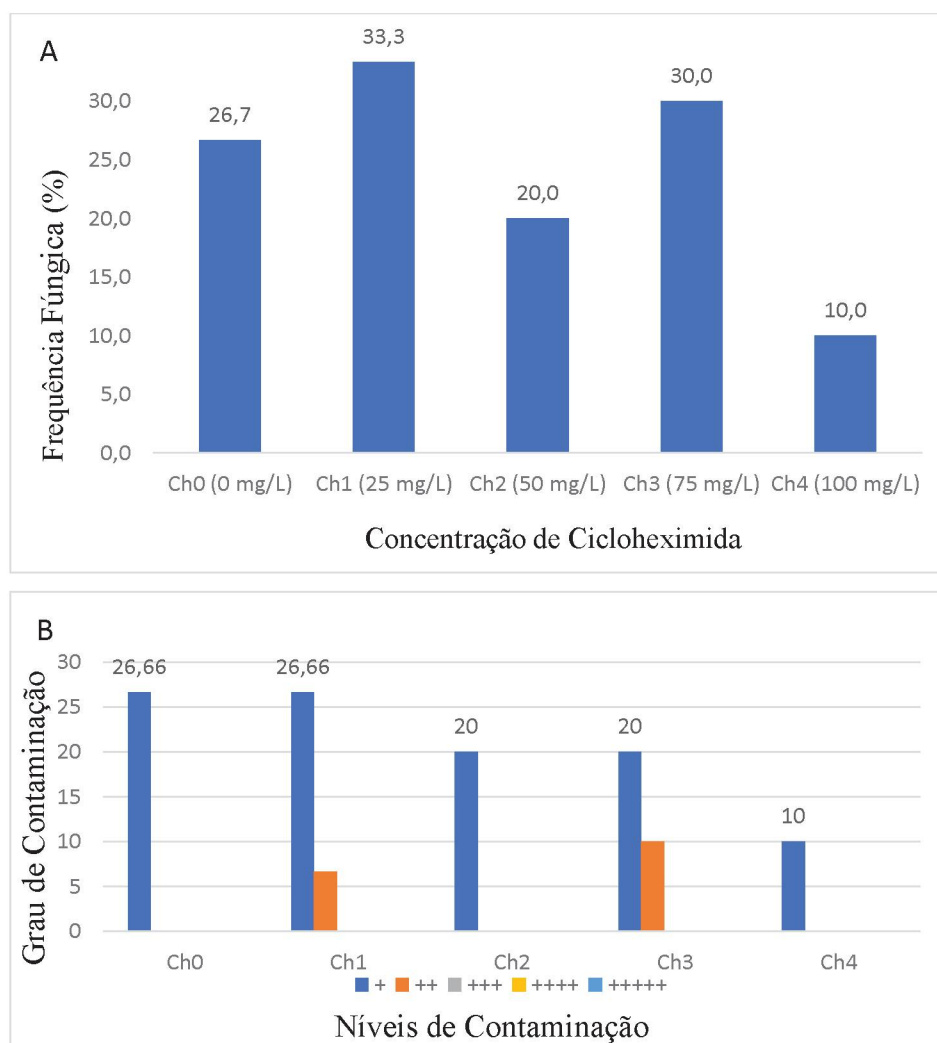


Fonte: O autor (2018).

### 3.2. Ensaio 2

No meio de cultura de Verma et al. (2001) modificado, a frequência fúngica variou de 26,7% e 33,3% na testemunha (sem aplicação) e no tratamento 1 (25 mg/L de cicloheximida), porém o melhor resultado foi obtido no tratamento 4 (100 mg/L de cicloheximida) com 10% de contaminação (Figura 3A). O grau de contaminação seguiu um padrão com níveis mais baixos quando comparados aos níveis de contaminação do experimento 1 (Figura 3B).

FIGURA 3 - FREQUÊNCIA FÚNGICA (A) E GRAU DE CONTAMINAÇÃO (B) NAS DIFERENTES DOSAGENS DE CICLOHEXIMIDA NO MEIO DE CULTURA ADAPTADO DE VERMA ET AL. (2001).



O segundo ensaio resultou na identificação e classificação de somente dois morfotipos de gêneros de fungos: *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. Uma

característica importante a ser considerada é que as espécies de fungos que se desenvolveram pertencem a gêneros fúngicos relatados como solubilizadores de fosfato, logo conseguem se desenvolver bem nesses meios de cultura (SOUCHIER et al., 2005; VASSILEV et al., 2014).

A diferença entre os meios de cultura quanto a diversidade de fungos contaminantes, a frequência fúngica e o grau de contaminação permite levantar a hipótese acerca da riqueza nutricional do meio de Sylvester Bradley et al. (1982) modificado, com o acréscimo do extrato de levedura. O extrato de levedura apresenta alta quantidade de fósforo na composição diminuindo a necessidade de realizar o processo de solubilização do fosfato de cálcio presente no meio de cultura. Esses ingredientes, que tornam o meio nutricionalmente mais rico, diminuíram a qualidade de avaliação do ISM dos isolados, assim como permitiu o desenvolvimento de vários microrganismos.

#### **4. PROTOCOLOS E SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO**

##### **4.1. Ensaio 1 e 2**

Os resultados demonstram que o melhor método quanto à avaliação do ISM e controle fúngico a ser utilizado é o meio modificado de Verma et al. (2001) e as dosagens de cicloheximida entre testemunha e 75 mg.L<sup>-1</sup> não se diferenciaram estatisticamente quando observados os índices de solubilização. Porém, ao analisar a quantidade na frequência fúngica e o grau de contaminação determinou-se que a dosagem de cicloheximida ideal era 50 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 1). A solubilização foi avaliada através da qualidade visual de formação dos halos ao fim do período de incubação de 7 dias.

TABELA 1 - ANÁLISE ESTATÍSTICA SOBRE O ÍNDICE DE SOLUBILIZAÇÃO MÉDIO (ISM) SOBRE A INTERAÇÃO E A INDIVIDUALIDADE DOS MEIOS DE CULTURA DE SYLVESTER-BRADLEY ET AL. (1982) (SB) E VERMA ET AL. (2001) (V) PARA OS FATORES ISOLADO, TEMPO DE CULTIVO, DOSE E MÉTODO E AS INTERAÇÕES ENTRE OS FATORES

Isolado	ISM			
	Ensaio 1 e 2		Ensaio 3	
	SB X V	SB	V	V
CNPF01F	1,5092 a	1,1914 ab	1,8270 b	2,1255 a
CNPF01G	1,4945 a	1,3208 a	1,6680 bc	1,6567 abc
CNPF01H	1,4653 ab	1,3524 a	1,5782 cd	1,5492 bc
CNPF02A	-	-	-	1,0057 d
CNPF04A	1,3495 bc	1,2503 ab	1,4486 de	1,3986 bcd
CNPF04E	0,9889 e	0,9778 c	1,0000 g	1,0000 d
CNPF06C	1,2248 d	1,1151 bc	1,3345 ef	1,3470 cd
CNPF08D	-	-	-	1,4585 bcd
CNPF10B1	1,5864 a	1,0875 bc	2,0853 a	1,8363 ab
CNPF13A	1,2456 cd	1,2993 a	1,1918 f	1,2440 cd
SEMIA 1126	-	-	-	1,0071 d
SEMIA 1127	-	-	-	1 d
<b>Tempo (dia)</b>				
3	1,306 b	1,0968 b	1,5148 b	1,3639 ab
5	1,4509 a	1,2479 a	1,6538 a	1,5279 a
7	1,3173 b	1,2532 a	1,3814 c	1,2654 b
<b>Dose (mg.L<sup>-1</sup>)</b>				
0	1,3327 ab	1,1455 a	1,5197ab	
25	1,3478 ab	1,1886 a	1,5070 ab	
50	1,3997 a	1,2523 a	1,5469 ab	
75	1,4119 a	1,2453 a	1,5785 a	
100	1,2981 b	1,1650 b	1,4312 b	
<b>Meio de Cultura</b>				
SB	1,1994 b			
V	1,5167 a			

Fonte: O autor (2018).

\*LEGENDA: Sylvester-Bradley et al. (1982) = SB; Verma et al. (2001) = V. Letras minúsculas diferentes nas colunas resultam em diferença estatística segundo o teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Os isolados mais eficientes na solubilização de fosfato foram CNPF10B1, CNPF01F e CNPF01G com ISM de 60, 52 e 51%, respectivamente, quando analisados os dados de interação dos fatores estudados nos dois meios de cultura e comparadas com a testemunha. Entre os dez isolados estudados, somente oito

foram avaliados, devido à contaminação dos isolados CNPF02A e CNPF08D, principalmente no meio de Sylvester-Bradley et al. (1982).

Analisando os meios de cultura em separado, foi possível perceber a diferença na qualidade de mensuração do ISM. Os melhores isolados na solubilização de fosfato foram: CNPF01F, CNPF01G, CNPF01H, CNPF04A e CNPF13A para o meio de cultivo de Sylvester-Bradley et al. (1982) e CNPF10B1 para o meio de Verma et al. (2001) (Tabela 1).

De acordo com a classificação do nível de solubilização de isolados empregado por Hara e Oliveira (2005) e Chagas Junior et al. (2010), somente dois isolados do presente trabalho (CNPF01F e CNPF10B1) apresentaram nível médio de solubilização com valores de ISM maiores que 2 e menores do que 4. Os demais isolados apresentaram valores inferiores a 2, considerado como nível baixo de solubilização.

A eficiência dos meios na qualidade da formação de halo para a avaliação dos isolados apresentou diferença estatística nos índices de solubilização dos dois meios de cultivo, onde o meio de Verma et al. (2001) permitiu avaliar/classificar seis grupos de isolados e o meio de Sylvester-Bradley et al. (1982) permitiu a classificação de apenas três grupos.

A característica visual do halo foi mais evidente no meio de cultura Verma et al. (2001). Provavelmente, a presença do extrato de levedura adicionado ao meio de Sylvester-Bradley et al. (1982) aumentou a quantidade de fósforo disponível devido a composição da parede celular das leveduras, ficando disperso no meio, e as bactérias o utilizam reduzindo a necessidade de solubilizar o fósforo ligado à fonte de cálcio do meio.

Ao analisar os dados do Ensaio 3, foi verificado que a estirpe SEMIA 1126 conseguiu solubilizar uma baixa quantidade de fosfato e a estirpe SEMIA 1127 visualmente não solubilizou o fosfato (formação de halo), durante o período de incubação de sete dias. Em processos de desenvolvimento de um inoculante, características além da nodulação e fixação biológica de nitrogênio como a solubilização de fosfato tornam estirpes como a SEMIA 1126 de maior importância quando comparada a SEMIA 1127, caso esse isolado realmente não apresente a capacidade de solubilizar o fosfato. Entretanto, a quantidade que tal estirpe

consegue solubilizar é baixa não diferenciando estatisticamente das estirpes que não apresentaram o halo de solubilização.

Nos três ensaios, os isolados que mais solubilizaram P foram CNPF01F, CNPF01G, CNPF01H, CNPF10B1 conseguindo índices de solubilização entre os três ensaios, índices que variaram entre 30% até 112 % a mais que a testemunha, durante o mesmo período de incubação. Esses valores de ISM reafirmam o potencial de uso desses microrganismos como potenciais promotores do crescimento de plantas (OUFDOU et al., 2016; BAHADIR; LIAQAT; ELTEM, 2018).

Os meios de cultura adotados no presente trabalho utilizam fontes de fosfato de ligação fraca, quando comparados a outros meios de cultura utilizados para avaliar a solubilização, os quais apresentam como fonte de fosfato férrico e de alumínio. Entretanto, o uso dessas fontes em meios de cultura não poderiam ser reproduzidos por necessitarem de agitação contínua, para evitar a precipitação dos sais durante o período de incubação.

## **5. CONCLUSÕES**

O uso da cicloheximida foi eficiente para o controle de fungos contaminantes.

O meio de cultura adaptado de Sylvester-Bradley et al. (1982), com adição de extrato de levedura não é indicado para a visualização da formação de halos por bactérias solubilizadoras de fosfato.

O meio de cultura de Verma et al. (2001) comprovou ser mais eficiente para a visualização dos halos de solubilização de fosfato pelas bactérias e determinar os ISM com maior qualidade.

Os melhores isolados bacterianos solubilizadores foram CNPF1F, CNPF01G e CNPF10B1.

O melhor protocolo para este tipo de estudo é o meio de cultura adaptado de Verma et al. (2001) com dosagem de cicloheximida entre 50 e 75 mg.L<sup>-1</sup>.

## 6. REFERÊNCIAS

BAHADIR, P. S.; LIAQAT, F.; ELTEM, R. Plant growth promoting properties of phosphate solubilizing *Bacillus* species isolated from the Aegean Region of Turkey. **Turkish Journal of Botany**, Ankara, v. 42, n. 2, p.183-196, 2018.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. Minnesota: Burgess, 3 ed. 1972. 241p.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; NASCIMENTO DE OLIVEIRA, A.; WILLERDING, A. L. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá-PR, v. 32, n. 2, p. 359-366, 2010.

DIAS, L. P. R.; COLPO GATIBONI, L.; BRUNETTO, G.; SIMONETE, M. A.; BICARATTO, B. Eficiência relativa de fosfatos naturais na adubação de plantio de mudas de *Eucalyptus dunnii* Maiden e *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage em solo sem e com calagem. **Ciência Florestal**, Santa Maria-RS, v. 25, n. 1, p. 37-48, 2015.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características Fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 40, n. 7, p. 667-672, 2005.

MASSESSINI, A. M.; SILVA, A. A.; REIS, M. R.; COSTA, M. D. Atividade de isolados bacterianos solubilizadores de fosfato na presença de formulações comerciais de glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 26, n. 4, p. 815-823, 2008.

MOREIRA, A. L.; ARAÚJO, F. F. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* spp. como potenciais promotores de crescimento de *Eucalyptus urograndis*. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 37, n. 5, p. 933-943, 2013.

OUFDOU, K.; BECHTAOUI, N.; EL ALAOUI, A.; BENIDIRE, L.; DAOUI, K.; GÖTTFERT, M. Symbiotic rhizobacteria for improving of the agronomic effectiveness of phosphate fertilizers. **Procedia Engineering**, v. 138, p. 325-331, 2016.

PARKINSON, D.; GRAY, T. R.; WILLIAMS, S. T. **Methods for studying the ecology of soil micro-organisms**. Oxford, Blackwell Scientific Publications. 1971, 116p.

RSTUDIO: Integrate Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA. Disponível em: <http://www.rstudio.com/>

SOUCHIER, E. L.; CAMPELLO, E. F. C.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. Mudas de espécies arbóreas inoculadas com bactérias solubilizadoras de

fosfato e fungos micorrízicos arbusculares. **Floresta**, Curitiba-PR, v. 35, n. 2, p. 329-334, 2005.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; TORRACA, S. L.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazônica**, Manaus-AM, v. 12, n. 1, p. 15-22, 1982.

VALADARES, S. V.; SILVA, L. F.; VALADARES, R. V.; FERNANDES, L. A.; NEVES, J. C. L.; SAMPAIO, R. A. Plasticidade fenotípica e frações fosfatadas em espécies florestais como resposta à aplicação de fósforo. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 39, n. 2, p. 225-232, 2015.

VASSILEV, N.; MENDES, G.; COSTA, M.; VASSILEVA, M. Biotechnological tools for enhancing microbial solubilization of insoluble inorganic phosphates. **Geomicrobiology Journal**, v. 31, n. 9, p. 751-763, 2014.

VERMA, S. C.; JAGDISH, K. L.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promotion and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 127-141, 2001.

### **CAPÍTULO 3 - DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE *Acacia mearnsii* De Wild.**

#### **RESUMO**

A diversidade de bactérias isoladas do nódulo de espécies florestais leguminosas tem como objetivo obter isolados que potencializem o aumento de produtividade. Os rizóbios são um grupo de bactérias que quando formam simbiose com plantas leguminosas podem realizar a fixação biológica de nitrogênio. Essas bactérias possuem os genes *nod* e *nif* responsáveis pela nodulação e a fixação. A acácia negra (*Acacia mearnsii* De Wild) é uma espécie leguminosa cultivada no estado do Rio Grande do Sul. Tem a produção voltada a obtenção de madeira e a extração de tanino da casca para curtimento de couro. O programa de melhoramento genético da TANAC S. A. resultou na determinação de três clones considerados mais produtivos. Esses, foram submetidos a testes de procedência e progênies com outros materiais genéticos além de materiais de origem seminal, localizados nos municípios de Cristal e Jaguarão/RS. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a diversidade de rizóbios isolados dos nódulos de *A. mearnsii* com base nas características morfofisiológicas e no teste de autenticação, além de determinar se existe especificidade entre uma estirpe de bactéria simbiótica para cada material genético/clone. Foram isoladas 187 bactérias dos nódulos de *A. mearnsii*, os quais foram caracterizados morfofisiologicamente. Com o resultado realizou-se um agrupamento com análise estatística multivariada baseada em distância euclidiana, comprovando alta diversidade fenotípica que variou de acordo com as distâncias estabelecidas entre 0,8 e 2,0. O teste de nodulação comprovou o isolamento de rizóbios, que correlacionados a caracterização morfofisiológica, permitem indicar a presença de isolados dos gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium*. Ainda, foram realizadas análises sobre cada material genético e cada local demonstrando que há diversidade dentro dos materiais e entre locais estudados.

**Palavras-Chave:** rizóbios, fixação biológica de nitrogênio, acácia negra

## DIVERSITY OF ISOLATED BACTERIA OF NODULES OF *Acacia mearnsii* DE WILD.

### ABSTRACT

The diversity of bacteria isolated from the nodule of leguminous forest species aims to obtain isolates that enhance the productivity increase. Rhizobia are a group of bacteria that when they form symbiosis with leguminous plants can perform biological nitrogen fixation. These bacteria have the *nod* and *nif* genes responsible for nodulation and fixation. The black wattle (*Acacia mearnsii* De Wild) is a leguminous species grown in the state of Rio Grande do Sul. Its production is aimed at obtaining wood and extracting tannin from the bark for leather tanning. TANAC S. A.'s breeding program resulted in the determination of three clones considered most productive. These were submitted to origin and progeny tests with other genetic materials besides seminal origin materials, located in the municipalities of Cristal and Jaguarão/RS. The present work aimed to characterize the diversity of rhizobia isolated from *A. mearnsii* nodules based on morphophysiological characteristics and authentication test, and to determine if there is specificity between a symbiotic bacterial strain for each genetic material / clone. 187 bacteria were isolated from *A. mearnsii* nodules, which were morphophysiological characterized. The result was a grouping with multivariate statistical analysis based on Euclidean distance, proving high phenotypic diversity that varied according to the distances established between 0.8 and 2.0. The nodulation test proved the isolation of rhizobia, which correlated with morphophysiological characterization allows to indicate the presence of isolates of the genera *Rhizobium*, *Mesorhizobium* and *Bradyrhizobium*. Other analyzes were performed on each genetic material and each site showing that there is diversity within the materials and between sites studied.

**Key words:** rhizobia, biological nitrogen fixation, black wattle

### 1. INTRODUÇÃO

A interação dos componentes solo-microrganismo-planta é necessária para a manutenção dos ecossistemas. Para as plantas, assim como para todos os seres vivos, existem elementos considerados essenciais para a nutrição e o desenvolvimento. Quando uma planta necessita de certos elementos nutricionais que não consegue absorver devido à baixa disponibilidade no solo, emite sinais através de substâncias exsudadas de suas raízes. Essas substâncias carregam molecular ou bioquimicamente a mensagem de que as plantas necessitam realizar associações com microrganismos, os quais aumentarão as taxas de atividade metabólica e atuarão no desenvolvimento populacional a fim de associar-se as plantas, podendo ser simbióticas, associativas ou de vida livre, resultando no aumento da taxa de nutrientes necessários a essas plantas (MIRANSARI, 2010 e OLDROYD et al., 2011).

A dinâmica dos solos é complexa, pois integra os organismos vivos que habitam o solo, em especial os procariotos que são os principais responsáveis pela manutenção e sobrevivência de comunidades vegetais e animais, por atuarem na decomposição de matéria orgânica, produção de húmus, na ciclagem bioquímica e de energia (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Outros benefícios desses microrganismos são possuir a capacidade de produzir compostos complexos que contribuem para a agregação do solo; decomposição de xenobióticos; controle biológico; promoção do crescimento de plantas, entre outros. (GLEDDIE et al., 1996; RICHARDSON et al., 2009; MATIAS et al., 2009).

Os microrganismos procarióticos são divididos em dois domínios *Archaea* e *Bacteria* de acordo com a classificação sistemática realizada com base na filogenia do gene ribossomal 16S (BARCELLOS et al., 2016).

Os microrganismos que compõem o domínio *Archaea* diferenciam-se do domínio *Bacteria*, devido à capacidade de sobrevivência em ambientes com condições extremas de temperatura, pressão, salinidade e acidez (pH), além de compreender espécies aeróbicas e anaeróbicas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Entretanto, o domínio *Bacteria*, foi dividido em 52 Filos, de acordo com Moreira e Siqueira (2006) composto por microrganismos que foram divididos nos Filos *Proteobacteria* (bactérias Gram-negativas), *Firmicutes* e *Actinobacteria* (Gram-positivas) e *Cyanobacteria* (também denominadas de “algas” azuis).

Entre as bactérias Gram-negativas do solo, existem as denominadas diazotróficas ou fixadoras de nitrogênio, que possuem a enzima denominada nitrogenase, a qual tem a capacidade de converter o N<sub>2</sub> do ar em formas de N assimiláveis as plantas, com baixos gastos energéticos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; SPRENT, 2009).

O grupo mais estudado das bactérias fixadoras de nitrogênio são a dos rizóbios, que compreendem bactérias de vida livre, que quando em simbiose com espécies leguminosas induzem os pelos radiculares a formarem as estruturas de proteção dos rizóbios chamados de nódulos. Essa estrutura é proveniente do prolongamento e envolvimento dos bacteroides pelas raízes, que quando são efetivos resultam na fixação biológica de nitrogênio, e isso só pode ser realizado se além da presença dos genes *nod* e *nif* ocorrer a expressão desses genes (SILVA, 2016; BOURNAUD et al., 2017). Os grupos de rizóbios que apresentam esses genes efetivos, na constituição de seu DNA, são divididos em diversas classes denominadas de  $\alpha$  – proteobactérias e  $\beta$  – proteobactérias, sendo as  $\alpha$  – proteobactérias as mais estudadas devido ao alto grau de predominância nas simbioses, entretanto estudos tem demonstrado que a classe das  $\beta$  – proteobactérias também são capazes de realizar nodulação e fixação de N efetiva, por também possuir os genes *nod* e *nif* na constituição do DNA, esses grupos também podem ser denominados como  $\alpha$  e  $\beta$  - rizóbios (BOURNAUD et al., 2017).

A forma inicial de classificar isolados de bactérias ocorre por meio da determinação dos possíveis gêneros, resultantes da avaliação das características culturais. Na classe das  $\alpha$  – proteobactérias, o gênero *Rhizobium* as colônias não absorvem o corante vermelho congo, apresentam crescimento rápido, ou seja, com diâmetros superiores a 5 mm de zero a dez dias de incubação, diferente do gênero *Mesorhizobium* que apresenta a velocidade de crescimento mais intermediária maior que 3 dias de incubação e menor que 5 dias, porém com grande variação das demais características (JESUS et al., 2005).

A reação de alteração da coloração verde para amarelo do meio de cultura com a presença do corante azul bromotimol é outra característica avaliada e significa que os isolados crescidos acidificaram o meio de cultura. Geralmente isolados bacterianos que tornam o meio mais ácido tendem a produzir maior

quantidade de polissacarídeos extracelulares (muco) – essas características são básicas de estirpes do gênero *Rhizobium* (ODEE et al., 1997; LAMMEL, 2007).

As bactérias do gênero *Bradyrhizobium* possuem características bem diferentes às do gênero *Rhizobium*, similares apenas na falta de absorção do corante vermelho. Entretanto, apresentam crescimento lento, com tamanho inferior a 1 mm após o período de incubação acima dos 5 dias podendo chegar até 14 dias. Com alteração do pH resultando na coloração azul, ou seja, alcalinizam o meio de cultura e com baixa produção de polissacarídeos extracelulares (EPS) (ODEE et al., 1997; LAMMEL, 2007).

Porém, a classificação fenotípica não permite determinar as espécies de rizóbios e sim, somente separar através de características de cultivo e morfofisiológicas os possíveis grupos ou gêneros a que pertencem (STROSCHEIN, 2007), ou seja, a classificação taxonômica é inviável, porque a determinação morfofisiológica não tão eficiente como é para espécies de eucariotos, com a exceção dos fungos que são mais complexos. Isso é decorrente do alto grau de recombinação genética dos procariotos, que em transferência horizontal chega a recombinar até 30% do DNA. A classificação taxonômica mais eficiente é obtida através de análise molecular a partir dos genes conservados nos ácidos ribonucleicos ribossômicos (rRNA) que servem para classificar a nível de gênero e o sequenciamento do DNA para identificação dos isolados à nível de espécie (LAMMEL, 2007).

O gênero *Acacia* pertence a Família Fabaceae, Subfamília Mimosoideae é constituído por cerca de 1.350 espécies (FAYE et al., 2007), as quais estão distribuídas por todos os continentes.

Os estudos de diversidades de rizóbios em espécies florestais pertencentes ao gênero *Acacia*, nativas ou exóticas (plantadas) em países como Austrália (RODRIGUES-ECHERRÍA et al., 2011; HOQUE, BROADHURST and THRALL, 2011; CRISÓSTOMO, RODRIGUES-ECHERRÍA and FREITAS, 2013), África do Sul (AMRANI et al., 2010), Argélia (BOUKHATEM et al., 2012), Senegal (DIOUF et al., 2007), Marrocos (SAKROUHI et al., 2016), China (LU et al., 2014), Tailândia e Filipinas (NGOM et al., 2004), Brasil (LAMMEL et al., 2013) e regiões da América do Norte e Central (LLORET et al., 2007) resultaram em espécies pertencentes ao grupo das  $\alpha$ -proteobacterias principalmente espécies dos

gêneros *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Ochrobactrum*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*) e *Bradyrhizobium*.

O grupo das  $\beta$  – proteobacterias também apresentaram espécies que apresentam a capacidade de induzirem a nodulação em plantas do gênero *Acacia* e realizar a simbiose e conseqüentemente a fixação biológica do nitrogênio, porém os rizóbios identificados com essa capacidade são pertencentes aos gêneros *Burkholderia*, *Phyllobacterium* e *Devosia* (DIOUF et al., 2007; HOQUE, BROADHURST e THRALL, 2011). Entretanto, ainda não existe uma compreensão sobre a interação/simbiose entre esses rizóbios e as plantas, pois as espécies arbóreas em que foram determinadas são altamente promíscuas, ou seja, apresentam potencial de formar associações simbióticas com diversas espécies de rizóbios (DIOUF et al., 2007; HOQUE, BROADHURST e THRALL, 2011). Outros estudos, em regiões do Brasil e África do Sul determinaram que a classe dos  $\beta$ -rizóbios induziram a formação de nodulos efetivos com atividade positiva para a realização da fixação biológica de nitrogênio, dentre os gêneros dessa classe as que foram isoladas pertenciam aos gêneros *Burkholderia*, *Paraburkholderia* e *Cupriavidus*, simbiontes em espécies florestais da subfamília *Mimosoideae* próximas às espécies do gênero *Acacia* (GYANESHWAR et al., 2011; BOURNAUD et al., 2017).

A acácia negra (*Acacia mearnsii* De Wild) é a quarta espécie florestal mais cultivada, presente quase que exclusivamente no estado do Rio Grande do Sul, com cerca de 142.000 ha (AGEFLOR, 2018). As estirpes de rizóbios identificadas em trabalhos de diversidade realizados com a espécie resultaram na obtenção de associações com isolados dos gêneros: *Rhizobium* (RODRÍGUES-ECHEVERRÍA et al., 2011; FIKRI-BENBRAHIM et al., 2017) e o gênero *Bradyrhizobium*, considerado o simbiótico dominante para essa espécie leguminosa (DREYFUS e DOMMARGUES, 1981; VARGAS et al., 2007; BIRNBAUM et al., 2012, BOUDIAF et al., 2014; KASCHUK e HUNGRIA, 2017), com 97% dos isolados obtidos de nódulos de plantas provenientes da Austrália (LAFAY e BURDON, 2001) e 100 % dos isolados de nódulos obtidos de plantios florestais no Brasil (VARGAS et al. 2007) e florestas nativas com invasão de acácia negra na Argélia (BOUDIAF et al., 2014).

As espécies predominantes na associação entre a *A. mearnsii* e os rizóbios são *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan) Kirchner, *B. elkanii* Kuykedall et al., *Rhizobium leguminosarum* (Frank) Ramirez-Bahena et al., *R. tropici* Martinez-Romero et al. e *R. radiobacter* (Beijerinck e van Delden) Young et al. (RODRÍGUES-ECHEVERRÍA et al., 2011; FIKRI-BENBRAHIM et al, 2017).

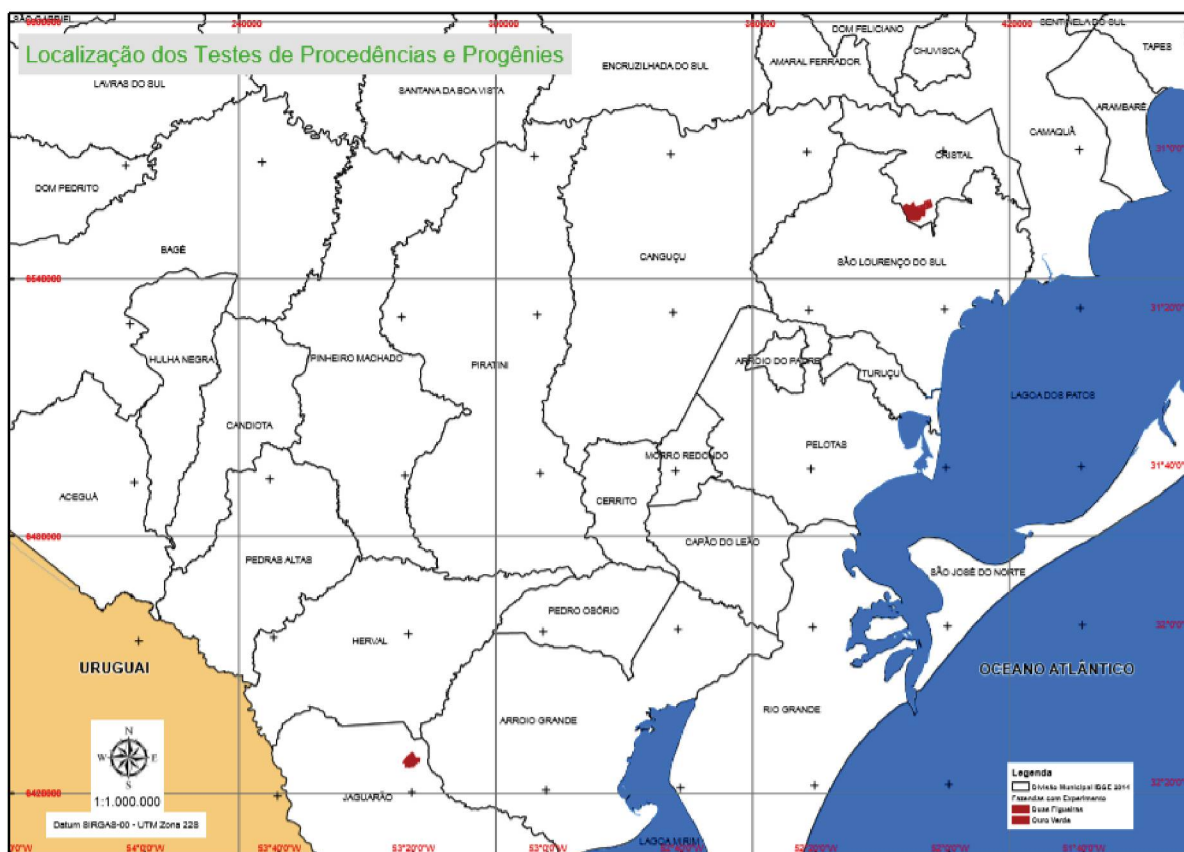
Possibilitar o uso da diversidade como base para pesquisas/desenvolvimento de inoculantes para plantas, a fim de garantir produtividade e sustentabilidade, é o desafio que se torna parte dos objetivos do presente trabalho: determinar a caracterização morfofisiológica de bactérias isoladas do nódulo de *A. mearnsii*; e determinar se existe especificidade entre uma estirpe de bactéria simbiótica para cada material genético/clone que compõem os testes de procedência e progênes.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Área Experimental e Coleta de Nódulos**

As coletas foram feitas em áreas experimentais da empresa Tanac S. A. constituídas por dois Testes de Procedência e Progênie (TPP), localizadas nas fazendas Ouro Verde e Duas Figueiras, dos municípios de Cristal e Jaguarão, respectivamente, no estado do Rio Grande do Sul (FIGURA 1). A primeira coleta de nódulos ocorreu em outubro de 2014 e a segunda coleta em fevereiro de 2015 (Anexo 1).

FIGURA 1 – DELIMITAÇÃO DAS ÁREAS DE COLETA DE NÓDULOS DE ACÁCIA NEGRA NOS MUNICÍPIOS DE CRISTAL E JAGUARÃO, ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL



Fonte: Tanac S. A., 2018.

Os municípios de Cristal e Jaguarão possuem clima classificado como Cfa, subtropical úmido, segundo a classificação de Köppen, com precipitações anuais em torno de 1.300 mm, apresentando no ano déficit hídrico em 7 a 23 mm, temperatura média do mês mais quente acima de 22 °C e a do mês mais frio inferior a 18 °C e superior a 3 °C, mínima absoluta de -5,0 °C e com geadas durante o ano e com uma altitude em torno de 100 m acima do nível do mar (MOCHIUTTI, HIGA e SIMON, 2008).

A fazenda Ouro Verde possui solo de característica arenosa e encontra-se na oitava rotação com *A. mearnsii*. Antes da implantação da acacicultura, a área era utilizada para cultivo com planta de característica agrícola, no caso a soja (*Glycine max* (L.) Merrill), espécie essa que é leguminosa e realiza simbiose com espécies de rizóbios. A fazenda Duas Figueiras tem solo com característica variável transitando de pedregoso, misto a argiloso, com presença predominante de solo argiloso, constituindo no primeiro ciclo de rotação da cultura.

Entre os materiais genéticos que compõem os testes, encontram-se os três clones mais produtivos e resistentes a adversidades climáticas, além dos

materiais seminais obtidos das áreas de produção de sementes (APS) da empresa utilizados no processo de produção de mudas. A nomenclatura dos materiais determinados para a coleta dos nódulos foram: clone 1; 2 e 3; APS Camboatá e APS Geada.

As áreas foram compostas por 20 linhas de plantio, com 57 e 30 plantas/indivíduos de materiais genéticos distintos em Cristal e Jaguarão respectivamente. Cada linha de plantio representou um bloco. As coletas ocorreram de maneira aleatória sobre os indivíduos de material genético selecionado dentro de cada bloco previamente determinado por sorteio e quando no sorteio de um bloco houve a falta de um indivíduo sorteado, coletou-se os nódulos do indivíduo com o mesmo material genético no próximo bloco. As coletas com os indivíduos determinados encontram-se especificadas no Anexo I e II.

Os nódulos foram coletados de maneira manual a partir da base do caule seguindo as raízes conforme eram encontrados, sem determinação de profundidade, sendo coletados a fim de ter uma quantidade suficiente para realizar o trabalho em laboratório. Em alguns momentos, foi necessário o auxílio de pá de mão, especialmente na área de Jaguarão, onde o terreno era mais argiloso/pedregoso quando comparado ao terreno arenoso de Cristal.

O material foi acondicionado em tubos Falcon de 15 mL, contendo algodão seco para manter baixa umidade evitando assim condições favoráveis para o desenvolvimento de fungos durante o transporte, até o momento do isolamento em laboratório.

## **2.2. Classificação do Nódulo, Isolamento, Purificação e Cultivo**

No Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas, os nódulos coletados nos testes de procedência e progênies de *Acacia mearnsii* foram quantificados e classificados quanto a sua morfologia, os quais apresentaram formatos classificados como: esférico, bastonete, bastão, amorfo, forma de leque e coraloide (FIGURA 2), determinados de acordo com a adaptação feita na metodologia de Lammel (2007).

FIGURA 2 – FORMA E DIMENSÃO DOS NÓDULOS COLETADOS DE RAÍZES DE *Acacia mearnsii*.



Formato dos nódulos: 1A e 1B – esféricos; 2A – bastonete; 3A e 3B – bastão; 4A e 4B – amorfo;  
5A – forma de leque; 6A – coraloide.

Cada quadriculado da folha de papel mede 0,5 x 0,5 cm

Fonte: O Autor, 2018.

Os nódulos coletados foram pesados em totalidade (peso seco total dos nódulos) e por indivíduo (em que é calculada a média de peso por unidade de nódulo) de acordo com as tabelas 1 e 2.

TABELA 1 - NÚMERO DE NÓDULOS, PESO DE NÓDULOS E MORFOLOGIA DE NÓDULOS COLETADOS NOS TESTES DE PROCEDÊNCIA E PROGÊNIES DE *Acacia mearnsii*, EM NOVEMBRO DE 2014, NOS MUNICÍPIOS DE CRISTAL E JAGUARÃO – RS.

(Continua)

NC	I	NN	PN (g)	PMIN (mg)	Morfologia do Nódulo							
					ES	BTE	BTÃO	AF	FL	AG	CO	
1	J1BL17	90	0,5360	0,0059	21		69					
2	J2BL17	94	0,7465	0,0079	69	2	18			5		
3	J3BL17	29	0,1711	0,0059	14	1	3	9		2		
4	J4BL18	81	0,5360	0,0066	59	6	7	3		1		5
5	J5BL18	70	0,6942	0,0099	40	5	10	15				
6	J6BL18	53	1,2554	0,0236	24	7	7	13		1		1
7	J7BL20	49	0,8919	0,0182	24	15	6	3				1
8	J8BL20	36	2,7301	0,0758	7		8	9		6		6
9	J9BL20	74	0,1912	0,0025	39	21	14					
10	J10BL22	42	0,3542	0,0084	25	5	6	6				
11	J11BL22	46	0,9494	0,0206	10	15	16	3		2		
11	J11BL22	46	0,9494	0,0206	10	15	16	3		2		
12	J12BL22	39	0,9920	0,0254	20	6	4	7		2		
13	J13BL24	79	0,3871	0,0049	36	28	12	3				
14	J14BL23	38	0,7061	0,0185	12	12	11	3				
15	J15BL24	31	4,5664	0,1473	5	1	3	5				17
16	C1BL1	76	0,4921	0,0064	53	5	12	6				
17	C2BL2	44	0,6898	0,0156	18	10	5	7		4		1
18	C3BL1	69	0,2100	0,0030	65	4						
19	C4BL4	27	0,0360	0,0013	27							
20	C5BL4	67	0,3023	0,0045	58	5	3	1				
21	C6BL4	24	0,0370	0,0015	24							
22	C7BL7	110	0,1580	0,0014	108	2						
23	C8BL7	38	0,5476	0,0144	13	10	6	6		2		1
24	C9BL7	56	0,1959	0,0034	47	9						
25	C10BL10	22	0,6039	0,0274	11		4	2		5		
26	C11BL10	55	0,3270	0,0059	24	22	5	3				1
27	C12BL10	22	0,0276	0,0012	15		5	2				
28	C13BL13	34	0,2014	0,0059	14	15	1	4				
29	C14BL14	15	0,4883	0,0325	4	2	3			6		
30	C15BL14	56	0,1107	0,0019	54	2						
31	C16BL1	35	0,3605	0,0103	19	4	7	4		1		
32	C17BL1	15	0,2315	0,0154	6	2	4	1		2		
33	C18BL4	47	0,5411	0,0115	32	4	10	2				

TABELA 1 - NÚMERO DE NÓDULOS, PESO DE NÓDULOS E MORFOLOGIA DE NÓDULOS COLETADOS NOS TESTES DE PROCEDÊNCIA E PROGÊNIES DE *Acacia mearnsii*, EM NOVEMBRO DE 2014, NOS MUNICÍPIOS DE CRISTAL E JAGUARÃO – RS.

(Conclusão)

NC	I	NN	PN (g)	PMIN (mg)	Morfologia do Nódulo						
					ES	BTE	BTÃO	AF	FL	AG	CO
32	C17BL1	15	0,2315	0,0154	6	2	4	1	2		
33	C18BL4	47	0,5411	0,0115	32	4	10	2			
34	C19BL3	67	0,3301	0,0049	27	28	10	1	1		
35	C20BL7	35	0,3478	0,0099	12	9	12	2			
36	C21BL7	26	0,8784	0,0337		9	8	2	7		
37	C22BL10	0			GALHA E AUSÊNCIA DE NÓDULOS						
38	C23BL10	6	0,1939	0,0323	6						
39	C24BL13	0			GALHA E AUSÊNCIA DE NÓDULOS						
40	C25BL13	48	0,2948	0,0061	30	11	5	2			

Fonte: O Autor, 2018.

NC – Número de coleta; I – Indivíduo; NN – Número de nódulos; PN – Peso de nódulos; PMIN – Peso médio individual de nódulos; ES – esférico; BTE – Bastonete; BTÃO – Bastão; AF – Amorfo; AG – Aglomerado; CO – Coraloide.

TABELA 2 - NÚMERO DE NÓDULOS, PESO DE NÓDULOS E MORFOLOGIA DE NÓDULOS COLETADOS NOS TESTES DE PROCEDÊNCIA E PROGÊNIES DE *Acacia mearnsii*, EM FEVEREIRO DE 2015, NOS MUNICÍPIOS DE CRISTAL E JAGUARÃO – RS.

(Continua)

NC	I	NN	PN (g)	PMIN (mg)	Morfologia do Nódulo							
					ES	BTE	BTÃO	AF	FL	AG	CO	
1	J26BL1	34	0,5932	0,0174	6	12	7	9				
2	J27BL1	61	1,1619	0,0190	25	14	8	7	5			2
3	J28BL1	62	0,7743	0,0124	4	34	8	15	1			
4	J29BL1	26	3,9902	0,1534			3	19	4			
5	J30BL1	76	1,0496	0,0138	10	44	16	6				
6	J31BL2	49	0,2866	0,0058	28	14		5	2			
7	J32BL2	59	2,0853	0,0353	7	18	16	18				
8	J33BL2	56	1,2147	0,0216	3	22	14	16	1			
9	J34BL2	49	1,1347	0,0231	6	12	9	18	4			
10	J35BL2	58	1,1179	0,0192		37	18	3				
11	J36BL4	54	2,8473	0,0527	13	18	5	9	6	1		2
12	J37BL4	47	1,423	0,0302		23	3	15	5			1
13	J38BL4	78	2,0774	0,0266	7	31	16	24				
14	J39BL4	44	4,3663	0,0992		15	3	19	4	2		1
15	J40BL4	42	3,8414	0,0914	3	11	4	11	5			8
16	J41BL6	32	2,4915	0,0778		14	4	9	4	1		
17	J42BL6	36	0,6355	0,0176		21	9	6				
18	J43BL6	45	2,8809	0,0640	3	7	9	22	4			
19	J44BL6	32	1,4177	0,0443	12		2	14	4			
20	J45BL6	43	1,3701	0,0318	2	12	11	18				
21	J46BL8	31	0,4684	0,0151	7	13	6	5				
22	J47BL8	67	0,8721	0,0130	37	25		3	1	1		
23	J48BL8	17	0,2303	0,0135		9	6	2				
24	J49BL8	2	0,0238	0,0119		1	1					
25	J50BL8	34	0,2401	0,0070	4		1	26	3			
26	J51BL17	37	0,8721	0,0235	25	4		8				
27	J52BL17	31	0,8557	0,0276	7	10	3	5	4	1		1
28	J53BL18	65	0,2607	0,0040	31	32	1	1				
29	J54BL18	20	0,6261	0,0313	2	3	4	11				
30	J55BL20	17	0,6388	0,0375	2	5	4	6				
31	J56BL20	10	2,0894	0,2089				7	1			2
32	J57BL22	47	1,3119	0,0279		17	11	19				
33	J58BL22	49	0,3637	0,0074	14	24	4	7				
34	J59BL24	26	1,2461	0,0479		3	4	12	4	2		1

TABELA 2 - NÚMERO DE NÓDULOS, PESO DE NÓDULOS E MORFOLOGIA DE NÓDULOS COLETADOS NOS TESTES DE PROCEDÊNCIA E PROGÊNIES DE *Acacia mearnsii*, EM FEVEREIRO DE 2015, NOS MUNICÍPIOS DE CRISTAL E JAGUARÃO – RS.

(Conclusão)

NC	I	NN	PN (g)	PMIN (mg)	Morfologia do Nódulo					
					ES	BTE	BTÃO	AF	FL	AG
35	J60BL24	0	PRESENÇA DE GALHAS E AUSÊNCIA DE NÓDULOS							
36	C26BL15	25	0,3346	0,01338	9	5	2	7	2	
37	C27BL15	16	0,1217	0,0076	6	5	2	3		
38	C28BL15	20	0,1559	0,0077	3	10	6	1		
39	C29BL14	9	0,0229	0,0025	4	2	3			
40	C30BL15	46	0,4267	0,0092	12	18	14	2		
41	C31BL16	69	0,4153	0,0060	35	25	9			
42	C32BL16	29	0,2627	0,0090	9	6	4	10		
43	C33BL16	22	0,1556	0,0070	7	10	4	1		
44	C34BL16	29	0,1794	0,0061	7	8	1	13		
45	C35BL16	45	0,0622	0,0013	45					
46	C36BL16	42	0,2405	0,0057	21	10	5	6		
47	C37BL17	49	1,8802	0,0383	12	7	9	16	5	
48	C38BL14	45	0,1926	0,0042	26	10	6	3		
49	C39BL17	19	0,1126	0,0059	10	3	1	5		
50	C40BL17	46	0,2644	0,0057	15	19	11	1		
51	C41BL18	18	0,0836	0,0046	9	7	2			
52	C42BL18	69	0,857	0,0124	33	24	6	5	1	
53	C43BL18	42	0,3402	0,0081	26	8	8			
54	C44BL18	34	0,2105	0,0061	14	10	5	5		
55	C45BL18	28	0,1664	0,0059	8	14	6			
56	C46BL19	27	0,253	0,0093	5	10	7	5		
57	C47BL19	47	0,4754	0,0101	20	12	9	6		
58	C48BL19	10	0,0845	0,0084	2	5		3		
59	PRESENÇA DE GALHAS E AUSÊNCIA DE NÓDULOS									
	C49BL19	0								
60	C50BL19	13	0,013	0,0010	13					

Fonte: O Autor, 2018.

NC – Número de coleta; I – Indivíduo; NN – Número de nódulos; PN – Peso de nódulos; PMIN – Peso médio individual de nódulos; ES – esférico; BTE – Bastonete; BTÃO – Bastão; AF – Amorfo; AG – Aglomerado; CO – Coraloide.

Para o processo de isolamento foram utilizados dez nódulos escolhidos aleatoriamente, os quais foram desinfestados em álcool 95% por cerca de 30 s, hipoclorito de sódio a 6 % durante 1 min e por fim enxaguados em água ultra purificada estéril por 4 vezes (BARRETT e PARKER, 2006). A obtenção dos isolados ocorreu através da maceração dos nódulos, em 500 µL de água ultra purificada. A maceração foi realizada em tubos de ensaio com bastão de vidro contra as paredes dos tubos. Após o processo de maceração, foi retirado da solução resultante, a quantidade de uma alça de 10 µL previamente esterilizada, pelo processo de flambagem, e efetuou-se a técnica do esfregaço em placas de Petri contendo meio de cultivo YMA segundo o método de Vincent (1970). Por fim, as placas foram incubadas em câmara BOD a 28 °C por sete dias.

Ao fim do período de incubação, obteve-se 187 isolados, os quais foram repicados para novas placas de Petri contendo o meio de cultivo YMA, e purificadas.

### **2.3. Caracterização Morfológica e de Promoção de Crescimento**

No Laboratório de Biologia do Solo da Universidade Federal do Paraná -UFPR foram realizadas as caracterizações morfológicas das bactérias purificadas, por meio da avaliação de forma, elevação, borda, brilho e coloração/pigmentação das colônias (NEDER, 1992).

Os isolados foram submetidos: 1) ao teste de coloração Gram e 2) ao teste de crescimento nas temperaturas de 28 e 32 °C em pH 6,8 do meio de cultura, com três placas/repetições por isolado. Em todos os ensaios de crescimento as placas foram submetidas ao período de incubação de sete dias em câmara BOD. A avaliação do crescimento ocorreu por mensuração do diâmetro das colônias, com paquímetro digital e os isolados com diâmetro médio final maior ou igual 5 mm eram consideradas crescidas. As medições ocorreram aos três, cinco e sete dias, com o objetivo de separar as cepas de rápido, médio e lento crescimento, respectivamente.

A produção de muco foi determinada de acordo com Lammel (2007) e a reação dos isolados em meio YMA com corante azul bromotimol e vermelho congo (ODEE et al., 1997).

## 2.4. Caracterização da Atividade de Promoção do Crescimento

O potencial dos isolados como promotores do crescimento de plantas ocorreu por meio de testes que avaliaram a capacidade de solubilizar fosfato e produzir o ácido indol acético (AIA).

A atividade de solubilização do fosfato foi feita por meio da adaptação do método de Verma et al. (2001): 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose; 5 g.L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>Cl; 1 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 15 g.L<sup>-1</sup> de agar; 4 g.L<sup>-1</sup> de CaHPO<sub>4</sub>; com pH ajustado em 6,8, e acrescentado 50 mg.L<sup>-1</sup> de ciclohexamida ao meio de cultura. Para assegurar que os isolados são solubilizadores, todos os isolados obtidos foram aplicados em quatro pontos por placa de Petri com três placas por repetição para cada isolado, ou seja foram visualizados doze repetições por isolado. As avaliações ocorreram após o período de sete dias de incubação em câmara BOD a 28 °C, quando foi possível avaliar a formação de um halo presente ao redor dos isolados, característica que nessas condições consideram a atividade positiva, ou seja, bactérias solubilizadoras de fosfato.

A avaliação da produção ácido indol acético (AIA) dos isolados foi realizada pelo método proposto por Asghar et al. (2002) com adaptações. Cada isolado foi crescido em dois tubos Falcon: um contendo 15 mL de meio de cultura líquido YMA e outro contendo 15 mL de meio de cultura líquido YMA acrescido de 50 mg.L<sup>-1</sup> de triptofano (precursor do AIA). Foram utilizados 380 tubos Falcon para o crescimento dos 187 isolados obtidos, além de duas amostras positivas (com presença das cepas SEMIA 1126 e SEMIA 1127) e ainda uma amostra em branco (sem a presença de microrganismos). O período de incubação, para esse teste foi de 4 dias em câmara BOD à 28 °C, sob agitação constante a 150 rpm.

Ao fim do período de incubação, as amostras foram divididas em subamostras, que serviram como repetições, em que cada um dos isolados, formaram seis subamostras, constituídas três com presença e três com ausência do triptofano, as quais foram obtidas por meio da transferência de 2 mL da solução de cada isolado para cada microtubo. Em seguida, foram submetidas à centrifugação a 10.000 rpm por 5 min e posteriormente, retirou-se 1,5 mL do sobrenadante, e neste foi acrescido 1 mL de solução Salkowski (composta de 12 g.L<sup>-1</sup> de FeCl<sub>3</sub> + 620 mL.L<sup>-1</sup> de HSO<sub>4</sub>, em 1000 mL de água destilada), mantida por 30 min sob ausência de

luz, para ocorrência da reação de oxidação. A quantificação foi feita utilizando-se espectrofotômetro, sob comprimento de onda de 550 nm.

A determinação da concentração real de AIA, foi obtida através da construção de curvas analíticas a fim de ajustar os dados. As concentrações finais de AIA obtidas em  $\mu\text{g/mL}$  de cada subamostra, com ausência e presença de triptofano, resultaram na determinação dos isolados que produzem o AIA.

## **2.5. Análise e Agrupamento dos Isolados**

Foram adotados valores para cada característica cultural e morfofisiológica dos isolados do nódulo da *Acacia mearnsii*, conforme Tabela 3. A essas características foram atribuídos valores de peso diferentes para criar um nível hierárquico, que resultaram na formação de matrizes, uma contendo todos os isolados obtidos nos cinco materiais genéticos para os dois municípios e matrizes individuais para cada material genético e local. As matrizes foram utilizadas para realizar a análise multivariada de agrupamento, a fim de serem divididos os isolados em grupos de acordo com as características.

TABELA 3 - VALOR RELATIVO AS CARACTERÍSTICAS CULTURAIS E MORFOLÓGICAS DOS ISOLADOS BACTERIANOS DOS ISOLADOS DE *Acacia mearnsii*

<b>Característica cultural</b>	<b>Observações</b>	<b>Valor determinado na Matriz</b>
<b>Reação/alteração de pH em meio YMA com Azul de bromotimol</b>	Amarelo – Alcalinização	3
	Azul – Acidificação	0
<b>Velocidade de Crescimento</b>	> 3 dias	2 para a data em que alcançou o crescimento e 0 para os demais dias
	> 5 dias	
	> 7 dias	
<b>Produção de EPS</b>	Pouco	1 ou 0 para a presença ou ausência da característica
	Intermediário	
	Muito	
<b>Absorção do Vermelho Congo</b>	Não absorve	1 ou 0 para a presença ou ausência da característica
	Absorve pouco	
	Absorve	
<b>Solubilização de Fosfato</b>	Solubiliza	1
	Não solubiliza	0
<b>Produção de AIA</b>	Produz	1
	Não produz	0
<b>Cor da Colônia</b>	Incolor	1
	Pigmentada	0

Fonte: O Autor, 2018.

Com a construção da planilha matricial, aplicou-se uma análise multivariada de agrupamento (Cluster analysis), com base na média das distâncias euclidianas por meio do software estatístico PAleontological STatistic (PAST) (HAMMER, HARPER, RYAN, 2001), a fim de selecionar e reduzir a quantidade de isolados para a extração de DNA e para o teste de nodulação.

## 2.6. Teste de Autenticação

O teste de autenticação foi realizado para determinar a capacidade que os isolados apresentam em formar a simbiose pela formação de nódulos em plantas teste. Por ser a leguminosa que aceita o maior número de rizóbios em testes de nodulação, utilizou-se o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar BRS Esteio, desenvolvida pela Embrapa Arroz e Feijão.

A determinação do potencial de nodulação dos isolados ocorreu de acordo o método Andrade e Hamakawa (1994) em que a inoculação dos isolados foi aplicada em feijão pré-germinado em BOD segundo as Regras para Análises de Sementes - RAS (BRASIL, 2009). O teste foi constituído por potes de vidro com capacidade de 250 mL, contendo papel filtro e a solução nutritiva padrão determinada por Somasegaran e Hoben (1985), para o desenvolvimento das plântulas e os nódulos.

Para cada um dos 60 isolados testados foram inoculadas quatro plantas (duas repetições por teste de autenticação).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Classificação dos Nódulos

A primeira coleta de material resultou na obtenção de nódulos de 38 indivíduos dos 40 selecionados (15 de Jaguarão e 25 de Cristal) e na segunda coleta nódulos de 58 indivíduos de 60 selecionados (35 de Jaguarão e 25 de Cristal). Em ambas as coletas, foi constatado que alguns indivíduos possuíam pequena quantidade de nódulos ou ausência total de nódulos possivelmente devido à presença de galhas nas raízes. Essas galhas foram provocadas pelo nematoide *Meloidogyne javanica* (R. M. D. G. CARNEIRO, comunicação pessoal, 2015).

A variação nos formatos dos nódulos encontrados no presente estudo foi semelhante aos formatos descritos por Lammel (2007) em espécies leguminosas presentes em Florestas de Araucária. Porém, a *A. mearnsii* apresentou todas as características descritas nos materiais e métodos, com exceção da forma de aglomerado na primeira coleta, enquanto que as seis espécies leguminosas pertencentes a família das *Mimosoideae* avaliadas por Lammel (2007) não apresentaram as formas bastonete e amorfo. Porém, foram descritas características fixas de morfologia para cada espécie: *Acacia dealbata* (Link) F. J. Muell e *Mimosa dolens* Vell. Var. *acerba* (Benth.) Barneby - esférico e bastão; *Mimosa filipetiola* Burkart - bastão e coraloide; *Mimosa pilulifera* Bent. var. *pseudincana* (Burkar) Barneby - forma de leque e aglomerado; *Mimosa scabrella* Benth. – esférico, bastão e forma de leque.

Em se tratando do formato de nódulos, quando se refere ao gênero *Acacia*, Goi, Faria e Neves (1984) relataram nódulos com características alongadas para as espécies *A. auriculiformis*, *A. raddiana* e *A. senegal* e coraloides em *A. decurrens* e *A. podalyriaefolia*.

A partir das tabelas 1 e 2 verificou-se que existe diferença no peso médio individual dos nódulos com variação de 0,0010 g até 0,2089 g entre os indivíduos/material genético (procedência) na primeira coleta e segunda coleta.

Entretanto, os indivíduos/material genético que se destacaram na segunda coleta, possuíam os maiores valores de pesos médios individuais dos nódulos com 0,2089 g, 0,1534 g, 0,1473 g e 0,0992 g, identificados como: J29BL1, J15BL24, J56BL20 e J39BL4 respectivamente. Os indivíduos que apresentaram os maiores valores de peso médio individual de nódulo, pertenciam ao TPP de Jaguarão, em que as procedências J56BL20 e J39BL4 eram origem seminal da APS Camboatá, e as procedências J29BL1 e J15BL24 de origem clonal, do clone 1 e clone 3, respectivamente. O peso médio individual dos nódulos pode, segundo Porto et al. (2017), determinar o potencial de eficiência simbiótica pois existe uma correlação entre o peso individual dos nódulos e a eficiência simbiótica, com valores de correlação entre 67 a 75%.

O processo de isolamento, purificação e cultivo/conservação de bactérias resultou na obtenção de 187 isolados bacterianos. Houve indivíduos que apresentaram até 10 isolados diferentes por indivíduo/planta coletada.

### **3.2. Caracterização Morfofisiológica**

O teste de coloração de Gram realizado com todos os isolados em microscópio ótico resultou em 168 isolados (89,8 %) Gram negativas (TABELA 4), característica básica de rizóbios. Apenas 19 isolados (10,2 %) apresentaram característica de bactérias bacilos Gram positivas.

Dos 187 isolados, avaliados por meio do crescimento em diâmetro das colônias (mm) na temperatura de 28 °C e pH 6,8, verificou-se que 94,7% dos isolados cresceram rapidamente, ou seja, crescem em menos de três dias de incubação. Somente 5,3% apresentaram crescimento intermediário, ou seja, com crescimento menor do que cinco dias. Nenhum isolado apresentou crescimento lento, com crescimento em sete dias. Para a temperatura de 32 °C, todos os isolados bacterianos apresentaram características crescimento rápido.

TABELA 4 – CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DE ISOLADOS BACTERIANOS DO NÓDULO DE *Acacia mearnsii*

<b>Característica dos isolados</b>	<b>Frequência dos isolados (%)</b>	
<b>Gram</b>		
Negativa	89,8	
Positiva	10,2	
<b>Taxa de Crescimento</b>	<b>28°C</b>	<b>32°C</b>
3 dias	94,7	100
5 dias	5,3	0
7 dias	0	0
<b>Produção de EPS</b>		
Baixa	31,0	
Média	47,6	
Alta	21,4	
<b>Mudança de pH</b>		
Ácido	70,0	
Alcalino	30,0	
<b>Absorção de Vermelho Congo</b>		
Incolor	66,8	
Pigmentada	33,1	
<b>Solubilizadoras de Fosfato</b>		
Solubiliza	57,2	
Não solubiliza	42,8	

Fonte: O Autor, 2018

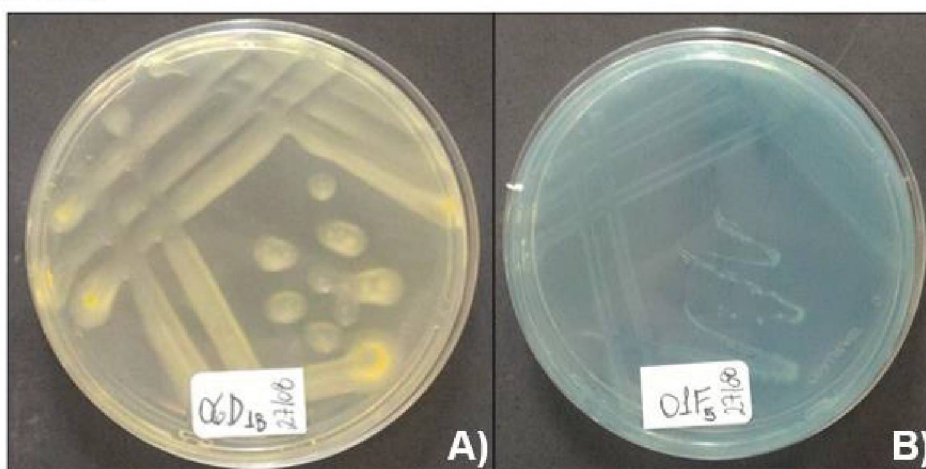
Os resultados na temperatura de 28 °C confirmam as características de crescimento dos rizóbios indicadas por Zakhia e Lajudie (2001), onde o gênero *Rhizobium* apresenta crescimento rápido e *Mesorhizobium* possui crescimento intermediário. Entretanto, o presente trabalho não apresentou isolados com características de crescimento lento, os quais geralmente são associados ao gênero dos *Bradyrhizobium*, este considerado como gênero dominante em leguminosas do gênero *Acacia*. Uma das possíveis explicações para a falta de rizóbios de crescimento lento, pode ser indicada pelo curto tempo de determinação para o desenvolvimento das mesmas, em que considerou-se o período de incubação de somente sete dias, ou seja, possivelmente uma maneira de assegurar que fossem obtidas as bactérias de lento crescimento seria aumentar o tempo do período de incubação de sete para dez dias (VICENT, 1970; ZAKHIA e LAJUDIE, 2001) e acima de dez dias para isolados com crescimento muito lento (HUNGRIA e SILVA, 2011).

A produção de polissacarídeos extracelulares (EPS) apresentou alto grau de variação sendo separadas nos valores de 31,0 %, 47,6 % e 21,4 % para as categorias de baixa, média e alta produtividade, respectivamente (TABELA 4). A produtividade de EPS está ligada a velocidade de crescimento e ao poder de infecção dos isolados (RIBEIRO, 2015). Os resultados do presente trabalho correlacionados com o rápido crescimento apontam que a maioria das bactérias tem

características semelhantes às descritas para os gêneros *Rhizobium* e *Mesorhizobium*, em que as produções de EPS foram altas e médias (RIBEIRO, 2015). Entretanto, 31,0 % dos isolados tiveram baixa produção de EPS, ou seja, possuíam características de bactérias pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*. Apesar de alguns isolados terem produzido pouco ou nenhuma quantidade de EPS, não podem ser identificadas como *Bradyrhizobium* porque os isolados obtidos não apresentavam valores de crescimento lento, ou seja, a coleção de bactérias possivelmente não possui bactérias pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*. Porém, isolados com crescimento rápido a intermediário, com características de baixa produção de EPS podem ser bactérias de outros gêneros, até mesmo isolados que não possuam a capacidade de fixador nitrogênio, mas encontravam-se presentes no interior dos nódulos (RIBEIRO, 2015).

Os isolados quando submetidos ao meio de cultura YMA com a presença do azul bromotimol tendem a alterar a coloração esverdeada do meio para as cores azul e amarelo quando modificam o pH do meio. De todos os isolados, 70,05 % modificaram para a coloração amarela significando que acidificaram o meio, característica pertencente a rizóbios do gênero *Rhizobium* e 29,95 % modificaram o meio para a cor azul (FIGURA 3), ou seja, alcalinizaram o meio característica de rizóbios pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*, constatado em totalidade no trabalho de diversidade de rizóbios realizado por Vargas et al. (2007).

FIGURA 3 – ALTERAÇÃO DE COLORAÇÃO DO MEIO DE CULTURA YMA COM A PRESENÇA DO AZUL BROMOTIMOL INOCULADAS COM BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE *Acacia mearnsii* DE WILD.



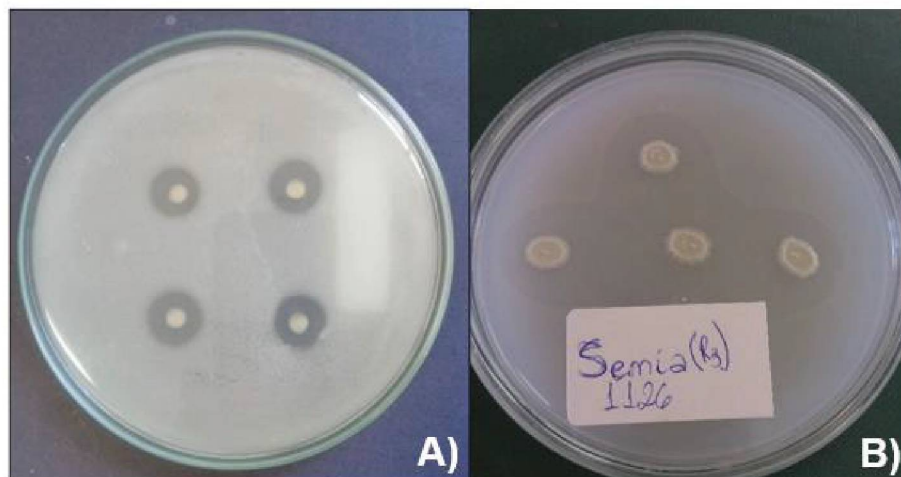
Alteração da coloração do meio de cultura YMA com presença do azul bromotimol para: A) Coloração amarela modificada pelo isolado 06D1B – Acidificou o meio; B) Coloração azulada modificada pelo isolado 01F5 – Alcalinizou o meio.

Fonte: O Autor, 2018.

Quanto a coloração das colônias a característica básica de rizóbios é de que não apresentam pigmentação, ou seja, não absorvem o vermelho congo e ficam incolores. No presente trabalho constou-se que 66,8 % dos isolados não absorviam a pigmentação vermelha, ou seja, apresentavam-se incolores os caracterizando como possíveis rizóbios, porém houve a presença de bactérias que absorveram o vermelho congo, cerca de 33,2 % dos isolados (1/3 de todos os isolados purificados), ou seja, encontravam-se pigmentadas nas placas, entretanto foram mantidas e também utilizadas no teste de autenticação devido a presença dos possíveis  $\beta$ -rizóbios que também possuem potencial de simbiose e eram antigamente descartados, por serem tratados como contaminantes (VARGAS et al., 2007).

A análise quanto a solubilização de fosfato no meio de cultura rico em fosfato de cálcio, comprovou que 107 isolados, ou seja, 57,7 % dos isolados obtidos possuíam a capacidade de solubilizar o fosfato de cálcio. Dentre as estirpes SEMIA utilizadas como referência contatou-se que somente a SEMIA 1126 apresentou a mesma capacidade de solubilização (Figura 4). O presente estudo utilizou o fosfato de cálcio como fonte de fósforo do meio, este componente apresenta somente uma ligação simples, sendo considerada uma ligação fraca. Por isso, outros estudos apontam que se fossem utilizadas fontes de fosfato que apresente maior força de ligação como o fosfato de ferro e de alumínio poderia restringir ainda mais esse valor de 57,7% de isolados com capacidade de solubilizar o fosfato pois o grau de solubilização dessas fontes de fosfato são das mais fáceis para as mais difíceis segundo a ordem crescente Ca-P - Al-P - Fe-P (BARROSO e NAHAS, 2008).

FIGURA 4 – SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO COM FORMAÇÃO DE HALO PELO MÉTODO DE VERMA ET AL. (2001) ADAPTADO.



A) Formação de halo pela solubilização de fosfato de isolado proveniente de nódulos de *Acacia mearnsii*; B) Formação de halo pela solubilização de fosfato com estirpe (SEMIA 1126).

Fonte: O Autor, 2018.

A produção de ácido indol acético (AIA) dos isolados foi positiva para todos os isolados tanto bactérias Gram negativas como positivas, assim como para as estirpes controles SEMIA, tanto na presença quanto na ausência de triptofano. Porém, para todos os isolados as taxas de concentração se apresentaram maiores na produção de AIA quando foram acrescidas com a presença do triptofano, os mesmos resultados foram obtidos no trabalho de Chagas Jr., Oliveira e Oliveira (2009) em que estudaram rizóbios isolados de feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp).

Em aspectos gerais, a diversidade de isolados bacterianos em nódulos de acácia negra é alta e utilizar somente a classificação morfofisiológica para determinar as estirpes de rizóbios, pode resultar em um grande erro. Não é possível fundamentar-se somente nessas características, pois a aplicação do corante vermelho congo, por exemplo, poderia ser um instrumento de pré seleção equivocada, em que bactérias que não absorvem o corante seriam previamente selecionadas por pertencerem ao grupo das alpha – proteobactérias ou  $\alpha$ -rhizobia, excluindo as  $\beta$  e  $\gamma$  – proteobactérias/rhizobia que absorvem o corante, mesmo que essas apresentem capacidade ou incapacidade de nodular e fixar o nitrogênio (BOURNAUD et al., 2017). Essa informação, ressaltou que dentro de um nódulo encontra-se uma abundância de bactérias, ou seja, está presente o rizóbio efetivo nodulante e fixador de nitrogênio assim como bactérias endofíticas de outras espécies ou outras cepas, que se estabelecem no interior do nódulo (SPRENT, 2009).

### 3.3. Teste de Autenticação

O teste de autenticação na nodulação em vasos com o feijão foi realizado com 60 isolados escolhidos aleatoriamente entre os 115 isolados obtidos na primeira coleta. Essa seleção se baseou nas características do tipo de Gram em que se decidiu utilizar bactérias Gram negativas e com características distintas quando comparadas as características morfológicas. Os resultados obtidos confirmaram que 57 isolados foram capazes de formar simbiose com a planta após 21 dias de inoculação, ou seja, conseguiram formar nódulo em casa de vegetação (Figura 5). Somente três isolados não conseguiram apresentar a capacidade de formar nódulos. Os isolados que formaram nódulos no feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), foram considerados como aptos para seguir o estudo, sendo possíveis isolados que servirão de base para a formação de um inoculantes.

FIGURA 5 - TESTE DE AUTENTICAÇÃO EM FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.) SEGUNDO MÉTODO DE ANDRADE E HAMAKAWA (1994), EM CASA DE VEGETAÇÃO. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, CURITIBA-PR.



A) Disposição dos vasos com feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculados com bactérias isoladas de nódulos de *Acacia mearnsii* De Wild.; B) Raízes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) com presença de nódulos após 21 dias de inoculação.

Fonte: O Autor, 2018.

### 3.4. Análise e Agrupamento dos Isolados

A análise de agrupamento dos isolados obtidos dos nódulos da *A. mearnsii* submetidos a uma análise multivariada por distância euclidiana sobre os parâmetros morfofisiológicos, para as duas áreas e os cinco materiais genéticos diferentes (três clones e duas variedades genética – APS Geada e Camboatá) resultaram em alta variação fenotípica (GRAFICO 1).

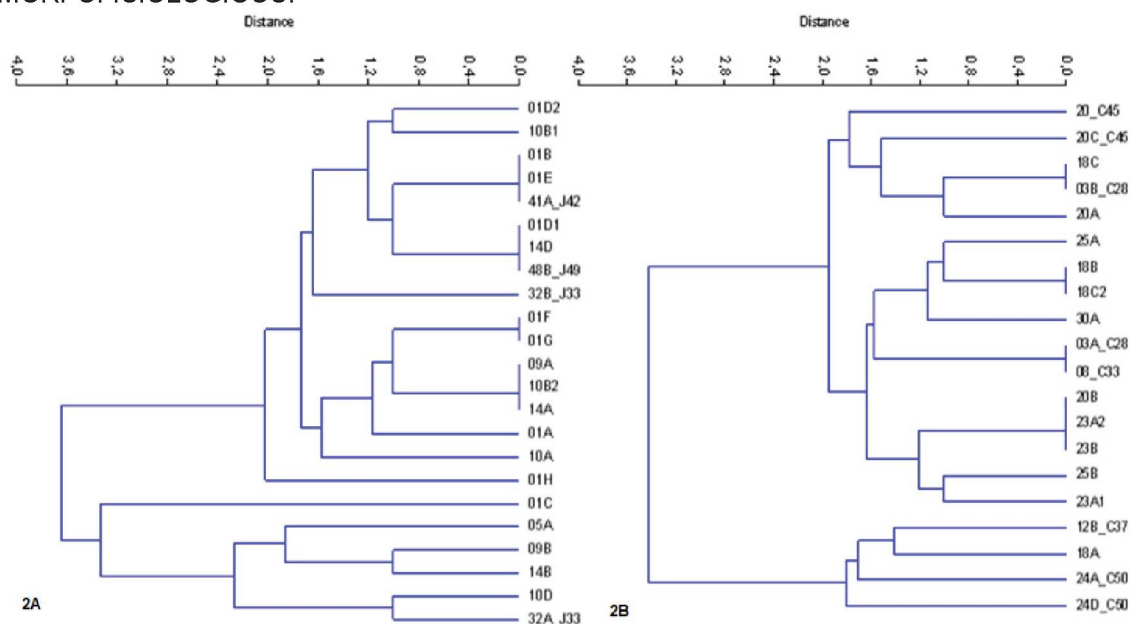
O número de grupos diminui naturalmente com o aumentar da distância entre as médias. Na distância de 0,8, 1,0 e 1,2 resultaram em 49, 29 e 19 grupos respectivamente, com a exclusão da estirpe SEMIA 1127 que resultou em um grupo específico nas 3 classificações, sendo desconsiderada. A SEMIA 1126 em todas as distâncias foi agrupada com demais isolados.

Dentre os 57 isolados que possuem a capacidade de nodular de acordo com o teste de autenticação é possível indicar que essa diversidade é alta por estarem distribuídos em todos os 29 grupos ao analisar o Gráfico 1 a uma distância igual a 1, excluindo o grupo composto somente pela SEMIA 1127.

A diversidade de bactérias quando avaliadas separadamente para cada local e material genético mantém ainda uma alta diversidade, comprovando que não existe uma especificidade entre um material genético e uma estirpe de bactérias, principalmente um rizóbio específico (GRÁFICO 2 a 6). As plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) são promíscuas, ao emitir os sinais bioquímicos de que necessitam da associação seja de vida livre ou simbiótica, e quaisquer microrganismos que possuam a capacidade de suprir essa necessidade da planta irá realizar a função (MICHIELS et al., 1998). As interações dos componentes solo-microrganismo-planta são essenciais para a manutenção dos ecossistemas (KING, 2011).



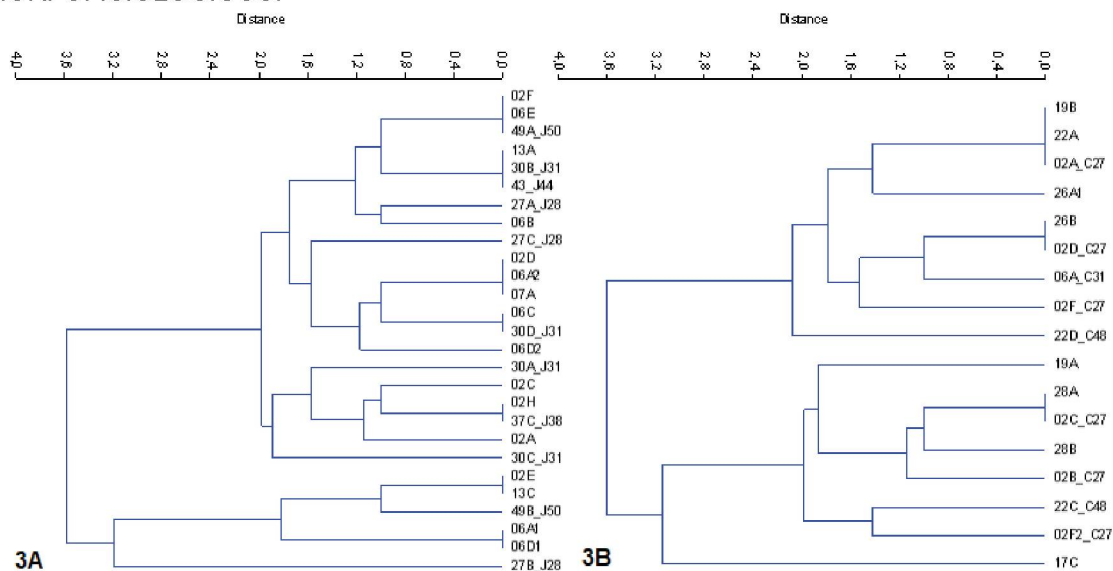
GRÁFICO 2 – AGRUPAMENTO DOS ISOLADOS OBTIDOS DO NÓDULO DE *Acacia mearnsii* DE WILD, DO CLONE 1, PARA JAGUARÃO/RS E CRISTAL/RS, SUBMETIDOS A UMA ANÁLISE MULTIVARIADA POR DISTÂNCIA EUCLIDIANA SOBRE OS PARÂMETROS MORFOFISIOLÓGICOS.



2A – Isolados de Jaguarão - RS; 2B – Isolados de Cristal – RS.

Fonte: O Autor, 2018.

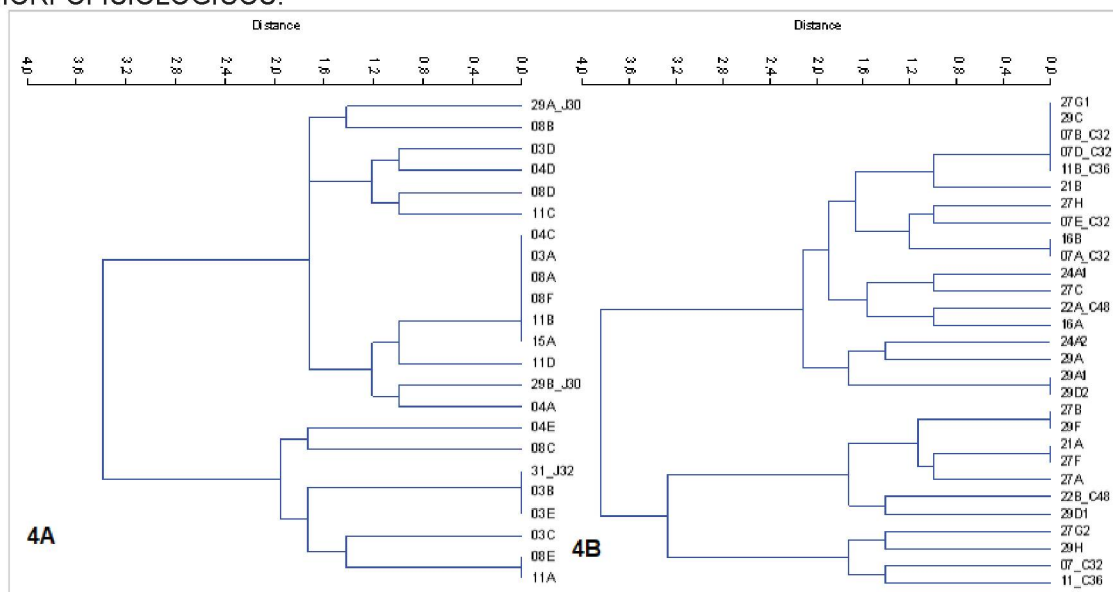
GRÁFICO 3 - GRUPAMENTO DOS ISOLADOS OBTIDOS DO NÓDULO DE *Acacia mearnsii* DE WILD, DO CLONE 2, PARA OS LOCAIS DE JAGUARÃO/RS E CRISTAL/RS, SUBMETIDOS A UMA ANÁLISE MULTIVARIADA POR DISTÂNCIA EUCLIDIANA SOBRE OS PARÂMETROS MORFOFISIOLÓGICOS.



3A – Isolados de Jaguarão - RS; 3B – Isolados de Cristal – RS.

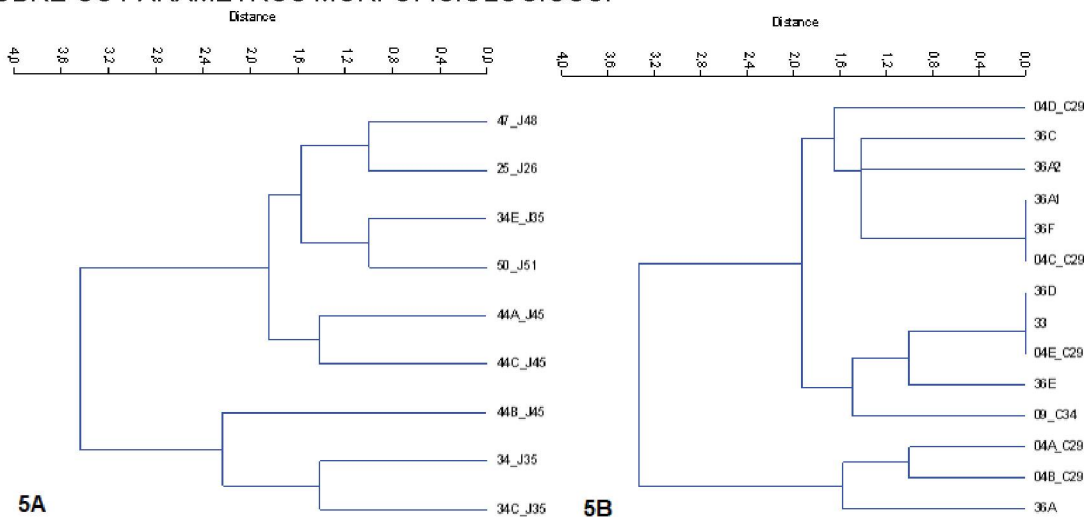
Fonte: O Autor, 2018.

GRÁFICO 4 - AGRUPAMENTO DOS ISOLADOS OBTIDOS DO NÓDULO DE *Acacia mearnsii* DE WILD, DO CLONE 3, PARA OS LOCAIS DE JAGUARÃO E CRISTAL, SUBMETIDOS A UMA ANÁLISE MULTIVARIADA POR DISTÂNCIA EUCLIDIANA SOBRE OS PARÂMETROS MORFOFISIOLÓGICOS.



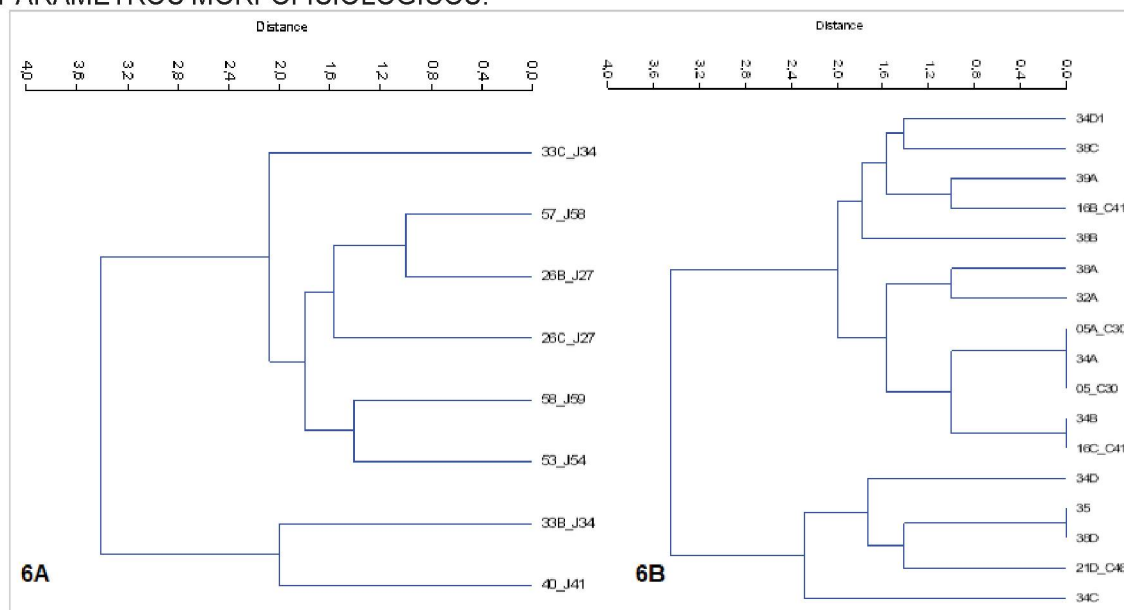
4A – Isolados de Jaguarão - RS; 4B – Isolados de Cristal – RS.  
Fonte: O Autor, 2018.

GRÁFICO 5 - AGRUPAMENTO DOS ISOLADOS OBTIDOS DO NÓDULO DE *Acacia mearnsii* DE WILD, DO MATERIAL SEMINAL APS CAMBOATÁ, PARA OS LOCAIS DE JAGUARÃO E CRISTAL, SUBMETIDOS A UMA ANÁLISE MULTIVARIADA POR DISTÂNCIA EUCLIDIANA SOBRE OS PARÂMETROS MORFOFISIOLÓGICOS.



5A – Isolados de Jaguarão - RS; 5B – Isolados de Cristal – RS.  
Fonte: O Autor, 2018.

GRÁFICO 6 - AGRUPAMENTO DOS ISOLADOS OBTIDOS DO NÓDULO DE *Acacia mearnsii* DE WILD, DO MATERIAL SEMINAL APS GEADA, PARA OS LOCAIS DE JAGUARÃO E CRISTAL, SUBMETIDOS A UMA ANÁLISE MULTIVARIADA POR DISTÂNCIA EUCLIDIANA SOBRE OS PARÂMETROS MORFOFISIOLÓGICOS.



6A – Isolados de Jaguarão - RS; 6B – Isolados de Cristal – RS.

Fonte: O Autor, 2018.

O presente trabalho apresenta nos dendrogramas dos Gráfico 2 a 6 alta diversidade de bactérias isoladas de nódulos de *A. mearnsii*, por configurar a formação de três a cinco grandes grupos no grau de distância igual a 2, o qual aumenta a quantidade de grupos quando essa distância é reduzida. Com essa quantidade de grupos dentro e entre materiais genéticos e possível inferir que a alta diversidade reduz a capacidade de especificidade entre cepas de uma espécie sendo viáveis a somente um material genético, indicando que as plantas podem realizar a simbiose com mais de um tipo de rizóbio.

A partir dessas informações mais a identificação molecular dos isolados que nodularam, será possível prosseguir para a etapa de confirmação da qualidade dos isolados referente à nodulação, além de determinar o potencial de resiliência dos isolados quando aplicadas em solos não estéreis, ou seja, se o inoculo terá a capacidade de se manter viável e efetivo quando entrar em contato com outros microrganismos presentes no solo. Finalmente com a determinação das estirpes que apresentarem maior potencial, será possível desenvolver novas tecnologias a ser utilizada como inoculante comercial.

#### 4. CONCLUSÕES

A análise multivariada de agrupamento por distância euclidiana demonstrou alta diversidade fenotípica de bactérias isoladas de nódulos de *Acacia mearnsii*.

O teste de nodulação com o feijão esteio resultou na nodulação de 56 bactérias de 60 bactérias testadas, comprovando o isolamento de rizóbios.

A grande quantidade de grupos permite inferir na presença de rizóbios dos gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium*.

A alta diversidade de grupos bacterianos nos dendrogramas dos materiais genéticos e localidades permitem rejeitar a hipótese sobre especificidade, uma vez que esses vários grupos existem dentro de mesmo material genético e diferentes localidades.

#### 5. REFERÊNCIAS

AGEFLOR - Associação Gaúcha de Empresas Florestais (2018) A Indústria de Base Florestal no Rio Grande do Sul – Ano Base 2016. Disponível em: <http://www.ageflor.com.br/noticias/wp-content/uploads/2017/08/A-INDUSTRIA-DE-BASE-FLORESTAL-NO-RS-2017.pdf>. Acessado em: 16 de maio de 2018.

AMRANI, S.; NOUREDDINE, N. E.; BHATNAGAR, T.; ARGANDONA, M.; NIETO, J. J.; VARGAS, C. Phenotypic and genotypic characterization of rhizobia associated with *Acacia saligna* (Labill.) Wendl. in nurseries from Algeria. **Systematic and applied microbiology**, v. 33, n. 1, p. 44-51, 2010.

ANDRADE, D. S.; HAMAKAWA, P. J. Estimativa do número de células de rizóbio no solo e inoculante por infecção em planta. In: HUNGRIA, M. ARAÚJO, R.S. (Eds.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, p.63-92, 1994.

ASGHAR, H.N.; ZAHIR, Z.A.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biology and Fertility of Soils*, v.35, p.231-237, 2002.

BARCELLOS, F. G.; DELAMUTA, J. R. M.; HUNGRIA, M.; MENNA, P.; BATISTA, J. D. S.; RIBEIRO, R. A. Taxonomia Bacteriana – Aspectos Atuais e Perspectivas. In: YAMADA-OGATTA, S. F., NAKAZATO, G., FURNALETTO, M., & NOGUEIRA, M. **Tópicos especiais em microbiologia**. *Embrapa Soja - Capítulo em livro científico (ALICE)*, 2016. Disponível em: <<http://www.uel.br/ccb/microbiologia/pages/livros.php>> Acessado em: 15/06/2018.

BARRETT, C. F.; PARKER, M. A. Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus* and *Rhizobium* sp. Nodule Bacteria on two *Mimosa* sp. in Costa Rica. **Applied and Environmental Microbiology**, Washinton, v. 72, n. 2, p. 1198 – 1206, 2006.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 4, p. 529-535, 2008.

BIRNBAUM, C.; BARRETT, L. G.; THRALL, P. H.; LEISHMAN, M. R. Mutualisms are not constraining cross-continental invasion success of *Acacia* species within Australia. **Diversity and Distributions**, v. 18, n. 10, p. 962-976. 2012. 10.1111/j.1472-4642.2012.00920.x

BOUDIAF, I.; LE ROUX, C.; BAUDOIN, E.; GALIANA, A.; BEDDIAR, A.; PRIN, Y.; DUPONNOIS, R. Soil Bradyrhizobium population response to invasion of a natural *Quercus suber* forest by the introduced nitrogen-fixing tree *Acacia mearnsii* in El Kala National Park, Algeria. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 70, p. 162-165, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.12.030>

BOUKHATEM, Z. F.; DOMERGUE, O.; BEKKI, A.; MERABET, C.; SEKKOUR, S.; BOUAZZA, F.; Robin; DUPONNOIS, Philippe; de LAJUDIE, Antoine; GALIANA; Symbiotic characterization and diversity of rhizobia associated with native and introduced acacias in arid and semi-arid regions in Algeria, **FEMS Microbiology Ecology**, Volume 80, Issue 3, 1 June 2012, Pages 534–547, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01315.x>

BOURNAUD C.; MOULIN, L.; CNOCKAERT, M; FARIA, S. M.; PRIN, Y.; SEVERAC, D.; VANDAMME, P. *Paraburkholderia piptadeniae* sp. nov. and *Paraburkholderia ribeironis* sp. nov., two root-nodulating symbiotic species of *Piptadenia gonoacantha* in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, p. 432–440, 2017. DOI 10.1099/ijsem.0.001648

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. *Regras para análise de sementes*. 2009.

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

CRISÓSTOMO, J. A.; RODRÍGUEZ-ECHEVERRÍA, S.; FREITAS, H. Co-introduction of exotic rhizobia to the rhizosphere of the invasive legume *Acacia saligna*, an intercontinental study. **Applied Soil Ecology**, v. 64, p. 118-126, 2013.

DIOUF, D.; SAMBA-MBAYE, R.; LESUEUR, D.; BA, A. T.; DREYFUS, B.; DE LAJUDIE, P.; NEYRA, M. Genetic diversity of *Acacia seyal* Del. rhizobial populations indigenous to Senegalese soils in relation to salinity and pH of the sampling sites. **Microbial ecology**, v. 54, n. 3, p. 553-566, 2007.

DREYFUS, B. L.; DOMMERGUES, Y. R. Nodulation of Acacia species by fast- and slow-growing tropical strains of Rhizobium. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 41, n. 1, p. 97-99, 1981.

FAYE, A.; SALL, S.; CHOTTE, J. L.; LESUEUR, D. Soil bio-functioning under *Acacia nilotica* var. tomentosa protected forest along the Senegal River. **Nutrient cycling in agroecosystems**, v. 79, n. 1, p. 35-44, 2007.

FIKRI-BENBRAHIM, K.; CHRABI, M.; LEBRAZI, S.; MOUMNI, M.; ISMAILI, M. Phenotypic and Genotypic Diversity and Symbiotic Effectiveness of Rhizobia Isolated from Acacia sp. Grown in Morocco. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 19, n. 1, p. 201-216, 2017.

GLEDDIE, S. C.; LEGGETT, M. E.; RICE, W. A.; OLSEN, P. E. **U.S. Patent No. 5,484,464**. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office, 1996.

GOI, S.R.; FARIA, S.M.; NEVES, M.C.P. Fixação de nitrogênio, tipo de nódulo e ocorrência de ureídeos em leguminosas florestais. **Pesquisa agropecuária brasileira**. v. 19, p. 185 – 190, 1984.

GYANESHWAR, P.; HIRSCH, A. M.; MOULIN, L.; CHEN, W. M.; ELLIOTT, G. N.; BONTEMPS, C.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; GROSS, E.; REIS JR., F. B.; SPRENT, J. I.; YOUNG, J. P. W.; JAMES, E. K. Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 24, n. 11, p. 1276-1288, 2011.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST-palaeontological statistics, ver. 1.89. **Palaeontol electron**, v. 4, n. 1, p. 1-9., 2001.

HOQUE, M. S.; BROADHURST, L. M.; THRALL, P. H. Genetic characterization of root-nodule bacteria associated with *Acacia salicina* and *A. stenophylla* (Mimosaceae) across south-eastern Australia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 299-309, 2011.

HUNGRIA, M.; SILVA, K. D. **Manual de curadores de germoplasma-microorganismos: rizóbios e bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Brasília, DF, *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Documentos (INFOTECA-E)*, 2011.

JESUS, E. D. C.; MOREIRA, F. M. D. S.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. I. D.; OLIVEIRA, M. S. D. Leguminosae nodulating bacteria diversity from three different land use systems in Brazilian Western Amazon. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 40, n. 8, p. 769-776, 2005.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M. Diversity and Importance of Diazotrophic Bacteria to Agricultural Sustainability in the Tropics. In: **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**. Springer International Publishing. p. 269-292, 2017. 10.1007/978-3-319-55804-2\_12

KING, J. Reaching for the Sun. 2 nd Edition, Cambridge University Press, UK, 2011.

LAFAY, B.; BURDON, J. J. Small-subunit rRNA genotyping of rhizobia nodulating Australian *Acacia* spp. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 1, p. 396 - 402, 2001. 10.1128/AEM.67.1.396-402.2001

LAMMEL, D. R. **Diversidade de rizóbios em Florestas de Araucária no Estado de São Paulo**. 2007. Universidade de São Paulo. (Tese de Doutorado)

LAMMEL, D. R.; CRUZ, L. M.; CARRER, H.; CARDOSO, E. J. Diversity and symbiotic effectiveness of beta-rhizobia isolated from sub-tropical legumes of a Brazilian Araucaria Forest. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 12, p. 2335-2342, 2013.

LLORET, L.; ORMENO-ORRILLO, E.; RINCON, R.; MARTÍNEZ-ROMERO, J.; ROGEL-HERNÁNDEZ, M. A.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Ensifer mexicanus* sp. nov. a new species nodulating *Acacia angustissima* (Mill.) Kuntze in Mexico. **Systematic and applied microbiology**, v. 30, n. 4, p. 280-290, 2007.

LU, J. K.; DOU, Y. J.; ZHU, Y. J.; WANG, S. K.; SUI, X. H.; KANG, L. H. *Bradyrhizobium ganzhouense* sp. nov., an effective symbiotic bacterium isolated from *Acacia melanoxylon* R. Br. nodules. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, n. 6, p. 1900-1905, 2014.

MATIAS, S. R.; PAGANO, M. C.; MUZZI, F. C.; OLIVEIRA, C. A.; CARNEIRO, A. A.; HORTA, S. N.; SCOTTI, M. R. Effect of rhizobia, mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing microorganisms in the rhizosphere of native plants used to recover an iron ore area in Brazil. **European Journal of Soil Biology**, v.45, n. 3, p. 259-266, 2009.

MICHIELS, J.; DOMBRECHT, B.; VERMEIREN, N., XI, C.; LUYTEN, E.; VANDERLEYDEN, J. *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 26, n. 3, p. 193-205, 1998.

MIRANSARI, M. Contribution of arbuscular mycorrhizal symbiosis to plant growth under different types of soil stress. **Plant Biology**, v. 12, n. 4, p. 563-569, 2010.

MOCHIUTTI, S.; HIGA, A. R.; SIMON, A. A. Fitossociologia dos estratos arbóreo e de regeneração natural em um povoamento de acácia-negra (*Acacia mearnsii*, De Wild.) na região da Floresta Estacional Semidecidual do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, v. 18, n. 2, p. 207-222, 2008.

MOREIRA, F. M.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Editora UFLA, Lavras, MG, p. 729, 2006.

NEDER, R. N. Microbiologia: manual de laboratório. São Paulo: Nobre, 1992.

NGOM, A.; NAKAGAWA, Y.; SAWADA, H.; TSUKAHARA, J.; WAKABAYASHI, S.; UCHIUMI, T.; NUNTAGIJ, A.; KOTEPONG, S.; SUZUKI, A.; HIGASHI, S.; ABE,

M. A novel symbiotic nitrogen-fixing member of the *Ochrobactrum* clade isolated from root nodules of *Acacia mangium*. **The Journal of general and applied microbiology**, v. 50, n. 1, p. 17-27, 2004.

ODEE, D. W.; SUTHERLE, J. M.; MAKATIANI, E. T.; MCINROY, S. G.; SPRENT, J. I. Phenotypic characteristics e composition of rhizobia associated with woody legumes growing in diverse Kenyan conditions. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 188, n. 1, p. 66 - 75, 1997.

OLDROYD, G. E.; MURRAY, J. D.; POOLE, P. S.; DOWNIE, J. A. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. **Annual Review of Genetics**, v. 45, p. 119-144, 2011.

PORTO, D. S.; FARIAS, E. D. N. C.; CHAVES, J. D. S.; SOUZA, B. F.; MEDEIROS, R. D. D.; ZILLI, J. É.; SILVA, K. D. Symbiotic effectiveness of *Bradyrhizobium ingae* in promoting growth of *Inga edulis* Mart. seedlings. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 41, p. 1-15, 2017.

RIBEIRO, V. A. **Produção e caracterização de exopolissacarídeos a partir de bactérias diazotróficas cultivadas em meios à base de glicerol residual**. 2015. Universidade Federal de Rio Grande (FURG). Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos)

RICHARDSON, A. E.; BAREA, J. M.; McNEILL, A. M.; PRIGENT-COMBARET, C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and Soil**, v. 321, n. 1-2, p. 305-339, 2009.

RODRÍGUEZ-ECHEVERRÍA, S.; LE ROUX, J. J.; CRISÓSTOMO, J. A.; NDLOVU, J. Jack-of-all-trades and master of many? How does associated rhizobial diversity influence the colonization success of Australian *Acacia* species? **Diversity and Distributions**, v. 17, n. 5, p. 946-957, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2011.00787.x>

SAKROUHI, I.; BELFQUIH, M.; SBABOU, L.; MOULIN, P.; BENA, G.; FILALI-MALTOUF, A.; LE QUÉRÉ, A. Recovery of symbiotic nitrogen fixing acacia rhizobia from Merzouga Desert sand dunes in South East Morocco—Identification of a probable new species of *Ensifer* adapted to stressed environments. **Systematic and applied microbiology**, v. 39, n. 2, p. 122-131, 2016.

SILVA, F. B. **Seleção de rizóbios nativos simbiotes de *Desmodium incanum* e avaliação da promoção de crescimento de gramíneas**. 2016. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Dissertação de Mestrado)

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. Methods in legume - Rhizobium technology. University of Hawaii Niftal. Biological Nitrogen Fixation, p. 54-63, 1985.

SPRENT, J. I. **Legume Nodulation: A global perspective**. Wiley-Blackell, pp. 183, 2009.

STROSCHEIN, M. R. D. **Caracterização de bactéria fixadora de nitrogênio em *Lupinus albescens***. Universidade Federal de Santa Maria, p. 83, 2007. (Dissertação de Mestrado)

VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; SCHOLLES, D.; SILVEIRA, J. R. P.; JUNG, G. C.; GRANADA, C. E.; NEVES, A. G.; BRAGA, M. M.; NEGREIROS, T. Genetic diversity and symbiotic efficiency of black wattle-nodulating rhizobia in soils of Rio Grande do Sul State, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, n. 4, p. 647-654, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832007000400005>

VERMA, S. C.; JAGDISH, K L.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promotion and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 127-141, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00333-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00333-9).

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford Blackwell scientific publications, Oxford, 1970. 164 p.

ZAKHIA, F.; DE LAJUDIE, P. Taxonomy of rhizobia. **Agronomie**, EDP Sciences, v. 21, n. 6-7, p. 569-576, 2001. 10.1051/agro:2001146

## ANEXO

## ANEXO 1 - IDENTIFICAÇÃO DOS INDIVÍDUOS COLETADOS (C) DE ACORDO COM O BLOCO (BL), MATERIAL GENÉTICO E ÉPOCA DE COLETA

Material Genético Primeira Coleta (outubro/2014)	Fazenda Ouro Verde (Cristal/RS)	Fazenda Duas Figueiras (Jaguarão/RS)
Clone 1	C3BL1; C5BL4; C8BL7; C10BL10; C15BL14	J1BL17; J5BL18; J9BL20; J10BL22; J14BL23
Clone 2	C2BL1; C4BL4; C7BL7; C11BL10; C13BL13	J2BL17; J6BL18; J7BL20; J12BL22; J13BL24
Clone 3	C1BL1; C6BL4; C9BL7; C12BL10; C14BL14	J3BL17; J4BL18; J8BL20; J11BL22; J15BL24
APS Camboatá	C16BL1; C18BL4; C21BL7; C22BL10; C24BL13	
APS Geada	C17BL1; C19BL3; C20BL7; C23BL10; C25BL13	
Material Genético Segunda Coleta (fevereiro/2015)		
Clone 1	C28BL15; C33BL16; C37BL17; C45BL18; C50BL19	J29BL1; J33BL2; J40BL4; J42BL6; J49BL8
Clone 2	C27BL15; C31BL16; C39BL17; C43BL18; C49BL19	J28BL1; J31BL2; J38BL4; J44BL6; J50BL8
Clone 3	C26BL15; C32BL16; C36BL17; C44BL18; C48BL19	J30BL1; J32BL2; J37BL4; J43BL6; J47BL8
APS Camboatá	C29BL14; C34BL16; C40BL17; C42BL18; C47BL19	J26BL1; J35BL2; J39BL4; J45BL6; J48BL8; J51BL17; J53BL18; J56BL20; J57BL22; J60BL24
APS Geada	C30BL15; C35BL16; C38BL14; C41BL18; C46BL19	J27BL1; J34BL2; J36BL4; J41BL6; J46BL8; J52BL17; J54BL18; J55BL20; J58BL22; J59BL24

Fonte: O Autor, 2018.

## REFERÊNCIAS GERAIS

ALTIERI, M. A. Agroecology: the science of natural resource management for poor farmers in marginal environments. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 93, n. 1, p. 1-24, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(02\)00085-3](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(02)00085-3)

ALVES, F. D. As faces do desenvolvimento rural no sul gaúcho: produção agroecológica familiar e monoculturas empresariais. **Agrária**, n. 7, p. 37-60, 2007. <http://dx.doi.org/10.11606/issn.1808-1150.v0i7p37-60>

AGEFLOR - Associação Gaúcha de Empresas Florestais (2018a) A Indústria de Base Florestal no Rio Grande do Sul – Ano Base 2016. Retrieved from <http://www.ageflor.com.br/noticias/wp-content/uploads/2017/08/A-INDUSTRIA-DE-BASE-FLORESTAL-NO-RS-2017.pdf>. Available in 16<sup>th</sup> May 2018.

AGEFLOR - Associação Gaúcha de Empresas Florestais (2018b) A Indústria de Base Florestal no Rio Grande do Sul – Ano Base 2015. Retrieved from <http://www.ageflor.com.br/noticias/wp-content/uploads/2016/09/AGEFLOR-DADOS-E-FATOS-2016.pdf>. Available in 16<sup>th</sup> May 2018

AMRANI, S.; NOUREDDINE, N. E.; BHATNAGAR, T.; ARGANDONA, M.; NIETO, J. J.; VARGAS, C. Phenotypic and genotypic characterization of rhizobia associated with *Acacia saligna* (Labill.) Wendl. in nurseries from Algeria. **Systematic and applied microbiology**, v. 33, n. 1, p. 44-51, 2010.

ANDRADE, D. S.; HAMAKAWA, P. J. Estimativa do número de células de rizóbio no solo e inoculante por infecção em planta. In: HUNGRIA, M. ARAÚJO, R.S. (Eds.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, p.63-92, 1994.

ANPII -Associação Nacional de Produtores e Importadores de Inoculantes - Estatísticas. 2018. Retrieved from <http://www.anpii.org.br/> Available in: 15<sup>th</sup> May 2018.

ASGHAR, H.N.; ZAHIR, Z.A.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, v.35, p.231-237, 2002.

ATANGANA, A.; KHASA, D.; CHANG, S.; DEGRANDE, A. Definitions and classification of agroforestry systems. In: **Tropical Agroforestry**. Springer Dordrecht, p. 35-47, 2014. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-7723-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-007-7723-1_3)

ATTIA, M. F.; EL-DIN, A. N. N.; EL-ZARKOUNY, S. Z.; EL-ZAIAT, H. M.; ZEITOUN, M. M.; SALLAM, S. M. Impact of Quebracho Tannins Supplementation on Productive and Reproductive Efficiency of Dairy Cows. **Open Journal of Animal Sciences**, v. 6, n. 4, p. 269, 2016. 10.4236/ojas.2016.64032

AUER, C. G.; SILVA, R. Fixação de nitrogênio em espécies arbóreas. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSI, M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Universidade Estadual de São Paulo, 1992. p. 160-167.

BAHADIR, P. S.; LIAQAT, F.; ELTEM, R. Plant growth promoting properties of phosphate solubilizing *Bacillus* species isolated from the Aegean Region of Turkey. **Turkish Journal of Botany**, Ankara, v. 42, n. 2, p.183-196, 2018.

BALBINO, L. C.; CORDEIRO, L. A. M.; PORFÍRIO-DA-SILVA, V.; MORAES, A. D.; MARTÍNEZ, G. B.; ALVARENGA, R. C.; KICHEL, A. N.; FONTANELI, R. S.; SANTOS, H. P.; FRANCHINI, J. C.; GALERANI, P. R. Evolução tecnológica e arranjos produtivos de sistemas de integração lavoura-pecuária-floresta no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 10, p 1-12, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2011001000001>

BARCELLOS, F. G.; DELAMUTA, J. R. M.; HUNGRIA, M.; MENNA, P.; BATISTA, J. D. S.; RIBEIRO, R. A. Taxonomia Bacteriana – Aspectos Atuais e Perspectivas. In: YAMADA-OGATTA, S. F., NAKAZATO, G., FURNALETTO, M., & NOGUEIRA, M. **Tópicos especiais em microbiologia**. *Embrapa Soja - Capítulo em livro científico (ALICE)*, 2016. Disponível em: < <http://www.uel.br/ccb/microbiologia/pages/livros.php>> Acessado em: 15/06/2018.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. Minnesota: Burgess, 3 ed. 1972. 241p.

BARRETT, C. F.; PARKER, M. A. Coexistence of *Burjholderia*, *Cupriavidus* and *Rhizobium* sp. Nodule Bacteria on two *Mimosa* sp. in Costa Rica. **Applied and Environmental Microbiology**, Washinton, v. 72, n. 2, p. 1198 – 1206, 2006.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 4, p. 529-535, 2008.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, J. P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant and Soil**, v. 378, n. 1-2, p. 1-33, 2014.

BAUHUS, J.; KHANNA, P. K.; MENDEN, N. Aboveground and belowground interactions in mixed plantations of *Eucalyptus globulus* and *Acacia mearnsii*. **Canadian Journal Forestry Research**, Montreal, v. 30, n. 12, p. 1886-1894, 2000. <https://doi.org/10.1139/x00-141>

BERENSCHOT, L. M.; FILIUS, B. M.; HARDJOSOEDIRO, S. Factors determining the occurrence of the agroforestry system with *Acacia mearnsii* in Central Java. **Agroforestry Systems**, v. 6, n. 1-3, p. 119-135, 1988. <https://doi.org/10.1007/BF02344749>

BINKLEY, D. Mixtures of nitrogen-fixing and non-nitrogen-fixing tree species. In: Cannell, M. G. R., Malcolm, D. C., Robertson, P. A. (Eds.), *The ecology of mixed species stands of trees*. Blackwell Scientific, London, pp. 99-123, 1992.

BINKLEY, D.; GIARDINA, C. Nitrogen fixation in tropical forest plantations. In: Nambiar, E. K. S.; Brown, A. G. (Eds.), **Management of Soil, Nutrients and**

**Water in Tropical Plantation Forests.** Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, pp. 297-337, 1997.

BIRNBAUM, C.; BARRETT, L. G.; THRALL, P. H.; LEISHMAN, M. R. Mutualisms are not constraining cross-continental invasion success of *Acacia* species within Australia. **Diversity and Distributions**, v. 18, n. 10, p. 962-976. 2012. 10.1111/j.1472-4642.2012.00920.x

BODDEY, R. M.; PEOPLES, M. B.; PALMER, B.; DART, P. J. Use of the  $^{15}\text{N}$  natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 57, n. 3, p. 235-270, 2000.

BOUDIAF, I.; BAUDOIN, E.; SANGUIN, H.; BEDDIAR, A.; THIOULOUSE, J.; GALIANA, A.; PRIN, Y.; LE ROUX, C.; LEBRUN, M.; DUPONNOIS, R. The exotic legume tree species, *Acacia mearnsii*, alters microbial soil functionalities and the early development of a native tree species, *Quercus suber*, in North Africa. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 65, p. 172-179, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.05.003>

BOUDIAF, I.; LE ROUX, C.; BAUDOIN, E.; GALIANA, A.; BEDDIAR, A.; PRIN, Y.; DUPONNOIS, R. Soil Bradyrhizobium population response to invasion of a natural *Quercus suber* forest by the introduced nitrogen-fixing tree *Acacia mearnsii* in El Kala National Park, Algeria. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 70, p. 162-165, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.12.030>

BOUKHATEM, Z. F.; DOMERGUE, O.; BEKKI, A.; MERABET, C.; SEKKOUR, S.; BOUAZZA, F.; GALIANA, A. Symbiotic characterization and diversity of rhizobia associated with native and introduced acacias in arid and semi-arid regions in Algeria. **FEMS microbiology ecology**, v. 80, n. 3, p. 534-547, 2012.

BOURNAUD C.; MOULIN, L.; CNOCKAERT, M.; FARIA, S. M.; PRIN, Y.; SEVERAC, D.; VANDAMME, P. *Paraburkholderia piptadeniae* sp. nov. and *Paraburkholderia ribeironis* sp. nov., two root-nodulating symbiotic species of *Piptadenia gonoacantha* in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, p. 432-440, 2017. DOI 10.1099/ijsem.0.001648

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. *Regras para análise de sementes*. 2009.

BRASIL. Instrução normativa nº 13, de 24 de março de 2011. Aprova as normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura, bem como as relações dos micro-organismos autorizados e recomendados para produção de inoculantes no Brasil, na forma dos Anexos I, II e III, desta Instrução. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 25 mar. 2011. Seção 1, p. 3-7.

BROCKWELL, J.; MITCHELL, P. A.; SEARLE, S. D.; LEACH, M. A.; CREWS, T. E. Direct benefits of rhizobial inoculation to *Acacia mearnsii* De Wild, as tubed

stock and in a plantation, and synergistic benefits to interplanted *Eucalyptus nitens* (Deane & Maiden) Maiden. **Australian forestry**, v. 74, n. 2, p. 120-132, 2011. <https://doi.org/10.1080/00049158.2011.10676354>

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

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; NASCIMENTO DE OLIVEIRA, A.; WILLERDING, A. L. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá-PR, v. 32, n. 2, p. 359-366, 2010.

CHAN, J. M.; DAY, P.; FEELY, J.; THOMPSON, R.; LITTLE, K. M.; NORRIS, C. H. *Acacia mearnsii* industry overview: current status, key research and development issues. **Southern Forests: a Journal of Forest Science**, v. 77, n. 1, p. 19-30, 2015. <https://doi.org/10.2989/20702620.2015.1006907>

COSTA, R. B.; DE ARRUDA, E. J.; DE OLIVEIRA, L. C. S. Sistemas agrossilvipastoris como alternativa sustentável para a agricultura familiar. **Interações**, Campo Grande, v. 3, n. 5, p. 25-32, 2016. <http://dx.doi.org/10.20435/interações.v3i5.567>

CRISÓSTOMO, J. A.; RODRÍGUEZ-ECHEVERRÍA, S.; FREITAS, H. Co-introduction of exotic rhizobia to the rhizosphere of the invasive legume *Acacia saligna*, an intercontinental study. **Applied Soil Ecology**, v. 64, p. 118-126, 2013.

DALGAARD, T.; HUTCHINGS, N. J.; PORTER, J. R. Agroecology, scaling and interdisciplinarity. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 100, n. 1, p. 39-51, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(03\)00152-X](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(03)00152-X)

DIAS, L. P. R.; COLPO GATIBONI, L.; BRUNETTO, G.; SIMONETE, M. A.; BICARATTO, B. Eficiência relativa de fosfatos naturais na adubação de plantio de mudas de *Eucalyptus dunnii* Maiden e *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage em solo sem e com calagem. **Ciência Florestal**, Santa Maria-RS, v. 25, n. 1, p. 37-48, 2015.

DIOUF, D.; SAMBA-MBAYE, R.; LESUEUR, D.; BA, A. T.; DREYFUS, B.; DE LAJUDIE, P.; NEYRA, M. Genetic diversity of *Acacia seyal* Del. rhizobial populations indigenous to Senegalese soils in relation to salinity and pH of the sampling sites. **Microbial ecology**, v. 54, n. 3, p. 553-566, 2007.

DREYFUS, B. L.; DOMMARGUES, Y. R. Nodulation of *Acacia* species by fast-and slow-growing tropical strains of *Rhizobium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 97-99. 1981.

DWIVEDI, S. L.; SAHRAWAT, K. L.; UPADHYAYA, H. D.; MENGONI, A.; GALARDINI, M.; BAZZICALUPO, M.; BIONDI, E. G.; HUNGRIA, M.; KASCHUK, G.; BLAIR, M. W.; ORTIZ, R. Advances in host plant and *Rhizobium* genomics to

enhance symbiotic nitrogen fixation in grain legumes. **Advances in Agronomy**, v. 129, p. 1-116, 2015. [10.1016/bs/agron.2014.09.001](https://doi.org/10.1016/bs.agron.2014.09.001)

EHRENBERGEROVÁ, L.; CIENCIALA, E.; KUČERA, A.; GUY, L.; HABROVÁ, H. Carbon stock in agroforestry coffee plantations with different shade trees in Villa Rica, Peru. **Agroforestry Systems**, v. 90, n. 3, p. 433-445, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10457-015-9865-z>

EPRON, D., NOUVELLON, Y., MARESCHAL, L., E MOREIRA, R. M., KOUTIKA, L. S., GENESTE, B., DELGADO-ROJAS, J. S., LACLAU, J. P., SOLA, G., GONÇALVES, J. L. M. & BOUILLET, J. P. Partitioning of net primary production in Eucalyptus and Acacia stands and in mixed-species plantations: two case-studies in contrasting tropical environments. **Forest ecology and management**, v. 301, p. 102-111, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2012.10.034>

FARRAR, K.; BRYANT, D.; COPE-SELBY, N. Understanding and engineering beneficial plant–microbe interactions: plant growth promotion in energy crops. **Plant biotechnology journal**, v. 12, n. 9, p. 1193-1206, 2014. [10.1111/pbi.12279](https://doi.org/10.1111/pbi.12279)

FAYE, A.; SALL, S.; CHOTTE, J. L.; LESUEUR, D. Soil bio-functioning under *Acacia nilotica* var. *tomentosa* protected forest along the Senegal River. **Nutrient cycling in agroecosystems**, v. 79, n. 1, p. 35-44, 2007.

FISHER, R. F.; BINKLEY, D. **Ecology and Management of Forest Soils**. John Wiley & Sons. 10 New York; Chichester, 2000.

FLEIG, F. D.; SCHNEIDER, P. R.; BRUM, E. T. Análise econômica dos sistemas de produção com acácia-negra (*Acacia mearnsii* de Wild.) no Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, v. 3, n. 1, p. 203-240, 1993. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20140114>

FIKRI-BENBRAHIM, K.; CHRABI, M.; LEBRAZI, S.; MOUMNI, M.; ISMAILI, M. Phenotypic and Genotypic Diversity and Symbiotic Effectiveness of Rhizobia Isolated from *Acacia* sp. Grown in Morocco. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 19, n. 1, p. 201-216, 2017.

FORRESTER, D. I.; BAUHUS, J.; COWIE, A. L. Nutrient cycling in a mixed-species plantation of *Eucalyptus globulus* and *Acacia mearnsii*. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 35, n. 12, p. 2942-2950, 2005. <https://doi.org/10.1139/x05-214>

FORRESTER, D. I.; COWIE, A. L.; BAUHUS, J.; WOOD, J. T.; FORRESTER, R. I. Effects of Changing the Supply of Nitrogen and Phosphorus on Growth and Interactions between *Eucalyptus globulus* and *Acacia mearnsii* in a Pot trial. **Plant and soil**, v. 280, n. 1, p. 267-277, 2006a. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-3228-x>

FORRESTER, D. I.; BAUHUS, J.; COWIE, A. L. Carbon allocation in a mixed-species plantation of *Eucalyptus globulus* and *Acacia mearnsii*. **Forest Ecology**

**and Management**, Amsterdam, v. 233, n. 2/3, p. 275-284, 2006b. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2006.05.018>

FORRESTER, D. I.; BAUHUS, J.; COWIE, A. L.; VANCLAY, J. K. Mixed-species plantations of Eucalyptus with nitrogen-fixing trees: a review. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 233, n. 2/3, p. 211-230, 2006c. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2006.05.012>

FORRESTER, D. I.; SCHORTEMAYER, M.; STOCK, W. D.; BAUHUS, J., KHANNA, P. K.; COWIE, A. L. Assessing nitrogen fixation in mixed-and single-species plantations of *Eucalyptus globulus* and *Acacia mearnsii*. **Tree Physiology**, v. 27, n. 9, p. 1319-1328, 2007. <https://doi.org/10.1093/treephys/27.9.1319>

FORRESTER, D. I.; VANCLAY, J. K.; FORRESTER, R. I. The balance between facilitation and competition in mixtures of Eucalyptus and Acacia changes as stands develop. **Oecologia**, v. 166, n. 1, p. 265-272, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00442-011-1937-9>

FORRESTER, D. I.; ALBRECHT, A. T. Light absorption and light-use efficiency in mixtures of *Abies alba* and *Picea abies* along a productivity gradient. **Forest ecology and management**, v. 328, p. 94-102, 2014a. [10.1016/j.foreco.2014.05.026](https://doi.org/10.1016/j.foreco.2014.05.026)

FORRESTER, D. I. The spatial and temporal dynamics of species interactions in mixed-species forests: from pattern to process. **Forest Ecology and Management**, v. 312, p. 282-292, 2014b. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2013.10.003>

FORRESTER, D. I. Transpiration and water-use efficiency in mixed-species forests versus monocultures: effects of tree size, stand density and season. **Tree physiology**, v. 35, n. 3, p. 289-304, 2015. [10.1093/treephys/tpv011](https://doi.org/10.1093/treephys/tpv011)

FORRESTER, D. I.; PRETZSCH, H. Tamm review: on the strength of evidence when comparing ecosystem functions of mixtures with monocultures. **Forest Ecology and Management**, v. 356, p. 41-53, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2015.08.016>

FORRESTER, D. I.; BAUHUS, J. A review of processes behind diversity—productivity relationships in forests. **Current Forestry Reports**, v. 2, n. 1, p. 45-61, 2016. <https://doi.org/10.1007/s40725-016-0031-2>

FORRESTER, D. I. Ecological and Physiological Processes in Mixed Versus Monospecific Stands. **Mixed-Species Forests**. Springer Berlin Heidelberg. p. 73-115, 2017. [10.1007/978-3-662-54553-9](https://doi.org/10.1007/978-3-662-54553-9)

FORRESTER, D. I.; AMMER, C.; ANNIGHÖFER, P. J.; BARBEITO, I.; BIELAK, K.; BRAVO-OVIEDO, A.; COLL, L.; DEL RÍO, M.; DRÖSSLER, L.; HEYM, M.; HURT, V.; LÖF, M.; DEN OUDEN, J.; PACH, M.; PEREIRA, M. G.; PLAGA, B. N. E.; PONETTE, Q.; SKRZYSZEWSKI, J.; STERBA, H.; SVOBODA, M.; ZLATANOV, T. M.; PRETZSCH, H. Effects of crown architecture and stand

structure on light absorption in mixed and monospecific *Fagus sylvatica* and *Pinus sylvestris* forests along a productivity and climate gradient through Europe. **Journal of Ecology**, p. 1-15. 2017. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12803>

FRANCIS, C.; LIEBLEIN, G.; GLIESSMAN, S.; BRELAND, T. A.; CREAMER, N.; HARWOOD, R.; SALOMONSSON, L.; HELENIUS, J.; RICKERL, D.; SALVADOR, R.; WIEDENHOEFT, M.; SIMMONS, S.; ALLEN, P.; ALTERI, M.; FLORA, C.; POINCELOT, R. Agroecology: the ecology of food systems. **Journal of sustainable agriculture**, v. 22, n. 3, p. 99-118, 2003. 99-118. [https://doi.org/10.1300/J064v22n03\\_10](https://doi.org/10.1300/J064v22n03_10)

FREITAS, E. C. S.; OLIVEIRA-NETO, S. N.; FONSECA, D. M.; SANTOS, M. V.; LEITE, H. G.; MACHADO, V. M. Deposição de serapilheira e de nutrientes no solo em sistema agrossilvipastoril com eucalipto e acácia. **Árvore**, v. 37, p. 409-417, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622013000300004>

FREITAS COELHO, S. R.; GONÇALVES, J. L. M.; MELLO, S. L. M.; MOREIRA, R. M.; SILVA, E. V.; LACLAU, J. P. Crescimento, nutrição e fixação biológica de nitrogênio em plantios mistos de eucalipto e leguminosas arbóreas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 6, p. 759-768, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2007000600001>

FROUFE, L. C. M.; RACHWAL, M. F. G.; SEOANE, C. E. S. Potencial de sistemas agroflorestais multiestrata para sequestro de carbono em áreas de ocorrência de Floresta Atlântica. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 31, n. 66, p. 143, 2011. 10.4336/2011.pfb.31.66.143

GALLOWAY, J. N.; TOWNSEND, A. R.; ERISMAN, J. W.; BEKUNDA, M.; CAI, Z.; FRENEY, J. R.; MARTINELLI, L. A.; SEITZINGER, S. P.; SUTTON, M. A. Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. **Science**, v. 320, n. 5878, p. 889-892, 2008. 10.1126/science.1136674

GLEDDIE, S. C.; LEGGETT, M. E.; RICE, W. A.; OLSEN, P. E. **U.S. Patent No. 5,484,464**. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office, 1996.

GODOI, S. G.; NEUFELD, A. D. H.; IBARR, M. A.; FERRETO, D. O. C.; BAYER, C.; LORENTZ, L. H.; VIEIRA, F. C. B. The conversion of grassland to acacia forest as an effective option for net reduction in greenhouse gas emissions. **Journal of Environmental Management**, v. 169, p. 91-102, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.11.057>

GOI, S.R.; FARIA, S.M.; NEVES, M.C.P. Fixação de nitrogênio, tipo de nódulo e ocorrência de ureídeos em leguminosas florestais. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 19, p. 185 – 190, 1984.

GRUBER, N.; GALLOWAY, J. N. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. **Nature**, v. 451, n. 7176, p. 293-296, 2008. <https://doi.org/10.1038/nature06592>

GYANESHWAR, P.; HIRSCH, A. M.; MOULIN, L.; CHEN, W. M.; ELLIOTT, G. N.; BONTEMPS, C.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; GROSS, E.; REIS JR., F. B.; SPRENT, J. I.; YOUNG, J. P. W.; JAMES, E. K. Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 24, n. 11, p. 1276-1288, 2011.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características Fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 40, n. 7, p. 667-672, 2005.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST-palaeontological statistics, ver. 1.89. **Palaeontol electron**, v. 4, n. 1, p. 1-9., 2001.

HENTZ, P.; CARVALHO, N. L.; LUZ, L. V.; BARCELLOS, A. L. Ciclagem de nitrogênio em sistemas de integração lavoura-pecuária. **Ciência e Natura**, v. 36, p. 663, 2014. 10.5902/2179460X12629

HOQUE, M. S.; BROADHURST, L. M.; THRALL, P. H. Genetic characterization of root-nodule bacteria associated with *Acacia salicina* and *A. stenophylla* (Mimosaceae) across south-eastern Australia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 299-309, 2011.

HUANG, X.; LIU, S.; WANG, H.; HU, Z.; LI, Z.; YOU, Y. Changes of soil microbial biomass carbon and community composition through mixing nitrogen-fixing species with *Eucalyptus urophylla* in subtropical China. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 73, p. 42-48, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.01.021>

HUNGRIA, M.; LOUREIRO, M. F.; MENDES, I. C.; CAMPO, R. J.; GRAHAM, P. H. Inoculant preparation, production and application. In: WERNER, D.; NEWTON, W. E. (Org) **Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment**. Dordrecht, Amsterdam: pp. 223-253, 2005.

HUNGRIA, M.; SILVA, K. D. **Manual de curadores de germoplasma-microorganismos: rizóbios e bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Brasília, DF, *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Documentos (INFOTECA-E)*, 2011.

IBA- Indústria Brasileira de Árvores (IBA). Relatório 2017. Disponível em: [http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA\\_RelatorioAnual2017.pdf](http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2017.pdf). Acesso em: 29/08/2015.

JESUS, E. D. C.; MOREIRA, F. M. D. S.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. I. D.; OLIVEIRA, M. S. D. Leguminosae nodulating bacteria diversity from three different land use systems in Brazilian Western Amazon. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 40, n. 8, p. 769-776, 2005.

KASCHUK, G.; KUYPER, T. W.; LEFFELAAR, P. A.; HUNGRIA, M.; GILLER, K. E. Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses? **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, p. 1233-1244, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.03.005>

KASCHUK, G.; YIN, X.; HUNGRIA, M.; LEFFELAAR, P. A.; GILLER, K. E.; KUYPER, T. W. Photosynthetic adaptation of soybean due to varying effectiveness of N<sub>2</sub> fixation by two distinct *Bradyrhizobium japonicum* strains. **Environmental and Experimental Botany**, v. 76, p. 1-6. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.10.002>

KASCHUK, G.; NOGUEIRA, M. A.; LUCA, M. J.; HUNGRIA, M. Response of determinate and indeterminate soybean cultivars to basal and topdressing N fertilization compared to sole inoculation with *Bradyrhizobium*. **Field Crops Research**, v. 195, p. 21-27, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2016.05.010>

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M. Diversity and Importance of Diazotrophic Bacteria to Agricultural Sustainability in the Tropics. In: **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**. Springer International Publishing. p. 269-292, 2017. 10.1007/978-3-319-55804-2\_12

KHANNA, P. K. Comparison of growth and nutrition of young monocultures and mixed stands of *Eucalyptus globulus* and *Acacia mearnsii*. **Forest Ecology and Management**, v. 94, n. 1/3, p. 105-113, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(96\)03971-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(96)03971-0)

KING, J. Reaching for the Sun. 2<sup>nd</sup> Edition, Cambridge University Press, UK, 2011.

KLEINPAUL, I. S. Plantio misto de *Eucalyptus urograndis* e *Acacia mearnsii* em sistema agroflorestal. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. p. 88, 2008.

KLEINPAUL, I. S.; SCHUMACHER, M. V.; VIERA, M.; NAVROSKI, M. C. Plantio misto de *Eucalyptus urograndis* e *Acacia mearnsii* em sistema agroflorestal: I- Produção de biomassa. **Ciência Florestal**, v. 20, n. 4, p. 621-627, 2010. <http://dx.doi.org/10.5902/198050982420>

LAFAY, B.; BURDON, J. J. Small-subunit rRNA genotyping of rhizobia nodulating Australian *Acacia* spp. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 1, p. 396-402, 2001. 10.1128/AEM.67.1.396-402.2001

LAMMEL, D. R. **Diversidade de rizóbios em Florestas de Araucária no Estado de São Paulo**. 2007. Universidade de São Paulo. (Tese de Doutorado)

LAMMEL, D. R.; CRUZ, L. M.; CARRER, H.; CARDOSO, E. J. Diversity and symbiotic effectiveness of beta-rhizobia isolated from sub-tropical legumes of a Brazilian Araucaria Forest. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 12, p. 2335-2342, 2013.

LAWRIE, A. C. Nitrogen fixation by native Australian legumes. **Australian Journal of Botany**, v. 29, n. 2, p. 143-157, 1981.

LE ROUX, J. J.; MAVENGERE, N. R.; ELLIS, A. G. The structure of legume–rhizobium interaction networks and their response to tree invasions. **AoB Plants**, v. 8, p 1-14, 2016. 10.1093/aobpla/plw038

LEYRER, A. Akazienanbau in Rio Grande do Sul-Sudbrasilien. **Unveröffentlichte Diplomarbeit am Frachbereich Forstwirtschaft der Fachhochschule Weihenstephan**, p. 134. 1987.

LI, Z. A.; PENG, S. L.; RAE, D. J.; ZHOU, G. Y. Litter decomposition and nitrogen mineralization of soils in subtropical plantation forests of southern China, with special attention to comparisons between legumes and non-legumes. **Plant and Soil**, v. 229, n. 1, p. 105-116, 2001. <https://doi.org/10.1023/A:1004832013143>

LLORET, L.; ORMENO-ORRILLO, E.; RINCON, R.; MARTÍNEZ-ROMERO, J.; ROGEL-HERNÁNDEZ, M. A.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Ensifer mexicanus* sp. nov. a new species nodulating *Acacia angustissima* (Mill.) Kuntze in Mexico. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 30, n. 4, p. 280-290, 2007.

LU, J. K.; DOU, Y. J.; ZHU, Y. J.; WANG, S. K.; SUI, X. H.; KANG, L. H. *Bradyrhizobium ganzhouense* sp. nov., an effective symbiotic bacterium isolated from *Acacia melanoxylon* R. Br. nodules. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, pt. 6, p. 1900, 2014.

MAY, B. M.; ATTIWILL, P., M. Nitrogen-fixation by *Acacia dealbata* and changes in soil properties 5 years after mechanical disturbance or slash-burning following timber harvest. **Forest Ecology Management**. v. 181, p. 339-355, 2003.

MASSENSSINI, A. M.; SILVA, A. A.; REIS, M. R.; COSTA, M. D. Atividade de isolados bacterianos solubilizadores de fosfato na presença de formulações comerciais de glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 26, n. 4, p. 815-823, 2008.

MATIAS, S. R.; PAGANO, M. C.; MUZZI, F. C.; OLIVEIRA, C. A.; CARNEIRO, A. A.; HORTA, S. N.; SCOTTI, M. R. Effect of rhizobia, mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing microorganisms in the rhizosphere of native plants used to recover an iron ore area in Brazil. **European Journal of Soil Biology**, v.45, n. 3, p. 259-266, 2009.

MENNA, P; HUNGRIA, M. Phylogeny of nodulation and nitrogen-fixation genes in *Bradyrhizobium*: supporting evidence for the theory of monophyletic origin, and spread and maintenance by both horizontal and vertical transfer. **International Journal of Systematic Evolutionaty Microbiology**. v. 61, p. 3052-3067, 2011. <http://dx.doi.org/10.1099/ijss.0.028803-0>

MICHIELS, J.; DOMBRECHT, B.; VERMEIREN, N., XI, C.; LUYTEN, E.; VANDERLEYDEN, J. *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 26, n. 3, p. 193-205, 1998.

MIRANSARI, M. Contribution of arbuscular mycorrhizal symbiosis to plant growth under different types of soil stress. **Plant Biology**, v. 12, n. 4, p. 563-569, 2010.

MOCHIUTTI, S.; HIGA, A. R.; SIMON, A. A. Susceptibilidade de ambientes campestres à invasão de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.) no Rio Grande do Sul. **Floresta**, v. 37, p. 239-253, 2007. <http://dx.doi.org/10.5380/rf.v37i2.8654>

MONTEIRO, P. E. R., WINAGRASKI, E., KASCHUK, G., GAIAD, S., MARQUES, R., AUER, C. G. Responses of *Eucalyptus benthamii* seedlings to the application of the organic fertilizer Bacsol. **Bosque**, v. 38, p. 507-513, 2017. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002017000300008>

MOREIRA, F. M.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Editora UFLA, Lavras, MG, p. 729, 2006.

MOREIRA, A. L.; ARAÚJO, F. F. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* spp. como potenciais promotores de crescimento de *Eucalyptus urograndis*. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 37, n. 5, p. 933-943, 2013.

NAIR, P. K. R.; FERNANDES, E. C. M.; WAMBUGU, P. N. Multipurpose leguminous trees and shrubs for agroforestry. **Agroforestry systems**, v. 2, n. 3, p. 145-163, 1984. <https://doi.org/10.1007/BF00147030>

NEDER, R. N. **Microbiologia: manual de laboratório**. São Paulo: Nobre, 1992.

NGOM, A.; NAKAGAWA, Y.; SAWADA, H.; TSUKAHARA, J.; WAKABAYASHI, S.; UCHIUMI, T.; ABE, M. A novel symbiotic nitrogen-fixing member of the Ochrobactrum clade isolated from root nodules of *Acacia mangium*. **The Journal of general and applied microbiology**, v. 50, n. 1, p. 17-27, 2004.

NICHOLS, J. D.; ROSEMEYER, M. E.; CARPENTER, F. L.; KETTLER, J. Intercropping legume trees with native timber trees rapidly restores cover to eroded tropical pasture without fertilization. **Forest Ecology and Management**, v. 152, n. 1, p. 195-209, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(00\)00603-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(00)00603-4)

NYGREN, P.; FERNÁNDEZ, M. P.; HARMAND, J. M.; LEBLANC, H. A. Symbiotic dinitrogen fixation by trees: an underestimated resource in agroforestry systems? **Nutrient cycling in agroecosystems**, v. 94, n. 2-3, p. 123-160, 2012. [10.1007/s10705-012-9542-9](https://doi.org/10.1007/s10705-012-9542-9)

ODEE, D. W.; SUTHERLE, J. M.; MAKATIANI, E. T.; MCINROY, S. G.; SPRENT, J. I. Phenotypic characteristics e composition of rhizobia associated with woody legumes growing in diverse Kenyan conditions. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 188, n. 1, p. 66 - 75, 1997.

OLDROYD, G. E.; MURRAY, J. M.; POOLE, P. S.; DOWNIE, J. A. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. **Annual Review of Genetics**, 154, p. 1541–1548, 2011. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132549>

OLIVEIRA, H. **A Acácia-negra e tanino no Rio Grande do Sul**. Associação Brasileira de Acacicultores. Canoas: La Salle. 1968.

ORCHARD, E. R.; DARBY, G. D. **Fertility changes under continued wattle culture with special reference to nitrogen fixation and base status of the soil.** In: Proceedings 6th International Soil Congress, Paris, 4, p. 305–310, 1956.

OREFICE, J.; SMITH, R. G.; CARROLL, J.; ASBJORNSEN, H.; KELTING, D. Soil and understory plant dynamics during conversion of forest to silvopasture, open pasture, and woodlot. **Agroforestry Systems**, v. 91, n. 4, p. 729-739, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10457-016-0040-y>

ORLANDI, T.; KOZLOSKI, G. V.; ALVES, T. P., MESQUITA, F. R.; ÁVILA, S. C. Digestibility, ruminal fermentation and duodenal flux of amino acids in steers fed grass forage plus concentrate containing increasing levels of *Acacia mearnsii* tannin extract. **Animal Feed Science and Technology**, v. 210, p. 37-45, 2015.

OUFDOU, K.; BECHTAOUI, N.; EL ALAOUI, A.; BENIDIRE, L.; DAOUI, K.; GÖTTFERT, M. Symbiotic rhizobacteria for improving of the agronomic effectiveness of phosphate fertilizers. **Procedia Engineering**, v. 138, p. 325-331, 2016.

PARKINSON, D.; GRAY, T. R.; WILLIAMS, S. T. **Methods for studying the ecology of soil micro-organisms.** Oxford, Blackwell Scientific Publications. 1971, 116p.

PILUZZA, G.; SULAS, L.; BULLITTA, S. Tannins in forage plants and their role in animal husbandry and environmental sustainability: a review. **Grass and Forage Science**, v. 69, n. 1, p. 32-48, 2014.

PIOTTO, D. A Meta-analysis comparing tree growth in monocultures and mixed plantations. **Forest Ecology and Management**, v. 255, n. 3/4, p. 781-786, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2007.09.065>

PORTO, D. S.; FARIAS, E. D. N. C.; CHAVES, J. D. S.; SOUZA, B. F.; MEDEIROS, R. D. D.; ZILLI, J. É.; SILVA, K. D. Symbiotic effectiveness of *Bradyrhizobium ingae* in promoting growth of *Inga edulis* Mart. seedlings. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 41, p. 1-15, 2017.

PRETZSCH H.; FORRESTER D. I. Stand Dynamics of Mixed-Species Stands Compared with Monocultures. In: PRETZSCH H.; FORRESTER D.; BAUHUS J. (eds) **Mixed-Species Forests.** Springer, Berlin, Heidelberg. p. 117-209, 2017. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-54553-9\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-662-54553-9_4)

RACHWAL, M. F. G.; CURCIO, G. R.; DEDECEK, R. A. A influência das características pedológicas na produtividade de acácia-negra (*Acacia mearnsii*), Butiá, RS. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 56, p. 53-62, 2008.

RAMACHANDRAN NAIR, P. K.; MOHAN KUMAR, B.; NAIR, V. D. Agroforestry as a strategy for carbon sequestration. **Journal of plant nutrition and soil science**, v. 172, n. 1, p. 10-23, 2009. <https://doi.org/10.1002/jpln.200800030>

RASMUSSEN, L. V.; BIERBAUM, R.; OLDEKOP, J. A.; AGRAWAL, A. Bridging the practitioner-researcher divide: Indicators to track environmental, economic, and sociocultural sustainability of agricultural commodity production. **Global Environmental Change**, v. 42, p. 33-46, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2016.12.001>

RIBEIRO, V. A. **Produção e caracterização de exopolissacarídeos a partir de bactérias diazotróficas cultivadas em meios à base de glicerol residual**. 2015. Universidade Federal de Rio Grande (FURG). Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos)

RICHARDSON, A. E.; BAREA, J. M.; McNEILL, A. M.; PRIGENT-COMBARET, C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and Soil**, v. 321, n. 1-2, p. 305-339, 2009.

RIOFRÍO, J.; DEL RÍO, M.; BRAVO, F. Mixing effects on growth efficiency in mixed pine forests. **Forestry: An International Journal of Forest Research**, v. 90, n. 3, p. 381-392, 2017. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpw056>

RIRA, M.; MORGAVI, D. P.; ARCHIMÈDE, H.; MARIE-MAGDELEINE, C.; POPOVA, M.; BOUSSEBOUA, H.; DOREAU, M. Potential of tannin-rich plants for modulating ruminal microbes and ruminal fermentation in sheep. **Journal of animal science**, v. 93, n. 1, p. 334-347, 2015. [10.2527/jas.2014-7961](https://doi.org/10.2527/jas.2014-7961)

RODRÍGUEZ-ECHEVERRÍA, S.; LE ROUX, J. J.; CRISÓSTOMO, J. A.; NDLOVU, J. Jack-of-all-trades and master of many? How does associated rhizobial diversity influence the colonization success of Australian Acacia species? **Diversity and Distributions**, v. 17, n. 5, p. 946-957, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2011.00787.x>

ROSENSTOCK, T. S.; TULLY, K. L.; ARIAS-NAVARRO, C.; NEUFELDT, H.; BUTTERBACH-BAHL, K.; VERCHOT, L. V. Agroforestry with N 2-fixing trees: sustainable development's friend or foe? **Current Opinion in Environmental Sustainability**, v. 6, p. 15-21, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cosust.2013.09.001>

RSTUDIO: Integrate Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA. Disponível em: <http://www.rstudio.com/>

SAMPAIO DE FREITAS, E. C.; NOLASCO DE OLIVEIRA NETO, S.; MIRANDA DA FONSECA, D.; VITÓRIA SANTOS, M.; GARCIA LEITE, H.; DINIZ MACHADO, V. Deposição de serapilheira e de nutrientes no solo em sistema agrossilvipastoril com eucalipto e acácia. **Revista Árvore**, v. 37, n. 3, p. 409-417, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622013000300004>

SANTOS, F. E. M.; SOBROSA, R. C.; COSTA, I. F. D.; CORDER, M. P. M. Detecção de fungos patogênicos em sementes de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild). **Ciência Florestal**, v. 11, n. 1, p. 13-20, 2001. <http://dx.doi.org/10.5902/19805098491>

SANTOS, F. M.; CHAER, G. M.; DINIZ, A. R.; DE CARVALHO BALIEIRO, F. Nutrient cycling over five years of mixed-species plantations of Eucalyptus and Acacia on a sandy tropical soil. **Forest Ecology and Management**, v. 384, p. 110-121, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2016.10.041>

SCHUMACHER, M. V.; VIERA, M.; LONDERO, E. K.; CALIL, F. N.; LOPES, V. G.; WITSCHORECK, R. Crescimento da acácia-negra em resposta à aplicação de nitrogênio, fósforo e potássio. **Cerne**, v. 19, p. 51-58, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-77602013000100007>

SAKROUHI, I.; BELFQUIH, M.; SBABOU, L.; MOULIN, P.; BENA, G.; FILALI-MALTOUF, A.; LE QUÉRÉ, A. Recovery of symbiotic nitrogen fixing acacia rhizobia from Merzouga Desert sand dunes in South East Morocco—Identification of a probable new species of Ensifer adapted to stressed environments. **Systematic and applied microbiology**, v. 39, n. 2, p. 122-131, 2016.

SIDDIQUE, I.; ENGEL, V. L.; PARROTTA, J. A.; LAMB, D.; NARDOTO, G. B.; OMETTO, J. P.; MARTINELLI, L. A.; SCHMIDT, S. Dominance of legume trees alters nutrient relations in mixed species forest restoration plantings within seven years. **Biogeochemistry**, v. 88, n. 1, p. 89-101, 2008. [10.1007/s10533-008-9196-5](https://doi.org/10.1007/s10533-008-9196-5)

SILVA, C. F.; MARTINS, M. A.; SILVA, E. M. R.; PEREIRA, M. G.; CORREIA, M. E. F. Influência do sistema de plantio sobre atributos dendrométricos e fauna edáfica, em área degradada pela extração de argila. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 37, n. 6, p. 1742-1751, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832013000600030>

SILVA, F. B. **Seleção de rizóbios nativos simbiotes de *Desmodium incanum* e avaliação da promoção de crescimento de gramíneas**. 2016. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Dissertação de Mestrado)

SILVA, F. C. L.; DE FARIAS, J. A. Análise econômica da produção de *Acacia mearnsii* De Wild e carvão vegetal no Vale do Caí e Taquari, Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 45, n. 5, p. 927-932, 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20140114>

SILVA, E.M.R.; DÖBEREINER, J. O papel das leguminosas no reflorestamento. In: **SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS**, 7., Curitiba, 1982. Associações biológicas entre espécies florestais e microorganismos para aumento da produtividade econômica dos reflorestamentos; anais. Curitiba: EMBRAPA; URPFCs, 1982. p.33-52

SILVESTER, W. B. Analysis of N<sub>2</sub> fixation. In: GORDON, J. C.; WHEELER, C. T. (eds) **Biological Nitrogen Fixation in Forest Ecosystems: Foundations and Applications**, Martinus Nijhoff, Boston, p.172-212, 1983.

SIMON, A. A. A cadeia produtiva da acácia-negra, aspectos econômicos, sociais e ambientais. In: STROHSCHOEN, A. G.; REMPEL, C. **Reflorestamento e**

**recuperação ambiental: Ambiente e tecnologia: desenvolvimento sustentável em foco.** Lajeado: Univates, p. 149 – 166, 2005.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. Methods in legume - Rhizobium technology. University of Hawaii Niftal. Biological Nitrogen Fixation, p. 54-63, 1985.

SOUCHIER, E. L.; CAMPELLO, E. F. C.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. Mudanças de espécies arbóreas inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares. **Floresta**, Curitiba-PR, v. 35, n. 2, p. 329-334, 2005.

SOUZA CASTILHOS, Z. M.; BARRO, R. S.; SAVIAN, J. F.; DO AMARAL, H. R. B. Produção Arbórea e Animal em Sistema Silvopastoril com Acácia-negra (*Acacia mearnsii*). **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 60, p. 39-47, 2009. 10.4336/2009.pfb.60.39

SPRENT, J. I. **Legume Nodulation: A global perspective.** Wiley-Blackell, pp. 183, 2009.

STROSCHEIN, M. R. D. **Caracterização de bactéria fixadora de nitrogênio em *Lupinus albus*.** Universidade Federal de Santa Maria, p. 83, 2007. (Dissertação de Mestrado)

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; TORRACA, S. L.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazônica**, Manaus-AM, v. 12, n. 1, p. 15-22, 1982.

TANAC S. A. **Cultura da Acácia Negra: Cartilha de Recomendações Técnicas.** Disponível em: [https://www.tanac.com.br/sites/default/files/certificados/Recomendacoes\\_tecnicas.pdf](https://www.tanac.com.br/sites/default/files/certificados/Recomendacoes_tecnicas.pdf) Acessado em: 20/08/2018.

TCHICHELLE, S. V.; MARESCHAL, L.; KOUTIKA, L. S.; EPRON, D. Biomass production, nitrogen accumulation and symbiotic nitrogen fixation in a mixed-species plantation of eucalypt and acacia on a nutrient-poor tropical soil. **Forest Ecology and Management**, v. 403, p. 103-111, 2017. 10.1016/j.foreco.2017.07.041

THRALL, P. H.; MURRAY, B. R.; WATKIN, E. L. J.; WOODS, M. J.; BAKER, K.; BURDON, J. J.; BROCKWELL, J. Bacterial partnerships enhance the value of native legumes in rehabilitation of degraded agricultural lands. **Ecological Management and Restoration**, v. 2, p. 233-235, 2001.

THRALL, P. H.; MILLSOM, A. C.; JEAUVONS, A. C.; WAAYERS, M.; HARVEY, G. R.; BAGNALL, D. J.; BROCKWELL, J. Seed inoculation with effective root-nodule bacteria enhances revegetation success. **Journal of Applied Ecology**, v. 42, p. 740-751, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2005.01058.x>

TYE, D.R.C.; DRAKE, D.C. An exotic Australian Acacia fixes more N than a coexisting indigenous Acacia in South Africa riparian zone. **Plant Ecology**, v. 213, n. 2, p. 251-257, 2012. [10.1007/s11258-011-9971-6](https://doi.org/10.1007/s11258-011-9971-6)

VALADARES, S. V.; SILVA, L. F.; VALADARES, R. V.; FERNANDES, L. A.; NEVES, J. C. L.; SAMPAIO, R. A. Plasticidade fenotípica e frações fosfatadas em espécies florestais como resposta à aplicação de fósforo. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 39, n. 2, p. 225-232, 2015.

VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; SCHOLLES, D.; SILVEIRA, J. R. P.; JUNG, G. C.; GRANADA, C. E.; NEVES, A. G.; BRAGA, M. M.; NEGREIROS, T. Genetic diversity and symbiotic efficiency of black wattle-nodulating rhizobia in soils of Rio Grande do Sul State, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, n. 4, p. 647-654, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832007000400005>

VASSILEV, N.; MENDES, G.; COSTA, M.; VASSILEVA, M. Biotechnological tools for enhancing microbial solubilization of insoluble inorganic phosphates. **Geomicrobiology Journal**, v. 31, n. 9, p. 751-763, 2014.

VERMA, S. C.; JAGDISH, K L.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promotion and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 127-141, 2001.

VEZZANI, F. M.; TEDESCO, M. J.; BARROS, N. F. Alterações dos nutrientes no solo e nas plantas em consórcio de eucalipto e acácia negra. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, n. 1, p. 225-231, 2001. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832001000100024>

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford Blackwell scientific publications, Oxford, 1970. 164 p.

VITOUSEK, P. M.; ABER, J. D.; HOWARTH, R. W.; LIKENS, G. E.; MATSON, P. A.; SCHINDLER, D. W.; SCHLESINGER, W. H.; TILMAN, D. Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. **Ecological Applications**, v. 7, n. 3, p. 737-750, 1997. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(1997\)007\[0737:HAOTGN\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(1997)007[0737:HAOTGN]2.0.CO;2)

WEI, C.; YANG, K.; ZHAO, G.; LIN, S.; XU, Z. Effect of dietary supplementation of gallic acid on nitrogen balance, nitrogen excretion pattern and urinary nitrogenous constituents in beef cattle. **Archives of Animal Nutrition**, v. 70, n. 5, p. 416-423, 2016.

ZAKHIA, F.; DE LAJUDIE, P. Taxonomy of rhizobia. **Agronomie**, EDP Sciences, v. 21, n. 6-7, p. 569-576, 2001. [10.1051/agro:2001146](https://doi.org/10.1051/agro:2001146)