

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO - UFRPE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MELHORAMENTO
GENÉTICO DE PLANTAS

JACILENE ANGELA DE SANTANA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FIXADOR DE NITROGÊNIO EM GENÓTIPOS DE
DESMANTHUS

RECIFE-PE
FEVEREIRO DE 2017

JACILENE ANGELA DE SANTANA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FIXADOR DE NITROGÊNIO EM GENÓTIPOS DE
*DESMANTHUS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Melhoramento Genético de Plantas.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Dr. Mário de Andrade Lira Júnior

Co-Orientadores: Prof. Dr. Vicente Imbroisi Teixeira

Prof. Dra. Mércia Virgínia Ferreira dos Santos

**RECIFE-PE
FEVEREIRO DE 2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

S232a Santana, Jacilene Angela de
Avaliação do potencial fixador de nitrogênio de genótipos de
Desmanthus / Jacilene Angela de Santana. – 2017.
56 f. : il.

Orientador: Mário de Andrade Lira Júnior.

Coorientadores: Vicente Imbroisi Texeira, Mércia Virgínia
Ferreira dos Santos

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Melhoramento
Genético de Plantas, Recife, BR-PE, 2017.

Inclui referências.

1. FBN 2. Leguminosas 3. Inoculante 4. ISSR. I. Lira Júnior,
Mário de Andrade, orient. II. Teixeira, Vicente Imbroisi, coorient.
III. Santos, Mércia Virgínia Ferreira dos, coorient. IV. Título

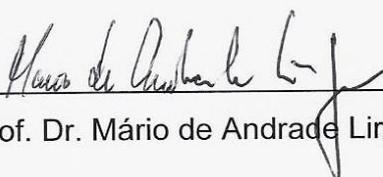
CDD 581.1

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FIXADOR DE NITROGÊNIO EM GENÓTIPOS DE
DESMANTHUS**

JACILENE ANGELA DE SANTANA

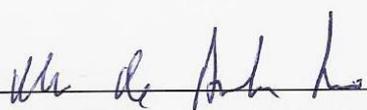
Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora em: 23/02/2017

ORIENTADOR:

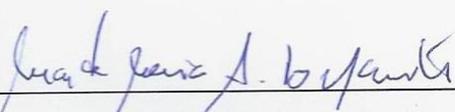


Prof. Dr. Mário de Andrade Lira Junior - UFRPE

EXAMINADORES:



Prof. Mário de Andrade Lira – DZ/UFRPE



Dra. Marta Maria Amâncio do Nascimento - IPA

**RECIFE – PE
FEVEREIRO DE 2017**

*Direi do Senhor:
"Tu és o meu refúgio e a minha fortaleza,
o meu Deus, em quem confio".*

Salmos 91:2

Ao Senhor Deus e toda minha família,

Ofereço

Aos meus Pais, e em Especial à Cybelle Souza de Oliveira pelo apoio, dedicação e atenção em todos os momentos que precisei nesta jornada.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pelo dom da vida, e por me guiar sempre na realização dos meus sonhos, meu refúgio, fortaleza e proteção constante.

Aos meus pais, Antônio Santana e Elizabete Santana por todo o apoio, incentivo e conselhos que me guiaram e ajudaram a construir o meu caráter, tornando meu sonho virar realidade. MUITÍSSIMO obrigada pela vida, carinho, confiança e dedicação.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela concessão da bolsa de mestrado, investindo em minha carreira acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Melhoramento Genético de Plantas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, por me acolher como aluna em mais um momento de aprendizado, bem como a Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Às minhas amigas Cybelle Souza, Aline Medeiros, Adeneide Cândido, e Rômulo Moraes Filho que lutaram junto comigo para a construção deste trabalho, bem como ensinamentos, na condução do experimento em laboratório e casa de vegetação, pelo companheirismo, alegrias e risadas.

À Elaine Cristina, Isabelle Tanaka, Aline Patrícia, Jéssica Damasceno, Carla Caroline, MeriamNefzaoui, e Mônica Melo, amigas que sempre dividiram comigo as alegrias e tristezas e sempre estarão comigo.

À todos os meus colegas da Pós Graduação: Andreza, Daniella Talita (in memoriam), Deisy, Nivaldo, Sueynne, e Viviane, pelo aprendizado e prazeroso convívio. E em especial aos colegas Ana, Adônis, Islan, Jaqueline, e Kleyton por me ajudar nesta jornada.

Aos professores de mestrado Dr. Gerson Quirino, Dra. Vivian Lages, Dr. Edson Ferreira e Dr. José Luis, pelos ensinamentos e dedicação ao programa de pós-graduação em Melhoramento Genético de Plantas.

Aos pesquisadores do Instituto Agrônomo de Pernambuco, Dr^o José NildoTabosa, e Dr^a Marta Amâncio, pelo apoio, ensinamentos e atenção sempre.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mário de Andrade Lira Júnior, pelos ensinamentos repassados, paciência, confia, pelo exemplo de profissionalismo e por ajudar na estruturação desse trabalho.

Ao meus Co-Orientadores, Dr. Vicente Imbroisi Teixeira e Dra. Mércia Virgínia Ferreira dos Santos, pelo apoio e disponibilidade concedidos, pela contribuição para a realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Professor Mário de Andrade Lira e Marta Maria Amâncio do Nascimento, por terem aceitado o convite a contribuir com este trabalho.

Enfim, agradeço a todos que de qualquer forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Meu muito obrigada!

LISTA DE TABELAS**CAPÍTULO II**

Tabela 2.4.1 Sequências e características dos primers utilizados para análise de dissimilaridade genética	44
Tabela 2.5.1 Sumário da diversidade genética obtida por ISSR- PCR	45
Tabela 2.5.2 Matriz de distância genética	46
Tabela 2.5.3 Valores médios da matéria seca da parte aérea (MSPA), sistema radicular (MSSR) e nódulos (MSN), número de nódulos (NN), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) e eficiência relativa (ER) de isolados no genótipo 10AU de <i>Desmanthus</i> spp, obtidos de solos de municípios do semiárido pernambucano	48
Tabela 2.5.4 Valores médios da matéria seca da parte aérea (MSPA), sistema radicular (MSSR) e nódulos (MSN), número de nódulos (NN), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) e eficiência relativa (ER) de isolados no genótipo 13AU de <i>Desmanthus</i> spp, obtidos de solos de municípios do semiárido pernambucano	49
Tabela 2.5.5 Valores médios da matéria seca da parte aérea (MSPA), sistema radicular (MSSR) e nódulos (MSN), número de nódulos (NN), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) e eficiência relativa (ER) de isolados no genótipo 31D de <i>Desmanthus</i> spp, obtidos de solos de municípios do semiárido pernambucano	50
Tabela 2.5.6. Valores médios da matéria seca da parte aérea (MSPA), sistema radicular (MSSR) e nódulos (MSN), número de nódulos (NN), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) e eficiência relativa (ER) de isolados no genótipo 50J de <i>Desmanthus</i> spp, obtidos de solos de municípios do semiárido pernambucano	51

LISTA DE FIGURAS**CAPÍTULO II**

Figura 2.5.1. Dendrograma UPGMA gerado a partir das medidas de dissimilaridade através da análise com marcadores ISSR.....	47
--	----

SUMÁRIO	RESUMO	11
ABSTRACT		12
CAPÍTULO I		13
1. REFERENCIAL TEÓRICO		14
1.1.Importância das plantas leguminosas		15
1.2.Potencial forrageiro das leguminosas.....		17
1.3. O Gênero <i>Desmanthus</i>		18
1.4.Fixação Biológica de Nitrogênio(FBN).....		20
1.5.Utilização do Marcador molecular ISSR em leguminosas		22
1.6 FBN e Melhoramento genético de plantas.		23
1.7REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		24
CAPÍTULO II		37
2. VARIABILIDADE DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO ENTRE ACESSOS DE <i>DESMANTHUS</i>		37
2.1.RESUMO.....		38
2.2.ABSTRACT		39
2.3.INTRODUÇÃO		40
2.4.MATERIAL E MÉTODOS		41
2.5RESULTADOS E DISCUSSÃO.....		45
2.6.CONCLUSÃO.....		55
2.7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		55

RESUMO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FIXADOR DE NITROGÊNIO EM GENÓTIPOS DE *DESMANTHUS*

Encontradas em diversos tipos de solos e climas, as leguminosas possuem uma ampla distribuição geográfica. Elas apresentam uma rica e importante diversidade taxonômica que as colocam como uma das maiores famílias em números de espécies, além de, em sua maior parte, proporcionarem simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, comumente conhecidas como rizóbio. As leguminosas forrageiras também possuem reflexos diretos sobre a produtividade animal, devido ao seu valor nutricional, pois participando da dieta animal contribuem para incrementar o ganho em peso bem como aportam maior quantidade de nutrientes à dieta, além de poder minimizar os custos de produtividade quando comparados com pastagens de gramínea exclusiva, submetidas à adubação com nitrogênio mineral. Nesse sentido o *Desmanthus*, gênero nativo do Brasil, apresenta-se como uma alternativa de grande interesse como fonte de leguminosas forrageiras para os trópicos semiáridos. Sendo assim, este trabalho visa avaliar o potencial fixador de nitrogênio e compatibilidade simbiótica de estirpes rizobianas provenientes do semiárido pernambucano com quatro acessos de *Desmanthus* que foram diferenciados através do marcador molecular ISSR. Estes foram avaliados em sacos de polietileno em casa de vegetação, em blocos casualizados, com quatro repetições, avaliando matéria seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSSR), número de nódulos (NN), peso de nódulo (MSN), acúmulo de N da parte aérea (ANPA), e eficiência relativa (ER), submetidos à análise de variância e ao teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Cada genótipo de *Desmanthus* obteve maior fixação com determinados isolados especificamente, os genótipos 31D e 13AU foram os que apresentaram maior capacidade de fixação de nitrogênio, em relação aos demais genótipos avaliados.

Palavras- Chave: Leguminosa forrageira, FBN, melhoramento genético

ABSTRACT***DESMANTHUS* GENOTYPES NITROGEN FIXING POTENTIAL EVALUATION**

Found in different types of soils and climates, the legumes have a wide geographical distribution. They have a rich and important taxonomic diversity that places them as one of the largest families in numbers of species, and, for the most part, provide symbiosis with nitrogen-fixing bacteria, commonly known as rhizobia. Forage legumes also have direct effects on animal productivity due to their nutritional value, since participating in the animal diet contribute to increase the gain in weight as well as contribute more nutrients to the diet, besides being able to minimize productivity costs when compared with exclusive grass pastures, submitted to fertilization with mineral nitrogen. In this sense *Desmanthus*, a native genus of Brazil, presents as an interesting alternative as a source of forage legumes for the semi-arid tropics. Thus, this work aims to evaluate nitrogen fixation potential and symbiotic compatibility of rhizobial strains from the semi - arid region of Pernambuco with four accessions of *Desmanthus* that were differentiated through molecular marker ISSR. These were evaluated in polyethylene bags in a greenhouse in a randomized complete block design, with four replications, evaluating shoot dry matter (MSPA), root (MSSR), number of nodules (NN), nodule weight (MSN), accumulation (ANPA), and relative efficiency (ER), submitted to analysis of variance and the Scott Knott test at 5% probability. Each genotype of *Desmanthus* obtained greater fixation with certain isolates specifically, the genotypes 31D and 13AU were those that presented greater capacity of fixation of nitrogen, in relation to the other evaluated genotypes.

Keywords: forage legumes, FBN, plant breeding

CAPÍTULO I

REFERENCIAL TEÓRICO

1. REFERENCIAL TEÓRICO

As leguminosas apresentam um importante recurso forrageiro, pois podem contribuir relevantemente no que se refere a composição e utilização das dietas dos animais.

O semiárido brasileiro apresenta elevadas temperaturas, intensidade luminosa (2.800 horas/ano), e baixa umidade relativa do ar que promovem o déficit hídrico, favorecendo elevada evapotranspiração (Alves, et al.; 2009); exibindo medidas de 2.700 mm anuais (Araújo Filho, et al.; 2010).

Na região semiárida, o uso de leguminosas com potencial forrageiro vem sendo visada como destaque na forma de minimizar a carência de forragem nas épocas secas, em virtude da adaptação destas plantas às condições do clima do semiárido (Santos et al., 2008a). Algumas espécies desse grupo apresentam a capacidade de permanecerem verdes por mais tempo que gramíneas forrageiras durante a estação seca (Santos et al., 2008).

As folhas de espécies lenhosas, são adicionadas à dieta animal na época de estiagem, e podem desempenhar o único recurso forrageiro disponível. Os ramos finos de plantas de porte arbóreo-arbustiva nativas da caatinga, auxiliam na porção volumosa da dieta dos ruminantes (Bakke et al.,2010).

O Nordeste brasileiro é considerado o centro de origem de várias leguminosas forrageiras, que ocorrem de forma espontânea, e apresentam propriedades favoráveis como grande resistência às condições edafoclimáticas da região, sendo encontradas em vários tipos de solos e clima, (Loiola et al., 2010).

Segundo Gardiner et al. (2010), o *Desmanthus* é uma leguminosa utilizada para pastejo com grande potencial para melhorar expressivamente a sustentabilidade e o sistema de produção nos trópicos secos.

Figueiredo et al. (2000) asseguram que leguminosas do gênero *Desmanthus* spp. apresentam alta rusticidade, agressividade e persistência, possibilitando o pastejo direto ou em consórcio com gramíneas. Oliveira et al. (2014) citam que *Desmanthus pernambucanus* podem ser cultivados para formação de banco de proteína, com estimativas de fixar grandes quantidades de N/ha/ano. Em estudos realizados por Diniz (2016), foi notado a variação da fixação em *Desmanthus* spp. entre 85 e 978 kg N/ha ano⁻¹.

O nitrogênio fixado no solo, e sua transferência ao agroecossistema, expressa a ampla importância das leguminosas, que atuam como plantas de cobertura, adubação verde, consórcio, aplicados na recuperação de solos degradados em meios ecológicos sucessionais como espécies pioneiras, e na pecuária com desenvolvimento de legumineiras e de pastejo, seja em pastagens associadas com gramíneas ou como banco de proteínas (Fontenele et al., 2009; Andrade et al., 2010).

Perante a grande importância das leguminosas do semiárido, esse trabalho objetivou avaliar a fixação biológica de nitrogênio em genótipos de *Desmanthus*.

1.1 Importância das leguminosas nativas do semiárido

No semiárido brasileiro, o Bioma Caatinga faz parte do ciclo de agricultura itinerante e ocupa uma área de aproximadamente 734.478 km² do Nordeste Brasileiro, onde é conhecido principalmente pelas visíveis adaptações às adversidades do meio em que está inserido (Medeiros, 2013)

A caatinga também é a principal forma de pasto nativo da atividade pecuária da região, com destaque para as plantas leguminosas (*Leguminosae*), apresentando 86 gêneros nativos e 320 espécies (Queiroz, 2009). Segundo Lima et al., (2013), essa família apresenta cerca de 212 gêneros nativos no Brasil que possuem cerca de 2.732 espécies.

Pertencente à ordem Fabales e representada por árvores, arbustos e ervas, a família Leguminosa e é uma das maiores e mais importantes famílias botânicas sendo fonte de produtos alimentares, medicinais, ornamentais e madeireiros, entre outros. A família *Leguminosae/Fabaceae* Lindl. Benth, Sub-Família *Mimosoideae* Benth, compreende cerca de 80 gêneros com aproximadamente 3300 espécies, muitas delas de grande importância medicinal, disseminadas por regiões temperadas e tropicais (Scalon, 2007; Missouri Botanical Garden (2009).

Elas estão presentes em grande parte na composição botânica da Caatinga e na dieta dos animais em pastejo (Moreira et al., 2006; Santos et al. 2008; Santos et al., 2010), com larga abundância de espécies nativas, em sua maior parte caducifólia, podendo ser de uso forrageiro (Maia e Gurgel, 2013).

SANTANA, J.A. Avaliação do potencial fixador de nitrogênio em genótipos de *Desmanthus*

De acordo com Pereira Filho et al., (2013) as plantas herbáceas e as folhas e ramos das espécies lenhosas produzem cerca de 4.000kg de matéria/ha/ano, mas apenas 10% (400kg) fica acessível ao pastejo dos animais. Entretanto, as plantas forrageiras da caatinga são os integrantes básicos da dieta de caprinos e ovinos da região.

Pereira et al., (2007), mencionam que os sistemas de produção mais intensos têm demandado por cultivares forrageiras mais produtivas, de melhor qualidade e mais adaptadas a ofertas ambientais específicas. Neste sentido, as leguminosas do gênero *Desmanthus* são altamente selecionadas pelos animais, Santos et al., (2010), e normalmente são consumidas in natura (em ramoneio ou no cocho), ou na forma de feno (FAO, 2010; Cook et al., 2015). No entanto, o gênero tem sido avaliado como de grande potencialidade para pastagens, podendo melhorar consideravelmente a sustentabilidade e o sistema de produção nos períodos de secas.

Embora estas espécies nativas de potencial forrageiro sejam usadas, ainda existe carência de algumas informações sobre o uso e manejo dessas espécies e as potencialidades que estas podem integrar para a região semiárida (Maia e Gurgel, 2013).

Por outro lado, as leguminosas forrageiras apresentam associação com microorganismos diazotróficos, que são bactérias capazes de fixar nitrogênio tornando-o disponível para absorção pelas plantas. As leguminosas que apresentam esta associação, tem a capacidade de fixar biologicamente taxas de 40 a 290 kg N ha⁻¹ ano⁻¹, com a grande maioria situando-se entre 70 a 140 kg ha⁻¹ ano⁻¹ (Benedetti, 2013). Entretanto, a fixação de N em leguminosas nativas do semiárido ainda é pouco investigada (Santos et al., 2010).

A utilização de leguminosas nativas como forrageira tem sido uma alternativa no intuito de suprir a deficiência nutricional dos rebanhos e proporcionar melhores aportes de N para o solo (Maciel et al., 2012). Contudo, apesar das leguminosas da Caatinga possuírem elevado conteúdo de PB, algumas apresentam reduzida digestibilidade, em virtude da associação com a fibra em detergente ácido (Santana et al., 2011; Santos et al., 2010). No entanto, a disponibilidade de N pode contribuir como mecanismo importante no processo de sucessão natural.

1.2 Potencial forrageiro das leguminosas

Os principais quesitos que apontam uma espécie com potencial forrageiro, segundo Carvalho et al. (2001), são apresentar boa germinação, facilidade de estabelecimento, boa aptidão de rebrota, habituação ao meio, ser resistente à seca, geada ou encharcamento do solo, resistência ao ataque de pragas e doenças, potencialidade produtiva de forragem, habilidade de fornecer ótimo valor nutritivo e falta de influências tóxicas para os animais.

Silva & Andrade (2008), relatam que a prática de cultivar forrageiras nativas é essencial para aumentar a disponibilidade de forragem para o rebanho na região Semiárida. Segundo Lima (2006), o potencial forrageiro das leguminosas nativas do Nordeste é grande, dentre as quais estão: *Macroptilium*, *Desmanthus*, *Sthylosanthes*, *Centrosema*, *rhynchosia*, *Zornia* e *Phaseolus*. Exercendo relevantes valores para a economia nos dias de hoje, as leguminosas nativas do Brasil, são bastante cultivadas em países como China, Índia, Tailândia, e países do continente africano. (Skerman et al., 1988; Vuthiprachumpai et al., 1998; Singh et al., 2007; Ajayi et al., 2008; Liplang et al., 2008; Liu et al., 2008).

Estudos de procedências em diferentes espécies têm evidenciado que existem diferenças entre si em crescimento, reprodução, produção de biomassa e componentes químicos (Liu et al., 2002), capacidade de enraizamento de estacas (Puri & Swamy, 1999) entre outros aspectos, significando que a variabilidade entre populações pode ser aproveitada de diferentes formas, de acordo com a necessidade do sistema de produção (Ohashi et al., 2010). Porém, é de grande importância possibilitar o conhecimento e exploração do potencial das leguminosas de interesse, que traduza as reais possibilidades de utilização.

O gênero *Desmanthus* tem manifestado grande interesse como uma leguminosa forrageira para os trópicos e o Semiárido (Costa et al., 2008). Tal gênero tem sido avaliado como grande potencialidade para alimentação animal, além de apresentar crescimento rápido, alta palatabilidade, esta espécie resiste ao corte e ao pastejo e apresenta alta produção de sementes. Em face da capacidade de fixação simbiótica do nitrogênio atmosférico e a sua contribuição para a produção animal, são fatores importantes para incrementar a produtividade e constituem um caminho da

direção da sustentabilidade de sistemas agrícolas e pecuários (Barcellos et al., 2008; Diniz Neto et al. (2013).

1.3. O Gênero *Desmanthus*

O gênero *Desmanthus* apresenta desde plantas com portes eretos nos trópicos úmidos, e arbustos espessos, na zona semiárida, até plantas prostradas nas regiões montanhosas (Burt, 1993). Este gênero contém 24 espécies pertencentes a subfamília *Mimosoideae* (Luckow, 1993).

Possuem ramos alongados e finos, folhas bipinadas, folíolos ablongos e frutos do tipo vagem, com altura que varia de 0,5 a 1,5 m, com nervuras auriculares opostas ao pecíolo, a inflorescência axilar e do tipo capítulo, hastes finas, vagens estreitas, raízes são duras e penetrantes (Queiroz, 2009). As raízes são penetrantes, duras, persistentes e devido à formação de xilopódios, órgãos armazenadores de água e nutrientes, tem grande resistência à seca (Alcântara & Bufarah, 2004). As flores andróginas ou unissexuais, actinomorfas, diclamídeas, pequenas com prefloração valvar, distribuídas em inflorescências do tipo racemosa (Luckow, 1993). Os frutos são do tipo legume, digitado, deiscente, monocarpelar, seco e possui comprimento de 50 a 90mm e 3 a 4mm de largura com 20 a 30 sementes; (Lewis & Schire, 2003).

É uma leguminosa arbustiva, perene, de larga ocorrência na região Nordeste e em solos arenosos e areno argilosos. Essa cultura possui uma ótima produção de sementes, o que facilita a sua propagação (Luckow, 1993).

Apresenta grande rusticidade, agressividade, podendo ser usada tanto pelos melhoristas de forrageiras para melhoria das pastagens (Aragão & Martins, 1996), como por ecologistas para a recuperação de áreas degradadas, como planta de cobertura de solo e como espécies primárias em formações sucessionais (Souza, 2005). Distribuídas espontaneamente em regiões secas em zonas tropicais e subtropicais das Américas, como Estados Unidos, Argentina, Peru e Brasil (Vavilov, 1992), as plantas do gênero *Desmanthus* apresentaram maior diversidade no México (14 espécies) e sul do Texas, EUA (8 espécies) (Lucrow, 1993; Muir, 2014).

No Brasil a sua ocorrência é muito ampla, segundo estudo taxonômico de Lucrow (1993) são cinco as espécies nativas no Brasil, composta de *Desmanthus leptophyllus* Kunth; *Desmanthus paspalaceus* (Lindm.); *Desmanthus tatuhyensis*;

Desmanthus pernambucanus (L.) Thellung; e *Desmanthus virgatus* (L) Willd), sendo as duas últimas espécies com destaque aos estados de Pernambuco, Paraíba, Piauí, Maranhão e Bahia, apresentados também em pesquisas da flora do Brasil (Morim e Lima, 2015).

Desmanthus pernambucanus L Thell., e *D. virgatus* são espécies arbustivas, autógamas (Santos et al., 2012). São consideradas plantas autógamas, por realizarem preferencialmente a autofecundação (acima de 95%), caracterizadas pela homozigose. Uma população de plantas autógamas é representada por uma ou várias linhas puras. Apesar de preferencialmente realizarem autofecundação, pode ocorrer uma baixa taxa de fecundação cruzada nas espécies autógamas. Esta frequência depende da população de insetos polinizadores, intensidade do vento, temperatura e umidade.

Santos et al. 2008, em estudos de determinação da composição botânica da dieta de ovinos em pastejo na Caatinga, observaram *Desmanthus virgatus* L., entre outras espécies, com altos índices de seletividade. Demonstrando grande importância no que diz respeito ao seu potencial forrageiro, como pastagem resistente em época de estiagem, a Jureminha (*Desmanthus Virgatus*) é uma espécie arbustiva perene, pertencente à sub-família *Mimosoideae*, que se desenvolve nas Regiões Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil. Adaptada a altitudes desde o nível do mar até aproximadamente 1.800 m, prefere vegetar em áreas de menor altitude (Moreira & Bragança, 2011). Tratando-se de uma cultura de rápida propagação, e elevada produção de sementes. São habituais a diferentes ambientes, sucedendo-se desde áreas do semiárido, a condições de alta umidade e existentes em solos arenosos e argilosos (Skerman, 1977).

O uso do material biológico como insumo na agricultura inclui desde o acesso do material vegetal existente em bancos de germoplasma para o uso em programas de melhoramento a materiais de base biotecnológica, bem como o emprego de microorganismos na fixação biológica de nitrogênio (Altieri, 2002).

Vários acessos de *Desmanthus* spp., foram retirados e inseridos na Austrália por diferentes instituições, ao longo dos últimos 50 anos, principalmente pela Organização de Pesquisa da Comunidade Científica e Industrial e Departamento de Indústrias Primárias de *Queensland* (Reid, 1983; Pengelly e Liu 2001).

Já em Pernambuco, Queiroz (2012) realizou amostragens em 11 municípios nos diferentes solos no Semiárido de Pernambuco, no qual avaliou a ocorrência de *Desmanthus* sp. e verificou a presença deste gênero nos 11 municípios representativos da caprinovino cultura, sendo os acessos retirados e inseridos no banco de germoplasma da Universidade Federal Rural de Pernambuco, entretanto Albuquerque (2013) verificou que existe pouca variabilidade morfológica entre 17 acessos deste banco de germoplasma, havendo à formação de um grande grupo com quinze acessos.

Segundo Andrews (2011), as leguminosas quando realizam a simbiose com rizóbios, geralmente obtêm mais que a metade do seu Nitrogênio através dessa fixação biológica, nas regiões áridas e semiárida. A quantidade de N fixado varia muito, dependendo da capacidade da simbiose e das propriedades ambientais, que afetam a produção de biomassa vegetal (StahLet al., 2002; Raddad et al., 2005).

1.4 Fixação biológica de Nitrogênio em leguminosas

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo realizado por alguns microrganismos conhecidos como rizóbios, capazes de captar o nitrogênio atmosférico, possuem o complexo enzimático denominado nitrogenase, capaz de quebrar a tripla ligação do N_2 , ocorrendo no interior de estruturas especializadas denominadas de nódulos. Estas são formadas por meio da simbiose de bactérias de alguns gêneros, em sua maioria parte com as do gênero *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* com determinadas espécies vegetais, tais como as leguminosas (Alcântara 2011). A FBN através da simbiose apresenta grande importância em climas tropicais, pois os solos têm baixa fertilidade e o nitrogênio é pouco disponível em decorrência das perdas deste nutriente no sistema solo-planta (Gualter, 2010).

Entretanto, um elemento que pode delimitar a simbiose em leguminosas, é a ausência de bactérias compatíveis e eficientes nos solos, que pode ser corrigida por meio da inoculação com rizóbios selecionados. Pela ausência de difusão da tecnologia e de respostas na produtividade das culturas no semiárido, a prática de inoculação com rizóbios não é comum. Caso contrário, poderia maximizar a simbiose

entre o macro e microbionte. (Freitas et al., 2012). Nesta circunstância, em que a FBN depende da simbiose com bactérias nativas, é importante constatar técnicas de manejo que potencializem essa fixação.

Devido à eficiência do processo de FBN, a simbiose entre rizóbios e leguminosas é um dos mais significativos sistemas simbióticos entre plantas e microrganismo, com ampla distribuição geográfica e efeito econômico para a agricultura, devido à considerável economia na utilização de fertilizantes nitrogenados (Herridge et al., 2008; Belay & Assefa, 2011; Freitas et al., 2011; Gualte et al., 2011).

Para o *Desmanthus* spp. alguns estudos têm sido destacados no que diz respeito a simbiose de estirpes rizobianas que são capazes de se associar com esse gênero de leguminosa (Date, 1991; Beyhaut et al., 2003; Beyhaut et al., 2006). Para obtenção de estirpes eficientes na FBN é necessário explorar a diversidade da população nativa de rizóbios de regiões com diferentes condições edafoclimáticas (Guimarães et al., 2012; Mathu et al., 2012).

Date (1991) e Burt (1993), em seus estudos, recomendam a estirpe CB3126 como inoculante para *Desmanthus* spp. Dessa forma, (Bahnisch et al., 1998), indicam que a inoculação de *D. virgatus* com a estirpe de *Rhizobium* CB3126, aumentou a produção de folhas nas plantas em relação aos controles não inoculados, tanto em estufas, como em campo em estudos feitos por (Brandon et al., 1998).

Já em estudos realizado por Beyhaut (2003), mostraram capacidade em nodular espontaneamente as espécies *Desmanthus illinoensis* (Michx.) Macmillan e *D. virgatus*, com rizóbios ocorrentes no solo, por outro lado, determinando uma estirpe específica para que ocorra nodulação, a *D. bicornutus* não proporcionou esta capacidade em nodular espontaneamente. Exigindo assim, rizóbios específicos para que ocorra nodulação.

Logo, características desejáveis em uma estirpe, incluem habilidade de formar nódulos, e fixar nitrogênio na espécie alvo. Neste sentido, em programas de melhoramento, a busca por materiais que estabeleça um eficiente processo simbiótico vem sendo alvo de pesquisas promissoras, (Belane & Dakora, 2009).

Herridge et al (2001), citam que o incremento na FBN por meio do melhoramento genético e do manejo eficiente tem um alto benefício econômico. No entanto, nem sempre tem apresentado resultados bem sucedidos. Muitos fatores contribuem para tal, como a dificuldade em combinar características como a fixação

de nitrogênio com outras características, tais como resistência a doenças, qualidade das sementes e produtividade. Os marcadores de DNA podem contribuir em programas de melhoramento vegetal para seleção de genótipos a serem utilizados futuramente como genitores de novas cultivares, pois apresentam entre os mais utilizados atualmente para várias espécies de plantas. (Costa, 2010).

1.5 Utilização de Marcador molecular ISSR em leguminosas

A utilização de marcadores genéticos em estudos populacionais de espécies arbóreas tem demonstrado tratar-se de ferramenta com grande poder de discriminação (Freitas et al., 2005). Neste aspecto, o marcador ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), que se baseia na amplificação de regiões entre sequências microssatélites adjacentes do DNA via PCR (Polymerase Chain Reaction), além de ser abundante no genoma, (González et al., 2002), apresenta elevado grau de polimorfismo, reprodutibilidade e baixo custo. (Santana et al., 2011)

O uso de marcadores torna-se fundamental para uma seleção mais eficiente dos recursos genéticos, e têm sido considerados importantes ferramentas na identificação individual, avaliação do grau de parentesco entre indivíduos, construção de mapas de ligação, variabilidade genética, entre outros.

A detecção de polimorfismos de DNA pode ser feita de diferentes formas. Os principais tipos de marcadores são baseados na hibridização de moléculas de DNA com sondas e na amplificação de sequências de DNA via PCR. Com o desenvolvimento da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) (Mullis; Faloona, 1987) surgiram novos marcadores moleculares. Os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polimorfism*) e minissatélites estão entre os que são baseados na hibridização de fragmentos de DNA, no entanto, entre aqueles cujo polimorfismo é revelado com base na amplificação de sítios de DNA destacam-se RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polimorfism*), microssatélites ou SSR (Single Sequence Repeat), ISSR (Inter sequence simple repeat), SNPs (*Single Nucleotide Polymorfism*), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*), dentre outros (Borém e Caixeta, 2009).

Os Marcadores ISSR são marcadores moleculares de característica dominante, altamente informativos e capazes de diferenciar indivíduos altamente apa-

rentados, sendo importantes para as estimativas da base genética de populações vegetais em programas de melhoramento e conservação de espécies florestais e arbustivas (Ansari et al., 2012).

1.6. FBN e Melhoramento Genético de Plantas leguminosas

Nas leguminosas a FBN é bastante variável, dependendo da espécie. No entanto, há um grande potencial para aumento da contribuição na fixação de nitrogênio entre essas espécies. Herridge e Danso (1995) consideram que o incremento dessa contribuição poderia ocorrer por meio do aumento da área de produção de leguminosas; da melhoria do manejo da cultura, que favorecesse os determinantes de produtividade; pela modificação genética de espécies que promovesse alta dependência da cultura à fixação biológica de N e alta produtividade.

Em razão da variabilidade encontrada nas leguminosas quanto à eficiência do processo de FBN, tem sido enfatizada a importância do melhoramento genético da planta para otimizar o fornecimento de N via fixação biológica. Vance (1998) cita que a quantidade de N fixado pela simbiose leguminosa-rizóbio poderia ser aumentada em 300 % em virtude do melhoramento genético e do manejo das culturas.

A busca por leguminosas forrageiras tropicais que apresentam materiais genéticos superiores está apenas se iniciando, pois mais de 90% das cultivares disponíveis no mercado, ou introduções existentes nos centros de pesquisa, estações experimentais ou universidades do Brasil, são selvagens, ou seja, não sofreram nenhum tipo de manipulação genética (Araújo et al., 2008), podendo ser usados para seleções e hibridações (Lira et al., 2010).

Na literatura existem poucos estudos com o melhoramento vegetal de leguminosas nativas do semiárido brasileiro, sendo essencial para seleção de indivíduos superiores a caracterização da variabilidade dos gêneros *Desmanthus*, bem como a formação de banco de germoplasma.

Estudos genéticos relacionados à *Desmanthus* spp., foram realizados com trabalhos incluindo avaliações agronômicas para seleção de acessos mais promissores (Albuquerque, 2013; Calado, 2015). A formação de bancos de germoplasma com sementes de acessos dessas plantas, vem potencializando o avanço de pesquisas genéticas, abrangendo avaliações morfológicas e nutritivas dos

acessos (Diniz, 2016). Pontos essenciais em programas de melhoramento de plantas, para obter materiais próprios para lançamento comercial.

A seleção fundamentada a partir da variabilidade natural das coleções de plantas, é o principal método de melhoramento genético de espécies forrageiras tropicais no Brasil, tendo em vista um propósito específico e adaptação a uma determinada região de produção (Sluszz, 2012).

Fundamentando a importância de que os estudos com a FBN estejam agregados ao melhoramento genético, foi com o melhoramento da soja, onde houve a seleção de rizóbios específicos, sem que seja necessário a utilização de qualquer fertilizante nitrogenado, cuja impactação são recorrentes no agronegócio (Alcântara, 2011)

A expansão do uso de leguminosas que apresentam eficiência simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio representa uma ferramenta interessante para o aumento da produção agrícola e agropecuária, e também em sistemas que elas estejam associadas. No entanto, pesquisas desenvolvidas com o objetivo de selecionar estirpes eficientes que potencializem a FBN são de extrema importância.

1.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ajayi, f.t.; babayemi, O.J.; Taiwo, A.A. Effects of supplementation of *Panicum maximum* with four herbaceous forage legumes on performance, nutrient digestibility and nitrogen balance in West African dwarf goats. **Animal Science Journal**, v.79, p.673-679, 2008.

Albuquerque, G.P. 2013. **Avaliação de acessos de *Desmanthus* e *Macroptilium* no semiárido Pernambucano**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Alcântara, P. B.; Bufarah, G. 2004. Plantas forrageiras: gramíneas e leguminosas. São Paulo: Nobel, 150 p. Alcântara RMCM (2011) Fixação Biológica de Nitrogênio em Genótipos Ancestrais de Feijão-caupi. Seropédica RJ. **Tese** (Doutorado em Ciência do Solo) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Altieri, M. **Agroecologia**: bases científicas para a agricultura sustentável Guaíba: Agropecuária, 2002. 592. P.

Alves, J. N.; Araújo, G. G. L.; Porto, E. R.; Castro, J. M.; Souza, L. C. Feno de ervas (*Atriplexnummularia*Lindl) e palma forrageira (*Opuntiaficus*Mill) em dietas para caprinos e ovinos. **Revista Científica de Produção Animal**, v.9, n.1, p.43- 52, 2009.

Andrade, A. P.; et al., Produção animal no semiárido o desafio de disponibilizar forragem, em quantidade e com qualidade, na estação seca. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.4, n.4, p. 01-14, dez. 2010.

Andrade, C.M.S.; ASSIS, G.M.L.; Sales, M.F.L. **Estilosantes Campo Grande: Leguminosa forrageira recomendada para solos arenosos do Acre**. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2010. 12 p. (Embrapa Acre. Documentos, 55).

Andrews, M., James, E.K., Sprent, J.I., Boddey, R.M., Gross, E., Reis Jr, F B., 2011.Nitrogen fixation in legumes and actinorhizal plants in natural ecosystems: values obtained using ¹⁵N natural abundance. **PlantEcologyandDiversity** 4, 131-140.

Aragão, W. M.; Martins, P. S. **Jureminha (Desmanthusvirgatus L.): uma leguminosa forrageira promissora**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 1996. 40 p.

Araújo, S. A. C; Deminicis, B. B.; Campos, P. R. S. S. **Melhoramento genético de plantas forrageiras tropicais no Brasil**. Archivos de Zootecnia, Córdoba, v. 57, p. 61- 76, 2008.

Araújo Filho, J. A. et al. Sistema de produção agrossilvipastoril no semiáridode Ceará. In: International Confere: Climate, Sustainability Anddevelopment In Semiarid Regions, 2nd., 2010, Fortaleza, CE. Fortaleza,CE, 2010. p. 1-17.

Bahnisch, G.A.; Date, R.A.; Brandon, N.J.; Pittaway, P. Growth responses of *Desmanthusvirgatus* to inoculation with *Rhizobium* strain CB3126. I. A pot trial with 8

SANTANA, J.A. Avaliação do potencial fixador de nitrogênio em genótipos de *Desmanthus*

clay soils from central and southern Queensland. *Tropical Grasslands*, v.32, p.13– 19, 1998.

Bakke, O.A.; Pereira Filho, J.M.; Bakke, I.A.; Codão, M.A. Produção e utilização da forragem de espécies lenhosas da caatinga. In: Gariglio, M.A.; Sampaio, E.V.; Sá B.; Cestaro, L.A.; Kageyama, P.Y. **Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da caatinga**. Brasília: Serviço Florestal Brasileiro, 2010. p.160-179.

Barcellos, A. O.; Ramos, A. K. B.; Vilela, L.; Martha Júnior, G. B. 2008.

Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.51-67.

Brandon, N.J.; Date, R.A.; Clem, R.L.; Robertson, B.A.; Graham, T.W.G. Growth responses of *Desmanthusvirgatus* to inoculation with *Rhizobium* strain CB3126. II. A field trial at 4 sites in south-east Queensland. *Tropical Grasslands*, v.32, p.20–27, 1998.

Belane, A. K.; Dakora, F. D. Symbiotec N₂ fixation in 30 cowpea (*VignaUnguiculata* L. Walp.) genotypes under field condition in Ghana, using the 15 N natural abundance technique symbions, v. 48, p.47-56, 2009.

Belay, Z. &Assefa, F. Symbiotic and phenotypic diversity of *Rhizobium leguminosarumbv. viciae* from Northern Gondar, Ethiopia. **African Journal ofBiotechnology**, v. 10, p. 4372-4379, 2011.

Benedetti, E. 2013.**Leguminosas e sistemas silvipastoril**, 1.ed. Uberlândia:EDFU, 127p.

Beyhaut, e.;Caraballo, p.; Illarze, g.; Sicardi, M. Inter-croppedperennial legumes in commercialEucalyptus spp. plantations enhancesoilqualityAgrocienciaUruguay, SpecialIssue, p.71-75, SILVA, D.S.; MEDEIROS, A.N. Eficiência do uso dos recursos da Caatinga: produção e conservação. In: **Simpósio Internacional sobre caprinos**

SANTANA, J.A. Avaliação do potencial fixador de nitrogênio em genótipos de *Desmanthus*

e ovinos de corte, 2., 2003, João Pessoa. Anais... João Pessoa: SINCORTE, 2003. p.571-582.

Beyhaut, E.; Dehaan, L.R.; Byun, J.L.; Sheaffer, C.C.; Graham, P.H. Response to inoculation in Illinois bundleflower. Canadian Journal of Plant Science, v.86, p.919–926, 2006.

Borem, A.; Caixeta, E.T. **Marcadores moleculares**. Vicosa, MG: UFV, 2009. 374 p.

Burt, R. L. *Desmanthus*: a tropical and subtropical forage legume: part 2. **Artificial key and specie descriptions**. Herbage Abstract. Australian, v. 63, p. 473-478, 1993.

Calado, T.B. 2015. Avaliações morfológicas e produtivas de genótipos de *Desmanthus* spp. sob diferentes intensidades de corte no semiárido Pernambucano. **Dissertação** (Mestrado em Zootecnia) – Unidade Acadêmica de Serra Talhada/Universidade Federal Rural de Pernambuco, p. 59.

Carvalho, M.M.; Xavier, D.F.; Alvim, M.J. Uso de leguminosas arbóreas na recuperação e sustentabilidade de pastagens cultivadas. In: Carvalho, M.M.; Alvim, M.J.; Carneiro, J.C. (Ed.) **Sistemas agrofloreais pecuários**: opções de sustentabilidade para áreas tropicais e subtropicais. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite; Brasília: FAO, 2001. p. 189-204.

Cook, B.G.; Pengelly, B.C.; Brown, S.D.; Donnelly, J.L.; Eagles, D.A.; Franco, M.A.; Hanson, J.; Mullen, B.F.; Partridge, I.J.; Peters, M.; Schultze-Kraft, R. Tropical Forages: an interactive selection tool. CSIRO, DPI&F(Qld), CIAT and ILRI, Brisbane, Austrália, 2005. Disponível em http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Desmanthus_pernambucanus.htm Acesso em: 28 de dez 2015.

Costa, F. G. P.; Silva, J. H. V.; Lima Neto, R. C.; Quirino, B. J. S.; Rodrigues, A. E. Utilização do feno de jureminha (*Desmanthusvirgatus*) na alimentação de frangos caipiras. **AgropecuáriaTécnica**, v.29, n.1-2, p.11-16, 2008.

SANTANA, J.A. Avaliação do potencial fixador de nitrogênio em genótipos de *Desmanthus*

Costa, J.L.; Oliveira, E.J.; Jesus, O.N.; Oliveira, G.A.F.; Neves, C.G. Marcadores moleculares como ferramenta para estruturação da diversidade genética em genótipos de maracujazeiro. **Jornada Científica** – Embrapa Mandioca e Fruticultura. 2010.

Date, R.A. **Nitrogen fixation in Desmanthus: strain specificity of Rhizobium and responses to inoculation in acidic and alkaline soil.** *Tropical Grasslands*, v.25, p.47– 55, 1991.

Diniz Neto, M. A.; Vasconcelos, R. C. M. de; Cavalcante, L. F.; Pimenta Filho, E. C.; Silva, I. F. de. Disponibilidade hídrica de dois solos e diferentes idades de corte no comportamento agrônomo da Jureminha. **Revista Ciência Agronômica**, v.44, n.1, p.24-33, 2013.

Diniz, W.P.S. Caracterização morfológica e nutricional de acessos de *Desmanthus* spp. submetidos a duas intensidades de corte. 2016. **(Dissertação de Mestrado)** – Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE., Recife – PE, 81f, 2016.

Fao, 2010. Grassland Index. **A searchable catalogue of grass and forage legumes.** Disponível em <<http://www.trc.zootechnie.fr/node/307>> Acesso em: 20 de Dezembro 2015

Figueiredo, M.V.B., B.N. Egídio & H.A. Burity. 2001. Water stress response on the enzymatic activity in cowpea nodules. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32: 195-200.

Fontenele, A. C. F. et al. Leguminosas tropicais: *Desmanthusvirgatus* (L.) Willd. uma forrageira promissora. *Revista Brasileira Agrocência*, Pelotas, v. 15, n. 1-4, p. 121-123, jan./dez. 2009.

Freitas, M. L. M.; Aukar, A. P. de A.; Sebben, A. M.; Moraes, M. L. T. de; Lemos, E. G. M. Variabilidade genética intrapopulacional em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. Por marcador AFLP. **Scientia Florestalis**, Piracicaba, n. 68, p. 21-28, ago.2005.

SANTANA, J.A. Avaliação do potencial fixador de nitrogênio em genótipos de *Desmanthus*

Freitas, A. D. S.; Silva, T. O.; Menezes, R. S. C.; Sampaio, E. V. S. B.; Araújo, E. R.; Fraga, V. S. Nodulação e fixação de nitrogênio por forrageiras da caatinga cultivadas em solos do semiárido paraibano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 1856-1861, 2011.

Freitas, A.D.S., Silva, A.F., Sampaio, E.V.S.B., 2012. **Yield and biological nitrogen fixation of cowpea varieties in the semi-arid region of Brazil**. Biomass and Bioenergy 45, 109-114.

Freitas, A.D.S.; Sampaio, E.V.S.B.; Santos, C.E.R.S.; Fernandes, A. R. 2010. Biological nitrogen fixation in tree legumes of the Brazilian semi-arid Caatinga. *Journal of Arid Environments*, v.74, p.344-349.

González, A.; Coulson, M.; Brettell, R. Development of DNA markers (ISSRs) in mango. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 575, p. 139- 143, 2002.

Gualter, R. M. R. **Efeito da inoculação com diferentes estirpes de rizóbio na nodulação, fixação biológica de nitrogênio e na produtividade em feijão-caupi**. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 2010, 72p.

Gualte, R. M. R.; Boddey, R. M.; Rumjanek, N. G.; Freitas, A. C. R.; Xavier, G. R. Eficiência agronômica de estirpes de rizóbio em feijão-caupi cultivado na região da Pré-Amazônia maranhense. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 303-308, 2011.

Gardiner, C.P.; Bielig, L.; Schlink, A.; Coventry, R.; WAYCOTT, M. 2010. *Desmanthus* – a new pasture legume for the dry tropics. [http://www.regional.org.au/au/asa/2004/poster/5/2/573_gardiner.htm?print=1\[2/16/2010 6:32:49 PM\]](http://www.regional.org.au/au/asa/2004/poster/5/2/573_gardiner.htm?print=1[2/16/2010 6:32:49 PM]). 2010.

Guimarães, A. A.; Jaramillo, P. M. D.; Nóbrega, R. S. A.; FLORENTINO, L. A.; SILVA, R. B.; MOREIRA, F. M. S. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the western Amazon by using cowpea as the trap plant. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, p. 6726-6733, 2012

Herridge, D. F.; Turpin, J. E.; Robertson, M. J. Improving nitrogen fixation of crop legumes through breeding and agronomic management: analysis with simulation modeling. ***Australian Journal of Experimental Agriculture***, v. 41, n. 3, p. 391-401, 2001.

Herridge, D. F.; Peoples, M. B.; Boddey, R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. ***Plant and Soil***, v. 311, p. 1-18, 2008.

Herridge, D. F. and S.K.A. Danso. 1995. Enhancing crops legume N₂ fixation through selection and breeding *Plant Soil* 174:51-82.

Lewis, G.P.; Schire, B.D. Leguminosae or fabaceae? In: KLITGAARD, B. B.; BRUNEAU, A. Advances in legume systematics. ***Kew Bulletin***: Royal Botanic Gardens, Inglaterra, 2003, p. 1-3.

Lima, J.L.S. de. Plantas forrageiras das caatingas - usos e potencialidades. Petrolina, PE: Embrapa-Cpatsa/Pne/rbg-Kew, 1996. 44 p.il.

Lima, H.C.; Queiroz, L.P.; Morim, M.P.; Souza, V.C.; Dutra, V.F.; Bortoluzzi, R.L.C.; Iganci, J.R.V.; Fortunato, R.H.; Vaz, A.M.S.F.; Souza, E.R.; Filardi, F.L.R.; Valls, J.F.M.; Garcia, F.C.P.; Fernandes, J.M.; Martins-Da-Silva, R.C.V.; Perez, A.P.F.; Mansano, V.F.; Miotto, S.T.S.; Tozzi, A.M.G.A.; Meireles, J.E.; Lima, L.C.P.; Oliveira, M.L.A.A.; Flores, A.S.; Torke, B.M.; Pinto, R.B.; Lewis, G.P.; Barros, M.J.F.;

Schütz, R.; Pennington, T.; Klitgaard, B.B.; Rando, J.G.; Scalon, V.R.; Cardoso, D.B.O.S.; Costa, L.C.; Silva, M.J.; Moura, T.M.; Barros, L.A.V.; Silva, M.C.R.; Queiroz, R.T.; Sartori, A.L.B.; Camargo, R.A. & Lima, I.B. 2013. Fabaceae. *In*: Lista de espécies

SANTANA, J.A. Avaliação do potencial fixador de nitrogênio em genótipos de *Desmanthus*

da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB115>>. Acesso em: 14 Out. 2016.

Liplang, N.; Tudsri, S.; Sooksathan, I.; Limaroon, S.; Nilagupta, P. (2008) Effect of intercropping four legumes on the yields of the intercropped physic nut and soil properties in Pakchong District, Nakomrachasima. In: 46^o Kasetsart University Annual Conference, Bangkok. **Proceedings...** Bangkok: Kasetsart University. 2008. 125-134p.

Lira, M. de A.; Cunha, M. V. de; Pereira, A. V. Melhoria genética do capim elefante. In: LIRA, M. de A.; Santos, M. V. F. dos; Dubeux Júnior, J. C. B.; Mello, A. C. L. de (Ed.). Capim-elefante: fundamentos e perspectivas. Recife: IPA: UFRPE, 2010. p. 31-48.

Liu, Z.; Zhou, G.; XU, S.; WU, J.; Yin, Y. Provenance variation in camptothecin concentrations of *Camptotheca acuminata* grown in China. **New Forests**, v. 24, p. 215–224, 2002.

Liu, G.D.; Michalk, D.L.; Bai, C.J.; YU; D.G.; Chen, Z.Q. Grassland development in tropical and subtropical southern China. **Rangeland Journal**, v.30, p.255-270, 2008.

Loiola, M.I.F. et al. Leguminosas e seu potencial de uso em comunidades rurais de São Miguel do Gostoso- RN. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 23, n. 3, p. 59-70, jul/set 2010.

Luckow, M. ***Desmanthus* (Leguminosae- Mimosoideae)**, 1993, 166 f, Monograph, Austrália, 1993.

Maia, L. A. E Gurgel, P. N. C. T. Um olhar sobre a utilização de plantas forrageiras da caatinga como estratégia de convivência com a seca no Alto- Oeste Potiguar **GEO Tema Pau dos Ferros**, Rio Grande do Norte, Brasil, v 3, n. 1, p. 31-43, jan/jun, 2013.

SANTANA, J.A. Avaliação do potencial fixador de nitrogênio em genótipos de *Desmanthus*

Mathu, S.; Herrmann, L.; Pypers, P.; Matiru, V.; Mwirichia, R.; Lesueur, D. Potential of indigenous bradyrhizobia versus commercial inoculants to improve cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) and green gram (*Vigna radiata* L. Wilczek.) yields in Kenya. *Soil Science and Plant Nutrition*, v. 58, p. 750-763, 2012.

Medeiros, J.A. Introdução da favela (*Cnidioscolus phyllacanthus*) em meio à caatinga no núcleo de desertificação seridó, na seca de 2012. *OKARA* v.2, p.241-254, 2013.

Moreira, N. M. et al. Caracterização da vegetação de Caatinga e da dieta de novilhos no Sertão de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 11. p. 1643-1651, nov. 2006

Moreira, H. J. C.; Bragança, H. B. N. **Manual de identificação de plantas infestantes**: Hortifrúti. Campinas: AgriculturalProducts, 2011. 1017p.

Morim, M. P.; Lima, H. C. de. *Desmanthus* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB18496>>. Acesso em: 09 Ago. 2016.

Muir, J.P.; Dubeux JR, J.C.B.; Santos, M.V.F.; Maposse, I.C.; Pitman, W.D.; Butler, T.J. Challenges to domesticating native forage legumes. *Tropical Grasslands – Forrajes Tropicales*, v.2, p.94-96, 2014.

Mullis, K.; Faloona, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 55, p. 335-350, 1987. Muona, O.; Yazdani, R.; Rudin, D. Genetic change between life stages in *Pinus*

Missouri Botanical Garden. *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, 2009.

Ohashi, S. T.; Yared, A. G.; Neto, J. T. F. Variabilidade entre procedências de paricá *Schizolobium parahybavar amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby plantadas no município de Colares – Pará. **Acta Amazonica**. v. 40, n. 1, p. 81–88. 2010.

SANTANA, J.A. Avaliação do potencial fixador de nitrogênio em genótipos de *Desmanthus*

Oliveira, V. R. 2010. **Recursos genéticos e aproveitamento da biodiversidade do semiárido brasileiro**. In: Semiárido Brasileiro: Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação, 2014. p. 89-124. Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/pesquisadores/livro_icid/arquivos_PDF/Capitulo_3_VISELDO_final.pdf>. Acesso em: 20 Set. 2016.

Pengelly, B.C.; Liu, C.J. Genetic relationships and variation in the tropical mimosoid legume *Desmanthus* assessed by random amplified polymorphic DNA. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.48, p.91-99, 2001.

Pereira, J.M. 2007. Utilização de leguminosas forrageiras na alimentação de bovinos. Disponível em: Acesso em 12/08/ 2016.

Pereira Filho, J.M. et al., Manejo da Caatinga para produção de caprinos e ovinos. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal**, Salvador, v. 14, n.1, p. 77-90 jan/mar., 2013

Puri, S.; Swamy, S.L. Geographical variation in rooting ability of stem cuttings of *Azadirachta indica* and *Dalbergiasisso o*. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 46, p. 29-36, 1999.

Queiroz, L.P. **Leguminosas da caatinga**. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana; Kew, Royal Botanic Gardens; Associação Plantas do Nordeste, 2009. 467p.

Queiroz, I. V. Ocorrência e germinação de sementes de *Desmanthus* sp. coletadas no semiárido pernambucano. 2012. 79 p. Dissertação (**Mestrado em Zootecnia**) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

Raddad, A.Y., Salih, A.A., El Fadl, M., Kaarakka, V., Luukkanen, O., 2005. Symbiotic nitrogen fixation in eight *Acacia senegal* provenances in dryland clays of the Blue Nile Sudan estimated by the 15N natural abundance method. *Plant Soil* 275, 261-269.

SANTANA, J.A. Avaliação do potencial fixador de nitrogênio em genótipos de *Desmanthus*

Reid, R. Pasture plant collecting in Mexico with emphasis on legumes for dry regions. **Australian Plant Introduction Review**, v.15, p.I-II, 1983.

Santana, D.F.Y.; Lira, M.A.; Santos, M.V.F.; Ferreira, M.A.; Silva, M.J.A.; Marques, K.A.; Mello, A.C.L.; Santos, D.C. 2011. Caracterização da caatinga e da dieta de novilhos fistulados, na época chuvosa, no semiárido de Pernambuco. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p. 69-78.

Santos, G. R. A.; Batista, A. M. V.; Guim, A.; Santos, M. V. F.; Silva, M. J. A.; Pereira, V. L. A. 2008. Determinação da composição botânica da dieta de ovinos em pastejo na Caatinga. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.37, p.1876-1883.

Santos, M. V.; Mota, V. A.; Santos, L. D. T.; Oliveira, N. J. F.; Geraseey, L. C.; Duarte, E. R. 2008. Sistemas agroflorestais: potencialidades para produção de forrageiras no Norte de Minas Gerais. Belo Horizonte, p. 99-109.

Santos, M.V. F.; Lira, A.M.; Dubeux JR., J.C.B.; Guim, A.; Mello, A.C.L.; Cunha, M.V. 2010. Potential of Caatinga forage plants in ruminant feeding. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 204-215.

Santos, E.C.X. R.; Carvalho, R.; Almeida, E.M.; Felix, L.P. Chromosome number variation and evolution in Neotropical *Leguminosae* (*Mimosoideae*) from northeastern Brazil. *Genetics and Molecular Research*, v.11, n.3, p.2451-2475, 2012.

Scalon, V. R. *Stryphnodendron*. In: JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. Lista de Espécies da Flora do Brasil. Rio de Janeiro, 2007. Disponível em: . Acesso em: 2 mar. 2015.

Silva, V. J.; Dubeux Júnior, J. C. B.; Teixeira, V. I.; Santos, M. V. F.; Lira, M. A.; Mello, A. C. L. 2010. Características morfológicas e produtivas de leguminosas forrageiras tropicais submetidas a duas frequências de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.97-102.

SANTANA, J.A. Avaliação do potencial fixador de nitrogênio em genótipos de *Desmanthus*

Silva, D. S.; Andrade, A. P. Tecnologia para o cultivo e uso de forrageiras nativas. Ln: Congresso Brasileiro DE Zootecnia, 17, 2008, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: ABZ, 2008. p. 1-15.

Singh, R.A.; Bhatt, R.K.; Gupta, S.; Tripathi, S.B. Economics of seed production of cultivated forages, grasses and range legume. Range Management Society of India, v.28, p.212-213, 2007.

Skerman, P.J.; Carmeron, D.G.; Riveros, F. **Tropical forage legumes**. 2nd ed. Food and Agricultural organization of the United Nations. Italy, 692P, 1988.

Sluszz, T. **Monitoramento tecnológico de cultivares de forrageiras tropicais**. Cadernos de Prospecção, Salvador, v. 5, n. 1, p. 1-13, 2012. Disponível em: www.portalseer.ufba.br Acesso em: 12 dez. 2016.

Skerman, P. J. Tropical forage legumes. Rome: United Nations Food and Agriculture Organization, 1977.

Skerman, P. J.; Cameron, D. G.; Riveros, F. Tropical forage legumes. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1988. 692 p.

Souza, V. C. **Botânica sistemática**: Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005. 329 p.

Stahl, L., Nyberg, G., Högberg, P., Buresh, R.J., 2002. Effects of planted tree fallows on soil nitrogen dynamics, above-ground and root biomass, N₂-fixation and subsequent maize crop productivity in Kenya. **Plant and Soil** 243, 103-117.

Vance, C. P. Legume symbiotic nitrogen fixation: agronomic aspects. In: SPAINK, H. P. (Ed.) *The Rhizobiaceae*. Kluwer Academic Publishers, 1998. p.509-530.

SANTANA, J.A. Avaliação do potencial fixador de nitrogênio em genótipos de *Desmanthus*

Vavilov, N.I. 1992. Origin and geography of cultivated plants. In: V.F. Dorofeyev (ed.), translated by D. Leove. Cambridge University Press, Great Britain.

Vuthiprachumpai, L., Phunhiput, W.; Nakmanee, G. 1998. Effect of Nitrogen Fertilizer and Farm Manure Application Rates on Yield of *Desmanthusvirgatus*. **Annual Research Project**. 195-210. Department of Livestock Development, Ministry of Agriculture and Cooperative, Bangkok.

CAPÍTULO II

VARIABILIDADE DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO ENTRE ACESSOS DE *DESMATNHUS*

2. Variabilidade da fixação biológica de nitrogênio entre acessos de *Desmanthus*

2.1 RESUMO

A presença de leguminosas forrageiras nativas, como *Desmanthus*, pode melhorar a dieta dos ruminantes, além de contribuir com a fixação biológica de nitrogênio atmosférico. Este trabalho avaliou o potencial de fixação biológica de nitrogênio em genótipos de *Desmanthus*, sob condições controladas. Foram utilizados isolados rizobianos nativos de solos do semiárido pernambucano e quatro genótipos de *Desmanthus*, caracterizados utilizando o marcador molecular ISSR. Os isolados foram avaliados quanto ao seu potencial para FBN em sacos de polietileno, em experimentos separados para cada genótipo de leguminosa. Foram incluídos tratamentos controle não inoculados sem N e recebendo 90 kg há⁻¹. As plantas foram colhidas aos 90 dias, separadas em parte aérea, raízes e nódulos. Todo material foi seco e pesado, o teor de N foi determinado e o acúmulo de N na parte aérea (ANPA) e a eficiência relativa (ER) foram calculados. Para todos os genótipos, o tratamento com adubação de N mineral (90 kg ha⁻¹), obteve resultados superiores a todos os isolados, para todas as variáveis analisadas. O isolado 49 se apresentou com um bom potencial de FBN para o genótipo 13AU, e o isolado 32 para o 31D por terem permitido uma ER acima de 50% da obtida no controle nitrogenado, apresentando assim, um maior desempenho para essa variável. Cada genótipo estabeleceu a fixação com isolados específicos, ou seja, obteve uma melhor fixação com um determinado isolado, e em sua maior parte, com os isolados provenientes dos solos de baixa fertilidade possuindo as maiores médias, exceto o genótipo 50J que não nodulou. A simbiose dos acessos com isolados do grupo de baixa fertilidade pode resultar de pressão seletiva devido à maior dependência na fixação biológica de N nestas condições. Os acessos de *Desmanthus* avaliados, apresentaram variabilidade da fixação de nitrogênio. Estes apresentaram potencial para seleção de materiais genéticos da planta com maior resposta à inoculação.

Palavra- Cave: FBN, leguminosas, inoculante, ISSR.

2.2 ABSTRACT

Variability of biological nitrogen fixation between *Desmanthus* accessions

The presence of native forage legumes, such as *Desmanthus*, can improve the diet of ruminants, besides contributing to the biological fixation of atmospheric nitrogen. This work evaluated the potential of biological nitrogen fixation in *Desmanthus* genotypes, under controlled conditions. Rhizobian isolates native to the semi - arid Pernambuco soils and four *Desmanthus* genotypes were used, characterized using the molecular marker ISSR. The isolates were evaluated for their potential for FBN in polyethylene bags, in separate experiments for each legume genotype. Non-inoculated control treatments without N and receiving 90 kg ha⁻¹ were included. The plants were harvested at 90 days, separated in aerial part, roots and nodules. All material was dried and weighed, the N content was determined and the accumulation of N in the aerial part (ANPA) and the relative efficiency (ER) were calculated. For all genotypes, treatment with mineral N fertilization (90 kg ha⁻¹), obtained results superior to all isolates, for all variables analyzed. Isolate 49 presented good FBN potential for genotype 13AU and isolate 32 for 31D because they allowed an ER above 50% of that obtained in the nitrogen control, thus presenting a higher performance for this variable. Each genotype established the fixation with specific isolates, that is, obtained a better fixation with a certain isolate, and for the most part, with the isolates from the low fertility soils possessing the highest averages, except the 50J genotype that did not nodulate. The symbiosis of the accessions with isolates from the low fertility group may result from selective pressure due to the greater dependence on the biological fixation of N under these conditions. The *Desmanthus* accesses evaluated showed nitrogen fixation variability. These presented potentials for selection of genetic material of the plant with greater response to inoculation.

Keywords: Biological nitrogen fixation, legumes, inoculant, ISSR

2.3 INTRODUÇÃO

A introdução de leguminosas é uma alternativa interessante para a redução da degradação de pastagens, devido à fixação de N₂ atmosférico, através da simbiose com as bactérias tradicionalmente conhecidas como rizóbio, mas apresenta grande variabilidade em sua capacidade de fixação biológica de nitrogênio (Torres *et al.*, 2009).

O gênero *Desmanthus* pertencente família *Leguminosae*, expressa alta produção de sementes. No entanto, dentre os microorganismos fixadores de nitrogênio que estabelecem simbiose com plantas, estes em leguminosas provavelmente se evidenciam por sua importância econômica, que está relacionada não só à distribuição geográfica e à utilização do hospedeiro, como também à maior eficiência do processo decorrente em uma parceria entre o macro e micro simbiote. Desta forma, diante da grande importância, tanto para as plantas como para a nutrição animal, o nitrogênio favorece para o aumento da capacidade de suporte da pastagem, prolongando a capacidade produtiva e melhorando a qualidade da dieta e o desempenho animal (Hayat *et al.*, 2010; Reis Junior *et al.*, 2010).

Como determinar a eficiência e tamanho da população rizobiana antes de implantar uma leguminosa não é viável, a prática da inoculação prévia das sementes começou a ser adotada no início do século XX (Albareda *et al.*, 2008). Esta técnica é baseada na seleção de estirpes rizobianas com alta capacidade de fixação de nitrogênio na maior parte dos ambientes em que a leguminosa será implantada, com as sementes sendo inoculadas com este material (Araújo *et al.*, 2012). Além disto, é amplamente reconhecido que o genótipo vegetal também apresenta grande efeito na fixação biológica de N (Belane e Dakora, 2011; Otsubo *et al.*, 2013), tornando importante a constante procura por novos materiais para este fim.

As coletas de germoplasma de algumas leguminosas representam uma necessidade urgente de garantir a conservação e, principalmente, de estudar e conhecer essa diversidade. Porém é importante garantir a disponibilidade, a médio e longo prazo, de características que possam ser utilizadas no desenvolvimento de novas cultivares, (Karia *et al.*, 2002; Walter *et al.*, 2006).

Estas coletas devem ser realizadas nas áreas de ocorrência natural, que

SANTANA, J.A. Avaliação do potencial fixador de nitrogênio em genótipos de *Desmanthus*

no caso de várias das leguminosas forrageiras com maior potencial de uso no mundo tropical, como representantes dos gêneros *Stylosanthes*, *Desmanthus* e *Macroptilium* é a caatinga nordestina (Date, 1997).

A introdução de leguminosas fixadoras de nitrogênio em pastagens pode contribuir para o enriquecimento da forragem produzida, uma vez que normalmente essas espécies têm elevado teor de proteínas, bem como para melhoria da fertilidade dos solos, aumentando o rendimento de outras culturas.

O estudo da fixação biológica de nitrogênio das espécies de *Desmanthus* é importante para a definição de estratégias como uma alternativa de grande interesse como fonte de leguminosas forrageiras para os trópicos semiáridos. Dessa forma o presente trabalho visa avaliar o potencial fixador de nitrogênio de genótipos de *Desmanthus*, sob condições controladas, e o efeito de diferentes isolados rizobianos.

2.4 MATERIAL E MÉTODO

Local do experimento

A pesquisa foi conduzida em casa de vegetação em Recife, Pernambuco, situado na latitude de 58' 61" S, longitude 39' 89" W e altitude de 169 m, com temperatura média de $\pm 30,25$ °C e umidade relativa do ar de 77,38%, no período de janeiro a outubro de 2016, sob iluminação natural.

Amostragem e isolamento de rizóbios que nodulam leguminosas por meio de planta-isca.

Este trabalho foi desenvolvido a partir de material coletado no ano de 2010, conforme descrito em Lira (2014). Isolados rizobianos nativos de onze municípios representativos do semiárido pernambucano: Santa Cruz, Parnamirim, Serra Talhada, Sertânia, Petrolina, Floresta, Tupanatinga, Jataúba, Santa Cruz do Capibaribe, Bom Jardim e Caetés, com amostras obtidas em cada classe de solo do município com base no Zoneamento Agroecológico do Estado de Pernambuco – ZAPE (Silva et al. 2001), foram obtidos utilizando o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.), como planta-isca, segundo metodologias convencionais, incluindo a avaliação de sua capacidade de fixação biológica de nitrogênio no feijão-caupi.

Uma análise de agrupamento foi desenvolvida com base nas características químicas e físicas do solo para a seleção de amostras representativas para a fase de isolamento, dos quais dois apresentaram as maiores diferenças em relação às características químicas e físicas (Lira 2014). Um grupo de solo com alta fertilidade formado por amostras de solos dos municípios de Floresta, Santa Cruz do Capibaribe e Parnamirim. E outro grupo de solo com baixa fertilidade formado por amostras de solos dos municípios de Caetés, Petrolina, Sertânia, Santa Cruz e Tupanatinga.

Segundo Arruda (2016), foi obtida grande diversidade entre os isolados do grupo de solo de baixa fertilidade comparado ao grupo de alta fertilidade . A grande diversidade neste grupo pode ser resultado da influência de fatores abióticos, como a fertilidade do solo.

Para execução deste trabalho, foram utilizadas as 10 melhores estirpes dos solos de alta (1, 19, 20, 22 e 26) e de baixa fertilidade (15,32,49, 107 e 118), selecionadas após a determinação da média da parte aérea, inoculadas no processo de autenticação para a utilização das mesmas no teste de eficiência simbiótica, (Arruda, 2016).

Material vegetal

As sementes dos genótipos foram coletadas de acessos individualmente identificados de jureminha *Desmanthus*spp., nos bancos ativos de germoplasma ligados ao Departamento de Zootecnia da UFRPE (Unidade Acadêmica de Serra Talhada). Foram utilizados quatro genótipos, sendo dois pertencentes as gerações F1 de acessos coletados em Santa Cruz do Capibaribe (31D), e Petrolina (50J). Os outros dois genótipos (10AU e 13AU) foram provenientes do Banco de Germoplasma de *Desmanthus* da Embrapa Tabuleiros Costeiros em Aracajú – SE, e possui origem Australiana.

.O município de Serra Talhada está localizado a uma latitude de 07°59'31" Sul e longitude 38°17'54" Oeste, na Mesorregião do Sertão pernambucano na Microrregião do Pajeú, a uma altitude de 429 metros, (IBGE, 2012). Caracterizado pelo clima do tipo semiárido, de temperatura média anual em torno de 37°C e precipitação média de 822 mm/ano. De acordo com a classificação climática de Köppen, o clima é do tipo BSwH (CPRM, 2005).

SANTANA, J.A. Avaliação do potencial fixador de nitrogênio em genótipos de *Desmanthus*

As mudas foram preparadas a partir de sementes desinfestadas e submetidas a escarificação mecânica com lixa de madeira (Lixa Folha Madeira Massa P60 Red. Wood Papel leve 225x275mm Bosch) seguida por imersão em água destilada por 45 minutos. Após esse período foi realizado a lavagem das sementes novamente com água destilada, com auxílio de uma peneira de metal com malha de 0,5 mm. Estas foram colocadas para germinar, entre 4 e 6 dias em bandejas contendo substrato esterilizado (areia lavada e vermiculita), transplantadas, e inoculadas.

Extração de DNA e Ensaio ISSR

O DNA das amostras de folhas coletadas dos quatro acessos de espécies do gênero *Desmanthus*, foi extraído de acordo com Alzate-Marin et al.,(2009), tendo sua pureza e concentração determinada em espectrofotômetro (Nanodrop). Em seguida, o DNA total foi diluído para uma concentração de 10 ng/ul.

Reações em Cadeia da Polimerase e Eletroforese

Foram selecionados quatro primers ISSR dentre os utilizados por Moraes Filho et al., (2011) de acordo com seu polimorfismo e número de loci amplificados(Tabela 1).

As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 20 µl, utilizando-se o Kit GoTaqmastermix (Promega™), consistindo em 8 µl de H₂O mili-q, 8 µl do mastermix (400 nM de cada desoxiribo nucleotídeo e 3 mM MgCl₂), 1,5 µM de primer e 25 ng de DNA molde. As amplificações foram realizadas seguindo as seguintes programações: desnaturação inicial a 95° por 15 minutos, seguidos de 30 a 35 ciclos de desnaturação a 94° por 30 segundos, temperatura de anelamento de 50° por 45 segundos e extensão a 72° por 2 minutos, e extensão final a 72° por 7 minutos ao fim dos ciclos de amplificação em termociclador Mastercycler (Eppendorf AG, Hamburg, Germany Mastercycler)

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese sob condições não-desnaturantes em géis de poliacrilamida 8%. Os fragmentos amplificados foram detectados em coloração com nitrato de prata (20%) segundo protocolo de Sanguinetti et al. (1994). A determinação dos tamanhos dos alelos foi feita utilizando-se marcadores de 50 (ISSR- Inter sequence simplerepeat) pares de base (Invitrogen™). Os marcadores ISSR são eficazes na detecção de

SANTANA, J.A. Avaliação do potencial fixador de nitrogênio em genótipos de *Desmanthus*

polimorfismo, têm baixo custo, são abundantes no genoma e reprodutíveis entre laboratórios (Santana et al., 2011).

O polimorfismo obtido pela técnica ISSR foi tabulado segundo presença (1) ou ausência (0) de bandas. Cada banda ISSR foi considerada um locus único e bi alélico, com um alelo amplificável e um alelo nulo. O Software GenAlex 6.5 (Peakall & Smouse, 2012) foi utilizado para gerar a matriz de distância genética segundo Nei (1972) e para calcular a Diversidade Genética de Nei (H_e), Número de alelos (N_a), Número efetivo de alelos (N_e), e porcentagem de loci polimórficos (PLP).

Tabela 2.4.1. Sequências e características dos primers da PCR, utilizados para análise de dissimilaridade genética:

Marcador ISSR		
Primer	sequência	TA (°C)
UBC#1	ACACACACACACACT	50
UBC#2	GAGAGAGAGAGAGAT	50
UBC#828	TGTGTGTGTGTGTGTC	50
UBC#834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	50

UBC- primers; TA- Temperatura de anelamento.

A partir da matriz de distância genética, a análise de coordenadas principais (PCoA) foi realizada pelo software GenAlex 6.5 (Peakall&Smouse, 2012). Adicionalmente, o software MEGA5 (Tamura et al., 2011) foi utilizado para a geração de um dendrograma de dissimilaridade genética com base no algoritmo UPGMA.

Teste de eficiência simbiótica/FBN

Esta avaliação foi conduzida em sacos de polietileno utilizando solução nutritiva de Hoagland sem N (Hoagland & Arnon, 1950), em experimentos separados para cada acesso, em casa de vegetação da UFRPE.

Cada experimento avaliou um genótipo inoculado com isolados previamente selecionados, e tratamentos controle não inoculados sem N (CSN),

SANTANA, J.A. Avaliação do potencial fixador de nitrogênio em genótipos de *Desmanthus*

não inoculado recebendo 90 kg/ha de N (CN), e inoculados com uma estirpe recomendada para o feijão-caupi, a BR 3267. (Zilli, et al, 2009b)

As plantas foram cultivadas durante 90 dias, colhidas, separadas em parte aérea, raízes e nódulos, que foram contados, e colocadas para secar em estufa de circulação forçada a 60°C por quatro dias, e em seguida pesadas. Toda a parte aérea da planta foi moída para determinação do teor de nitrogênio total. Além disto foi calculada a eficiência relativa (ER).

$$ER = \left(\frac{MSPA_{parcela}}{A_{CN}} \right) \times 100$$

O acúmulo de N na parte aérea (ANPA) foi calculado a partir do teor de N total, analisado por meio do método Kjeldahl, de acordo com a metodologia descrita por Silva e Queiroz (2002), multiplicado pela massa de matéria seca da parte aérea.

Os dados de matéria seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e nódulos (MSN), número de nódulos (NN), ER e ANPA foram submetidos à análise de variância com o teste F. Para os dados de MSPA, MSR e MSN, os dados foram transformados em raiz quadrada. Para o NN, ANPA, e ER foram utilizados $\log_{10}(n+1)$, utilizando SISVAR 5.3 (Ferreira, 2008)

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os fragmentos de ISSR foram tratados como marcadores dominantes e avaliados como caracteres binários: presente (1) ou ausente (0). Em análises subsequentes, somente foram considerados os fragmentos polimórficos que puderam ser avaliados de forma reproduzível em todos os indivíduos analisados.

Foram amplificados um total de 55 loci, onde 32 apresentaram polimorfismo (58,18%). A amplificação foi conduzida com DNA amostrado dos acessos de *Desmanthus*. Os quatro primers utilizados geraram uma média de 13,75 loci, variando entre 6 (#UBC2 e #UBC828) e 13 (#UBC1), como pode ser observado na tabela abaixo, (Tabela 2.5.1).

Tabela 2.5.1. Sumário da diversidade genética obtida por ISSR- PCR (*Reação em cadeia da polimerase*):

Marcador Molecular ISSR

N	NL	LP	LM	%LP	He
#UBC1	19	13	6	68,42	-
#UBC2	11	6	5	54,55	-
#UBC828	10	6	4	60,00	-
#UBC834	15	7	8	46,67	-
Total	55	32	23	58,18	0,221

N= Primers, NL = Numero de Loci, LP = Loci Polimórficos, LM = Loci Monomórficos, He = Diversidade Genética de Nei.

Considerando-se todos os genótipos, observou-se que houve diferença genética entre os genótipos *Desmanthus*, onde (He= 0,221). A diversidade gênica ou heterozigiosidade esperada (He), conforme Nei (1972), refere-se ao nível de heterozigiosidade de uma população obtido a partir de freqüências alélicas desta. Este valor equivale à quantidade de heterozigotos esperada (heterozigiosidade) em uma população de cruzamentos ao acaso (panmítica).

Esta medida pode representar a variação tanto em populações de espécies alógamas quanto autógamias. É considerada uma medida mais apropriada de diversidade gênica. A identidade genética de Nei, calculada entre os acessos, de he=0,221 valor este que, por não serem próximos a 1, mostram o grau de dissimilaridade genética entre as genótipos avaliados, Nei (1978).

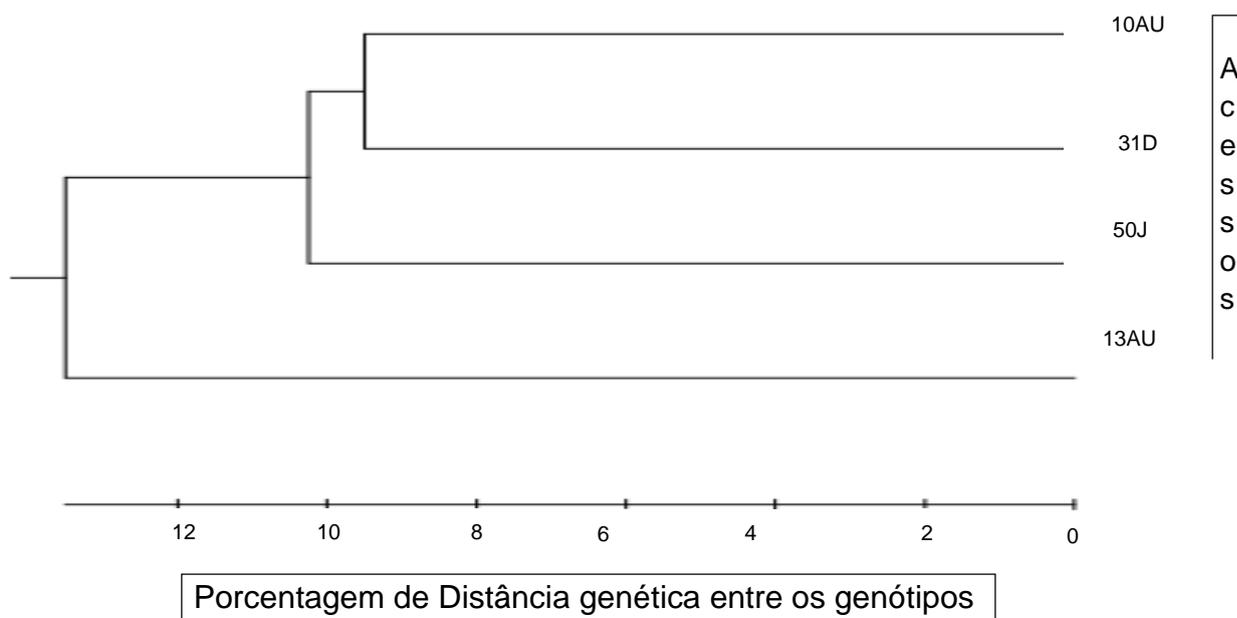
Os quatro genótipos são geneticamente distintos, sendo 10AU e 31D os mais próximos geneticamente, com 19% de dissimilaridade genética entre si e 31D e 13AU os mais distantes geneticamente com 30% de dissimilaridade genética, e o 50J com 23% de dissimilaridade. A matriz de distância genética apresentou baixas distâncias genéticas entre os genótipos estudados. (Tabela 2.5.2)

Tabela 2.5.2 Matriz de Distância Genética:

		Genótipos			
		10 AU	31D	50J	13AU
10AU		0			
31D		0,19	0		
50J		0,21	0,20	0	
13AU		0,28	0,30	0,23	0

Além da matriz de distância genética dos genótipos, a dissimilaridade genética destes foi observada, como mostra no dendograma na figura (2.5.1)

Figura 2.5.1. Dendograma de dissimilaridade genética dos genótipos de *Desmanthus* :



Dendrograma obtido pelo método UPGMA, gerado a partir das medidas de dissimilaridade através da análise com marcadores ISSR para 4 indivíduos de *Desmanthus*.

A matriz de dissimilaridade e o dendrograma obtido através de marcadores moleculares ISSR avaliados isoladamente, pelo método UPGMA, apresentaram que existe diferença entre os quatro genótipos analisados, mesmo trabalhando com uma amostra relativamente pequena. A análise do dendrograma identificou subgrupos principais, cujas composições mostram que há relação clara entre distância genética. O genótipo 13AU, mostrou-se completamente diferenciado dos demais acessos 10AU, 31D e 50J, formando um grupo exclusivo. Embora estes sejam pouco distantes, os genótipos analisados apresentaram variabilidade genética, e mostraram haver relação de grau de parentesco.

Quanto ao teste de eficiência simbiótica, para os genótipos 10AU, 13AU e 31D, os tratamentos inoculados sempre apresentaram resultados significativamente inferiores às plantas fertilizadas com nitrogênio, porém, geralmente foram superiores às plantas não inoculadas sem nitrogênio.

SANTANA, J.A. Avaliação do potencial fixador de nitrogênio em genótipos de *Desmanthus*

Para o genótipo 10AU, diversos isolados apresentaram resultados superiores à BR3267 quanto ao NN, ANPA e ER. Os isolados 15, 32 e 118 apresentaram maior NN. O isolado 118 foi o que obteve maior média entre os demais, e embora todos os tratamentos tenham apresentado ER muito inferior ao das plantas fertilizadas, o 118 permitiria uma MSPA equivalente a 22% da obtida com plantas fertilizadas com nitrogênio mineral. Houve grande variação nos valores para a variável NN, com 10 isolados diferenciando-se dos controles com e sem nitrogênio, no qual não nodularam os isolados 1, 19, 26, e 22, estes, considerados como estirpes de solo baixa fertilidade. (Tabela 2.5.3).

Tabela 2.5.3 Valores médios da matéria seca da parte aérea (MSPA), sistema radicular (MSSR) e nódulos (MSN), número de nódulos (NN), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) e eficiência relativa (ER) de isolados no genótipo 10AU de *Desmanthus*, obtidos de solos de municípios do semiárido pernambucano.

Isolados	MSPA ----(mg plan ⁻¹) ----	MSSR	MSN (mg plan ⁻¹)	NN (und.)	ANPA (mg plan ⁻¹)	ER ----%----
1	499,7 b	189,5 b	0,0 b	0,0 c	74,6 b	7,4 c
15	935,5 b	240,8 b	55,1 a	9,0 a	110,1b	13,8 c
19	857,0 b	57,4 c	0,0 b	0,0 c	8,41 c	1,3 d
20	134,4 b	95,2 c	3,0 b	1,3 c	13,1 c	1,9 d
22	451,8 b	154,3 b	30,0 a	5,0 b	48,5 c	6,7 c
26	141,1b	73,0 c	0,0 b	0,0 c	28,4 c	2,1 d
32	338,9 b	133,6 b	44,6 a	7,0 a	24,2 c	5,0 c
49	71,4 b	45,2 c	11,7 b	1,7 c	3,5 c	1,1 d
107	416,7 b	165,8 b	29,8 a	3,5 b	66,4 b	6,2 c
118	1.495,2 b	395,7 b	52,3 a	6,7 a	207,2 b	22,1 b
BR3267	124,5 b	52,4 b	8,7 b	2,2 b	9,8 c	1,8 d
CN	6.765,9 a	1654,2 a	0,0 b	0,0 c	958,5 a	100,0 a
CSN	630,0 b	37,4 b	0,0 b	0,00 c	3,8 c	1,0 d
CV(%)	54,0	37,0	109,0	129,2	35,0	88,1

Na coluna média seguida por mesma letra não diferem estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de SkottKnott. Dados de MSPA, MSSR e MSN transformados em raiz quadrada e NN, ANPA e ER transformados em Log10. Onde: CN- Controle com Nitrogênio; CSN- Controle Sem Nitrogênio e CV- Coeficiente de variação.

Para o genótipo 13AU, o isolado 49 apresentou médias superiores à BR3267 em todas as variáveis, diferindo estatisticamente em MSPA, MSSR, MSN, NN, ANPA e ER e proporcionando uma MSPA correspondente a 51% em relação às plantas tratadas com nitrogênio. Obtendo diferença não significativas entre os isolados, 49, 107 e BR3267. Este isolado 49 foi uma das melhores estirpes em estudo executado por Arruda (2016), sendo considerado com elevado potencial para inoculante para a cultura do feijão-caupi. Já os isolados 15 e 19 não nodularam, demonstrando que não devem ser selecionados para este genótipo pois não existiu afinidade simbiótica entre estes microsimbiontes e a planta (Tabela 2.5.4).

Tabela 2.5.4 Valores médios da matéria seca da parte aérea (MSPA), sistema radicular (MSSR) e nódulos (MSN), número de nódulos (NN), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) e eficiência relativa (ER) de isolados no genótipo 13AU de *Desmanthus*, obtidos de solos de municípios do semiárido pernambucano.

Isolados	MSPA ----- (mg plan^{-1}) -----	MSSR	MSN (mg plan^{-1})	NN (und.)	ANPA (mg plan ¹)	ER ----%---
1	460,2 b	136,7 c	14,2 b	3,5 b	69,9 b	9,4 c
15	67,7 b	38,3 c	0,0 b	0,0 b	4,4 b	1,4 c
19	72,5 b	57,4 c	0,0 b	0,0 b	15,0 b	1,5 c
20	106,8 b	49,0 c	8,0 b	2,0 b	31,3 b	2,2 c
22	888,5 b	240,0 c	22,0 b	1,5 b	141,8 b	18,1 c
26	232,8 b	89,5 c	22,7 b	3,0 b	76,1 b	4,7 c
32	296,6 b	102,3 c	23,8 b	4,5 b	77,0 b	6,0 c
49	2.523,8 a	515,0 b	107,0 a	12,5 a	691,3 a	51,3 b
107	66,2 b	44,3 c	2,1 b	11,0 a	3,6 b	1,3 c
118	237,2 b	106,6 c	15,5 b	1,0 b	40,9 b	4,8 c
BR3267	419,5 b	183,0 c	97,8 a	12,0 a	78,5 b	8,5 c
CN	4.916,9 a	986,8 a	0,0 b	0,0 b	806,0 a	100,0 a
CSN	286,8 b	133,5 c	0,0 b	0,0 b	69,8 b	5,8 c
CV(%)	88,1	51,4	156,6	172,4	37,7	95,5

Na coluna média seguida por mesma letra não diferem estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de SkottKnott. Dados de MSPA, MSSR e MSN transformados em raiz quadrada e NN, ANPA e ER transformados em Log10. Onde: CN- Controle com Nitrogênio; CSN- Controle Sem Nitrogênio, e CV- Coeficiente de variação.

Quanto ao genótipo 31D, os isolados 1 e 32 e a BR 3267 foram os que obtiveram as maiores médias para a maioria das variáveis, porém o 32 foi o que permitiu a maior MSPA (52%) da obtida pelas plantas do controle com nitrogênio. Os isolados 1, 15, 20, 32, 49, 107 e BR3267 não se diferiram estatisticamente, com maiores valores de NN.A inoculação com a estirpe BR3267 nesse genótipo, promoveu maiores resultados para ANPA e ER. Tal resultado evidencia a eficiência dessa estirpe em disponibilizar N para este acesso vegetal, de uma forma mais eficaz do que com os outros isolados inoculados. Porém, este apresenta um indicativo de boa eficiência simbiótica com estirpe recomendada para o feijão caupi. Consistindo em um dos parâmetros para o potencial de seleção de genótipos superiores (Tabela 2.5.5)

Tabela 2.5.5 Valores médios da matéria seca da parte aérea (MSPA), sistema radicular (MSSR) e nódulos (MSN), número de nódulos (NN), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) e eficiência relativa (ER). de isolados no genótipo 31D de *Desmanthus*, obtidos de solos de municípios do semiárido pernambucano.

Isolados	MSPA -----(mg plant^{-1}) -----	MSSR	MSN (mg plant^{-1})	NN (und.)	ANPA (mg plant^{-1})	ER ----%----
1	1.071,6 b	372,4 b	75,1 a	8,0 a	209,8 a	31,7 b
15	966,2 b	290,3 b	79,1 a	8,7 a	150,5 a	28,5 b
19	652,0 b	259,3 b	23,5 b	3,3 b	126,5 a	19,7 b
20	596,0 b	156,9 b	56,8 a	6,3 a	74,8 b	17,61 b
22	781,1 b	277,7 b	0,0 b	0,0 b	193,7 a	23,1 b
26	178,2 c	85,2 c	33,2 b	3,8 b	20,6 b	5,7 b
32	1.776,0 b	551,5 b	159,0 a	8,8 a	240,5 a	52,5 b
49	748,6 b	256,9 b	93,0 a	7,3 a	179,5 a	22,1 b
107	915,6 b	319,9 b	95,8 a	10,0 a	210,4 a	27,1 b
118	867,0 b	284,7 b	38,6 a	4,0 b	102,0 a	25,6 b
BR3267	1.222,0 b	372,3 b	56,8 a	6,5 a	280,6 a	36,1 b
CN	3.384,6a	972,5 a	0,0 b	0,0 b	574,9 a	100,0 a
CSN	99,2 c	72,7 c	0,0 b	0,0 b	5,8 b	3,0 b
CV (%)	49,2	39,8	82,7	89,8	26,8	40,9

Na coluna média seguida por mesma letra não diferem estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de SkottKnott. Dados de MSPA, MSSR e MSN transformados em raiz quadrada e NN, ANPA e ER transformados em Log10. Onde: CN- Controle com Nitrogênio; CSN- Controle Sem Nitrogênio, e CV- Coeficiente de variação.

Em relação ao genótipo 50J, este apresentou uma particularidade quanto aos demais genótipos, pois foi o único que não estabeleceu simbiose com nenhum dos isolados, não havendo nodulação. O fato da nodulação não ter ocorrido apenas neste genótipo demonstra que este provavelmente apresenta uma maior diferença genética com relação aos demais genótipos estudados, e/ou este fato também possa ter acontecido em decorrência de uma possível interferência na multiplicação das bactérias, já que os inóculos foram preparados para cada genótipo (Tabela 2.5.6).

Tabela 2.5.6 Valores médios da matéria seca da parte aérea (MSPA), sistema radicular (MSSR) e nódulos (MSN), número de nódulos (NN), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) e eficiência relativa (ER) de isolados no genótipo 50J de *Desmanthus*, obtidos de solos de municípios do semiárido pernambucano.

Isolados	MSPA -----(mg plan^{-1})---	MSSR (mg plan^{-1})	MSN (mg plan^{-1})	NN (und.)	ANPA (mg plan^{-1})	ER ----%----
1	429,0 b	88,4 b	0,0 a	0,0 a	34,8 b	34,1 b
15	179,0 b	39,7 b	0,0 a	0,0 a	12,3 c	14,2 b
19	77,9 b	45,7 b	0,0 a	0,0 a	4,0 c	6,2 b
20	128,2 b	79,7 b	0,0 a	0,0 a	8,2 c	10,2 b
22	129,2 b	69,6 b	0,0 a	0,0 a	13,3 c	10,3 b
26	94,2 b	57,8 b	0,0 a	0,0 a	6,3 c	7,5 b
32	130,1 b	85,1 b	0,0 a	0,0 a	15,0 c	10,3 b
49	226,2 b	76,3 b	0,0 a	0,0 a	49,8 b	17,9 b
107	196,5 b	116,7 b	0,0 a	0,0 a	23,7 b	15,6 b
118	139,0 b	77,2 b	0,0 a	0,0 a	13,6 c	11,0 b
BR3267	127,2 b	81,2 b	0,0 a	0,0 a	12,0 c	10,1 b
CN	1.257,9 a	468,3 a	0,0 a	0,0 a	135,4 a	100,0 a
CSN	139,6 b	61,5 b	0,0 a	0,0 a	10,7 c	11,1 b
CV(%)	133,5	89,58	0,0	0,0	26,7	23,82

Na coluna média seguida por mesma letra não diferem estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de SkottKnott. Dados de MSPA, MSSR e MSN transformados em raiz quadrada e NN, ANPA e ER transformados em Log10. Onde: CN- Controle com Nitrogênio; CSN- Controle Sem Nitrogênio, CV- Coeficiente de variação.

A massa de nódulos é um parâmetro intimamente relacionado com a FBN e tem sido indicado para programas de melhoramento vegetal que buscam o

aumento da fixação de N₂. As correlações entre esse parâmetro e a quantidade de nitrogênio fixado requerem uma redução nos custos, tempo e materiais desses programas (Ankomah et al., 1996). Assim, diante da inexistência de nodulação no genótipo 50J e da nodulação dos demais genótipos com diferentes isolados, podemos afirmar que estes parâmetros são realmente úteis para a seleção de genótipos, como uma das etapas de trabalhos de melhoramento vegetal relacionados à FBN.

Portanto a ausência, ou baixa quantidade de N fixada não se deu pela falta de nodulação provavelmente. No entanto, se sabe que a nodulação é uma condição necessária, mas não suficiente para que haja fixação de N₂ (Cleveland et al., 1999), pois diversos fatores biológicos, químicos e físicos podem influenciar a FBN através de seus simbioses (Freire, 1984; Moreira; Siqueira, 2006).

Neste sentido, a ausência de nodulação ou a nodulação ineficiente em determinadas espécies, sob determinadas condições edáficas e ambientais, e/ou a fase vegetativa, ciclo, e porte da planta, podem ser um dos fatores limitantes que pode influenciar no estabelecimento, desenvolvimento e funcionamento da simbiose (Freire, 1984), assim como também o preparo do inoculante. Um destes fatores pode ter diminuído a capacidade destes inoculantes em auxiliar no aumento da fixação, como possa ter acontecido com o genótipo 50J especificamente.

Devido a variabilidade existente, diferentes isolados devem ser recomendados pra diferentes genótipos. Visto que nessa pesquisa, os genótipos avaliados se estabeleceram melhor com um (ou poucos) isolado (s) diferente (s), específico para cada acesso.

Praticamente todos os isolados com maior média de MSPA, NN e MSN, foram oriundos do grupo de solo de baixa fertilidade. Já os isolados com os menores valores de MSPA, NN e MSN são pertencentes ao grupo de solo de alta fertilidade.

Várias investigações têm-se centrado sobre o isolamento, análise e caracterização simbiótica de estirpes rizobianas que são capazes de se associar com *Desmanthus*spp. (Date, 1991; Beyhaut et al., 2003; Beyhaut et al., 2006; Freitas et al., 2011). Parecendo existir estirpes específicas para ocorrência de nodulação (Freitas et al., 2011) com genótipos específicos.

Os isolados se apresentaram de forma diferente para cada variável. O genótipo 31D apresentou maiores médias para as variáveis MSPA, ANPA, MSR e ER., em relação aos genótipos 10AU e 13AU, enquanto que o genótipo 50J apresentou as menores médias possivelmente devido à ausência de nodulação. A avaliação de rizóbios nativos torna possível a seleção de estirpes eficientes já adaptadas às condições local, que atendam aos requisitos específicos para a melhor fixação desta leguminosa, e assim possa aumentar o seu potencial produtivo.

Ao contrário de leguminosa como a soja (*Glycinemax*), que apresenta de médio a alto potencial de fixação de N, variando de 109 a 250 kg ha⁻¹ (Hungria et al, 2001), o *Desmanthus* aparentemente possui um baixo potencial de fixação de N, como relatado por Amrstrong et al., (1996), que ao trabalharem com duas variedades de *D. virgatus* na Austrália, observaram uma taxa de N₂ fixado de 3 e 15 kg ha⁻¹ de N. Nesta pesquisa, os tratamentos nitrogenados (CN) obteve médias bastante elevadas, visto que foi utilizado a dosagem de 90 kg ha⁻¹ de N, aplicação possivelmente maior do que a capacidade de fixação de N nesta espécie, inferindo que a superestimação dos resultados de CN, de alguma forma possa ter ocultado a real eficiência dos isolados com bom desempenho.

Alguns estudos encontraram resultados, por exemplo, doses de 40 a 80 kg de N por hectare reduziram em cerca de 50% a FBN em *Leucaena leucocephala* (Sanginga et al., 1989), reforçando a hipótese de que o aumento da disponibilidade de N no solo tende a inibir a FBN (Compton et al., 2004; Marcarelli; Wurtsbaugh, 2007).

Em diferentes regiões geográficas, Peoples et al. (2009) estimaram as seguintes quantidades de N fixado para feijão-caupi: 51 a 125 kg N ha⁻¹ para o Sul da Ásia; 3 a 201 kg N ha⁻¹ na África e 9 a 51 kg N ha⁻¹ na América do Sul. Observa-se que as quantidades de N fixado apresentam grande variabilidade entre regiões de cultivo e na própria região.

Neste estudo, podemos destacar o isolado 49 com um bom potencial de FBN para o genótipo 13AU, e o isolado 32 para o 31D por terem permitido uma ER acima de 50% da obtida no controle nitrogenado, e inferir que os genótipos de *Desmanthus* estudados apresentam potencial para melhoramento e seleção com inoculação de isolados específicos para cada acesso, de modo a potencializar a

SANTANA, J.A. Avaliação do potencial fixador de nitrogênio em genótipos de *Desmanthus*

FBN, visto que cada genótipo estabeleceu melhor simbiose com determinados isolados bacteriano.

Os parâmetros que avaliam o desenvolvimento da planta (ER e ANPA) foram inferiores à testemunha com nitrogênio, em todos os genótipos, obtendo melhores simbiose com os isolados provenientes dos solos de baixa fertilidade. As condições de baixa fertilidade dos solos podem ter exercido uma pressão seletiva, mantendo apenas as estirpes mais eficientes quanta a fixação de N nestes solos.

Segundo Pimratch et al. (2004), consideram a biomassa da parte aérea como um atributo criterioso na identificação do desempenho da FBN, e a consideram como a característica mais confiável para seleção de cultivares com maior potencial simbiótico em solos com baixa disponibilidade de nitrogênio.

No entanto, nesta pesquisa a realidade de que os isolados rizobianos com melhores desempenhos simbióticos serem oriundos de solo de baixa fertilidade, pode ser explicado pela condição de estresse da baixa fertilidade dos solos, favorecendo assim uma interação simbiótica entre plantas e rizóbios adaptados e mais eficientes quanto a FBN. (Lima et al., 2005).

Vários fatores determinam a eficiência da simbiose, como por exemplo, a morfologia e a estrutura dos nódulos os quais, por sua vez, são determinados pelo hospedeiro, e pelas características genótípicas e fenotípicas das bactérias simbióticas (Sprent, 2007). Como se sabe trocas genéticas ocorrem entre as bactérias do solo, levando algumas espécies a perderem os genes que determinam a simbiose e a FBN, e outras passam a adquirir esses genes e, conseqüentemente, a capacidade de fixar N atmosférico (Sprent, 2003)

A otimização da capacidade de fixação de nitrogênio das leguminosas, por meio do melhoramento genético vegetal, é um processo complexo porque existem dois componentes associados a serem considerados, a planta hospedeira e o rizóbio.

Os dados deste estudo confirmaram que a contribuição da FBN para as cultivares melhoradas é muito variável, e que nem sempre a estirpe do rizóbio representa o fator determinante para que ocorra um bom desempenho da nodulação e da fixação biológica. Ou seja, a habilidade em fixar nitrogênio está intrinsecamente associada aos fatores genéticos da planta, relacionados de modo direto à FBN. Neste aspecto, este estudo indica possíveis linhas de pesquisa, tais

SANTANA, J.A. Avaliação do potencial fixador de nitrogênio em genótipos de *Desmanthus*

como: a avaliação de linhagens quanto à FBN e a influência do ciclo e do porte da cultura na contribuição da fixação biológica de N. Em sinopse, as linhas de pesquisa voltadas com este estudo são necessárias para que a FBN em *Desmanthus* seja melhor entendida e otimizada. Pois houve uma variação de resposta em relação à fixação biológica de nitrogênio.

2.6 CONCLUSÃO

1. Os acessos avaliados apresentaram variabilidade genética, mostrando haver relação de parentesco entre estes indivíduos, independente da distância entre os mesmos.
2. Os genótipos de *Desmanthus* apresentaram potencial de fixação de nitrogênio. Houve resposta à inoculação com as estirpes.
3. É necessário a seleção de isolados específicos para cada acesso de *Desmanthus*. Enfatizando assim, a importância do melhoramento genético vegetal devido à variabilidade encontrada nas leguminosas quanto à eficiência da fixação biológica de nitrogênio.

2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albareda, M.; Rodríguez-Navarro, D. N.; Camacho, M.; Temprano, F. J. Alternatives to peat as a carrier for rhizobial inoculants: Solid and liquid formulations. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 11, p. 2771-2779, 2008.

Alzate-Marin, A. L. et al. An efficient and rapid DNA miniprep procedure suitable for PCR/SSR and RAPD analyses in tropical forest tree species. **Braz. arch. biol. technol.** [online]. vol.52, n.5 1217-1224, 2009.

Ankomah, A. B.; Zapata, F.; Hardarson, G.; Danso, S. K. A. Yield, nodulation, and N₂ fixation by cowpea cultivars at different phosphorus levels. **Biology and Fertility of Soils**, v. 22, p.10-15, 1996.

Araújo, A. S. F.; Leite, L. F. C.; Iwata, B. F.; Lira Junior, M. A.; Xavier, G. R.; Figueiredo, M. B. V. Microbiological process in agroforestry systems. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 32, n. 1, p. 215-216, 2012.

SANTANA, J.A. Avaliação do potencial fixador de nitrogênio em genótipos de *Desmanthus*

Armstrong, R. D., Probert, M., and McCosker, K. (1996b). **Utilisation of nitrogen from plant residues and fertiliser by wheat in Central Queensland farming systems**. In 'Proceedings of the 8th Australian Agronomy Conference'. Toowoomba, 30 January–2 February 1996.

Arruda, A.M. Avaliação de cultivares de feijão-caupi quanto à eficiência para fixação biológica de nitrogênio, Recife- pe. 2016.

Belane, A. K.; Dakora, F. D. Photosynthesis, symbiotic N and C accumulation in leaves of 30 nodulated cowpea genotypes grown in the field at Wa in the Guinea savanna of Ghana. **FieldCropsResearch**, v. 124, n. 3, p. 279-287, 2011.

Beyhaut, e.; Caraballo, p.; Illarze, g.; Sicardi, M. Inter-cropped perennial legumes in commercial Eucalyptus spp. plantations enhance soil quality. *Agrociencia Uruguay, Special Issue*, p.71-75, Silva, D.S.; Medeiros, A.N. Eficiência do uso dos recursos da Caatinga: produção e conservação. In: **Simpósio Internacional sobre caprinos e ovinos de corte**, 2., 2003, João Pessoa. Anais... João Pessoa: Sincorte, 2003. p.571-582.

Beyhaut, E.; Dehaan, L.R.; Byun, J.L.; Sheaffer, C.C.; Graham, P.H. Response to inoculation in Illinois bundle flower. *Canadian Journal of Plant Science*, v.86, p.919–926, 2006.

Cleveland, C.C.; Townsend, A.R.; Schimel, D.S.; Fisher, H.; Howarth, R.W.; Hedin, L.O.; Perakis, S.S.; Latty, E.F.; Von Fischer, J.C.; Elser, A.; Wasson, M.F. Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N₂) fixation in natural ecosystems. **Global Biogeochemical Cycles**, Washington, v. 13, n. 2, p. 623- 645, 1999.

Compton, J.E.; Watrud, L.S.; Porteous, L.A.; Degroot, S. Response of soil microbial biomass and community composition to chronic nitrogen additions at Harvard Forest. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 196, p. 143–158, 2004.

CPRM - Serviço Geológico do Brasil. Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea – Diagnóstico do município de Serra Talhada, estado de Pernambuco. In: Mascarenhas, J. C.; Beltrão, B. A.; Souza Junior, L. C.; Galvão,

SANTANA, J.A. Avaliação do potencial fixador de nitrogênio em genótipos de *Desmanthus*

M. J. T. G.; Pereira, S. N.; Miranda, J. L. F. (Orgs). Recife: CPRM/Prodeem. 2005. 12 p.

Date, R.A. **Nitrogen fixation in Desmanthus: strain specificity of Rhizobium and responses to inoculation in acidic and alkaline soil.** *Tropical Grasslands*, v.25, p.47– 55, 1991.

Date, R. A. The contribution of R & D on root-nodule bacteria to future cultivars of tropical forage legumes. **Tropical Grasslands**, v. 31, n. 4, p. 350-354, 1997.

Ferreira, D.F. Sisvar: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium*, v.6, p.36-41, 2008. Disponível em: Acesso em: 04 dez. 2016.

Freitas, A. D. S.; Silva, T. O.; Menezes, R. S. C.; Sampaio, E. V. S. B.; Araújo, E. R.; Fraga, V. S. Nodulação e fixação de nitrogênio por forrageiras da caatinga cultivadas em solos do semiárido paraibano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 1856-1861, 2011.

Freire, J.R. Important limiting factors in soil. In: Alexander, M. (Ed.). **Biological nitrogen fixation: ecology, technology and physiology**. New York: Plenum Press, 1984. p. 51-74.

Hayat, R.; ALI, S.; Amara, U.; Khalid, R.; Ahmed, I. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann Microbiol*, v.60, p.579-598.

Hoagland, D. R.; Arnon, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: California Agricultural Experiment Station, 1950.

Hungria, M; Campo, R.J.; Mendes, I. C. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. Londrina: Embrapa Soja. Circular técnica. 2001. 48p.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Demográfico de 2012. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatística/população/censo2010/total/polulação_p_ernambuco.pdf. (b). Acesso em: 13/06/2016.

SANTANA, J.A. Avaliação do potencial fixador de nitrogênio em genótipos de *Desmanthus*

Karia, C. T.; Andrade, R. P. de; Charchar, M. J. D. A.; Gomes, A. C. **Caracterização morfológica de acessos do Gênero Stylosanthes no banco ativo de germoplasma da Embrapa Cerrados** - coleção 1994/1995. Planaltina: Embrapa Cerrados, 24p. (Embrapa Cerrados. Boletim de pesquisa, 72), 2002.

Lima, A. S.; Pereira, J. P. A. R.; Moreira, F. M. S.; Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de Bradyrhizobium spp. de solos da Amazônia. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 40, p. 1095-1104, 2005.

Lira TP (2014) Diversidade e eficiência simbiótica de isolados rizobianos provenientes de solos com diferentes condições edafoclimáticas. Pernambuco- PE. **Dissertação** (Mestrado em Ciência do Solo) Universidade Federal de Rural de Pernambuco.

Marcarelli, A.M.; Wurtsbaugh, W.A. Effects of upstream lakes and nutrient limitation on periphytic biomass and nitrogen fixation in oligotrophic, subalpine streams. **Freshwater Biology**, Oxford, v. 52, p. 2211–25, 2007.

Moraes Filho, R. M.; Jimenez, H. J.; Montarroyos, A. V. V.; Musser, R. S.; Silva, M. M.; Silva, E. F.; Martins, L. S. S. Variabilidade genética em genótipos da coleção de germoplasma de *Citrus*, do Instituto Agrônomo de Pernambuco Brejão-PE, por meio de marcadores moleculares ISSR. **Citrus Research and Technology**, v. 32, p. 67-76, 2011.

Moreira, F.M.S.; Siqueira, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

Nei, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, v. 106, p. 283-292, 1972.

Nei, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, v.83, p.583-590, 1978

Otsubo, A. A.; Brito, O. R.; Mercante, F. M. Productivity and nodulation of promising lineages of the Carioca bean group inoculated with *Rhizobium tropici* or

SANTANA, J.A. Avaliação do potencial fixador de nitrogênio em genótipos de *Desmanthus*

supplemented with nitrogen fertilizer. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, p. 2763, 2013.

Peakall, R.; Smouse, P.E. GenAEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research a nupdate. *Bioinformatics*, 2012. <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/early/2015/07/20/bioinformatics.bts460.full.pdf>

Peoples, M. B.; Brockwell, J.; Herridge, D. F.; Rochester, I. J.; Alves, B. J. R.; Urquiaga, S.; Boddey, R. M.; Dakora, F. D.; Bhattarai, S.; Maskey, S. L.; Sampet, C.; Rerkasem, B.; Khans, D. F.; Hauggaard-Nielsen, H.; Jensen, B. S. The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems **Symbiosis**, v. 48, p. 1-17, 2009.

Pimratch, S. Heritability and correlation for nitrogen fixation and agronomic traits of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Songklanakarin Journal Science Technology**, v. 26, n. 3, p. 305-315, 2004.

Reis Junior, F.B.; Simon, M.F.; Gross, E.; Boddey, R. M., Elliott, G. N., Neto, N. E., Loureiro, M.F.; Queiroz, L.P.; Scotti, M.R.; Chen, W.M.; Norén, A. 2010. Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. *New Phytologist*, v.186, p.934-946.

Sanginga, N.; Mulongoy, K.; Ayanaba, A. Effectivity of indigenous rhizobia for nodulation and early nitrogen fixation with *Leucaena Leucecephala* grown in Nigerian soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.21, n. 2, p. 231-235, 1989.

Sanguinetti, C.J.; Dias, E.N.; Simpson, A.J.G. Rapid silver staining and recovery of PCR separated on polyacrylamide gels. **Biotechnology**, v. 17, p. 914 -921, 1994.

Santana, I. B. B.; Oliveira, E. J.; Soares Filho, W. S.; Ritzinger, R.; Amorim, E. P.; Costa, M. A. P. C.; Moreira, R. F. C. Variabilidade genética entre acessos de umbu-cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 33, n. 3, p. 868-876, 2011.

SANTANA, J.A. Avaliação do potencial fixador de nitrogênio em genótipos de *Desmanthus*

Silva, D.J.; Queiroz, A.C. Análise de alimentos – Métodos químicos e biológicos. Viçosa: UFV, p 235, 3 ed. 2002.

Silva, F. B. R.; Santos, J. C. P.; Silva, A. B.; Cavalcanti, A. C.; Silva, F. H. B. B.; Burgos, N.; Parahyba, R. B. V.; Oliveira Neto, M. B.; Souza Neto, N. C.; Araújo Filho, J. C.; Lopes, O. F.; Luz, L. R. Q. P.; Leite, A. P.; Souza, L. G. M. C.; Silva, C. P.; Varejão-Silva, M. A.; Barros, A. H. C. **Zoneamento Agroecológico do Estado de Pernambuco. Recife: Embrapa Solos** - Unidade de Execução de Pesquisa e Desenvolvimento/Governo do Estado de Pernambuco (Secretaria de Produção Rural e Reforma Agrária), 2001.

Sprent, J.I Mutual sanction. Nature, London, v. 422, p.672- 674,2003.

Sprent, J.I; James, E.K. Legume Evolution: Where Do Nodules and Mycorrhizas Fit In **Plant Physiology**, v. 144, p. 575–581, 2007

Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular biology and evolution**, v.28, p. 2731-2739, 2011.

Torres, A. R.; Cursino, L.; Muro-Abad, J. I.; Gomes, E. A.; De Araújo, E. F.; Hungria, M.; Cassini, S. T. A. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from the state of Minas Gerais, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 852-856, 2009.

Walter, B.M.T.; Cavalcanti, T.B.; Bianchetti, L.B.; Valls, J.F.M. Coleta de germoplasma vegetal: relevância e conceitos básicos. In: Walter, B.M.T; Cavalcanti, T.B. Fundamentos Para A Coleta De Germoplasma Vegetal. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, p.778, 2006.

SANTANA, J.A. Avaliação do potencial fixador de nitrogênio em genótipos de *Desmanthus*

Zilli, J. É.; Xavier, G. R.; Moreira, F. M. de S.; Freitas, A. C. R. de; Oliveira, L. A. Fixação biológica de nitrogênio. In: ZILLI, J. É.; Vilarinho, A. A.; Alves, J. M. A. (Ed.). **A cultura do feijão-caupi na Amazonia brasileira**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2009b. p. 185-221.