

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**

**VINICIUS SANTOS GOMES DA SILVA**

**PROSPECÇÃO DE RIZÓBIOS DE LEGUMINOSAS ARBÓREAS EM  
SOLOS DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO SOB DIFERENTES USOS DA  
TERRA**

**Recife  
2017**



Vinicius Santos Gomes da Silva  
Engenheiro Agrônomo

**Prospecção de rizóbios de leguminosas arbóreas em solos do Semiárido brasileiro sob diferentes usos da terra**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Agronomia – Ciência do Solo

Orientadora

Dra. Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos

Coorientadores

Prof. Dr. Alexandre Tavares da Rocha

Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas

**Recife  
2017**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa desde que citada a fonte.

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

S586p Silva, Vinicius Santos Gomes da  
Prospecção de rizóbios de leguminosas arbóreas em  
solos do Semiárido brasileiro sob diferentes usos da terra /  
Vinicius Santos Gomes da Silva. – 2017.  
159 f. : il.

Orientadora: Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos.  
Coorientadores: Ana Dolores Santiago de Freitas;  
Alexandre Tavares da Rocha.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciências do  
Solo, Recife, BR-PE, 2017.  
Inclui referências.

1. Diversidade rizobiana 2. Eficiência simbiótica  
3. Fixação biológica de nitrogênio 4. *Leucaena leucocephala*  
5. Mimosa caesalpinifolia I. Santos, Carolina Etienne  
de Rosália e Silva, orient. II. Freitas, Ana Dolores Santiago de,  
coorient. III. Rocha, Alexandre Tavares da, coorient.  
IV. Título

CDD 631.4

VINICIUS SANTOS GOMES DA SILVA

**Prospecção de rizóbios de leguminosas arbóreas em solos do Semiárido brasileiro sob diferentes usos da terra**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Agronomia – Ciência do Solo.

Aprovada em 08 de agosto de 2017

---

Dra. Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos  
Orientadora  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

BANCA EXAMINADORA

---

Dr. Dário Costa Primo  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profa. Dra. Izabel Cristina de Luna Galindo  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Profa. Dra. Giselle Gomes Monteiro Fracetto  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas  
Universidade Federal Rural de Pernambuco



Aos meus pais, Eliane e Valdemy, principais  
incentivadores na realização deste sonho.

**DEDICO**



## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Aos meus pais, minha irmã Elaine e minha namorada Sabrina, que sempre me motivaram, entenderam as minhas faltas e momentos de afastamento, e me mostraram o quanto é importante estudar.

A minha orientadora Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos e minha coorientadora Ana Dolores Santiago de Freitas, agradeço o apoio inestimável para realização deste estudo, a dedicação, amizade e o entusiasmo científico que souberam transmitir durante esses anos de convivência. Agradeço ainda pela confiança e por compartilhar de suas linhas de pesquisa e que hoje podemos ver alguns frutos desse trabalho.

Ao meu coorientador Alexandre Tavares da Rocha pelas contribuições neste trabalho.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, pela oportunidade e condições concedidas para realização da pesquisa.

Aos professores da Pós-Graduação em Ciência do Solo da UFRPE, representados por Newton Pereira Stamford, Giselle Gomes Monteiro Fracetto, Felipe José Cury Fracetto, Emídio Cantidio Almeida de Oliveira, Mateus Rosas Ribeiro Filho, Maria Betânia Galvão dos Santos Freire, Flávio Adriano Marques e Mário Lira de Andrade Júnior pelos ensinamentos transmitidos durante meu doutoramento.

Ao amigo Mauro Wagner de Oliveira, que foi meu orientador na graduação e mestrado, por ter me inserido no meio acadêmico, pelo compartilhamento de suas ideias e experiências, e por sempre acreditar e me incentivar a seguir em frente no meio científico.

Ao laboratório de Genômica do Instituto Agronômico de Pernambuco, pela contribuição para realização deste estudo, em especial às pesquisadoras Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra e Adália Cavalcanti Mergulhão, pelos conselhos, amizade e ensinamentos.

Ao pesquisador Paulo Ivan Fernandes Júnior, pela presteza e ajuda no desenvolvimento da tese.

Aos estimados colegas bolsistas e estagiários, que muito ajudaram na construção deste trabalho, Pablo Acácio Souza, Andressa Oliveira e Cíntia Gouveia. E ao amigo, colega de doutorado, Aleksandro Ferreira da Silva, pela amizade, suporte e auxílio em várias etapas do trabalho.

Aos amigos de pós-graduação, representados por Abraão Cícero da Silva, Adriana Bezerra da Silva, Aglair Cardoso, Bruno Campos Mantovanelli, Carlos Vitor Oliveira Alves, Juscélia Ferreira da Silva, Mayame de Brito Santana, Juliet Emília Santos Souza, Jéssyca Adriana Gomes Florêncio, Leandro Reis, Gerson Moreira Barros, Emanuelle Maria da Silva, Felipe Martins do Rêgo Barros, Jéssica Rafaela de Souza Oliveira, Tiago Santos e Thiago Schlosser.

A Sra. Maria do Socorro Santana, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo pela cordialidade e presteza.

A FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) pela concessão da bolsa de doutorado.

Enfim a todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para este trabalho e fizeram parte da minha jornada. Muito obrigado!

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 01

- Tabela 1 - Características gerais dos municípios de Belo Jardim na mesorregião do Agreste e Serra Talhada na mesorregião do Sertão, Semiárido do estado de Pernambuco, Brasil. ....60
- Tabela 2 - Análises físicas de amostras de solos coletadas em áreas com diferentes formas de uso da terra no Semiárido de Pernambuco .....62
- Tabela 3 - Caracterização química de solos coletados em áreas com diferentes formas de uso da terra no Semiárido de Pernambuco. ....62
- Tabela 4 - Número e biomassa seca de nódulos em mudas de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*) e leucena (*Leucaena leucocephala*) em solos coletados em diferentes sistemas de uso da terra, na região Semiárida brasileira. ....65
- Tabela 5 - Biomassa seca da parte aérea e de raízes, e nitrogênio acumulado na biomassa aérea de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*) e leucena (*Leucaena leucocephala*) cultivadas em solos coletados sob diferentes sistemas de uso da terra na região Semiárida brasileira. ....69

### Capítulo 02

- Tabela 1 - Características gerais dos municípios de Belo Jardim na mesorregião do Agreste e Serra Talhada na mesorregião do Sertão, Semiárido do estado de Pernambuco, Brasil. ....81
- Tabela 2 - Análises físicas e classificação textural de amostras de solos coletadas em áreas com diferentes formas de uso da terra no Semiárido de Pernambuco. ....84
- Tabela 3 - Caracterização química de solos coletados em áreas com diferentes formas de uso da terra no Semiárido de Pernambuco. ....84
- Tabela 4 - Teste de qui-quadrado para as frequências observadas e esperadas para proporção de isolados bacterianos de nódulos de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) oriundos de diferentes sistemas de uso da terra que amplificaram fragmentos de genes simbióticos. ....90
- Tabela 5 - Teste de qui-quadrado para as frequências observadas e esperadas para proporção de isolados bacterianos de nódulos de leucena (*Leucaena*

	<i>leucocephala</i> (Lam.) de Wit) oriundos de diferentes sistemas de uso da terra que amplificaram fragmentos de genes simbióticos.....	91
Tabela 6 -	Número de grupos, índices de dominância de Simpson, diversidade de Shannon, riqueza de Margalef e equitabilidade de Pielou de bactérias isoladas de nódulos de sabiá ( <i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth.) e leucena ( <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit.) cultivadas em amostras de solos provenientes de diferentes sistemas de uso da terra no Semiárido brasileiro .....	99
Tabela 7 -	Resultados da pesquisa de similaridade no GenBank com o programa Blast de 20 isolados de nódulos de sabiá ( <i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth.) cultivados em solos do Semiárido brasileiro sob diferentes usos da terra. ....	102
Tabela 8 -	Resultados da pesquisa de similaridade no GenBank com o programa Blast de 19 isolados de nódulos de leucena ( <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit.) cultivados em solos do Semiárido brasileiro sob diferentes usos da terra.....	103

### Capítulo 03

Tabela 1 -	Distribuição do número de isolados de acordo com os usos da terra em que foram obtidos.....	118
Tabela 2 -	Valores médios da eficiência relativa de isolados rizobianos de sabiá ( <i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth.) e leucena ( <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit.) oriundos de solos do Semiárido brasileiro sob diferentes usos da terra. ....	122
Tabela 3 -	Teste de qui-quadrado para as frequências observadas e esperadas para proporção de rizóbios eficientes nativos de solos do Semiárido brasileiro sob diferentes usos da terra para inoculação de sabiá ( <i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth.) e leucena ( <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit.). ....	124
Tabela 4 -	Valores médios da massa de matéria seca da parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA), e da eficiência relativa dos diferentes isolados de rizóbios inoculados em sabiá ( <i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth.), .....	125

Tabela 5 - Valores médios da massa de matéria seca da parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA), e da eficiência relativa dos diferentes isolados de rizóbios inoculados em leucena ( <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit).	126
Tabela 6 - Matriz de correlação entre a massa de matéria seca da parte aérea (MSPA), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA), eficiência relativa, número de nódulos (NN) e massa seca de nódulos (MSN) dos rizóbios altamente eficientes (>80% de eficiência relativa) inoculados em <i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth e <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit.	120
Tabela 7 - Resultados da pesquisa de similaridade no GenBank com o programa Blast dos isolados de nódulos de sabiá ( <i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth.) e <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit cultivados em solos do Semiárido brasileiro sob diferentes usos da terra.	129

#### Capítulo 04

Tabela 1 - Atributos químicos e físicos dos solos e características dos municípios em que eles foram coletados.	143
Tabela 2- Isolados bacterianos oriundos de nódulos de leguminosas arbóreas utilizados no experimento.	144
Tabela 3 - Medidas de altura e diâmetro de mudas de <i>Leucaena leucocephala</i> e <i>Mimosa Caesalpinifolia</i> crescendo em resposta à inoculação de rizóbios, aos 30, 60 e 90 dias após a semeadura.	147
Tabela 4 - Valores médios do número e biomassa seca de nódulos de mudas de <i>Leucaena leucocephala</i> e <i>Mimosa caesalpinifolia</i> cultivadas em diferentes solos (Arg = Argissolo, Lat = Latossolo, Luv = Luvisolo) do Nordeste brasileiro, em função da inoculação de rizóbios nativos da região Semiárida do Brasil.	149
Tabela 5 - Valores médios da biomassa seca de raízes e da parte aérea de mudas de <i>Leucaena leucocephala</i> e <i>Mimosa caesalpinifolia</i> cultivadas em diferentes solos (Arg = Argissolo, Lat = Latossolo, Luv = Luvisolo) do Nordeste	

brasileiro, em função da inoculação de isolados de rizóbios nativos da região Semiárida do Brasil.....	150
Tabela 6 - Valores médios dos teores e acúmulo de nitrogênio da parte aérea de mudas de <i>Leucaena leucocephala</i> e <i>Mimosa caesalpinifolia</i> cultivadas em diferentes solos (Arg = Argissolo, Lat = Latossolo, Luv = Luvissolo) do Nordeste brasileiro, em função da inoculação de isolados de rizóbios nativos da região Semiárida do Brasil. ....	152
Tabela 7 - Coeficiente de correlação da altura de plantas aos 90 dias (ALT), diâmetro das plantas aos 90 dias (DIA), número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), parte aérea (MSPA), raízes (MSR) concentração de nitrogênio na parte aérea (CNPA), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) das mudas de <i>Leucaena leucocephala</i> e <i>Mimosa caesalpinifolia</i> . ....	153

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 01

- Figura 1 - Mapa dos municípios de Belo Jardim na mesorregião do Agreste e Serra Talhada na mesorregião do Sertão, Semiárido do estado de Pernambuco, Brasil. ....61
- Figura 2 - Aumentos médios na altura de mudas de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*) (A) e leucena (*Leucaena leucocephala*) (B) aos 30, 60 e 90 dias após o plantio, comparações feitas no último dia de avaliação de cada espécie. Médias com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )..66
- Figura 3 - Aumentos médios no diâmetro de mudas de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*) (A) e leucena (*Leucaena leucocephala*) (B) aos 30, 60 e 90 dias após o plantio, comparações feitas no último dia de avaliação de cada espécie. Médias com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). ....67
- Figura 4 - Aumentos médios no número de folíolos de mudas de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*) (A) e leucena (*Leucaena leucocephala*) (B) aos 30, 60 e 90 dias após o plantio, comparações feitas no último dia de avaliação de cada espécie. Médias com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). ....68

### Capítulo 02

- Figura 1 - Mapa dos municípios de Belo Jardim na mesorregião do Agreste e Serra Talhada na mesorregião do Sertão, Semiárido do estado de Pernambuco, Brasil. ....82
- Figura 2 - Avaliação da qualidade da extração do DNA total de alguns isolados utilizados no estudo, por meio da eletroforese em gel de agarose a 0,8 % por 30 minutos a 80 v, foi utilizado em cada poço 2,0  $\mu$ L do DNA de cada isolado. ....88
- Figura 3 - Amplificação do gene *nifH* (M = marcado de peso molecular 100pb) em isolados de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth). ....89
- Figura 4 - Distribuição de isolados de nódulos de duas leguminosas arbóreas em função do tempo de crescimento em YMA. (A) sabiá (*Mimosa*

	<i>caesalpinifolia</i> Benth.) e (B) leucena ( <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit.).....	92
Figura 5 -	Distribuição de isolados de nódulos de duas leguminosas arbóreas em função da produção de muco (exopolissacarídeos). (A) sabiá ( <i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth.) e (B) leucena ( <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit.).....	94
Figura 6 -	Distribuição de isolados de nódulos de duas leguminosas arbóreas em função da alteração do pH em meio YMA. (A) sabiá ( <i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth) e (B) leucena ( <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit.).....	95
Figura 7 -	Distribuição de isolados de nódulos de duas leguminosas arbóreas em função do diâmetro da colônia em meio YMA. (A) sabiá ( <i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth) e (B) leucena ( <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit.).....	96
Figura 8 -	Distribuição de isolados de nódulos de duas leguminosas arbóreas em função da cor de suas colônias nos diferentes sistemas de uso da terra. (A) sabiá ( <i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth) e (B) leucena ( <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit.).....	97
Figura 9 -	Dendograma das características fenotípicas de isolados de nódulos de duas leguminosas arbóreas que amplificaram fragmentos de genes simbióticos (A). <i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth., (B) <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam) de Wit. ....	100
Figura 10 -	Árvore filogenética construída a partir das sequências parciais do gene 16S rRNA dos isolados bacterianos de (A) leucena e (B) sabiá e outras sequências de estirpes de rizóbios disponíveis no GenBank. ....	104

#### Capítulo 04

Figura 1 -	Municípios em que foram coletadas as amostras de solo utilizadas no experimento. Serra Talhada no Sertão, Belo Jardim no Agreste e Paudalho na Zona da Mata de Pernambuco. ....	142
Figura 2 -	Eficiência relativa de isolados rizobianos inoculados em leucena (A) e sabiá (B).....	151

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL .....	23
1.1 Hipóteses .....	25
1.2 Objetivo Geral .....	25
1.3 Objetivos específicos.....	26
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	27
2.1 Principais entradas de nitrogênio (N) em sistemas agrícolas e naturais .....	27
2.2 Fixação biológica do nitrogênio .....	28
2.3 Associação simbiótica rizóbio-leguminosa .....	29
2.3.1 Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosas.....	30
2.3.2 A família Leguminosae .....	31
2.3.3 Importância de leguminosas arbóreas na fixação biológica de N <sub>2</sub> .....	32
2.4. Semiárido brasileiro: características e usos da terra .....	33
2.4.1 Utilização de leguminosas arbóreas no Semiárido brasileiro .....	34
2.4.1.1 Leucena: características, uso e fixação biológica de nitrogênio .....	35
2.4.1.2 Sabiá: características, uso e fixação biológica de nitrogênio .....	36
2.5 Ocorrência, características e diversidade de rizóbios no Semiárido brasileiro ....	36
2.5.1 Caracterização fenotípica de bactérias que nodulam leguminosas.....	38
2.5.2 Caracterização genotípica de bactérias que nodulam leguminosas.....	39
2.6 Eficiência simbiótica de rizóbios no Semiárido brasileiro .....	42
REFERÊNCIAS .....	43
3 SISTEMAS DE USO DA TERRA AFETAM A NODULAÇÃO E O CRESCIMENTO DE LEGUMINOSAS ARBÓREAS EM SOLOS DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO .....	55
Resumo .....	56
Abstract .....	57
3.1 Introdução .....	58
3.2 Material e métodos .....	60
3.3 Resultados e Discussão.....	64
3.4 Conclusões .....	70
Referências .....	71
4 CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DE NÓDULOS DE LEGUMINOSAS ARBÓREAS CULTIVADAS EM SOLOS SOB DIFERENTES USOS DA TERRA DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO .....	75

Resumo .....	76
Abstract .....	77
4.1 Introdução .....	78
4.2 Material e Métodos .....	81
4.2.1 Captura de rizóbios .....	81
4.2.2 Isolamento e caracterização fenotípica das bactérias dos nódulos .....	83
4.2.3.1 <i>Extração de DNA</i> .....	85
4.2.3.2 <i>Amplificação de fragmentos de genes nifH e nodC</i> .....	85
4.2.4 Avaliação da diversidade dos isolados bacterianos .....	86
4.2.5 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e análises filogenéticas .....	86
4.3 Resultados e Discussão .....	88
4.3.1 Obtenção dos isolados bacterianos dos nódulos das leguminosas .....	88
4.3.2 Amplificação simultânea de fragmentos dos genes <i>nifH</i> e <i>nodC</i> como ferramenta para a seleção preliminar das bactérias .....	88
4.3.3 Caracterização fenotípica .....	91
4.3.4 Avaliação da diversidade .....	97
4.3.5 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e análises filogenéticas .....	100
4.4 Conclusões .....	105
Referências .....	106
<b>5 EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE RIZÓBIOS NATIVOS DE SOLOS DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO, SOB DIFERENTES USOS DA TERRA, PARA INOCULAÇÃO DE LEGUMINOSAS ARBÓREAS .....</b>	<b>113</b>
Resumo .....	114
Abstract .....	115
5.1 Introdução .....	116
5.2 Material e Métodos .....	118
5.2.1 Origem dos isolados .....	118
5.2.2 Experimento de eficiência simbiótica .....	118
5.2.3 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA dos isolados mais eficientes .....	120
5.3 Resultados e Discussão .....	121
5.3.1 Capacidade simbiótica .....	121
5.3.2 Eficiência simbiótica .....	121
5.3.3 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA dos isolados mais eficientes .....	128
5.4 Conclusões .....	130

Referências .....	131
6 EFICIÊNCIA DE RIZÓBIOS NATIVOS DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO NO CRESCIMENTO DE LEGUMINOSAS ARBÓREAS EM DIFERENTES SOLOS.....	137
Resumo .....	138
Abstract .....	139
6.1 Introdução .....	140
6.2 Material e Métodos.....	142
6.3 Resultados e Discussão.....	146
6.4 Conclusão .....	154
Referências .....	155
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	159



## Prospecção de rizóbios de leguminosas arbóreas em solos do Semiárido brasileiro sob diferentes usos da terra

### RESUMO

A inoculação de leguminosas arbóreas com bactérias fixadoras de nitrogênio, pode contribuir para elevar as quantidades de N<sub>2</sub> fixado, sendo uma prática de suma importância para aquisição de nitrogênio em locais onde o aporte de tecnologia é baixo, como os verificados no Semiárido brasileiro. Além disso, o uso de rizóbios nativos eficientes e competitivos representam uma importante estratégia para a recuperação de áreas degradadas do bioma Caatinga. Objetivou-se com este trabalho isolar, caracterizar, avaliar a diversidade e selecionar rizóbios eficientes e competitivos nativos do Semiárido brasileiro. Para isso, foram realizadas expedições no Semiárido de Pernambuco para coleta de amostras de solos (Luvissolo e Argissolo) sob diferentes sistemas de uso da terra: vegetação nativa (caatinga) e áreas com diferentes sistemas agrícolas (monocultivo e consórcio com várias espécies), as quais foram usadas para o cultivo em vaso de duas leguminosas arbóreas, sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) e leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.), usadas como planta-isca para obtenção de nódulos e que serviram para avaliar a habilidade dos rizóbios nativos em promover crescimento e nodulação. Foi constatada a existência de populações de bactérias naturalmente estabelecidas com capacidade de nodular as leguminosas arbóreas nos sistemas de uso avaliados, sendo verificada uma maior nodulação nas plantas cultivadas no Argissolo. Dos nódulos obtidos, foram isoladas em meio YMA 213 bactérias de leucena e 160 de sabiá. Todos os isolados foram avaliados quanto a habilidade de fixar nitrogênio e formar nódulos por meio da amplificação de fragmentos de genes simbióticos *nifH* e *nodC*, os que apresentaram amplificação de pelo menos um gene simbiótico (104 isolados de sabiá e 144 de leucena) foram selecionados e na sequência foram caracterizados fenotipicamente, com base nas características, foram agrupados, e avaliados quanto a sua diversidade. Constatou-se que os sistemas de uso da terra não influenciaram nos índices de diversidade. Com o agrupamento por espécie, foram formados 20 grupos de isolados de sabiá e 19 de leucena. Representantes dos grupos tiveram o gene 16S do rRNA parcialmente sequenciado para determinar o posicionamento taxonômico. Ficou evidenciado maior promiscuidade da leucena, uma vez que a mesma nodulou com representantes dos gêneros *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium* e *Burkholderia*, enquanto o sabiá nodulou somente com bactérias do gênero *Burkholderia*. Os 104 isolados de sabiá e 144 de leucena foram avaliados quanto a eficiência simbiótica em experimentos em casa de vegetação e cultivados em substrato estéril contendo uma mistura de areia e vermiculita, os mais eficientes foram selecionados e avaliados quanto a sua eficiência simbiótica em três solos (Latossolo, Argissolo e Luvissolo). Os isolados 36F e 45G para leucena e 1E e 4D de sabiá mostraram-se bem promissores quanto à FBN.

Palavras-chave: Diversidade rizobiana. Eficiência simbiótica. Fixação biológica de nitrogênio. *Leucaena leucocephala*. *Mimosa caesalpinifolia*.



## Prospecting of rhizobia from Brazilian Semiarid region under different land use systems for inoculation of tree legumes

### ABSTRACT

The inoculation of tree legumes with nitrogen fixing bacteria can contribute to increase as N<sub>2</sub> fixed amounts, being a practice of importance for input of nitrogen in places where entry of technology is reduced, such as those verified in the Brazilian Semiarid region. In addition to this, the use of efficient and competitive native rhizobia represents an important strategy for lands reclamation of the Caatinga biome. The aim of this study was to isolate, characterize, evaluate a diversity and select efficient and competitive native rhizobia to the Brazilian Semiarid region. For this, were carried out expeditions in Brazilian Semiarid region for collect soil samples (Luvisol and Ultisol) under different land use systems: native vegetation (caatinga) and areas with different agricultural systems (such as monoculture and consortium and several species). The soil samples were used for cultivation of tree two legumes in pots. Sabia (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth.) and leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit), were used as trap-plant to obtain nodules and served to evaluate the ability of native rhizobia to promote growth and natural nodulation. Was verified the existence of populations of bacteria naturally established with ability to nodulate the tree legumes in all land use systems evaluated. Verified a greater nodulation in the plants cultivated in the Ultisol. From nodules obtained, were isolated in YMA medium, 213 bacteria of leucena and 160 of sabia. All isolates were evaluated by ability to nitrogen fixation and form nodules, through the symbiotic genes fragments amplification (*nifH* and *nodC*). Were selected the isolates which amplified the symbiotic genes (104 isolates of sabia and 144 of leucena), in the sequence were characterized phenotypically. Based on characteristics, the isolates were grouped and evaluated by diversity. Was verified that land use systems did not influence diversity indices. Were formed 20 groups of isolates of sabia and 19 of leucena, representatives of the groups had the 16S rRNA gene partially sequenced to determine the taxonomic positioning. Was evidenced more promiscuity of the leucena, since it nodulated with representatives of the genus *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium* and *Burkholderia*, while sabia were nodulated only by *Burkholderia*. The 104 isolates of sabia and 144 of leucena were evaluated to symbiotic effectiveness in greenhouse experiments in cropping on sterile substrate, containing a mixture of sand and vermiculite. The isolates more efficient were selected and evaluated for their symbiotic effectiveness in three soils (Oxisol, Ultisol and Luvisol). The isolates 36F and 43K for leucena, 1E and 4D for sabia showed very promising for BNF.

Keywords: Rhizobia diversity. Symbiotic effectiveness. Biological nitrogen fixation. *Leucaena leucocephala*. *Mimosa caesalpiniiifolia*.



## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Regiões semiáridas em todo o mundo estão sujeitas à seca e a flutuações naturais do clima. A seca pode ser causada pela diminuição da precipitação, aumento da evaporação, abaixamento dos lençóis freáticos ou por mudanças no uso da terra. As suas principais consequências incluem a redução da produção agrícola, degradação do solo e alterações dos ecossistemas.

No Brasil, a região semiárida estende-se por uma extensa área no Nordeste, e é caracterizada por elevadas temperaturas, reduzidas precipitações pluviais e baixa produção de biomassa. Nestas condições, um sistema de produção sustentável exige práticas eficientes de manejo, pois a capacidade regenerativa dos solos é baixa. Contudo, o que se tem verificado, normalmente, são práticas de manejo pouco sustentáveis, em sistemas de uso da terra que se caracterizam predominantemente pela substituição da caatinga por áreas de cultivo, com corte e queima da vegetação nativa.

Após as mudanças de uso da terra, com as sucessões de cultivos agrícolas e atividades pastoris, o solo torna-se empobrecido em nutrientes, as áreas são degradadas, e então são abandonadas para regeneração da vegetação natural. Nestas, o restabelecimento da fertilidade do solo é fundamental para que ocorra, de maneira mais rápida, a reabilitação da vegetação. No tocante aos nutrientes, em regiões semiáridas, o nitrogênio tem sido um dos elementos mais limitantes em ecossistemas naturais e agrícolas. A principal via de entrada deste elemento para estes locais é a fixação biológica (FBN), a qual, se bem manejada, se caracteriza como alternativa viável e sustentável para reabilitação de áreas degradadas.

O plantio de leguminosas arbóreas com habilidade de se associar simbioticamente com bactérias fixadoras de nitrogênio se constitui em uma estratégia para favorecer o aumento da disponibilidade de N no sistema. Essas leguminosas podem ser usadas na alimentação animal, adubação verde, plantas de cobertura, produção de madeira e lenha, cercas vivas, árvores de sombra, quebra-ventos, e em sistemas agroflorestais. Para a escolha das espécies, devem ser consideradas características de rusticidade, rápido crescimento, alta produção de biomassa e principalmente habilidade de estabelecer simbiose com rizóbios. Entre as espécies

que reúnem essas características podem ser destacadas a leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.) e o sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.).

O sucesso da inserção dessas leguminosas depende, principalmente, do estabelecimento de uma simbiose eficiente com os micro-organismos diazotróficos nativos. A eficiência simbiótica pode ser restringida por diversas condições relacionadas à planta, ao microssimbionte e às condições edafoclimáticas. Evidentemente, com a inexistência de populações nativas de bactérias capazes de nodular determinada espécie vegetal, a simbiose não se estabelece. Deste modo, a introdução de leguminosas arbóreas em um sistema agroflorestal ou em uma área a ser recuperada deve ser precedida por avaliações das populações rizobianas naturalmente estabelecidas. Estas informações servirão para identificação de populações indígenas eficientes, e da necessidade de inoculação, quando ocorrer a presença de bactérias compatíveis, mas ineficientes.

Diferentes sistemas de uso da terra ou coberturas vegetais podem afetar a diversidade rizobiana, possibilitando o favorecimento de populações diferenciadas com relação à eficiência simbiótica. Poucos estudos abordaram a ocorrência, diversidade e eficiência de microssimbiontes de leucena e sabiá naturalmente estabelecidos em solos do Semiárido brasileiro. Deste modo, pesquisas desta natureza fazem-se necessárias, uma vez que a obtenção e o conhecimento da diversidade de rizóbios nativos representam uma importante estratégia nesta região, pois constitui o passo inicial para a seleção de estirpes eficientes e competitivas para a confecção de inoculantes para uso biotecnológico, em especial, nos ecossistemas naturais e agrícolas onde o aporte de tecnologias é baixo, como os usados pela agricultura familiar no Nordeste. Diante dessas considerações, no presente trabalho, avaliou-se em solos do Semiárido brasileiro sob diferentes usos da terra, a ocorrência, diversidade e a eficiência de populações de rizóbios naturalmente estabelecidas com habilidade de se associar simbioticamente com leucena e sabiá.

A tese está dividida em referencial teórico e quatro capítulos. O referencial teórico traz uma revisão bibliográfica sobre FBN e sua importância para o Semiárido brasileiro. No primeiro capítulo foi estudado, a ocorrência de população rizobiana nativa com capacidade de nodular leucena e sabiá em solos sob diferentes sistemas de uso da terra no Semiárido Brasileiro. O segundo capítulo trata do isolamento, caracterização fenotípica e genética de bactérias de nódulos de sabiá e leucena

cultivadas em solos sob diferentes sistemas de uso da terra no Semiárido brasileiro. Neste capítulo, as bactérias são submetidas à amplificação de fragmentos de genes simbióticos, sendo selecionadas as que amplificaram o *nifH* e/ ou *nodC*. No terceiro capítulo as bactérias selecionadas após a amplificação de genes simbióticos, são avaliadas quanto a sua capacidade simbiótica em estudos com substrato estéril para selecionar os isolados mais eficientes. No quarto capítulo os isolados mais eficientes do terceiro capítulo foram testados em vasos com solo não esterilizado para verificar o potencial simbiótico e a competitividade desses isolados com as estirpes nativas do solo, a fim de selecionar os isolados com maiores potenciais para experimentação em campo e possível utilização como inoculante comercial.

### 1.1 Hipóteses

Solos do Semiárido brasileiro abrigam populações rizobianas capazes de nodular *L. leucocephala* e *M. caesalpinifolia*, sendo o potencial simbiótico variável com o sistema de uso da terra.

As bactérias de nódulos de *L. leucocephala* e *M. caesalpinifolia* presentes em solos do Semiárido brasileiro apresentam alta diversidade, e esta diversidade é afetada pelo sistema de uso da terra.

Nos solos do Semiárido brasileiro existem populações nativas de bactérias nodulíferas eficientes na fixação de nitrogênio em plantas de *L. leucocephala* e *M. caesalpinifolia*, sendo a eficiência alterada pelo sistema de uso da terra.

A inoculação de *L. leucocephala* e *M. caesalpinifolia* com isolados rizobianos estimula o crescimento e o acúmulo de nitrogênio das leguminosas.

### 1.2 Objetivo Geral

Avaliar em solos do Semiárido brasileiro, sob diferentes usos da terra, a ocorrência, diversidade e a eficiência de populações de rizóbios, naturalmente estabelecidas, com habilidade de se associar simbioticamente com *L. leucocephala* e *M. caesalpinifolia*.

### 1.3 Objetivos específicos

Avaliar o crescimento e a nodulação natural de *L. leucocephala* e *M. caesalpiniiifolia* em solos do Semiárido brasileiro sob diferentes sistemas de uso da terra.

Obter uma coleção de rizóbios nativos de solos do Semiárido brasileiro, sob diferentes sistemas de uso da terra (caatinga, monocultivo e consórcio), capazes de nodularem plantas de *L. leucocephala* e *M. caesalpiniiifolia*.

Determinar características fenotípicas e genotípicas da coleção de rizóbios nativos de solos do Semiárido brasileiro, sob diferentes sistemas de uso da terra.

Avaliar se a diversidade rizobiana tem sido alterada pelas mudanças de uso da terra nos sistemas estudados.

Avaliar a eficiência simbiótica de rizóbios de *L. leucocephala* e *M. caesalpiniiifolia* no crescimento de mudas em substrato estéril e em solo.

Selecionar rizóbios eficientes e promissores para serem utilizados como inoculantes para sabiá e leucena.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Principais entradas de nitrogênio (N) em sistemas agrícolas e naturais

Quinto elemento mais abundante do universo, o N, perde em quantidade apenas para o hidrogênio, hélio, oxigênio e neônio (HILY BLANT et al., 2010). É essencial à vida, pois participa da constituição de ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas e hormônios. Deste modo, as principais reações bioquímicas nos seres vivos são dependentes de N, sendo carbono, oxigênio e hidrogênio os demais elementos que os organismos requerem em maiores quantidades (CANFIELD; GLAZER; FALKOWSKI, 2010).

Em plantas, as elevadas exigências de N o tornam um dos fatores mais limitantes para os sistemas agrícolas e naturais (PEÑUELAS et al., 2013), sendo as principais fontes de fornecimento: 1) o solo, principalmente pela decomposição/mineralização da matéria orgânica; 2) fixação não biológica, resultante de processos naturais; 3) fertilizantes nitrogenados e 4) fixação biológica do N atmosférico ( $N_2$ ) (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007).

No que se refere ao N do solo, o estoque contido na matéria orgânica é finito, passível de exaurimento, após cultivos sucessivos. As condições climáticas predominantes nos trópicos intensificam a decomposição da matéria orgânica, bem como as perdas, e resultam em baixos teores do elemento (MAIA et al., 2008).

A fixação não biológica representa outra via de aporte de N, é resultante de processos naturais, tais como a reação de descargas elétricas com o  $N_2$ , vulcanismo e combustão, estas fontes contribuem com aproximadamente 4 Tg de nitrogênio fixado anualmente na Terra (SCHUMANN; HUNTRIESER, 2007).

Os fertilizantes nitrogenados contribuem com cerca de 100 Tg das entradas anuais de N (GALLOWAY et al., 2013). É uma fonte obtida por meio de processo industrial, que apresenta alta demanda energética e requer: 1) hidrogênio (oriundo de gás de petróleo); 2) um catalisador metálico (usualmente o ferro); 3) altas temperaturas (400° a 650°C); e 4) altas pressões (20 a 40 MPa) (EPSTEIN; BLOOM, 2006). Estima-se em seis barris de petróleo o custo energético por tonelada de  $NH_3$  produzida (HUNGRIA; MENDES; MERCANTE, 2013). O alto custo desses insumos e as incertezas climáticas, que diminuem as respostas das culturas à sua aplicação,

reduzem a viabilidade da aplicação de fertilizantes nitrogenados por grande parte dos agricultores (FREITAS et al., 2015).

Por fim, tem-se como via de entrada do nitrogênio a fixação biológica de nitrogênio (FBN), contribuindo com  $190 \text{ Tg ano}^{-1}$ . Consiste na conversão do  $\text{N}_2$  atmosférico em formas assimiláveis pelos organismos vivos (EPSTEIN; BLOOM, 2006), é de importância fundamental para manutenção da vida na Terra, sendo considerada o segundo processo biológico mais importante da natureza, depois da fotossíntese (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

## 2.2 Fixação biológica do nitrogênio

Na Terra, um dos principais reservatórios do N é a atmosfera. Nela o N gasoso apresenta uma concentração de cerca de 78% de seu volume, apresentando um estoque de aproximadamente  $3,9 \times 10^{21} \text{ Tg}$  na forma diatômica ( $\text{N}_2$ ) não combinada (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Apesar do grande reservatório, devido à tripla ligação covalente entre os átomos de nitrogênio, o  $\text{N}_2$  não está disponível para os eucariotos e para maioria dos procariotos, uma vez que a maioria dos organismos o absorve apenas nas formas combinadas. Assim, processos que resultem na quebra da ligação trivalente são de grande importância para a manutenção na vida da Terra, já que o N presente nos ecossistemas é oriundo direta ou indiretamente do  $\text{N}_2$ . (SHRIDHAR, 2012).

A FBN merece destaque dentre os processos de quebra da tripla ligação do  $\text{N}_2$ , por ser a principal forma de entrada de N em sistemas naturais e agrícolas de subsistência (FREITAS et al., 2015). Este processo é realizado por organismos diazotróficos que englobam uma grande variedade de procariotos dos domínios *Archaea* e *Bacteria*, incluindo representantes de arqueias, bactérias gram negativas e gram positivas que apresentam elevada diversidade fenotípica, fisiológica e genética (MOREIRA et al., 2010).

Os fixadores de N podem ser de vida livre, ou viver em associações, estas podem variar em especificidade, estrutura e localização (MOREIRA et al., 2010). Conforme o tipo de relação que estabelecem com as plantas eles são classificados em: 1) associativos, aqueles que formam associações superficiais aos tecidos radiculares, 2) endofíticos, os que colonizam os tecidos internos das plantas, 3) simbióticos, os capazes de formar nódulos, pertencentes aos grupos *Frankia* e

rizóbios. *Frankia* induz a nodulação em plantas das famílias Betulaceae, Casuarinaceae, Coriariaceae, Datisceae, Elaeagnaceae, Myricaceae, Rhamnaceae e Rosaceae. E rizóbios formam nódulos nas simbioses com leguminosas (SANTI; BOGUSZ; FRANCHE, 2013).

### **2.3 Associação simbiótica rizóbio-leguminosa**

Dentre as associações entre fixadores de  $N_2$  e plantas, certamente a que se tem maior interesse e, por consequência, a mais estudada é a simbiose rizóbio e leguminosa, devido a sua importância econômica, e maior impacto quantitativo sobre o ciclo do nitrogênio (SPRENT; ARDLEY; JAMES, 2017). Estima-se que 47 Tg de  $N_2$  são fixados anualmente por leguminosas nas atividades agrícolas e pastoris (HERRIDGE; PEOPLES; BODDEY, 2008), e 5 milhões de toneladas métricas fixados por leguminosas em ecossistemas naturais (GRAHAM; VANCE, 2003).

Esta simbiose é resultado de um processo complexo de comunicação molecular, que envolve a expressão de genes em ambos os parceiros simbióticos (LIRA JÚNIOR; NASCIMENTO; FRACETTO, 2015). Inicialmente, as raízes das leguminosas exsudam um coquetel de compostos fenólicos, identificados como flavonoides, chalconas, betaínas e isoflavonoides (ANDREWS; ANDREWS, 2017). A percepção destes compostos pelas bactérias ativa os genes da nodulação (*nod*) e induzem reações quimiostáticas que direcionam os rizóbios para as raízes. Após a ativação dos genes da nodulação, os rizóbios começam a sintetizar os fatores *nod*, identificados como lipoquitooligossacarídeos, que atuam como moléculas sinalizadoras induzindo a expressão gênica na planta hospedeira (LIRA JÚNIOR; NASCIMENTO; FRACETTO, 2015).

Depois da exsudação e quimiotaxia, inicia-se o processo de colonização, com a adesão e multiplicação dos rizóbios ao redor dos pelos radiculares. Na sequência, o pelo se encurva envolvendo os rizóbios e, por meio da degradação de parte da parede celular do pelo, a plasmalema começa a se invaginar. Os rizóbios invadem o pelo radicular utilizando um tubo denominado de cordão de infecção. No interior do cordão, as bactérias continuam se multiplicando formando o nódulo primário. A partir do estabelecimento do nódulo definitivo, as bactérias, que se encontram dentro das células do córtex, param de se multiplicar, aumentam de tamanho e sofrem várias transformações bioquímicas até se transformarem em bacteroides, e então, tornam-se capazes de fixar  $N_2$  (SANTOS et al., 2008).

### 2.3.1 Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosas

As bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosas têm sido coletivamente denominadas de rizóbios (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). O primeiro isolamento de bactérias oriundas de nódulos de leguminosas foi realizado por Beijerinck (1888) e o termo rizóbio é oriundo da primeira espécie descrita, *Rhizobium leguminosarum* (FRANK, 1889).

Até a década de 80 (século XX), todas as bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> nodulíferas eram classificadas no gênero *Rhizobium*, que abrangia tanto as bactérias de crescimento rápido, como as lentas (WALKER et al., 2015). Jordan (1982) propôs a separação dos rizóbios em dois gêneros conforme o tempo de crescimento, *Bradyrhizobium*, que englobaria os rizóbios de crescimento lento e *Rhizobium* os de crescimento rápido.

Posteriormente, uma nova subdivisão do gênero *Rhizobium* foi realizada. Chen, Yan e Li (1988) utilizaram métodos de hibridização de DNA e sorológicos em rizóbios isolados de nódulos de *Glycine max* e propuseram a criação do gênero *Sinorhizobium*. Mais tarde outros gêneros foram descritos, incluindo *Azorhizobium* isolado em nódulos de *Sesbania rostrata* (DREYFUS; GARCIA; GILLIS, 1988), *Mesorhizobium* obtido em *Cicer arietinum* (JARVIS et al., 1997), *Allorhizobium* isolado de *Neptunia natans* (LAJUDIE et al., 1998).

Até o final do século XX, somente as  $\alpha$ -proteobactérias (gêneros *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*) eram consideradas como bactérias capazes de formar nódulos em leguminosas. Em 2001, dois gêneros (*Burkholderia* e *Cupriavidus*) de  $\beta$ -proteobactérias foram relatados como capazes de nodular leguminosas (MOULIN et al., 2001). A partir de então, diversas outras bactérias foram incluídas como rizóbios. Atualmente, os gêneros de rizóbios estão distribuídos em  $\alpha$ -proteobactérias (*Aminobacter*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Neorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium* e *Shinella*),  $\beta$ -proteobactérias (*Boedetella*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Neisseria* e *Boedetella*) (HOWIESON; DILWORTH, 2016) e *Pseudomonas* sp. e *Xanthomonas* no grupo das  $\gamma$ -proteobactérias (SHIRAISHI; MATSUSHITA; HOUGETSU, 2012).

No tocante às espécies, é difícil precisar a quantidade de bactérias que nodulam leguminosas, em razão da inserção de novas espécies, e também da frequente reclassificação das já descritas, com base na web site <https://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia> que compila dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) e LPSN (List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature) atualmente são registradas 98 espécies (WEIR, 2016). Este número provavelmente deve ser aumentado, uma vez que a maioria dos estudos de taxonomia de rizóbios foram conduzidos com bactérias isoladas de leguminosas produtoras de grãos de importância agrícola, cultivadas em regiões de clima temperado (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Trabalhos utilizando espécies nativas de regiões tropicais ainda são escassos, mas demonstram o elevado potencial de descrição de novas espécies (RADL et al., 2014; SANFRONOVA et al., 2017).

### 2.3.2 A família Leguminosae

A família Leguminosae, também denominada Fabaceae, é a terceira maior família de Angiospermas (>19.500 espécies e 730 gêneros), sendo Asteraceae e Orchidaceae maiores em número de espécies (LPWG, 2013). Com base nas estruturas florais, a família é dividida em três subfamílias, Caesalpinioideae, Mimosoideae, e Papillioideae, que representam 22%, 10%, e 67%, respectivamente, do total de espécies (SPRENT; ARDLEY; JAMES, 2017). Os membros das Caesalpinioideae estão agrupados em quatro tribos: Caesalpinieae, Cassieae, Cercideae e Detarieae compreendendo 170 gêneros e 2.250 espécies. Mimosoideae é agrupada em duas tribos: os Ingeae e Mimoseae, com 80 gêneros e 3.270 espécies, enquanto a Papillioideae é composta por 28 tribos com 480 gêneros e 13.800 espécies (ANDREWS; ANDREWS, 2017). Recentemente, uma nova classificação de subfamília foi proposta com base em análise filogenética, abrangendo cerca de 20% das espécies e 90% dos gêneros, utilizando de sequências do gene *matK*. A partir dos resultados foi proposta a separação das leguminosas em seis subfamílias Caesalpinioideae, Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae, Duparquetioideae e Papillioideae (LPWG, 2017).

As estruturas das flores dos membros das subfamílias diferem significativamente, mas as leguminosas são extremamente diversas em muitos outros aspectos como a) hábito de crescimento, abrangendo ervas, arbustos, lianas

e árvores (SPRENT; ARDLEY; JAMES, 2017), b) habitats, as leguminosas estão presentes desde florestas tropicais até desertos, de baixadas até habitats alpinos, além da existência de espécies aquáticas (LPWG, 2017) c) nodulação, levantamentos em campo, casa de vegetação e viveiros avaliaram a habilidade de nodulação em cerca de 23% das espécies conhecidas e demonstraram que 88% eram nodulíferas. Das plantas avaliadas, nodularam 96% das Papilionoideae, 87% Mimosoideae, e 24% das Caesalpinioideae (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A maioria das espécies da família possui reconhecida importância ambiental, e muitas são cultivadas desde a antiguidade como alimentícias, forrageiras, madeiras, oleaginosas, adubo verde, fornecedoras de celulose, melíferas, medicinais, ornamentais e ainda, para recuperação de áreas degradadas (GRAHAM; VANCE, 2003).

### **2.3.3 Importância de leguminosas arbóreas na fixação biológica de N<sub>2</sub>**

O manejo da (FBN) por meio da utilização de leguminosas arbóreas tem sido uma estratégia utilizada para prover sustentabilidade e a segurança alimentar nos sistemas agrícolas dos trópicos e, assim, vem recebendo atenção de pesquisadores, organizações governamentais e agricultores (MUNROE; ISAAC, 2013).

Nas áreas cultivadas, pastagens, sistemas agroflorestais e em áreas degradadas, a inclusão destas árvores tem reduzido a erosão, aumentado a biodiversidade, restaurado a cobertura vegetal e mantido a fertilidade dos solos (KURPPA; LEBLANC; NYGREN, 2010; CHAER et al., 2011; ISAAC; KIMARO, 2011; SILESHI et al., 2014), apresentando-se como alternativa para reduzir a fragilidade de alguns sistemas de produção agrícola praticados nos trópicos.

Em regiões tropicais, as leguminosas arbóreas frequentemente obtêm mais da metade de suas exigências de nitrogênio a partir da FBN (FREITAS et al., 2010; ANDREWS et al., 2011). Entretanto, a capacidade de fixação varia muito entre as espécies e é dependente das especificidades da simbiose e das condições ambientais. No Quênia, por exemplo, de 70 a 90% do N na biomassa de *Sesbania sesban* e *Calliandra calothyrsus* foi derivado da FBN, totalizando 120 a 360 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> (STAHL et al., 2002), enquanto no Sudão, 48% do N de *Acacia senegal* foi fixado a partir da atmosfera (% Ndfa), introduzindo 36 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> de N para o agrossistema (RADDAD et al., 2005), corroborando que o manejo da FBN via leguminosas arbóreas

pode representar significativas entradas de N para sistemas produtivos, assim como para reabilitação de áreas degradadas.

#### **2.4. Semiárido brasileiro: características e usos da terra**

Regiões semiáridas compõem mais de 18% da superfície da Terra (KOOHAFKAN; STEWART, 2008). No Brasil, estende-se por cerca de 1 milhão de km<sup>2</sup>, abrangendo 1.113 municípios de nove estados (Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais) (BRASILEIRO et al., 2009).

A principal formação vegetal da região é a caatinga (LIMA JÚNIOR et al., 2014), uma floresta seca, constituída por formações xerófilas, heterogêneas e de fisionomias e diversidades variadas (ALVES; ARAÚJO; NASCIMENTO, 2009), composta de uma vegetação que varia de aberta e arbustiva até fechada e florestal (SANTOS et al., 2013). A vegetação é constituída, principalmente, de espécies herbáceas, arbustivas e arbóreas de pequeno porte, caducifólias, e geralmente com espinhos (ALVES; ARAÚJO, NASCIMENTO, 2009).

O clima predominante na região é semiárido quente, classificado em Koppen como tipo BSh. No qual são observadas elevadas temperaturas médias (23° e 27°C) e reduzidas precipitações pluviiais (300 a 800 mm anuais) com um período de estiagem de oito a nove meses, e precipitação concentrada entre fevereiro e abril (ALVARES et al., 2014).

No âmbito das atividades antrópicas, a agricultura e pecuária configuram-se como as principais atividades econômicas desenvolvidas pela população habitante da região (BARRETO et al., 2010). A agricultura, historicamente, vem sendo praticada de modo itinerante, onde os sistemas de produção são baseados na conversão da vegetação nativa em áreas de cultivo, com corte e queima da caatinga, exploração por um curto período e subsequente abandono (pousio), antes de novo ciclo de derrubada e queima (ARAÚJO FILHO, 2002). A pecuária é desenvolvida predominantemente em sistemas de criação extensiva, tendo a caatinga como a principal, e muitas vezes, a única fonte de alimentos para os rebanhos ovinos, caprinos e bovinos. Nas áreas de caatingas arbóreas, como nas arbustivas, os criadores de gado queimam o pasto antes da estação das chuvas, para facilitar o brotamento do mesmo, inserindo nas áreas uma grande quantidade de animais

(bovinos, caprinos e ovinos), acima da capacidade de suporte das mesmas (ALVES, ARAÚJO; NASCIMENTO, 2009).

#### **2.4.1 Utilização de leguminosas arbóreas no Semiárido brasileiro**

Secas cíclicas, balanço hídrico anual negativo, solos rasos, baixa produção de fitomassa, rápida decomposição da matéria orgânica e dificuldade para manutenção da cobertura vegetal são características do Semiárido brasileiro (MAIA et al., 2008; ALBUQUERQUE et al., 2012). Estes fatores, combinados com os sistemas agropecuários extrativistas, em uma agricultura desenvolvida às custas do desmatamento indiscriminado da caatinga, queimadas, períodos de pousio inadequados e atividades pastoris com predomínio de superpastejo, tem resultado em solos carentes em nutrientes e ambientes degradados (ARAÚJO FILHO, 2002).

A intensificação das atividades antrópicas ocasiona, geralmente, uma redução na diversidade das plantas e, uma alteração na disponibilidade dos recursos, o que leva a uma diminuição na diversidade de animais e, provavelmente, de micro-organismos do solo. Estas mudanças podem levar a alterações nas funções dos ecossistemas, nos serviços ambientais prestados, afetando sua produtividade e sustentabilidade (JESUS et al., 2005).

Em áreas degradadas do Semiárido brasileiro, o restabelecimento da fertilidade do solo é fundamental para criar condições que acelerem a recomposição da vegetação (CHAER et al., 2011). A disponibilidade de N é um fator chave nesse processo, visto que tem sido relatado como um dos nutrientes mais limitantes para o crescimento de plantas, e a FBN via simbiose rizóbio leguminosa a principal via de entrada deste elemento em áreas em regeneração (FREITAS et al., 2015). Logo, o manejo adequado, por meio da inclusão de leguminosas arbóreas que se associam as bactérias fixadoras de nitrogênio, constitui-se em uma opção promissora para criação de sistemas de produção agrícolas mais sustentáveis e para recuperação de áreas degradadas.

Informações sobre a FBN em leguminosas arbóreas nos solos do Semiárido brasileiro são escassas, mas os poucos estudos evidenciam a importância deste processo para estes locais (FREITAS et al., 2010; NASCIMENTO, 2013; MARTINS et al., 2015a; SILVA et al., 2017). Freitas et al. (2010) estimaram a FBN em leguminosas da Caatinga e destacaram que *Mimosa tenuiflora*, *Mimosa arenosa* e *Piptadenia*

*stipulacea* apresentam alto potencial de fixação, demonstrado por contribuições médias que chegaram a 68% de N derivado da fixação biológica. Nascimento (2013) avaliou a contribuição da FBN na nutrição de mudas de leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.) e sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) cultivadas em solos do Semiárido nordestino e verificaram contribuições de até 99%, o que indica o elevado potencial destas plantas para serem utilizadas na região.

Além do potencial de uso para recuperação de áreas degradadas, as leguminosas arbóreas podem ser utilizadas em sistemas agrossilvipastoris e agroflorestais, na produção de forragem, na estabilização de taludes contra a erosão, como cobertura rica em nitrogênio para agrossistemas, produção de madeira e lenha, e cercas vivas (BARRETO et al., 2010; MARTINS et al., 2015a).

A escolha das espécies deve levar em consideração as seguintes características: fácil estabelecimento no campo, sistema radicular profundo, crescimento rápido, elevada produção de biomassa, altos teores de N e P na biomassa, biomassa de fácil decomposição, tolerância às condições adversas de solo e clima, e principalmente habilidade de estabelecer simbiose com rizóbios (DRUMMOND et al., 2004; COSTA; DURIGAN, 2010; CHAER et al., 2011; SILVA et al., 2016). Dentre as leguminosas que reúnem essas características, são aqui destacadas a leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit) e o sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.).

#### **2.4.1.1 Leucena: características, uso e fixação biológica de nitrogênio**

A leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit) é uma leguminosa arbórea nativa da América Central, pertencente à subfamília Mimosoideae, que tem sido amplamente distribuída nas regiões tropicais (PENICHE et al., 2014). É uma espécie considerada pioneira e de alta plasticidade, apresentando bom crescimento tanto em locais úmidos como secos, demonstrado por bom desenvolvimento em ambientes que variam desde 650 a 3.000 mm de precipitação anual (COSTA; DURIGAN, 2010).

É uma leguminosa que se destaca por múltiplas possibilidades de aproveitamento, sendo utilizada na produção de lenha e madeira, alimentação animal, quebra vento, adubos verdes, sistemas agroflorestais, e reabilitação de áreas degradadas, sendo ampla sua utilização nestes ambientes perturbados devido ao seu rápido crescimento, produção de elevadas quantidades de sementes, capacidade de

se reproduzir sexuada e assexuadamente, curto período pré-reprodutivo (COSTA; DURIGAN, 2010) alta produção de biomassa (CHOTCHUTIMA et al., 2013) e, principalmente, pela capacidade de estabelecer simbiose com uma ampla gama de rizóbios.

Em sua região de origem, o México, *L. leucocephala* é nodulada por uma seleção diversificada de rizóbios, incluindo *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (WANG; ROMERO; ROMERO, 1999). Até o momento não foram investigados os gêneros que promovem a nodulação no Semiárido brasileiro. Em outras regiões semiáridas, como Panxi na China, os gêneros que promoveram nodulação foram os mesmos verificados no México, acrescentando-se *Mesorhizobium* (XU et al., 2013).

#### **2.4.1.2 Sabiá: características, uso e fixação biológica de nitrogênio**

O sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) é uma leguminosa arbórea de crescimento rápido pertencente a subfamília *Mimosoideae* (NOVEMBRE et al., 2007) que apresenta elevada capacidade de fornecimento de nitrogênio via deposição de folhas (FERREIRA et al., 2007; FREIRE et al., 2010), alto teor de N nas folhas, cerca de 2,4 dag kg<sup>-1</sup> (SOUZA et al., 2007) e alta produção de biomassa (cerca de 7 t ha<sup>-1</sup>) (NÓBREGA 2014).

Nativa da região Nordeste do Brasil, é uma espécie utilizada principalmente para produção de madeira, aproveitada na forma de estacas e mourões para confecção de cercas, e como fonte energética (RIBASKI et al., 2003).

Ao analisar a capacidade simbiótica de sabiá com rizóbios nos solos do Semiárido brasileiro, verifica-se que esta espécie nodula predominantemente com *Burkholderia*, com isolados que de uma maneira geral são de rápido crescimento e que acidificam o meio de cultura (CHEN et al., 2008; REIS JUNIOR et al., 2010; MARTINS et al., 2015b).

### **2.5 Ocorrência, características e diversidade de rizóbios no Semiárido brasileiro**

O sucesso da introdução de leguminosas arbóreas nos sistemas de cultivo depende, em grande parte, de estarem noduladas. Entretanto, pode acontecer que, mesmo na presença de diazotróficas compatíveis e com a formação de nódulos nas plantas, a simbiose não seja eficiente (FAYE et al., 2007). Silva et al. (2017),

estimaram a fixação de nitrogênio em caatinga sob diferentes tempos de regeneração, e verificaram nodulação nas plantas, mas constataram que, em média, apenas 20 a 46% do nitrogênio era proveniente da fixação, com uma contribuição máxima de 18 kg ha<sup>-1</sup>, sugerindo baixa eficiência do processo.

Logo, a avaliação da ocorrência ou não de bactérias eficientes na comunidade nativa da área e a previsão da necessidade de inoculação, configura-se em um importante passo para o estabelecimento de leguminosas arbóreas (SOUZA et al., 2007). Havendo necessidade de inoculação, muitas vezes inocula-se com estirpes obtidas e recomendadas para outras regiões, o que tem resultado com frequência na ausência de ganhos no crescimento vegetativo, nos teores de N na planta e na nodulação das raízes de leguminosas cultivadas em solos do Semiárido brasileiro (MARINHO et al., 2014; SIZENANDO et al., 2016). Esta ausência de resposta à inoculação pode ser resultante da baixa adaptabilidade das estirpes recomendadas às condições edafoclimáticas da região ou incapacidade para colonizar efetivamente as raízes na presença de populações de rizóbios já estabelecidas no solo (FERNANDES; FERNANDES; HUNGRIA, 2003).

A nodulação e/ou a eficiência do processo de fixação biológica de nitrogênio podem ser restringidas por diversas condições relacionadas à planta, ao microssimbionte e às condições de clima e solo que afetam a simbiose. Tanto o crescimento de rizóbios em vida livre nos solos, como sua capacidade de nodular as plantas e fixar nitrogênio, são sensíveis a condições ambientais e podem ser dependentes da qualidade do solo. Diferentes coberturas vegetais ou manejos afetam a diversidade de rizóbios (JESUS, 2004; SANTOS et al., 2017), podendo favorecer, de forma diferenciada, populações mais ou menos eficientes.

Vários trabalhos demonstraram a capacidade de leguminosas arbóreas associarem-se com rizóbios nativos do Semiárido brasileiro (REIS JUNIOR et al., 2010; SILVA et al., 2016; SILVA et al., 2017; MENEZES et al., 2017), contudo, pouco ainda se sabe sobre as características, diversidade e eficiência de seus microssimbiontes. A fim de preencher esta lacuna, nos últimos anos vem crescendo o interesse sobre a diversidade de rizóbios nativos de solos da região, principalmente os capazes de nodular leguminosas da caatinga do gênero *Mimosa* (TEIXEIRA et al., 2010; FREITAS et al. 2014; MARTINS et al., 2015b) e *Erytrina* (MENEZES et al., 2016; MENEZES et al., 2017). Os resultados das pesquisas indicam a presença de uma

comunidade muito diversa com representantes dos gêneros *Bradyrhizobium*, *Paraburkholderia*, *Rhizobium*, (REIS JÚNIOR et al., 2010; MARTINS et al., 2015b; RADL et al., 2014; MENEZES et al., 2017).

Atualmente diversas técnicas baseadas em características fenotípicas e genéticas estão disponíveis para caracterização e avaliação da diversidade rizobiana (FREITAS et al., 2007; FREITAS et al., 2014; MARTINS et al., 2015b; MENEZES et al., 2016). Frequentemente são empregados, inicialmente, métodos fenotípicos, que consistem na caracterização das bactérias por meio de testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos, que permitem uma descrição inicial dos micro-organismos em estudo e possibilitam agrupar os isolados quanto ao fenótipo (SANTOS et al., 2017).

### **2.5.1 Caracterização fenotípica de bactérias que nodulam leguminosas**

A caracterização fenotípica de isolados é realizada em meio YMA sólido com azul de bromotimol em um pH de 6,8 a 7,0 (VINCENT, 1970), e são avaliadas as características de tempo de crescimento, alteração no pH do meio de cultura, diâmetro das colônias, coloração da colônia, produção de muco (exopolissacarídeos extracelulares), dentre outros (MARTINS et al., 1997). Howieson e Dilworth (2016) descrevem as características em meio YMA apresentadas por bactérias dos gêneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Neorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium*, *Ensifer*, *Shinella*, *Burkholderia* e *Cupriavidus*.

Com relação ao tempo de crescimento e alteração do pH em meio de cultura, trabalhos que avaliaram as características de bactérias que nodulam leguminosas cultivadas em solos do Semiárido brasileiro têm demonstrado o predomínio de bactérias de crescimento rápido e que acidificam o meio (SANTOS et al., 2007; MEDEIROS et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2010; MARTINS et al., 2015b; MENEZES et al., 2016).

As colônias de rizóbios podem desenvolver coloração branca, amarela, creme e rósea (HOWIESON; DILWORTH, 2016). Santos et al. (2007) em estudo de caracterização e seleção de populações nativas de rizóbios para feijão-caupi cultivado em solo da região Semiárida de Pernambuco verificaram uma predominância de colônias de cor branca. Menezes et al. (2016) avaliaram a diversidade de rizóbios de

*Eritrina velutina* (Willd) nativos da Caatinga e observaram a maior frequência de colônias cremes e amarelas.

Os trabalhos que avaliaram o diâmetro das colônias têm adotado a estratificação em três grupos: as que apresentam diâmetro inferior a 1 mm, colônias com diâmetro que variam de 1 a 2 mm e os isolados que desenvolvem colônias com diâmetro superior a 2mm (HOWIESON; DILWORTH, 2016). Para isolados de *Arachis hipogea*, *Arachis villosulicarpa*, *Stylosanthes guyanensis*, *Stylosanthes scabra*, *Aeschynomene americana*, *Aeschynomene paniculatae*, *Aeschynomene histrix* cultivados em solos da caatinga, foi verificado por Santos et al. (2007) que as colônias, em sua maioria, tinham diâmetro entre 1 a 2 mm.

A produção de muco vem sendo descrita como um mecanismo envolvido no processo de adaptação e sobrevivência dos rizóbios sob condições edafoclimáticas adversas, tais como, temperatura elevada (SILVA et al., 2007). Realizando a caracterização fenotípica de bactérias isoladas de nódulos de *Erythrina velutina* cultivadas em solos do Semiárido brasileiro, Menezes et al. (2016) verificaram que em 72% dos isolados existia alta capacidade de produção de muco. Resultados semelhantes foram observados por Freitas et al. (2007) com Jacatupé, e por Freitas et al. (2014) com *Mimosa tenuiflora* e *Mimosa paraibana*.

## **2.5.2 Caracterização genotípica de bactérias que nodulam leguminosas**

Os métodos genotípicos de taxonomia, direcionados para moléculas de ácidos nucléicos, tem avançado nos últimos 20 anos e, resultaram no desenvolvimento de importantes ferramentas para estudos de diversidade rizobiana (GIONGO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2012; MARTINS et al., 2015b; RODRIGUES, 2016; MENEZES et al., 2017).

### **2.5.2.1 Fingerprinting genômico**

Dentre as técnicas de caracterização genotípica empregadas para estudos de rizóbios que nodulam leguminosas, merecem destaque aquelas baseadas no *fingerprinting* genômico. Por meio da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é promovida a amplificação de sequências de DNA repetitivas e altamente conservadas presentes em múltiplas cópias nos genomas da maioria das bactérias (FREITAS et al., 2007; LEITE, 2011; MENEZES et al., 2016). Estes elementos repetitivos parecem

estar localizados em diferentes posições intergênicas, em ambas as orientações, sendo o ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus), REP (Repetitive Extragenic Palindromic) e BOX (Box element) as três principais famílias de elementos (HUNGRIA.; CHUEIRE; BANGEL, 2008). Segundo Martins et al. (2015b), as ampliações com os oligonucleotídeos dos elementos REP, ERIC e BOX geram perfis eletroforéticos altamente característicos, permitindo a distinção entre isolados rizobianos.

O BOX-PCR, por gerar impressões digitais mais robustas e produzir um padrão de fragmentos mais complexos, tem sido umas das técnicas moleculares mais utilizadas em estudos de diversidade de rizóbios provenientes do Semiárido brasileiro (FREITAS et al., 2007; FREITAS et al., 2014; MARTINS et al., 2015b; MENEZES et al., 2016).

#### *2.5.2.2 Amplificação de fragmentos de genes simbióticos para seleção de bactérias de nódulos de leguminosas*

Nem todas as bactérias isoladas de nódulos de leguminosas são necessariamente rizóbios (FERNANDES JUNIOR, 2013). Tal fato é evidenciado quando são inoculados em seus hospedeiros de origem e constata-se ausência de nodulação (SILVA et al., 2012; XU et al. 2013; ARAÚJO.; CARVALHO; MOREIRA, 2017). A falta de nódulos pode estar relacionada aos genes de codificação da nitrogenase (*nif*) e da nodulação (*nod*) de alguns rizóbios serem codificados no plasmídeo. Esta característica confere a estes isolados maior instabilidade genética, fazendo com que os genes da nodulação possam ser perdidos com o tempo (HOWIESON; DILWORTH, 2016). A não nodulação do hospedeiro de origem pode também estar ligada ao isolamento de organismos não simbiotes presentes na parte interna e externa dos nódulos radiculares durante o processo de isolamento/purificação, a exemplo de bactérias dos gêneros *Paenibacillus* e *Bacillus*, que são endofíticas de nódulos, mas não nodulíferas (COSTA et al., 2013; JARAMILLO et al., 2013).

Para evitar gastos de recursos e de tempo com a caracterização e avaliação simbiótica de bactérias que não apresentam a capacidade de nodular, é recomendada a confirmação da nodulação em experimentos com substrato estéril, onde a bactéria isolada é reinoculada na planta hospedeira original. Este processo, conhecido como

“autenticação”, geralmente é realizado em condições de casa de vegetação, utilizando vasos com areia e vermiculita (esterilizados) como substrato (VINCENT, 1970).

Os ensaios para a autenticação frequentemente ocupam grande espaço e correm o risco de serem perdidos caso ocorra nodulação no tratamento controle não inoculado. Nestes experimentos, a obtenção do resultado depende do desenvolvimento vegetativo da espécie avaliada, podendo levar muito tempo para algumas culturas. Dessa forma, novas abordagens metodológicas que diminuam a quantidade de isolados a serem avaliados nos estudos de autenticação ou suprimam sua necessidade têm sido demandadas (FERNANDES JUNIOR et al., 2013).

Como alternativa a esses experimentos de autenticação, foram propostas metodologias que indicam a capacidade de FBN por meio da amplificação de fragmentos dos genes *nifH* e *nodC*. Inicialmente pela amplificação individual dos genes *nifH* e *nod C* (MOTHAPO et al., 2013) e, posteriormente, com o sistema duplex em que ocorre a amplificação simultânea dos fragmentos dos dois genes (FERNANDES JUNIOR et al., 2013). O duplex foi utilizado por Silva (2015) e Rodrigues (2016) em isolados de nódulos de *Mimosa tenuiflora*, *Anadenanthera colubrina* e *Erythrina velutina* cultivadas em solos da caatinga, servindo para selecionar bactérias para estudos de eficiência simbiótica.

#### 2.5.2.3 Sequenciamento do gene 16S rRNA

O sequenciamento do gene 16S rRNA é uma das mais importantes ferramentas utilizadas pela rizobiologia para o posicionamento taxonômico e classificação de rizóbios. O gene 16S rRNA é um componente da subunidade 30S dos ribossomos dos procariotos, cujas outras moléculas de RNA componentes são a 23S e a 5S. Como o 16S é o mais conservado dos rRNAs, ele é proposto como um “relógio evolucionário” capaz da reconstrução da árvore da vida (WOESE, 1987). O gene 16S é considerado um bom marcador filogenético por exibir algumas regiões conservadas, as quais são úteis para decifrar as relações filogenéticas entre organismos distantes e regiões mais variáveis, utilizadas para diferenciar organismos estreitamente relacionados (WILLEMS, 2006; RADL et al., 2014).

## 2.6 Eficiência simbiótica de rizóbios no Semiárido brasileiro

Com relação à eficiência simbiótica de rizóbios no Semiárido brasileiro, até o momento os trabalhos têm sido direcionados para o feijão-caupi (MARTINS et al., 2003; MARINHO et al., 2014; MARINHO et al., 2017) e fornecem indicativo de que solos da região semiárida são fontes importantes de micro-organismos com potencial biotecnológico para uso como inoculantes.

A metodologia para obtenção de bactérias eficientes na FBN compreende na coleta de nódulos nas raízes de leguminosas presentes na área de estudo (REIS JUNIOR et al., 2010), de nódulos de plantas-iscas crescendo em vasos com solo da área (SANTOS et al., 2017), ou de nódulos de plantas-iscas inoculadas com diluição do solo crescendo em substrato estéril (JESUS, 2004). Vale ressaltar, que nestes estudos, é interessante realizar a coleta de material em diferentes tipos de solo, como também em diferentes sistemas de uso da terra e/ou diferentes coberturas vegetais, uma vez que a população bacteriana pode variar em tamanho, número de indivíduos e eficiência simbiótica de acordo com o solo, ambiente, uso da terra ou cobertura vegetal (NASCIMENTO, 2013; SANTOS et al., 2017).

Após a obtenção dos nódulos, na sequência é realizado o isolamento do rizóbio em meio YMA, purificação das colônias, seleção das bactérias isoladas em condições controladas (assépticas) e não controladas. A seleção de micro-organismos é uma das etapas mais importantes nesse processo, pois nessa etapa é confirmado se a bactéria isolada é realmente rizóbio, e se é capaz de nodular e fixar nitrogênio. Através da confirmação, identifica-se a eficiência da FBN nas bactérias avaliadas. Para tanto, existem diferentes condições de ensaio, compondo as bases de recomendação de estirpes, que se divide em quatro etapas: 1) seleção em condições controladas em laboratório; 2) seleção em condições esterilizadas em vasos com substrato estéril; 3) seleção em vasos com solo não esterilizado; e 4) seleção em condições de campo. A obtenção de uma coleção de isolados nativos e a pré-seleção de bactérias eficientes geram recursos genéticos para implementação de programas para a recomendação de novas estirpes (FARIA, 2002).

Estudos de diversidade e eficiência e seleção de rizóbios associados a leguminosas arbóreas em solos do Semiárido brasileiro podem revelar possibilidades de exploração para uso em sistemas agroflorestais, recuperação de áreas degradadas e solos depauperados (MENEZES et al., 2017).

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, U. P.; ARAUJO, E. L.; ASFORA, E. D. A. C.; LIMA, A. L. A.; SOUTO, A.; BEZERRA, B. M.; FERRAZ, E. M. N.; FREIRE, E. M. X.; SAMPAIO, E. V. S. B.; LAS, F. M. G.; MOURA, G. J. B.; PEREIRA, G. A.; MELO, J. G.; RAMOS, M. A.; RODAL, M. J. N.; SCHIEL, N.; LYRA, R. M. N.; ALVES, R. R. N.; AZEVEDO JUNIOR, S. M.; TELINO JUNIOR, W. R.; SEVERI, W. Caatinga Revisited: ecology and conservation of an important seasonal dry forest. **Science World Journal**, Kaduna, v. 1, n. 1, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1100/2012/205182>>.
- ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; MORAES, G.; LEONARDO, J.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, Stuttgart, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>>.
- ALVES, J. J. A.; ARAÚJO, M. A.; NASCIMENTO, S. S. Degradação da Caatinga: uma investigação ecogeográfica. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 22, n. 3, p.126-135, 2009.
- ANDREWS, M.; ANDREWS, M. E. Specificity in legume-rhizobia symbioses. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 18, n. 4, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/ijms18040705>>.
- ANDREWS, M.; JAMES, E. K.; SPRENT, J. I.; BODDEY, R. M.; GROSS, E.; REIS JUNIOR, F. B. Nitrogen fixation in legumes and actinorhizal plants in natural ecosystems: values obtained using <sup>15</sup>N natural abundance. **Plant Ecology and Diversity**, Edimburgo, v. 4, n. 2, p. 131-144, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/17550874.2011.644343>>.
- ARAÚJO FILHO, J. A. Caatinga: agroecologia versus desertificação. **Ciência hoje**, Brasília, v. 30, n. 180, p. 44-45, 2002.
- ARAÚJO, K. S.; CARVALHO, F. D.; MOREIRA, F. M. S. *Bukholderia* strains promote *Mimosa* spp. growth but not *Macroptilium atropurpureum*. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 48, n. 1, p. 41-48, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.5935/1806-6690.20170005>>.
- BARRETO, M. L. J.; LIMA, D. M.; OLIVEIRA, J. P. F.; RANGEL, A. H. N. Utilização da leucena (*Leucaena leucocephala*) na alimentação ruminantes. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v. 5, n. 1, p. 7-16, 2010.
- BEIJERINCK, M. W. Cultur des *Bacillus radicola* aus den Knollchen. **Botanish Zeitung**. Berlim, v. 46, n. 1, p. 740-750, 1888.
- BRASILEIRO, R. S. Alternativas de desenvolvimento sustentável no semiárido nordestino: da degradação à conservação. **Scientia Plena**, Aracaju, v. 5, n. 5, p. 1-12, 2009.

CANFIELD, D. E.; GLAZER, A. N.; FALKOWSKI, P. G. The evolution and future of earth's nitrogen cycle. **Science**, Washington, v. 330, n. 6001, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1126/science.1186120>>.

CHAER, G. M., RESENDE, A. S., CAMPELLO, E. F. C., FARIA, S. M.; BODDEY, R. M. Nitrogen-fixing legume tree species for the reclamation of severely degraded lands in Brazil. **Tree Physiology**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 139-149, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/treephys/tpq116>>.

CHEN, W. M.; FARIA, S. M.; CHOU, J. H.; JAMES, E. K.; ELLIOTT, G. N.; SPRENT, J. I.; VANDAMME, P. *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpinifolia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Londres, v. 58, n. 1, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.65816-0>>.

CHEN, W. X.; YAN, G. H.; LI, J. L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Londres, v. 38, n. 1, p. 392-397, 1988. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/00207713-38-4-392>>.

CHOTCHUTIMA, S.; KANGVANSACHOL, K.; TUDSRI, S.; SRIPICHITT, P. Effect of Spacing on Growth, Biomass Yield and Quality of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.) for Renewable Energy in Thailand. **Journal of Sustainable Bioenergy Systems**, Washington, v. 3, n. 1, p. 48-56, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4236/jsbs.2013.31006>>.

COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F.; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L. D. V. M.; MOREIRA, F. M. S. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 9, p. 1275-1284, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2013000900012>>.

COSTA, J. N. M. N.; DURIGAN, G. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (*Fabaceae*): invasive or ruderal? **Revista Árvore**, Viçosa, v. 34, n. 5, p. 825-833, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622010000500008>>.

DREYFUS, B.; GARCIA, J. L.; GILLIS M. Characterization of *Azorhizobium* isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Londres, v. 38, n. 1, p. 89-98, 1988. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1099 / 00207713-38-1-89>>.

DRUMOND, M. A.; MORGADO, L. B.; RIBASKI, J. ALBUQUERQUE, S.; CARVALHO FILHO, O. M. Contribuição da Embrapa Semi-árido para o desenvolvimento dos sistemas agroflorestais no Semi-árido brasileiro. **Agrossilvicultura**, Viçosa, v. 1, n. 2, p. 145-153, 2004.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Nutrição mineral de plantas, princípios e perspectivas**. 2. ed. Planta, Londrina, 2006. 403p.

FAYE, A.; SALL, S.; CHOTTE, J. L.; LESUEUR, D. Soil bio-functioning under *Acacia nilotica* var. tomentosa protected forest along the Senegal River. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Ithaca, v. 79, n. 1, p. 35-44, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10705-007-9033-7>>.

FARIA, M. P. **Obtenção de estirpes eficientes de rizóbios eficientes na fixação de nitrogênio para espécies florestais**. Seropédica, Embrapa Agrobiologia. 2002. 16p. (Embrapa CNPAB. Documentos, 134).

FERNADES JÚNIOR, P. I.; MORGANTE, C. V.; GAVA, C. A. T.; SANTOS, C. A. F.; CUNHA, J. B. A.; MARTINS, L. M. V. **Duplex PCR para a amplificação simultânea de fragmentos dos genes nifH e nodC em bactérias isoladas de nódulos de leguminosas**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2013. 6p. (Embrapa Semiárido, Comunicado Técnico).

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 7, p. 835-842, 2003. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2003000700007>>.

FERREIRA, R. L. C.; LIRA JUNIOR, M. A.; ROCHA, M. D., SANTOS, M. D.; LIRA, M. D. A.; BARRETO, L. P. Deposição e acúmulo de matéria seca e nutrientes em serapilheira em um bosque de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 1, p. 7-12, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622007000100002>>.

FRANK B. Über der gegenwärtige Stand unserer Kenntnisse der Assimilation elementaren Stickstoffs durch die Pflanze. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**. v. 7, n. 1, p. 234–247, 1889.

FREIRE, J. L.; DUBEUX JÚNIOR, J. C. B.; LIRA, M. A., FERREIRA, R. L. C., SANTOS, M. V. F., FREITAS, E. V. Decomposição de serrapilheira em bosque de sabiá na Zona da Mata de Pernambuco. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 8, p.1659-16652, 010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982010000800006>>.

FREITAS, A. D. S.; BORGES, W. L.; ANDRADE, M. M. M; SAMPAIO, E. V. S. B.; SANTOS, C.E.R.S; PASSOS, S. R.; XAVIER, G. R.; MULATO, B. M.; LYRA, M.C.C.P. Characteristics of nodule bacteria from *Mimosa* spp grown in soils of the Brazilian semiarid region. **African Journal of Microbiology Research**, Abuja, v. 8, n. 8, p. 788-796, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.5897/AJMR2013.6518>>

FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SANTOS, C. E. R. S.; SILVA, A. F.; CARVALHO, R. Fixação biológica de nitrogênio no Semiárido Brasileiro. **Revista Brasileira de Geografia e Física**, Recife, v.8, p. 585-597, 2015.

FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, C. L.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; LYRA, M. C. C. P. Caracterização de rizóbios isolados de Jacatupé cultivado em solo salino do estado de Pernambuco, Brasil. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 3, p. 497-504, 2007.

FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SANTOS, C. E. R. S.; FERNANDES, A. R. Biological nitrogen fixation in legume trees of the Brazilian caatinga. **Journal of Arid Environments**, Exeter, v. 74, n. 3, p. 344-349, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaridenv.2009.09.018>>.

GALLOWAY, J. N.; TOWNSEND, A. R.; ERISMAN, J. W.; BEKUNDA, M.; CAI, Z.; FRENEY, J. R.; SUTTON, M. A. Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. **Science**, Washington, v. 320, n. 5878, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1126/science.1136674>>.

GIONGO, A.; AMBROSINI, A.; VARGAS, L. K.; FREIRE, J. R. J.; ZANETTINI, M. H.; PASSAGLIA, L. M. P. (2008). Evaluation of genetic diversity of bradyrhizobia strains nodulating soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] isolated from South Brazilian fields. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 38, n. 3, p. 261-269, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.10.016>>.

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Legumes: importance and constraints to greater use. **Plant Physiology**, Washington, v.131, n.3, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1104/pp.017004>>.

HERRIDGE, D. F.; PEOPLES, M. B.; BODDEY, R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and Soil**, Amsterdam, v. 311, n. 2, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11104-008-9668-3>>.

HILY-BLANT, P.; MARET, S.; BACMANN, A.; BOTTINELLI, S.; PARISE, B.; CAUX, E.; CECCARELLI, C. Nitrogen hydrides in the cold envelope of IRAS 16293-2422. **Astronomy & Astrophysics**, Les Ulis, v. 16, n. 1, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1051/0004-6361/201015253>>.

HOWIESON, J. G., DILWORTH, M. J. **Working with rhizobia**. 1 ed. Camberra: ACIAR, 2016, 314 p.

HUNGRIA, M., MENDES, I. C.; MERCANTE, F. M. **A fixação biológica do nitrogênio como tecnologia de baixa emissão de carbono para as culturas do feijoeiro e da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2013. 24p. (Embrapa Soja, Documentos, 337).

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E. V. **Caracterização genética de rizóbios e outras bactérias e promotoras do crescimento de plantas por BOX – PCR**. Londrina, Embrapa Soja, 2008. 12p. (Embrapa Soja. Comunicado Técnico, 79).

ISAAC, M. E.; KIMARO, A. A. Diagnosis of nutrient imbalances with vector analysis in agroforestry systems. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 40, n. 3, p. 860-865, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2134/jeq2010.0144>>.

JARAMILLO, P. M. D.; GUIMARÃES, A. A.; FLORENTINO, L. A.; SILVA, K. B.; NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S. Symbiotic nitrogen-fixing bacterial populations trapped from soils under agroforestry systems in the Western Amazon. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 70, n. 6, p.397-404, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162013000600004>>.

JARVIS, B. D. W.; BERKUM, P. V.; CHEN, W. X.; NOUR, S. M.; FERNANDEZ, M. P.; CLEYET, M. J. C.; GILLIS, M. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Londres, v. 47, n. 3, p. 895-898, 1997. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1099/00207713-47-3-895>>.

JESUS, E. C.; MOREIRA, F. M. S.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. I. D.; OLIVEIRA, M. S. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 8, p. 769-775, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2005000800006>>.

JORDAN, D. C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**. Londres, v. 32, n. 1, p. 136–139, 1982. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1099/00207713-32-1-136>>.

KOOHAFKAN, P.; STEWART, B. A. **Water and cereals**. The Food and Agriculture Organization of the United Nations and Earthscan, Rome, 2012. 133p.

KURPPA, M.; LEBLANC, H. A.; NYGREN, P. Detection of nitrogen transfer from N<sub>2</sub>-fixing shade trees to cacao saplings in <sup>15</sup>N labelled soil: ecological and experimental considerations. **Agroforestry Systems**, Amsterdam, v. 80, n. 2, p. 223-239, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10457-010-9327-6>>.

LAJUDIE, F.; LAURENT, E. F.; WILEMS, A.; TORCK, U.; COOPMAN, R.; COLLINS, M. D.; KERSTERS, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **International Journal of Systematic Bacteriology**. Londres. v. 48, n. 1, p. 1277-1290, 1998. Disponível em < <https://doi.org/10.1099/00207713-48-4-1277>>.

LEITE, J. **Caracterização de bactérias nativas de solos do Semiárido brasileiro isoladas de nódulos de feijão-caupi**. 2011. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Seropédica, 2011.

LIMA JÚNIOR, C.; ACCIOLY, L. J. O.; GIONGO, V.; LIMA, R. L. F. A.; SAMPAIO, E. V. S. B.; MENEZES, R. S. C. Estimativa de biomassa lenhosa da caatinga com uso de equações alométricas e índice de vegetação. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 42, n. 102, p. 289-298, 2014.

LIRA JUNIOR, M. A.; NASCIMENTO, L. R.; FRACETTO, G. G. M. Legume-rhizobia signal exchange: promiscuity and environmental effects. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne v. 6. n. 945, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00945>>

LPWG. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny The Legume Phylogeny Wor A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **Taxon**, Bratislava, v. 66, n. 1, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.12705/661.3>>.

LPWG. Legume phylogeny and classification in the 21st century: progress, prospects and lessons for other species-rich clades. **Taxon**, Bratislava, v. 62, n. 2, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.12705/622.8>>.

MAIA, S. M. F.; XAVIER, F. A. D. S.; OLIVEIRA, T. S. D.; MENDONÇA, E. D. S.; ARAÚJO FILHO, J. A. Frações de nitrogênio em Luvissole sob sistemas agroflorestais e convencional no semi-árido cearense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, n. 1, p. 381-392, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832008000100036>>.

MARINHO, R. D. C. N.; FERREIRA, L. D. V. M.; SILVA, A. F. D.; MARTINS, L. M. V.; NÓBREGA, R. S. A.; FERNANDES JÚNIOR, P. I. Symbiotic and agronomic efficiency of new cowpea rhizobia from Brazilian Semi-Arid. **Bragantia**, Campinas, v. 76; n. 2; p. 273-281, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1678-4499.003>>.

MARINHO, R. D. C. N.; NÓBREGA, R. S. A.; ZILLI, J. É.; XAVIER, G. R.; SANTOS, C. A. F.; AIDAR, S. D. T.; FERNANDES JÚNIOR, P. I. Field performance of new cowpea cultivars inoculated with efficient nitrogen-fixing rhizobial strains in the Brazilian Semiarid. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 49, n. 5, p. 395-402, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2014000500009>>.

MARTINS, J. C. R.; FREITAS, A. D. S. D.; MENEZES, R. S. C.; SAMPAIO, E. V. D. S. B. Nitrogen symbiotically fixed by cowpea and gliricidia in traditional and agroforestry systems under semiarid conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 50, n. 2, p.178-184, 2015 a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2015000200010>>.

MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; RANGEL, F. W.; RIBEIRO, J. R. A.; NEVES, M. C. P., MORGADO; L. B.; RUMJANEK, N. G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 38, n. 6, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00374-003-0668-4>>.

MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. **Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de "rizóbio"**. Seropédica, EMBRAPA: CNPAB, 1997. 14p. (Embrapa-CNPAB. Comunicado Técnico, 19).

MARTINS, P. G. S.; LIRA JUNIOR, M. A.; FRACETTO, G. G. M.; SILVA, M. L. R. B.; VINCENTIN, R. P. *Mimosa caesalpinifolia* rhizobial isolates from different origins of the Brazilian Northeast. **Archives of Microbiology**, Amsterdam, v. 197, n. 3, p. 459-469, 2015 b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00203-014-1078-8>>.

MEDEIROS, E. V.; MARTINS, C. M.; LIMA, J. A. M.; FERNANDES, Y. T. D.; OLIVEIRA, V. R.; BORGES, W. L. Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do Estado do Rio Grande do Norte solos do Estado do Rio Grande do Norte. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 3. 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v31i3.793>>.

MENEZES, K. A. S.; ESCOBAR, I. E. C.; FRAIZ, A. C. R.; MARTINS, L. M. V.; FERNANDES JÚNIOR, P. I. Genetic Variability and Symbiotic Efficiency of *Erythrina velutina* Willd. root Nodule Bacteria from the Semi-Arid Region in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 41, n. 1, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/18069657rbc20160302>>.

MENEZES, K. A. S.; NUNES, G. F. O.; SAMPAIO, A. A.; SILVA, A. F.; SOUZA, L. S. B.; GAVA, C. A. T.; MARTINS, L. M. V.; FERNANDES JÚNIOR, P. I. Diversity of new root nodule bacteria from *Erythrina velutina* Willd., a native legume from the Caatinga dry forest (Northeastern Brazil). **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 39, n. 2, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.19084/RCA15050>>.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K. NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: Diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, Teresina, v. 1, n. 2, p. 74-99, 2010.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729p.

MOTHAPO, N. V.; GROSSMAN, J. M.; MAUL, J. E.; SHI, W.; ISLEIB, T. Genetic diversity of resident soil rhizobia isolated from nodules of distinct hairy vetch (*Vicia villosa* Roth) genotypes. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 64, n. 2, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.12.010>>.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN, C. M. Nodulation of legumes by members of the  $\beta$ -subclass of proteobacteria. **Nature**, Londres, v. 411, n. 6850, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/doi:10.1038/35082070>>.

MUNROE, J. W.; ISAAC, M. E. N<sub>2</sub>-fixing trees and the transfer of fixed-N for sustainable agroforestry: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, Amsterdam, v. 34, n. 2, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s13593-013-0190-5>>.

NASCIMENTO, L. R. V. **Diversidade de isolados bacterianos e sua influência na FBN em diferentes coberturas vegetais**. 2013. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2013.

NÓBREGA, C. C. D. **Crescimento, produção de biomassa e desrama artificial de espécies florestais em resposta ao método de cultivo em Macaíba, RN.** 2014. 35f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2014.

NOVEMBRE, A. D. L. C.; FARIA, T. C.; PINTO, D. H. V.; CHAMMA, H. M. C. P. Teste de germinação de sementes de sansão-do-campo (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. – *Fabaceae - Mimosoideae*). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n. 3, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222007000300006>>.

OLIVEIRA, A. M. R.; BANGEL, E. V.; HUNGRIA, M.; SILVEIRA, J. R. P.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B. Characterization of the spacer region 16-23S rDNA for differentiation of strains of rhizobia used in the production of commercial inoculants in Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n.8, p. 1423-1429, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782012000800015>>.

PENICHE, I. N. G.; GONZÁLEZ, Z. U. L.; PÉREZ, C. F. A.; KU, J. C. V.; AYALA, A. J. B.; SÁNCHEZ, F. J. S. Milk production and reproduction of dual-purpose cows with a restricted concentrate allowance and access to an association of *Leucaena leucocephala* and *Cynodon nlemfuensis*. **Journal of Applied Animal Research**, Washington, v. 42, n. 3, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/09712119.2013.875902>>.

PENUELAS, J.; POULTER, B.; SARDANS, J.; CIAIS, P.; VAN DER VELDE, M.; BOPP, L.; NARDIN, E.; VICCA, S.; OBERSTEINER, M.; JANSSENS, I. A. Human-induced nitrogen–phosphorus imbalances alter natural and managed ecosystems across the globe. **Nature communications**, London, v. 4, n. 2934, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms3934>>.

RADDAD, EI A.Y.; SALIH, A.A.; EL FADL, M.A.; KAARAKKA, V.; LUUKKANEN, O. Symbiotic nitrogen fixation in eight *Acacia senegal* provenances in dryland clays of the Blue Nile Sudan estimated by the <sup>15</sup>N natural abundance method. **Plant and Soil**, Amsterdam, v. 275, n. 1, p. 275-261, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11104-005-2152-4>>.

RADL, V.; SIMÕES, J. L. A.; LEITE, J.; PASSOS, S. R.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; ZILLI, J. E. *Microvirga vignae* sp. nov., a root nodule symbiotic bacterium isolated from cowpea grown in semi-arid Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Londres, v. 64, n. 3, p. 725–730, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.053082-0>>.

REIS JUNIOR, F. B.; SIMON, M. F.; GROSS, E.; BODDEY, R. M.; ELLIOTT, G. N.; NETO, N. E.; LOUREIRO, F. M.; QUEIROZ, L. P.; SCOTTI, M. R.; CHEN, W. M.; NORÉN, A.; RUBIO, M. C.; FARIA, S. M., BONTEMPS, C.; GOI, S. R.; YOUNG, J. P. W.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. **New Phytologist**, Lancaster, v. 186, n. 4, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03267.x>>.

RIBASKI J, LIMA, P. C. F.; OLIVEIRA, V. R.; DRUMOUND, M. A. **Sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia*) árvore de múltiplo uso no Brasil**. Colombo: Embrapa Florestas. 2003. 4 p. (Embrapa Florestas. Comunicado Técnico, 104).

RODRIGUES, D. R. **Diversidade e eficiência em promoção do crescimento vegetal de bactérias de solos da Caatinga pernambucana oriundas de nódulos de leguminosas arbóreas nativas**. 2016. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.

SAFRONOVA, V. I.; KUZNETSOVA, I. G.; SAZANOVA, A. L.; BELIMOV, A. A.; ANDRONOV, E. E.; CHIRAK, E. R.; OSLEDKIN, Y.S.; ONISHCHUK, O. P.; OKSANA, N.; KURCHAK, N.; SHAPOSHNIKOV, A. I.; WILLEMS, A. *Microvirga ossetica* sp. nov., a species of rhizobia isolated from root nodules of the legume species *Vicia alpestris* Steven. **International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology**, Londres, v. 67, n. 1, p. 94-100, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.001577>>.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, Oxford, v. 111, n. 5, p. 743-767, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/aob/mct048>>.

SANTOS, C. E. R. S.; SILVA, V. S. G.; FREITAS, A. D. S.; SILVA, A. F.; BEZERRA, R. V.; LYRA, M. C. C. P.; FERREIRA, J. S. Prospecting of efficient rhizobia for peanut inoculation in a Planosol under different vegetation covers. **African Journal of Microbiology Research**, Abuja, v. 11, n. 4, 123-131, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5897/AJMR2016.8355>>.

SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S. F.; VIEIRA, I. M. M. B. V. COLAÇO, W. Fixação simbiótica do N<sub>2</sub> em leguminosas tropicais. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N.; SANTOS, C. E. R. S. **Microorganismos e agrobiodiversidade**. Guaíba: Agrolivros, 2008. cap. 1, p. 17-41.

SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C. P.; RUNJANEK, N. G.; BORGES, W. L.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 2, n. 4, p. 249-256, 2007.

SANTOS, E. M.; ALMEIDA, G. V. L.; OLIVEIRA, L. L. S. S.; MENESES, E. R. A.; GUEDES, M. V.; SACRAMENTO, A. C.; BEZERRA, G. S. C. L.; BRITO, J. V. A.; SANTOS, J. C. O Parque Estadual Mata da Pimenteira - Primeira Unidade de Conservação Estadual na Caatinga de Pernambuco. In: SANTOS, E. M.; MELO JÚNIOR, M.; CAVALCANTI, J. S. S.; ALMEIDA, G. V. L. **Parque estadual mata da pimenteira: riqueza natural e conservação da caatinga**. Recife: Editora da UFRPE, 2013. 268p.

SCHUMANN, U.; HUNTRIESER, H. The global lightning-induced nitrogen oxides source. **Atmospheric Chemistry and Physics**, Göttingen, v. 7, n. 14, p. 3823–3907 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5194/acp-7-3823-2007>>.

SHIRAISHI A., MATSUSHITA N., HOUGETSU T. Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. **Systematic and Applied Microbiology**. Amsterdam, v. 33, n. 5, p. 269-274, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2010.04.005>>.

SHRIDHAR, B. S. Review: nitrogen fixing microorganisms. **International Journal of Microbiological Research**, New York, v. 3, n.1, p. 46-52, 2012.

SILESHI, G. W.; MAFONGOYA, P. L.; AKINNIFESI, F. K.; PHIRI, E.; CHIRWA P.; BEEDY T.; MAKUMBA W.; NYAMADZAWO, G.; NJOLOMA, J.; WUTA, M.; NYAMUGAFATA P., JIRI, O. Agroforestry: Fertilizer Trees. **Encyclopedia of Agriculture and Food Systems**, Lilongwe, v. 1, n. 1, p. 15-21, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00022-X>>.

SILVA, A. F. **Fixação biológica de nitrogênio em leguminosas nativas de áreas com diferentes tempos de regeneração da caatinga**. 2015. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2015.

SILVA, A. F.; FREITAS, A. D. S.; COSTA, T. L.; FERNANDES JUNIOR, P. I.; MARTINS, L. M. V.; SANTOS, C. E. R. S.; MENEZES, K. A. S.; SAMPAIO, E. V. S. B. Biological nitrogen fixation in tropical dry forests with different legume diversity and abundance. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Ithaca, v. 117, n. 3, p. 321-334, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10705-017-9834-1>>.

SILVA, K.; CASSETARI, A. S.; LIMA, A. S., BRANDT, E.; PINNOCK, E.; VANDAMME, P.; MOREIRA, F. M. S. Diazotrophic *Burkholderia* species isolated from the Amazon region exhibit phenotypical, functional and genetic diversity. **Systematic and applied microbiology**, v. 35, n. 4, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.04.001>>.

SILVA, V. S. G.; SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S.; STAMFORD, N. P.; SILVA, A. F.; LYRA, M.C.C.P. Systems of land use affecting nodulation and growth of tree legumes in different soils of the Brazilian semiarid area. **African Journal of Agricultural Research**. Abuja, v. 11, n. 40, p. 3966-3974, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5897/AJAR2016.11603>>.

SILVA, V. N.; SILVA, L. E. S. F.; FIGUEIREDO, M. V. B.; CARVALHO, F. G.; SILVA, M. L. R. B.; SILVA, A. J. N. Caracterização e seleção de populações nativas de rizóbios de solo da região semiárida de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiania, v. 37, n. 1, p. 16-21, 2007.

SIZENANDO, C. I. T.; RAMOS, J. P. C.; FERNANDES JUNIOR, P. I.; LIMA, L. M.; FREIRE, R. M. M.; SANTOS, R. C. Agronomic efficiency of *Bradyrhizobium* in peanut under different environments in Brazilian Northeast. **African Journal of Agricultural Research**. Abuja, v. 11, n. 37, p. 3482-3487, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5897/AJAR2016.1129>>.

SOUZA, L. A. G.; NETO, E. B.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P. Desenvolvimento e nodulação natural de leguminosas arbóreas em solos de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 2, p. 207-217, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2007000200009>>.

SPRENT, J. I.; ARDLEY, J.; JAMES, E. K. Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. **New Phytologist**, Lancaster, v. 215, n. 1, p. 40-56, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/nph.14474>>.

STAHL, L.; NYBERG, G.; HÖGBERG, P.; BURESH, R. J. Effects of planted tree fallows on soil nitrogen dynamics, above-ground and root biomass, N<sub>2</sub>-fixation and subsequent maize crop productivity in Kenya. **Plant and Soil**, Amsterdam, v. 243, n. 1, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1023/A:1019937408919>>.

TEIXEIRA, F. C. P.; BORGES, W. L.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Characterization of indigenous rhizobia from Caatinga. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 201-208, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822010000100029>>.

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

WALKER, R.; AGAPAKIS, C. M.; WATKIN, E.; HIRSCH, A. M. Symbiotic nitrogen fixation in legumes: perspectives on the diversity and evolution of nodulation by *Rhizobium* and *Burkholderia* Species. In: BRUIJIN, F. J. **Biological Nitrogen Fixation**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2015. cap. 69, p. 913-925.

WANG, E. T.; ROMERO, J. M.; ROMERO, E. M. Genetic diversity of rhizobia from *Leucaena leucocephala* nodules in Mexican soils. **Molecular Ecology**, Austin, v. 8, n. 5, 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-294X.1999.00608.x>>.

WEIR, B. S. **The current taxonomy of rhizobia**, 2016. Disponível em: <<https://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>. Acesso em: 04 de julho, 2017.

WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: an overview. **Plant and soil**, Amsterdam, v. 287, n.1, p. 3-14, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11104-006-9058-7>>.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 51. n. 2, p. 221-271, 1987.

XU, K. W.; PENTTINEM, P.; CHEN, Y. X.; CHEN, Q.; ZHANG, X. Symbiotic efficiency and phylogeny of the rhizobia isolated from *Leucaena leucocephala* in arid-hot river valley in Panxi, Sichuan, China. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 97, n. 2, p. 783-793, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/s00253-012-4246-2>>.



## **CAPÍTULO 01**

### **3 SISTEMAS DE USO DA TERRA AFETAM A NODULAÇÃO E O CRESCIMENTO DE LEGUMINOSAS ARBÓREAS EM SOLOS DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO**

## Sistemas de uso da terra afetam a nodulação e o crescimento de leguminosas arbóreas em solos do Semiárido brasileiro

### Resumo

O estímulo ao plantio de leguminosas arbóreas em áreas degradadas, deve ser precedido por avaliações da capacidade nodulífera das leguminosas por populações rizobianas naturalmente estabelecidas, pois essas informações irão contribuir para definição de quais espécies serão plantadas para a recuperação de áreas alteradas. Deste modo, objetivou-se com este estudo, avaliar o crescimento e a nodulação natural de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.), e leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit) cultivadas em vasos com solos (Argissolo e Luvisolo) do Semiárido brasileiro, coletados em diferentes sistemas de uso da terra: vegetação nativa (caatinga) e áreas com diferentes sistemas agrícolas (monocultivo e consórcio com várias espécies). Foram conduzidos dois experimentos independentes, um para cada leguminosa, em delineamento de blocos ao acaso, com 6 tratamentos (usos da terra) e 4 repetições. Aos 30, 60 e 90 dias após o semeio foram contados o número de folíolos e medidos a altura e o diâmetro do colo das plantas. A colheita foi realizada aos 90 dias para as duas espécies e, na sequência, foram determinados o número de nódulos, biomassa seca da parte aérea, raízes e nódulos, e o acúmulo de nitrogênio da parte aérea. Os resultados evidenciam que nos sistemas de uso da terra estudados existem populações de bactérias capazes de nodular sabiá e leucena. Foram observadas diferenças significativas no crescimento (altura, número de folíolos e diâmetro do colo) de *M. caesalpinifolia*, apresentando menor desenvolvimento as plantas cultivadas no Luvisolo sob monocultivo. O crescimento, nodulação e acúmulo de nitrogênio das leguminosas arbóreas foram favorecidos no Argissolo. A leucena apresentou maior potencial de fixação de N<sub>2</sub> e eficiência da nodulação com populações de rizóbios naturalmente estabelecidas nas amostras de solos dos sistemas de uso avaliados.

Palavras-chave: Agricultura sustentável. Fixação biológica de nitrogênio. Rizóbios nativos. Simbiose.

## Systems of land use affecting nodulation and growth of tree legumes in different soils of the Brazilian semiarid region

### Abstract

The growth of tree legumes in degraded areas must be preceded by assessments of nodulation ability of naturally established rhizobia populations since such information contribute to define the species which can be planted for recovering disturbed areas. The aim of this study was to evaluate the growth and natural nodulation of *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. and *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. in soils of the Brazilian semiarid under different systems of land use native vegetation (caatinga) and areas with different agricultural systems (a monocrop system and an intercropping with various species). For each species was realized a greenhouse experiment in randomized block design, using soils of different types (Luvisol and Ultisol), with 4 replicates. The results show significant differences in the evaluated growth characteristics (height, leaflet number and shoot diameter) of *M. caesalpiniiifolia*, that have been displayed lower plant growth when grown in the Luvisol under conventional system. Plant growth, nodulation and total N accumulation in both seedling tree legumes were increased in Ultisol submitted to the different systems. Leucena tree legume showed higher potential of biological nitrogen fixation and nodulation effectiveness promoted by indigenous rhizobia.

Keywords: Biological nitrogen fixation. Indigenous rhizobia. Symbioses. Sustainable agriculture.

### 3.1 Introdução

Nas regiões tropicais, os sistemas de produção agrícola predominantes são baseados na conversão de áreas nativas em áreas de cultivo, com corte e queima da vegetação nativa, exploração e subsequente abandono (pousio), antes de novo ciclo de derrubada e queima. Na região semiárida do Brasil, a vegetação nativa (Caatinga), que abrangeria uma área estimada entre 6 e  $9 \times 10^5$  km<sup>2</sup> (SAMPAIO, 1995), também faz parte do ciclo de agricultura itinerante, além de ser a principal forma de pasto nativo da extensa atividade pecuária da região. Parte destes usos, ao longo dos séculos, deixou a vegetação nativa degradada, com vários locais em processo de desertificação. Atualmente restam menos de 50% da vegetação original (MENEZES et al., 2012).

O uso de insumos biológicos, como o plantio de leguminosas, consiste em umas das principais práticas que podem ser empregadas para recuperação dessas áreas degradadas (PEREIRA; RODRIGUES, 2012), pela sua biomassa que protege o solo contra a erosão (GARBA; DALHATU, 2015), pelo fornecimento de matéria orgânica que melhora a fertilidade do solo (WU et al., 2016), e pela capacidade de estabelecer associações simbióticas com bactérias que fixam nitrogênio (MARTINS et al., 2015a). O sucesso da inserção de determinada espécie depende, em grande parte, de estarem noduladas com rizóbios eficientes. Assim, o estímulo de uso de leguminosas arbóreas deve ser precedido por avaliações do crescimento e da capacidade nodulífera em associações com as populações rizobianas naturalmente estabelecidas (SILVA et al., 2009). Essas informações irão contribuir para definição de quais espécies serão plantadas para a recuperação de áreas alteradas (SOUZA et al., 2007)

A nodulação e/ou a eficiência do processo de fixação biológica de nitrogênio podem ser restringidas por diversas condições relacionadas à planta, ao microsimbionte. e às condições de clima e solo que afetam a simbiose. Logicamente, na ausência de populações nativas de bactérias capazes de nodular determinada espécie vegetal, a simbiose não se estabelece. Geralmente populações de rizóbios capazes de nodular leguminosas são abundantes em solos de regiões de onde as espécies são nativas (BALA et al., 2003). Entretanto, pode ocorrer que, mesmo na presença de populações de rizóbios compatíveis, a simbiose não seja eficiente (FAYE

et al., 2007). Tanto o crescimento de rizóbios em vida livre nos solos, como sua capacidade de nodular as plantas e fixar nitrogênio, são sensíveis as condições ambientais e podem ser dependentes da qualidade do solo. Diferentes coberturas vegetais ou manejos podem afetar a diversidade de rizóbios (JESUS et al., 2005; SANTOS et al., 2017), podendo favorecer, de forma diferenciada, populações mais ou menos eficientes.

Leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit) e sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) são exemplos de leguminosas com potencial de uso na recuperação de áreas degradadas em regiões semiáridas. O Sabiá é uma árvore de pequeno porte nativa do Semiárido brasileiro, com grande importância socioeconômica na região, tendo uso destacado na produção de mourões, estacas, lenhas e carvão, sendo utilizada ainda na alimentação animal (MOURA et al., 2006; RIBEIRO et al., 2008; COSTA FILHO et al., 2013). Originária da América Central, a leucena é uma leguminosa perene, arbórea (PENICHE et al., 2014) que, devido às suas múltiplas formas de utilização: forragem, produção de madeira, carvão vegetal, melhoramento do solo, sombreamento, quebra-vento e cerca viva, se encontra distribuída por toda região tropical (BARRETO et al., 2010).

Sob as hipóteses de que solos do Semiárido brasileiro abrigam populações rizobianas capazes de estabelecerem simbiose com sabiá e leucena e que o potencial simbiótico é variável com o sistema de uso da terra, objetivou-se com este estudo, avaliar o crescimento e a nodulação natural de sabiá (*M. caesalpinifolia*) e leucena (*L. leucocephala*) em solos do Semiárido brasileiro que originalmente eram cobertos por caatinga e atualmente encontram-se sob diferentes sistemas de uso da terra.

### 3.2 Material e métodos

Amostras de solos da camada superficial (0-20 cm) foram coletadas em áreas sob diferentes sistemas de uso da terra em dois municípios, com diferentes condições climáticas e classes de solo (Tabela 1). Belo Jardim na Mesorregião do Agreste e Serra Talhada na Mesorregião do Sertão. Em cada município, áreas com vegetação nativa (caatinga) e áreas com diferentes sistemas agrícolas (monocultivo e consórcio com várias espécies) foram selecionados.

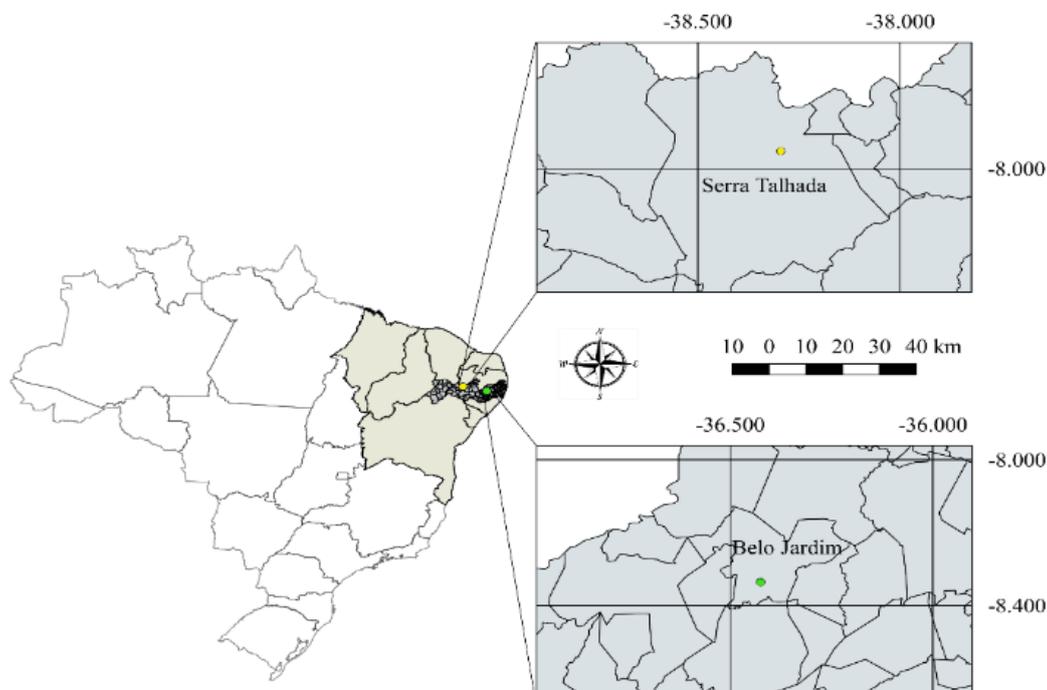
**Tabela 1.** Características gerais dos municípios de Belo Jardim na mesorregião do Agreste e Serra Talhada na mesorregião do Sertão, Semiárido do estado de Pernambuco, Brasil

Características	Municípios	
	Belo Jardim	Serra Talhada
Coordenadas	08° 20' 08" S	07° 59' 31" S
	36° 25' 27" W	38° 17' 54" W
Altitude (m)	608	429
Precipitação média anual (mm)	660	716
Meses com deficiência hídrica	4-5	6-7
Temperatura média (°C)	24	24
Classe de solo	Argissolo (EMBRAPA, 2013)	Luvisolo (EMBRAPA, 2013)

Em Belo Jardim os usos da terra utilizados foram: 1) caatinga de agreste (floresta subúmida decídua); 2) monocultivo de banana e 3) consórcio de gramíneas e leguminosas (sorgo, feijão-caupi, *Crotalaria juncea* e feijão de porco). Em Serra Talhada os usos da terra selecionados foram: 1) caatinga de sertão (floresta semiárida decídua), 2) monocultivo de feijão-caupi, 3) agrofloresta de leguminosas e árvores frutíferas (*Crotalaria juncea*, cajueiro). Em cada município, os sistemas de uso da terra foram escolhidos em locais adjacentes com atributos físicos e químicos semelhantes (Tabelas 2 e 3) (EMBRAPA, 1997).

Nas seis áreas, quatro parcelas com 10 x 10 m foram estabelecidas. Em cada parcela, cinco amostras simples de solo foram coletadas. As subamostras de cada parcela foram misturadas para a obtenção de uma amostra composta para

representar os tratamentos com diferentes sistemas de uso da terra. Cada tratamento foi amostrado quatro vezes e correspondem as quatro repetições usadas no experimento em casa-de-vegetação.



**Figura 1.** Mapa dos municípios de Belo Jardim na mesorregião do Agreste e Serra Talhada na mesorregião do Sertão, Semiárido do estado de Pernambuco, Brasil

Foram conduzidos dois experimentos independentes e simultâneos (um para sabiá (*M. caesalpinifolia*) e outro para leucena (*L. leucocephala*)). O delineamento experimental adotado foi o de blocos ao acaso com quatro repetições. Os solos dos diferentes sistemas de uso foram os tratamentos, cada unidade experimental consistiu de três vasos com uma planta em cada, cultivada nas amostras compostas de solo obtidas nas diferentes áreas de coleta. Totalizando 24 unidades experimentais para cada espécie, com 72 vasos para cada experimento.

As sementes de sabiá e leucena foram submetidas a choque térmico, com água à temperatura de 80 °C por 15 minutos, seguido da imersão em água à temperatura ambiente por 12 horas. Antes da semeadura, foram desinfestadas com álcool etílico a 95% por um minuto e, em seguida imersas em hipoclorito de sódio a 1% por dois minutos, posteriormente foram feitas 10 lavagens com água destilada e estéril. Por ocasião da semeadura, cada vaso recebeu quatro sementes, deixando, após quinze dias, uma planta por vaso.

**Tabela 2.** Análises físicas e classificação textural de amostras de solos coletadas em áreas com diferentes formas de uso da terra no Semiárido de Pernambuco

Cobertura do Solo	Densidade de solo -----g cm <sup>-3</sup> -----	Densidade de partículas	Granulometria (%)			Classificação Textural
			Areia	Silte	Argila	
Luvissolo (Serra Talhada)						
Caatinga	1,45 ± 0,15	2,58 ± 0,11	73,0 ± 3,25	11,7 ± 2,75	15,3 ± 0,80	Franco Arenoso
Agricultura	1,61 ± 0,06	2,60 ± 0,04	77,2 ± 3,95	10,0 ± 3,57	12,8 ± 0,80	Franco Arenoso
Agrofloresta	1,54 ± 0,03	2,69 ± 0,14	72,2 ± 4,09	10,3 ± 3,65	17,5 ± 0,92	Franco Arenoso
Argissolo (Belo Jardim)						
Caatinga	1,30 ± 0,02	2,64 ± 0,19	74,4 ± 3,52	9,3 ± 0,54	16,3 ± 3,28	Franco Arenoso
Agricultura	1,55 ± 0,01	2,52 ± 0,50	71,4 ± 2,94	9,7 ± 1,80	18,9 ± 1,17	Franco Arenoso
Consórcio	1,31 ± 0,06	2,62 ± 0,03	75,7 ± 1,11	10,4 ± 0,80	13,9 ± 1,89	Franco Arenoso

X ± Y, onde X = Médias e Y = Intervalo de confiança.

**Tabela 3.** Caracterização química de solos coletados em áreas com diferentes formas de uso da terra no Semiárido de Pernambuco

	pH	CO	P	K	Ca	Mg	Na	Al	H+Al
	Água	dag kg <sup>-1</sup>	mg dm <sup>-3</sup>		-----cmoc dm <sup>-3</sup> -----				
Luvissolo (Serra Talhada)									
Caatinga	6,37 ± 0,28	1,06 ± 0,16	114 ± 20	0,60 ± 0,21	2,97 ± 1,66	1,02 ± 0,32	0,12 ± 0,02	0,0	2,48 ± 0,83
Agricultura	6,76 ± 0,20	0,77 ± 0,38	105 ± 22	0,75 ± 0,15	2,85 ± 0,31	0,86 ± 0,38	0,11 ± 0,09	0,0	2,15 ± 0,75
Agrofloresta	6,35 ± 0,48	0,77 ± 0,18	75 ± 14	0,73 ± 0,08	2,93 ± 1,63	1,37 ± 0,60	0,11 ± 0,02	0,0	2,31 ± 0,21
Argissolo (Belo Jardim)									
Caatinga	5,86 ± 0,41	1,45 ± 0,74	68 ± 29	0,62 ± 0,10	2,32 ± 0,5	0,88 ± 0,33	0,07 ± 0,01	0,0	3,30 ± 0,98
Agricultura	6,28 ± 0,46	0,84 ± 0,16	69 ± 24	0,73 ± 0,17	2,04 ± 1,32	0,89 ± 0,23	0,09 ± 0,01	0,0	2,70 ± 1,01
Consórcio	5,78 ± 0,30	0,70 ± 0,12	89 ± 18	0,69 ± 0,14	2,14 ± 1,47	0,99 ± 0,34	0,08 ± 0,01	0,0	3,52 ± 0,69

X ± Y, onde X = Médias e Y = Intervalo de confiança.

Durante os experimentos, foram contados o número de folíolos e medidos a altura e o diâmetro do colo das plantas, com régua e um paquímetro digital, respectivamente. As medições nas duas leguminosas foram realizadas aos 30, 60 e 90 dias após o semeio.

A colheita foi realizada aos 90 dias para as duas espécies. Foram determinados o número de nódulos e a biomassa seca da parte aérea e raízes, após a secagem em estufa a 65°C por 72 horas. Os nódulos foram estocados em sílica gel, para a posterior determinação do peso seco em sílica. A biomassa da parte aérea foi passada em moinho tipo Willey, sendo posteriormente quantificado o teor de nitrogênio (MALAVOLTA; VITTI, G.C; OLIVEIRA, 1997). Os valores da biomassa da parte aérea das plantas foram usados no cálculo do N total acumulado na parte aérea, pela multiplicação do teor do nitrogênio da parte aérea pela biomassa acumulada.

Os resultados de altura de plantas, diâmetro do colo, número de folíolos, biomassa seca da parte aérea, raiz e nódulos, número de nódulos, e acúmulo de nitrogênio da parte aérea foram submetidos à análise de variância pelo Teste F, para as variáveis em que o F foi significativo, compararam-se as médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, sendo as análises estatísticas realizadas no programa computacional Sisvar (FERREIRA, 2011).

### 3.3 Resultados e Discussão

Nos dois solos amostrados a existência de populações de microssimbiontes compatíveis foi demonstrada pela nodulação natural das duas leguminosas arbóreas. Para o sabiá, a nodulação foi mais abundante nas plantas cultivadas no Argissolo, porém os nódulos formados nas plantas cultivadas no Luvisolo foram maiores e a biomassa total de nódulos não diferiu entre as plantas cultivadas nos dois solos. A leucena nodulou mais abundantemente quando cultivada no Argissolo com monocultivo, mas os nódulos foram pequenos e a biomassa total de nódulos só diferiu da biomassa de nódulos das mudas cultivadas no Luvisolo com agrofloresta (Tabela 4).

Os solos dos diferentes sistemas de uso da terra não apresentaram limitações à nodulação no que se refere à acidez do solo, e a presença de alumínio ou de sódio (Tabela 2). No tocante a disponibilidade de água verifica-se que apesar da precipitação anual média de Serra Talhada (Sertão) ser superior à de Belo Jardim (Agreste) (Tabela 1), a mesorregião do Agreste tem maior disponibilidade de água ao longo do ano do que no Sertão. A precipitação está concentrada principalmente em três meses (fevereiro até abril) na mesorregião do Sertão (média de 73% da precipitação anual) e o mês de maior precipitação representa 41% da precipitação anual. Em contraste, no Agreste, a precipitação é razoavelmente bem distribuída ao longo de cinco meses, de março a julho (67% da precipitação anual), e o mês de maior precipitação representa apenas 16% da precipitação anual. Além disso, há uma grande variação interanual da precipitação total no Sertão (FREITAS et al., 2010), o que pode ter resultado em uma diminuição na sobrevivência das populações de rizóbios naturalmente estabelecidas no Luvisolo de Serra Talhada, o que poderia explicar a diferente nodulação observada para as duas leguminosas cultivadas nos dois solos usados (Tabela 4).

Os resultados de nodulação contrastam com outros trabalhos que compararam a capacidade nodulífera das duas leguminosas (SOUZA et al., 2007; NASCIMENTO, 2013), nestes trabalhos a nodulação foi maior em sabiá, enquanto no presente estudo observou-se uma nodulação superior da leucena. Geralmente populações de rizóbios capazes de nodular leguminosas são abundantes em solos de regiões de onde as espécies são nativas (BALA et al., 2003), sabendo-se que a leucena é uma espécie

exótica era de se esperar uma menor nodulação do que em sabiá. Isso, pode estar relacionado às populações rizobianas nativas predominantes nas áreas e à habilidade que elas têm de estabelecerem associações simbióticas. Trabalhos têm demonstrado que as duas leguminosas apresentam maior afinidade por grupos de proteobactérias diferentes. O sabiá associa-se mais com  $\beta$ -rizóbios (REIS JUNIOR et al., 2010; MARTINS et al., 2015 b), enquanto a leucena nodula predominantemente com  $\alpha$ -rizóbios (WANG et al. 1999). É possível que essa preferência diferenciada das leguminosas quanto aos seus pares simbióticos tenha influenciado a nodulação natural, contudo são necessários estudos mais refinados no que se refere à ecologia e diversidade das diazotróficas nodulíferas, para melhor explicar o comportamento nodulífero diferenciado.

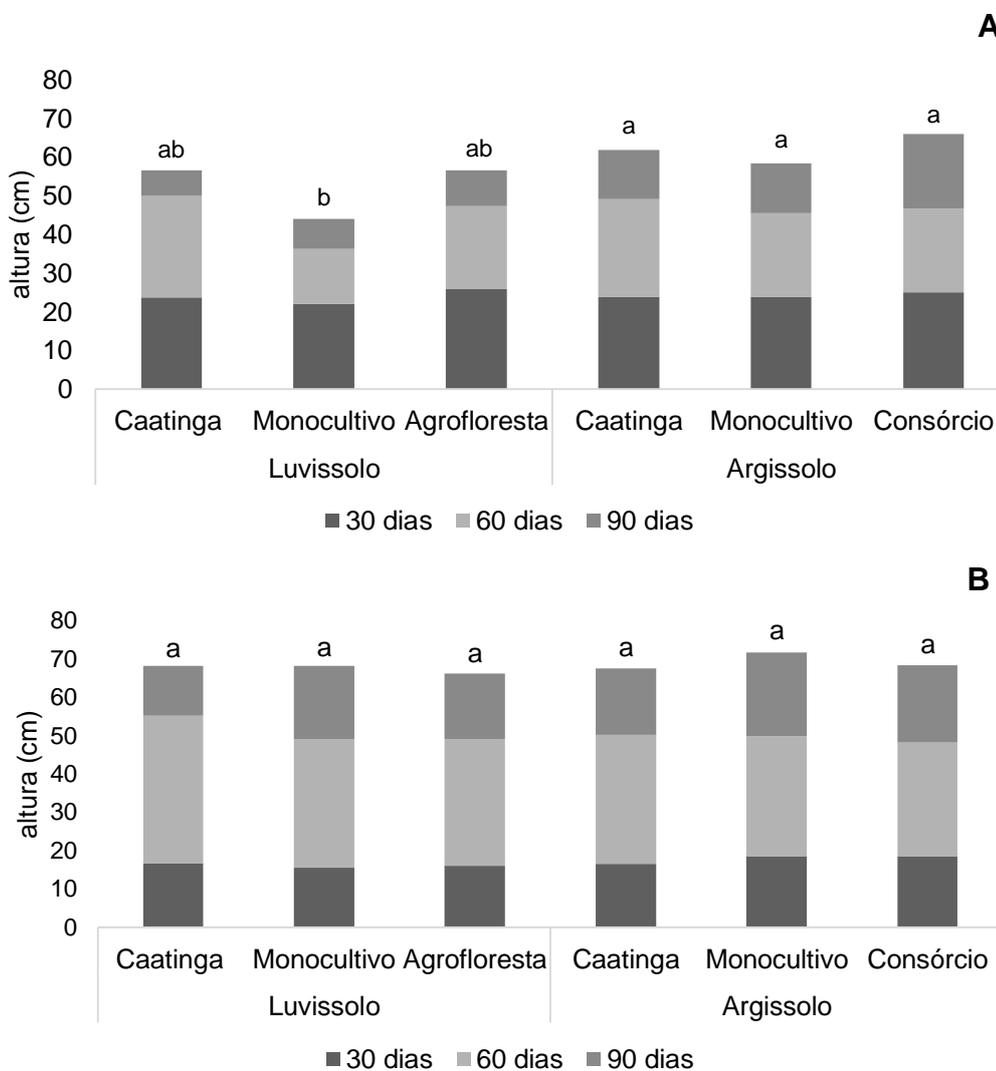
**Tabela 4.** Número e biomassa seca de nódulos em mudas de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*) e leucena (*Leucaena leucocephala*) em solos coletados em diferentes sistemas de uso da terra, na região Semiárida brasileira

Solo/Sistema de uso da terra	Número de nódulos		Biomassa seca de nódulos (mg planta <sup>-1</sup> )	
	Sabiá	Leucena	Sabiá	Leucena
<u>Luvissolo (Serra Talhada)</u>				
Caatinga	4,7 b	33,4 bc	42,5 a	190,75 ab
Monocultivo	4,6 b	40,0 bc	40,5 a	201,7 ab
Agrofloresta	12,8 b	18,7 c	45,5 a	91,7 b
<u>Argissolo (Belo Jardim)</u>				
Catinga	71,3 a	48,7 b	116,2 a	138,5 ab
Monocultivo	63,1 a	100,2 a	99,7 a	262,7 a
Consórcio	57,9 a	37,9 bc	153,5 a	152,0 ab
Médias	35,78	46,51	82,95	172,91
CV (%)	48,67	23,86	92,45	31,52

Média com a mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

As duas leguminosas se desenvolveram normalmente, apresentando 100% de sobrevivência. As mudas de sabiá cultivadas no Argissolo atingiram maior altura que as cultivadas no Luvissolo, principalmente quando o solo tem cobertura de consórcio (Figura 2). Neste solo as mudas de sabiá alcançaram 65,9 cm, crescimento comparável com os solos de caatinga e monocultivo (Argissolo). A menor altura foi

verificada na área de Luvissole oriundo de monocultivo. No tocante à leucena os sistemas de uso não influenciaram a altura das mudas apresentando uma média de 68 cm aos 90 dias após o semeio (Figura 2).

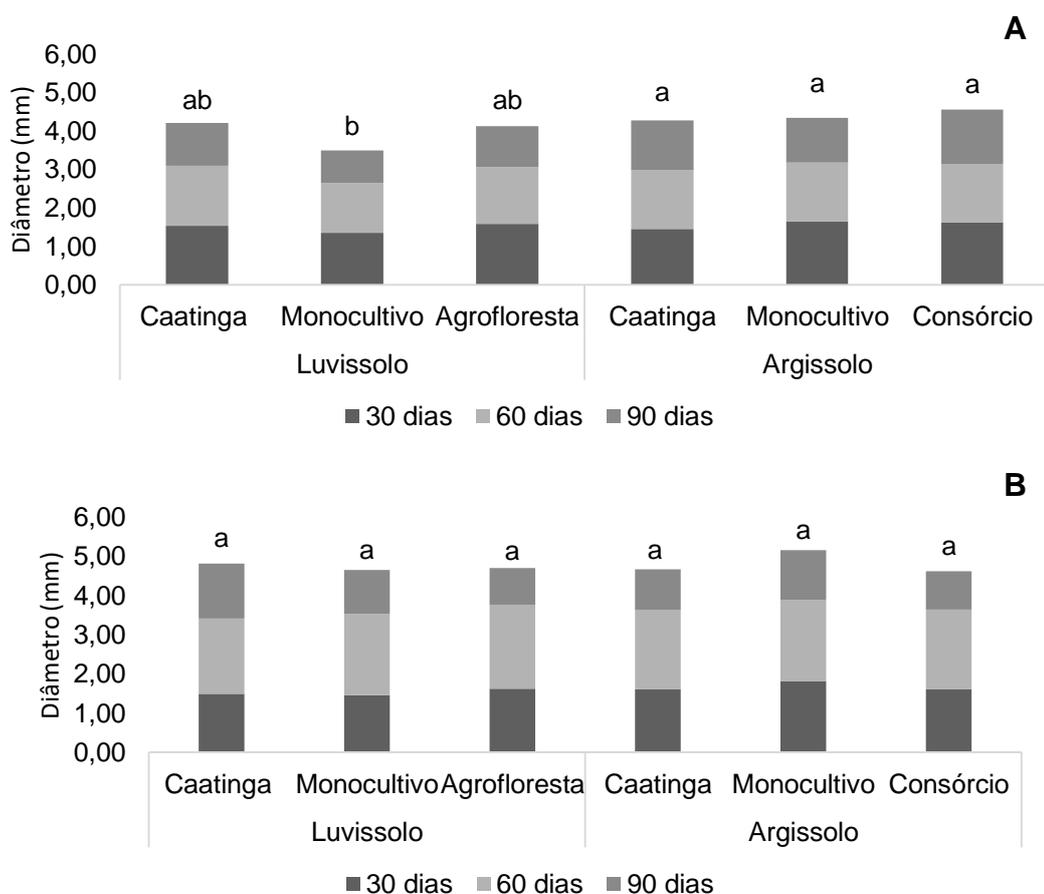


**Figura 2.** Aumentos médios na altura de mudas de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*) (A) e leucena (*Leucaena leucocephala*) (B) aos 30, 60 e 90 dias após o plantio, comparações feitas no último dia de avaliação de cada espécie. Médias com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

A altura constitui-se numa variável importante na predição do desenvolvimento das plantas, sendo tecnicamente aceita como uma boa medida para avaliação do potencial de desempenho das mudas (DUTRA et al., 2015). Para espécies arbóreas, as mudas estão aptas para o plantio em campo quando apresentam uma altura da parte aérea entre 15 e 30 cm (PAIVA; GOMES, 2000). Desse modo, no presente estudo, aos 30 dias, para todos os solos testados, as plantas de sabiá e leucena

encontravam-se na faixa supramencionada, podendo se inferir, assim, que segundo esse critério, as mudas das duas leguminosas estariam aptas ao plantio em campo aos 30 dias após o semeio.

O crescimento em diâmetro do colo de sabiá, de maneira semelhante ao verificado para altura, também apresentou o menor desenvolvimento no solo proveniente do Luvissole sob monocultivo (Figura 3). Na leucena, o diâmetro do colo não foi influenciado pelo sistema de uso da terra, apresentando um diâmetro médio de 4,7 mm.

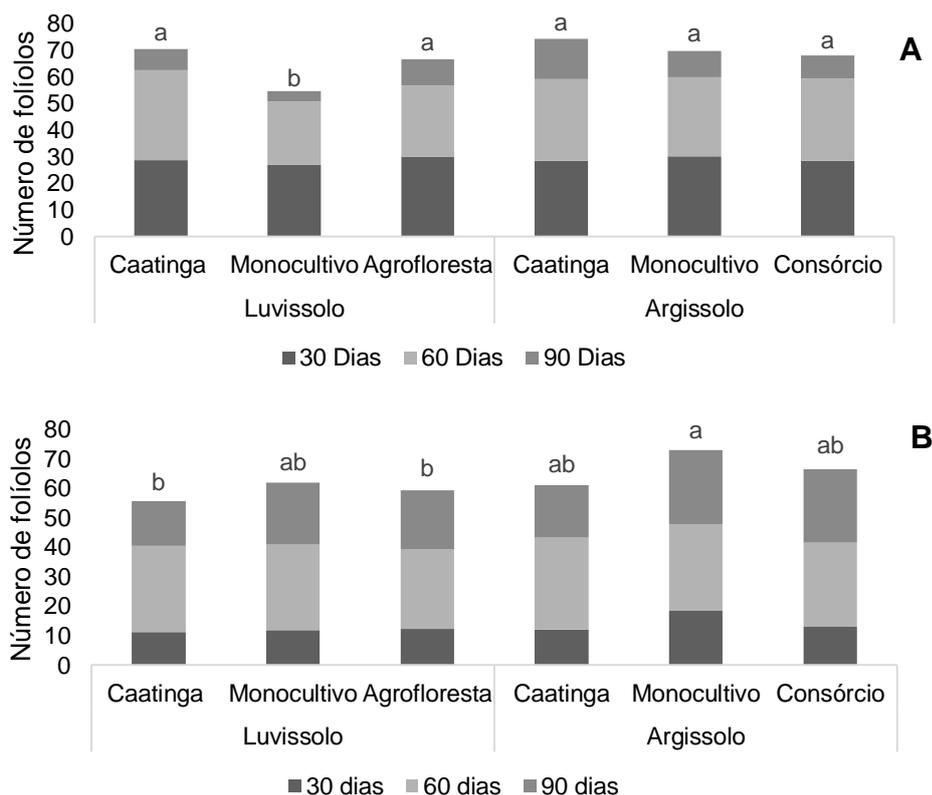


**Figura 3.** Aumentos médios no diâmetro de mudas de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*) (A) e leucena (*Leucaena leucocephala*) (B) aos 30, 60 e 90 dias após o plantio, comparações feitas no último dia de avaliação de cada espécie. Médias com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

O diâmetro do colo é uma variável de grande importância em estudos de avaliação do potencial de sobrevivência e crescimento após o plantio (SOUSA et al., 2006). Para Cruz et al. (2012), as mudas devem apresentar diâmetros maiores para exprimir melhor equilíbrio do crescimento da parte aérea. No entanto, a definição de um valor de diâmetro que exprima com fidelidade o real padrão de qualidade das

mudas para o plantio em local definido depende da espécie, do local, do método e das técnicas de produção (GOMES et al., 2001).

O número de folíolos das duas espécies foi influenciado pela cobertura vegetal. Para sabiá o menor número foi verificado na área de Luvissole sob monocultivo, os demais sistemas de uso foram semelhantes. Quanto a leucena, observou-se um maior número de folíolos no Argissolo sob monocultivo (Figura 4).



**Figura 4.** Aumentos médios no número de folíolos de mudas sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*) (A) e leucena (*Leucaena leucocephala*) (B) aos 30, 60 e 90 dias após o plantio, comparações feitas no último dia de avaliação de cada espécie. Médias com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

A biomassa seca da parte aérea e das raízes de leucena foram semelhantes nos diferentes sistemas de uso da terra, observando-se um acúmulo médio de 6,3 e 2,4 gramas, para parte aérea e raízes, respectivamente (Tabela 5). Enquanto para o sabiá, constatou-se uma menor produção de biomassa da parte aérea no Luvissole. Os maiores valores foram obtidos no Argissolo sob consórcio e monocultivo. Ao comparar as duas leguminosas verifica-se que leucena apresentou uma biomassa da parte aérea e raiz 5% e 60% respectivamente superior aos encontrados para o sabiá.

Tais resultados diferem dos obtidos por Souza et al. (2007) que verificaram maiores acúmulos de biomassa da parte aérea e raízes de sabiá em relação a leucena.

**Tabela 5.** Biomassa seca da parte aérea e de raízes, e nitrogênio acumulado na biomassa aérea de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*) e leucena (*Leucaena leucocephala*) cultivadas em solos coletados sob diferentes sistemas de uso da terra na região Semiárida brasileira

<u>Solo</u> /Sistema de uso da terra	Biomassa seca da parte aérea		Biomassa seca do sistema radicular		Acúmulo de N	
	Sabiá	Leucena	Sabiá	Leucena	Sabiá	Leucena
	(g planta <sup>-1</sup> )		(g planta <sup>-1</sup> )		(mg planta <sup>-1</sup> )	
<u>Luvissolo</u> (Serra Talhada)						
Caatinga	6,0 ab	6,3 a	1,7 a	2,6 a	120 ab	124 ab
Monocultivo	3,8 b	5,8 a	1,1 a	2,1 a	58 b	119 b
Agrofloresta	5,8 ab	6,1 a	1,6 a	2,6 a	109 ab	132 ab
<u>Argissolo</u> (Belo Jardim)						
Caatinga	6,2 ab	6,3 a	1,4 a	2,2 a	130 a	135 ab
Monocultivo	7,1 a	7,3 a	1,6 a	2,9 a	165 a	164 a
Consórcio	7,0 a	6,0 a	1,6 a	2,3 a	172 a	138 ab
Média Geral	5,99	6,3	1,50	2,46	126	135
CV (%)	17,53	12,70	17,01	23,22	22,21	13,37

Média seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

As mudas de leucena acumularam 8% mais N em sua biomassa dos que as plantas de sabiá. Para as duas leguminosas o nutriente foi acumulado em maior quantidade no Argissolo. Para sabiá, o maior acúmulo foi observado na cobertura de consórcio 172 mg planta<sup>-1</sup>. As plantas de leucena acumularam em média 135 mg planta<sup>-1</sup> e o maior acúmulo foi verificado no Argissolo sob monocultivo (Tabela 4).

Um dos fatores que podem ter resultado no baixo acúmulo de biomassa e de nitrogênio na parte aérea das mudas de sabiá cultivadas no Luvissolo oriundo de monocultivo, foi o baixo aporte de nitrogênio via fixação biológica (FBN), como resultado da baixa nodulação das plantas nessa área. Tendo em vista que o nitrogênio comumente é o nutriente mais requerido pelas plantas, um dos mais limitantes a produtividade em regiões semiáridas e que a sua principal via de entrada nessas áreas é por meio da fixação biológica (FREITAS et al., 2015), o manejo eficiente da FBN a fim de otimizar o processo é algo necessário.

### 3.4 Conclusões

Em todos os sistemas de uso da terra estudados, existem populações de bactérias capazes de nodular sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*) e leucena (*Leucaena leucocephala*).

O crescimento, nodulação e acúmulo de nitrogênio de sabiá e leucena, foram favorecidos no Argissolo.

A leucena apresentou maior potencial de fixação de N<sub>2</sub> e eficiência da nodulação com populações de rizóbios naturalmente estabelecidas nos sistemas de uso da terra estudados.

## Referências

- BALA, A.; MURPHY, P. J.; OSUNDE, A. O.; GILLER, K. E. Nodulation of tree legumes and the ecology of their native rhizobial populations in tropical soils. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 211-223, 2003. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0929-1393\(02\)00157-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0929-1393(02)00157-9)>.
- BARRETO, M. L. J.; LIMA, D. M.; OLIVEIRA, J. P. F.; RANGEL, A. H. N. Utilização da leucena (*Leucaena leucocephala*) na alimentação ruminantes. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v. 5, n. 1, p. 7-16, 2010.
- COSTA FILHO, R. T.; VALERI, S. V.; CRUZ, M. C. P. Calagem e adubação fosfatada no crescimento de mudas de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. em latossolo vermelho-amarelo. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 23, n. 1, p. 89-98, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5902/198050988442>>.
- CRUZ, C. A. F.; PAIVA, H. N. D.; CUNHA, A. C. M.; NEVES, J. C. L. Produção de mudas de canafístula cultivadas em Latossolo vermelho amarelo álico em resposta a macronutrientes. **Cerne**, Lavras v. 18, n. 1, p. 87-98, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0104-77602012000100011>>.
- DUTRA, T. R.; MASSAD, M. D.; MATOS, P. S.; SARMENTO, M. F. Q.; OLIVEIRA, J. C. D. Crescimento inicial e qualidade de mudas de caviúna-do-cerrado e caroba-do-campo em resposta a adubação nitrogenada. **Agropecuária Científica do Semiárido**, Campina Grande, v. 11, n. 3, p. 52-61, 2015.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de métodos de análises de solo**. 2.ed. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997. 212p.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília, DF: Embrapa Solos, 2013. 353 p.
- FAYE, A.; SALL, S.; CHOTTE, J. L.; LESUEUR, D. Soil bio-functioning under *Acacia nilotica* var. tomentosa protected forest along the Senegal River. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Ithaca, v. 79, n. 3, p. 35-44, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10705-007-9033-7>>.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>>.
- FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SANTOS, C.; SILVA, A.; CARVALHO, R. Fixação biológica de nitrogênio no Semiárido Brasileiro. **Revista Brasileira de Geografia e Física**, Recife v. 8, n. 1, p. 585-597, 2015.
- FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SANTOS, C. E. R. S.; FERNANDES, A. R. Biological nitrogen fixation in legume trees of the Brazilian caatinga. **Journal of Arid Environments**, Exeter, v. 74, n. 3, p.344-349, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaridenv.2009.09.018>>.

GARBA, J.; DALHATU, S. Soil erosion constraints to sustainable crop production in central senatorial district of Zamfara, north-western Nigeria. **Journal of Soil Science and Environmental Management**, Abuja, v. 6, n. 3, p. 42-50, 2015. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.5897/JSSEM14.0449>>.

GOMES, J. M.; COUTO, L.; LEITE, H. G.; XAVIER, A.; GARCIA, S. L. R. Parâmetros morfológicos na avaliação da qualidade de mudas de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 26, n. 6, p.655-666, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622002000600002>>.

JESUS, E. C.; MOREIRA, F. M. S.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. I. D.; OLIVEIRA, M. S. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 8, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2005000800006>>.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: POTAFÓS, 1997. 319 p.

MARTINS, J. C. R.; FREITAS, A. D. S. D.; MENEZES, R. S. C.; SAMPAIO, E. V. D. S. B. Nitrogen symbiotically fixed by cowpea and gliricidia in traditional and agroforestry systems under semiarid conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 50, n. 2, p.178-184, 2015 a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2015000200010>>.

MARTINS, P. G. S.; LIRA JUNIOR, M. A.; FRACETTO, G. G. M; SILVA, M. L. R. B.; VINCENTIN, R. P. *Mimosa caesalpinifolia* rhizobial isolates from different origins of the Brazilian Northeast. **Archives of Microbiology**, Amsterdam, v.197, n. 3, 2015 b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00203-014-1078-8>>.

MENEZES, R. S. C.; SAMPAIO, E. V. S. B.; GIONGO, V; MARIN, A. M. P. Biogeochemical cycling in terrestrial ecosystems of the Caatinga Biome. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 72, n. 3, p. 643-653, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842012000400004>>.

MOURA, O. N.; PASSOS, M. A. A.; FERREIRA, R. L. C.; MOLICA, S. G.; LIRA JÚNIOR, M. D. A.; LIRA, M. D. A.; SANTOS, M. V. F. Distribuição de biomassa e nutrientes na parte aérea de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. **Revista Árvore**, Viçosa v. 30, n. 1, p. 877-884, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622006000600002>>.

NASCIMENTO, L. R. V. **Diversidade de isolados bacterianos e sua influência na FBN em diferentes coberturas vegetais**. 2013. 109f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2013.

PAIVA, H. N.; GOMES, J. M. **Viveiros florestais**. 2.ed. Viçosa: UFV, 2000. 69p. (Cadernos didáticos, 72)

PENICHE, I. N. G.; GONZÁLEZ, Z. U. L.; PÉREZ, C. F. A.; KU, J. C. V.; AYALA, A. J. B.; SÁNCHEZ, F. J. S. Milk production and reproduction of dual-purpose cows with a restricted concentrate allowance and access to an association of *Leucaena leucocephala* and *Cynodon nlemfuensis*. **Journal of Applied Animal Research**, v. 42, n. 3, p. 345-351, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/09712119.2013.875902>>.

PEREIRA, J. S.; RODRIGUES, S. C. Crescimento de espécies arbóreas utilizadas na recuperação de área degradada. **Caminhos de Geografia**, Uberlândia v. 13, n. 41 p.102-108, 2012.

REIS JUNIOR, F. B.; SIMON, M. F.; GROSS, E.; BODDEY, R. M.; ELLIOTT, G. N.; NETO, N. E.; LOUREIRO, F. M.; QUEIROZ, L. P.; SCOTTI, M. R.; CHEN, W. M.; NORÉN, A.; RUBIO, M. C.; FARIA, S. M., BONTEMPS, C.; GOI, S. R.; YOUNG, J. P. W.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. **New Phytologist**, Lancaster, v. 186, n. 4, p. 934-946, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03267.x>>.

RIBEIRO, M. C. C.; BARROS, N. M. S.; BARROS, A. P.; SILVEIRA, L. M. Tolerância do sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth) à salinidade durante a germinação e o desenvolvimento de plântulas. **Revista Caatinga**, v. 21, n. 5, p. 123-126, 2008.

SAMPAIO, E. V. S. B. Overview of the Brazilian caatinga. **Seasonally Dry Tropical Forests**, In: BULLOCK, S. H.; MOONEY, H. A.; MEDINA E (Eds.), *Seasonally Tropical Dry Forests*. Cambridge University Press, Cambridge. p. 35-63, 1995.

SANTOS, C. E. R. S.; SILVA, V. S. G.; FREITAS, A. D. S.; SILVA, A. F.; BEZERRA, R. V.; LYRA, M. C. C. P.; FERREIRA, J. S. Prospecting of efficient rhizobia for peanut inoculation in a Planosol under different vegetation covers. **African Journal of Microbiology Research**, Abuja, v. 11, n. 4, p. 123-131, 2017. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.5897/AJMR2016.8355>>.

SILVA, E.; MIRANDA, J.; ARAÚJO, A.; CARVALHO, E.; NUNES, L. Nodulação natural de leguminosas em solos de cerrado do estado do Piauí. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 4, n. 3, p. 274-277, 2009.

SOUZA, L. A. G.; NETO, E. B.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P. Desenvolvimento e nodulação natural de leguminosas arbóreas em solos de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 2, p. 207-217, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2007000200009>>.

SOUZA, P. A.; VENTURIN, N.; MACEDO, R. L. G. Adubação mineral do ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 3, p. 261-270, 2006.

WANG, E. T.; ROMERO, J. M.; ROMERO, E. M. Genetic diversity of rhizobia from *Leucaena leucocephala* nodules in Mexican soils. **Molecular Ecology**, v. 8, n. 1, p. 721-724, 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-294X.1999.00608.x>>.

WU, G. L.; LIU, Y.; TIAN, F. P.; SHI, S. H. Legumes functional group promotes soil organic carbon and nitrogen storage by increasing plant diversity. **Land Degradation and Development**, v. 28, n. 2, p. 1336-1344, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002 / ldr.2570>>.

## **CAPÍTULO 02**

### **4 CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DE NÓDULOS DE LEGUMINOSAS ARBÓREAS CULTIVADAS EM SOLOS SOB DIFERENTES USOS DA TERRA DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO**

## Caracterização de bactérias de nódulos de leguminosas arbóreas cultivadas em solos sob diferentes usos da terra do Semiárido brasileiro

### Resumo

O isolamento, a caracterização e o conhecimento da diversidade de rizóbios nativos constituem etapas fundamentais na seleção de bactérias com potencial de uso como inoculantes para leguminosas arbóreas usadas na recuperação de áreas degradadas. Objetivou-se com o estudo, isolar, caracterizar e avaliar a diversidade de bactérias isoladas de nódulos de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) e leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit) cultivadas em vasos com solos (Argissolo e Luvisolo) coletados no Semiárido brasileiro sob diferentes sistemas de uso da terra: vegetação nativa (caatinga) e áreas com diferentes sistemas agrícolas (monocultivo e consórcio com várias espécies). A colheita das plantas foi realizada aos 90 dias, para as duas espécies. Para o isolamento em meio YMA, 9 nódulos foram amostrados aleatoriamente por parcela. Posteriormente, os isolados foram caracterizados fenotipicamente e submetidos à amplificação dos genes simbióticos *nifH* e *nodC*. Foram obtidos 160 isolados bacterianos dos nódulos de sabiá e 213 de leucena. Destes, 104 de sabiá e 144 de leucena amplificaram pelo menos um gene simbiótico. Dos que amplificaram, 94% para leucena e 93% para sabiá apresentaram crescimento rápido. Quanto à reação do pH no meio de cultura, a maioria dos isolados promoveu a acidificação (70% e 71% para sabiá e leucena, respectivamente). A partir da caracterização fenotípica, os isolados foram agrupados e índices de diversidade foram calculados. As amostras de solos dos diferentes sistemas de uso da terra, evidenciaram baixa diversidade, foram semelhantes nos índices avaliados e na frequência de bactérias que amplificam fragmentos de genes simbióticos. Com o agrupamento por espécie foram formados vinte grupos de isolados de sabiá e dezenove de leucena. Representantes dos grupos tiveram o gene 16S rRNA parcialmente sequenciado visando determinar o posicionamento taxonômico. Ficou evidenciado maior promiscuidade da leucena, uma vez que a mesma nodulou com representantes dos gêneros *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium* e *Burkholderia*, enquanto que o sabiá nodulou somente com bactérias do gênero *Burkholderia*.

Palavras-chave: Agricultura sustentável. Fixação biológica de nitrogênio. Recuperação de áreas degradadas. Rizóbios nativos.

## Characterization of root nodule bacteria from tree legumes under soils of different land uses of Brazilian Semiarid region

### Abstract

The isolation, characterization and knowledge of the diversity of native rhizobia are fundamental steps in the selection of bacteria with potential use as inoculants for tree legumes used in the recovery of degraded areas. The aim of this study was to isolate, characterize and to evaluate the diversity of bacteria isolated from nodules of sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) and *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit cultivated in pots with soils collected in the Brazilian semi-arid under different systems of use Land: native vegetation (caatinga) and areas with different agricultural systems (monoculture and consortium with several species). The plants were harvested at 90 days for both species. For isolation in YMA medium, 9 nodules were randomly sampled per replicate. Subsequently, the isolates were characterized morphophysiologically and submitted to the amplification of symbiotic genes *nifH* and *nodC*. A total of 160 bacterial isolates were obtained from *M. caesalpinifolia* and *L. leucocephala* nodules. Of these, 104 of leukemia and 144 of leukemia amplified at least one symbiotic gene. Of those who amplified, 94% for leucine and 93% for sage showed rapid growth. As for the pH reaction in culture medium, most of the isolates promoted acidification (70% and 71% for sabiá and leucena, respectively). From the morphophysiological characterization, the isolates were grouped and diversity indexes were calculated. Soil samples from different land use systems showed low morphophysiological diversity and were similar in the indexes evaluated and in the frequency of nodule bacteria that amplify fragments of symbiotic genes. Nineteen groups of isolates of sabiá and twenty of leucena were formed. Representatives of the groups had the 16S rRNA gene partially sequenced to determine the taxonomic positioning. It was evidenced more promiscuity of the leucena, since it nodulated with representatives of the genus *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium* and *Burkholderia*, while it sabiá nodule only with bacteria of the genus *Burkholderia*.

Keywords: Sustainable agriculture. Biologic nitrogen fixation. Land reclamation. Indigenous rhizobia.

## 4.1 Introdução

O Semiárido brasileiro apresenta uma área de cerca de 1 milhão de km<sup>2</sup>, abrangendo 1.113 municípios de nove estados do Brasil (Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe Bahia e Minas Gerais) (BRASILEIRO et al., 2009). Esta região detém 23,5 milhões de habitantes concentrando mais de dois terços da população pobre em áreas rurais (BUAINAIN; GARCIA, 2013). É uma região caracterizada por apresentar temperaturas elevadas e regime pluvial com distribuição irregular no tempo e no espaço, o que resulta em longos períodos de seca (BRASILEIRO et al., 2009).

As características destas áreas influenciam grande parte da população a sobreviver de atividades econômicas ligadas à agricultura e pecuária, com sistemas de produção baseados na substituição da vegetação nativa (caatinga) por espécies cultivadas e pastagens. Nesta conversão são empregadas com frequência práticas como desmatamento, queimadas e preparo indevido do solo, resultando em solos empobrecidos e desprovidos de vegetação (SACRAMENTO et al., 2013; BEUCHLE et al., 2015; SOUZA; MENEZES; ARTIGAS, 2015).

Diante da degradação do bioma, a intervenção do homem se faz necessária, visando criar condições que acelerem os mecanismos naturais de sucessão natural, e assim, permitir que se estabeleça nova dinâmica ecológica. Em condições como estas, o papel da intervenção técnica é de recuperar funções básicas do ambiente como cobertura do solo, ciclagem de nutrientes, abrigo e alimento para a fauna. A partir dessas, as funções ecológicas mais facilmente perceptíveis como riqueza de espécies e biodiversidade poderão também se expressar (CHAER et al., 2011; RESENDE et al., 2013; LIMA et al., 2015).

A inclusão de leguminosas arbóreas, tais como leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.) e sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.), em sistemas de cultivo ou em áreas degradadas, consiste em uma das principais práticas que podem ser empregadas para reduzir a fragilidade dos sistemas produtivos. Em outras regiões do Brasil, o plantio de leguminosas arbóreas têm reduzido a erosão, aumentado a biodiversidade, restaurado e mantido a fertilidade dos solos (CHAER et al., 2011). Na escolha das leguminosas, um dos principais aspectos a serem considerados é a habilidade de estabelecerem associações simbióticas com bactérias nativas que fixam nitrogênio (MACEDO et al., 2008; CHAER et al., 2011), assumindo grande destaque,

mediante o fato que um dos fatores que mais limitam a produção vegetal no semiárido depois da restrição hídrica é a disponibilidade de nitrogênio (FREITAS et al., 2010; FREITAS et al., 2015).

No que diz respeito às bactérias nativas do Semiárido brasileiro que nodulam sabiá e leucena, poucos foram os trabalhos que promoveram isolamento, caracterização e avaliação da diversidade (MENEZES, 2013; NASCIMENTO, 2013; MARTINS et al., 2015). Deste modo, pesquisas fazem-se necessárias, uma vez que a obtenção e o conhecimento de rizóbios nativos representam uma importante estratégia nessa região, pois constitui o passo inicial para a seleção de estirpes eficientes e competitivas para a produção de inoculantes para uso biotecnológico, especialmente em ecossistemas naturais e agrícolas onde o aporte de tecnologias é baixo, como os usados pela agricultura familiar.

Em sua região de origem, o México, *L. leucocephala* é nodulada por uma seleção diversificada de rizóbios do grupo das  $\alpha$ -proteobactérias, incluindo *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (WANG; ROMERO; ROMERO, 1999). Até o momento não foram investigados os gêneros que promovem a nodulação no Semiárido brasileiro. Em outras regiões semiáridas, como Panxi na China, os gêneros que promoveram nodulação foram os mesmos verificados no México, acrescentando-se *Mesorhizobium* (XU et al., 2013). Para o sabiá, os trabalhos têm demonstrando maior preferência em formar simbiose com  $\beta$ -proteobactéria do gênero *Burkholderia*, atualmente *Paraburkholderia* (REIS JUNIOR et al., 2010; MARTINS et al., 2015).

Em trabalhos de isolamento, caracterização e avaliação da diversidade de rizóbios presentes nos solos, os isolados rizobianos devem ser obtidos por meio da retirada de nódulos presentes na área de estudo (REIS JUNIOR et al., 2010), de nódulos de plantas–iscas crescendo em vasos com solo da área (SANTOS et al., 2017), ou de nódulos de plantas-iscas inoculadas com diluição do solo e crescendo em substrato estéril (MACHADO et al., 2016). Vale ressaltar, que é interessante nesses estudos realizar a coleta de material em diferentes tipos de solo, como também em diferentes sistemas de uso da terra e/ou diferentes coberturas vegetais, uma vez que a população bacteriana pode variar em tamanho e número de indivíduos de acordo com o solo, ambiente, uso da terra ou cobertura vegetal (JESUS et al., 2005; CALHEIROS, 2012; NASCIMENTO, 2013; SANTOS et al., 2017).

Sob as hipóteses de que as bactérias de nódulos de sabiá e leucena, nativas do Semiárido brasileiro apresentam alta diversidade, e esta diversidade será afetada pelo sistema de uso da terra, o objetivo deste trabalho foi isolar, caracterizar e avaliar a diversidade de bactérias de nódulos de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) e leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.), nativas de solos do Semiárido brasileiro, sob diferentes sistemas de uso da terra

## 4.2 Material e Métodos

### 4.2.1 Captura de rizóbios

Amostras de solos da camada superficial (0-20 cm) foram coletadas em áreas sob diferentes sistemas de uso da terra em dois municípios, com diferentes condições climáticas e classe de solo (Tabela 1). Belo Jardim na Mesorregião do Agreste e Serra Talhada na Mesorregião do Sertão. Em cada município, áreas com vegetação nativa (caatinga) e áreas com diferentes sistemas agrícolas (monocultivo e consórcio com várias espécies) foram selecionadas.

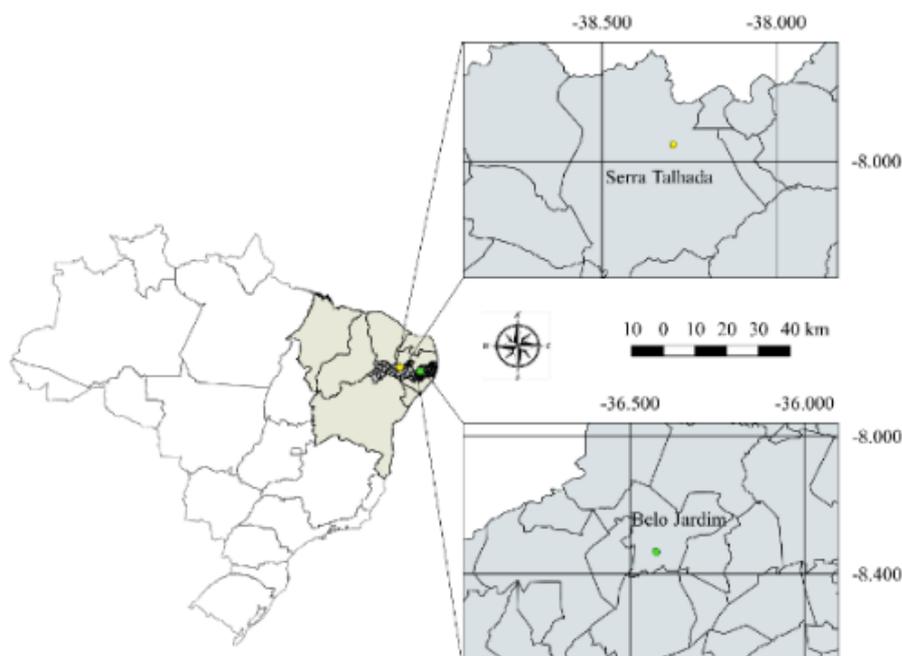
Em Belo Jardim os usos da terra utilizados foram: 1) caatinga de agreste (floresta subúmida decídua); 2) monocultivo de banana (*Musa* spp.) e 3) consórcio de gramíneas e leguminosas (*Sorghum bicolor* (L.), *Vigna unguiculata* (L.) Walp, *Crotalaria juncea* L. e *Canavalia ensiformis* DC.). Em Serra Talhada os usos da terra selecionados foram: 1) caatinga de sertão (Floresta semiárida decídua), 2) monocultivo de *Vigna unguiculata* (L.), 3) agrofloresta contendo leguminosas e árvores frutíferas (*Crotalaria juncea* L, *Anacardium occidentale* L.). Em cada município, os sistemas de uso da terra foram escolhidos em locais adjacentes com atributos físicos e químicos semelhantes (Tabela 2 e 3) (EMBRAPA, 1997).

**Tabela 1.** Características gerais dos municípios de Belo Jardim na mesorregião do agreste e Serra Talhada na mesorregião do Sertão, Semiárido do estado de Pernambuco, Brasil

Características	Municípios	
	Belo Jardim	Serra Talhada
Coordenadas	08° 20' 08" S	07° 59' 31" S
	36° 25' 27" W	38° 17' 54" W
Altitude (m)	608	429
Precipitação média anual (mm)	660	716
Meses com deficiência hídrica	4-5	6-7
Temperatura média (°C)	24	24
Classe de solo	Argissolo (EMBRAPA, 2013)	Luvissolo (EMBRAPA, 2013)

Nas seis áreas, quatro parcelas com 10 x 10 m foram estabelecidas. Em cada parcela, cinco amostras simples de solo foram coletadas. As subamostras de cada

parcela foram misturadas para a obtenção de uma amostra composta para representar os tratamentos com diferentes sistemas de uso da terra. Cada tratamento foi amostrado quatro vezes e correspondem as quatro repetições usadas no experimento em casa de vegetação.



**Figura 1:** Mapa dos municípios de Belo Jardim na mesorregião do agreste e Serra Talhada na mesorregião do Sertão, Semiárido do estado de Pernambuco, Brasil

Dois experimentos independentes (um para leucena e outro para sabiá) foram conduzidos em casa de vegetação. O delineamento experimental adotado foi o de blocos ao acaso com quatro repetições. Os solos dos diferentes sistemas de uso da terra corresponderam aos tratamentos em casa de vegetação. Cada unidade experimental consistiu de três vasos com uma planta cada. Assim, ficaram estabelecidas 24 unidades experimentais para cada espécie, totalizando 72 vasos por experimento.

As sementes de sabiá e leucena foram submetidas à choque térmico, com água à temperatura de 80 °C por 15 minutos, seguido de imersão em água à temperatura ambiente por 12 horas. Antes da semeadura, foram desinfestadas com álcool etílico à 95% por um minuto e, em seguida, imersas em hipoclorito de sódio a 1% por dois minutos. Posteriormente foram feitas 10 lavagens com água destilada esterilizada. Por ocasião da semeadura, cada vaso recebeu quatro sementes, deixando, após quinze

dias, uma planta por vaso. A colheita foi realizada aos 90 dias para as duas espécies. Ao final de 90 dias as plantas foram colhidas, os nódulos retirados, contados e acondicionados em tubos com sílica-gel para secagem e conservação para posterior isolamento bacteriano.

#### **4.2.2 Isolamento e caracterização fenotípica das bactérias dos nódulos**

Foram amostrados aleatoriamente nove nódulos por unidade experimental. Os nódulos amostrados de cada tubo foram reidratados (2 horas) e, em seguida imersos em álcool 95% (30 segundos) para quebra da tensão superficial, seguido por desinfestação superficial por imersão em hipoclorito de sódio a 5% por cinco minutos, e lavados em água destilada esterilizada por dez vezes. O isolamento foi conduzido em placas de Petri com meio de cultura contendo extrato de levedura, manitol e ágar (YMA, pH 6.8), com adição de corante vermelho congo (0,25% em 0,2N de KOH) (VINCENT, 1970). As placas foram incubadas em estufa tipo BOD a 28° C e o aparecimento das colônias foi monitorado diariamente, por um período de até 10 dias. Após o aparecimento das colônias, os isolados bacterianos foram transferidos para placas de Petri contendo meio YMA com azul de bromotimol como indicador de pH e incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente,

Após ser verificado o crescimento das colônias isoladas, realizou-se a caracterização conforme Martins et al. (1997) avaliando 1) tempo de crescimento (rápido – colônias isoladas apareciam até três dias depois de repicadas; intermediário – colônias apareciam de quatro a seis dias; e lenta – colônias apareciam depois de seis dias); 2) modificação do pH do meio de cultura após o crescimento das colônias (ácida, alcalina, neutra) 3) tamanho da colônia (puntiforme - colônias com diâmetro menor que 1 mm; colônias com diâmetro entre 1-2 mm e colônias com diâmetro >2 mm); 4) forma da colônia (circular ou irregular); 5) aparência da colônia (homogênea ou heterogênea); 6) transparência da colônia (opaca - quando não possui o brilho; translúcida - quando permitia a passagem da luz através da placa; e transparente – quando além de permitir a passagem da luz, percebia-se claramente o que havia do outro lado); 7) cor das colônias (branca, amarela ou rosa); 8) presença de muco (sim ou não); 9) quantidade de muco (muito ou pouco); 10) elevação (colônias elevadas ou não). Após a caracterização, os isolados foram crescidos em meio YMA e estocados no meio YM (extrato de levedura e manitol) contendo 20% de glicerol a -11° C.

**Tabela 2.** Análises físicas e classificação textural de amostras de solos coletadas em áreas com diferentes formas de uso da terra no Semiárido de Pernambuco

Cobertura do Solo	Densidade de solo -----g cm <sup>-3</sup> -----	Densidade de partículas	Granulometria (%)			Classificação Textural
			Areia	Silte	Argila	
Luvissolo (Serra Talhada)						
Caatinga	1,45 ± 0,15	2,58 ± 0,11	73,0 ± 3,25	11,7 ± 2,75	15,3 ± 0,80	Franco Arenoso
Agricultura	1,61 ± 0,06	2,60 ± 0,04	77,2 ± 3,95	10,0 ± 3,57	12,8 ± 0,80	Franco Arenoso
Agrofloresta	1,54 ± 0,03	2,69 ± 0,14	72,2 ± 4,09	10,3 ± 3,65	17,5 ± 0,92	Franco Arenoso
Argissolo (Belo Jardim)						
Caatinga	1,30 ± 0,02	2,64 ± 0,19	74,4 ± 3,52	9,3 ± 0,54	16,3 ± 3,28	Franco Arenoso
Agricultura	1,55 ± 0,01	2,52 ± 0,50	71,4 ± 2,94	9,7 ± 1,80	18,9 ± 1,17	Franco Arenoso
Consórcio	1,31 ± 0,06	2,62 ± 0,03	75,7 ± 1,11	10,4 ± 0,80	13,9 ± 1,89	Franco Arenoso

X ± Y, onde X =Médias e Y = Intervalo de confiança.

**Tabela 3.** Caracterização química de solos coletados em áreas com diferentes formas de uso da terra no Semiárido de Pernambuco

	pH	C	P	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup>	Al <sup>3+</sup>	H+Al
	Água	g kg <sup>-1</sup>	mg dm <sup>-3</sup>		-----cmolc dm <sup>-3</sup> -----				
Luvissolo (Serra Talhada)									
Caatinga	6,37 ± 0,28	1,06 ± 0,16	114 ± 20	0,60 ± 0,21	2,97 ± 1,66	1,02 ± 0,32	0,12 ± 0,02	0,0	2,48 ± 0,83
Agricultura	6,76 ± 0,20	0,77 ± 0,38	105 ± 22	0,75 ± 0,15	2,85 ± 0,31	0,86 ± 0,38	0,11 ± 0,09	0,0	2,15 ± 0,75
Agrofloresta	6,35 ± 0,48	0,77 ± 0,18	75 ± 14	0,73 ± 0,08	2,93 ± 1,63	1,37 ± 0,60	0,11 ± 0,02	0,0	2,31 ± 0,21
Argissolo (Belo Jardim)									
Caatinga	5,86 ± 0,41	1,45 ± 0,74	68 ± 29	0,62 ± 0,10	2,32 ± 0,5	0,88 ± 0,33	0,07 ± 0,01	0,0	3,30 ± 0,98
Agricultura	6,28 ± 0,46	0,84 ± 0,16	69 ± 24	0,73 ± 0,17	2,04 ± 1,32	0,89 ± 0,23	0,09 ± 0,01	0,0	2,70 ± 1,01
Consórcio	5,78 ± 0,30	0,70 ± 0,12	89 ± 18	0,69 ± 0,14	2,14 ± 1,47	0,99 ± 0,34	0,08 ± 0,01	0,0	3,52 ± 0,69

X ± Y, onde X =Médias e Y = Intervalo de confiança.

### 4.2.3 Amplificação de fragmentos de genes simbióticos como ferramenta para seleção de rizóbios

Para avaliar a habilidade dos isolados em realizar a fixação biológica de nitrogênio eles foram submetidos à reação duplex para a amplificação simultânea de fragmentos dos genes *nifH* e *nodC*, seguindo protocolo estabelecido por Fernandes Júnior et al. (2013).

#### 4.2.3.1 Extração de DNA

Os isolados cresceram em meio TY por 72 horas sob 250 rpm a 28° C. A partir do cultivo de células, adotou-se o método de Dhaese (1979) para extração de DNA genômico. Centrifugou-se 1,5 ml de células bacterianas durante 3 minutos a 13.000 rpm. Em seguida o sedimento celular obtido foi ressuspensionado com 567 µl de TE (10 mM de Tris-HCl e 1 mM de EDTA, pH 8), 30 µl de SDS à 20% e 3 µl de proteinase K (20 µl g ml<sup>-1</sup>). Misturou-se e incubou-se durante 1 hora a 37°C. Depois deste tempo, em que as células sofreram lise, se adicionou 500 µl de fenol-clorofórmio e centrifugou durante 5 minutos. Este passo se repetiu várias vezes até o desaparecimento do precipitado branco característico da presença de proteínas. Para eliminação do fenol das amostras, elas foram tratadas com 500 µl de clorofórmio: álcool: isoamílico (24:1). O DNA se precipitou adicionando-se 0,8 volumes de isopropanol e 0,1 volumes de acetato sódico 3 M. Centrifugou durante 5 minutos, e o DNA precipitado foi lavado com álcool a 70% e ressuspensionado com 100-500 µl de TER (10 mM de Tris-HCl pH 8,1 mM de EDTA e 10 mg ml<sup>-1</sup> de RNAase). O DNA extraído foi armazenado a -20° C.

A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose (0,8%). A eletroforese foi realizada em tampão TAE (45mM Tris-Acetato, 1mM de EDTA, pH 8,3) à 80 V durante 30 minutos. Visualizado por meio de luz ultravioleta (UV) e fotografado.

#### 4.2.3.2 Amplificação de fragmentos de genes *nifH* e *nodC*

A reação de PCR foi dimensionada para um volume final de 10 µl, contendo tampão de reação 1X, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, Taq DNA polimerase 0,25U. Os iniciadores utilizados foram 1µM de PolF (TGCGAYCCSAARGCBGACTC) e PolR (ATSGCCATCATYTCRCCGGA) para a amplificação de um fragmento de aproximadamente 360 pares de bases (pb) correspondente à parte do gene *nifH* no operon *nifH*HKD (POLY; MONROZIER; BALLY, 2001) e 0,6 µl de *NodCF* (AYGTHGTYGAYGACGGTTC) e *NodCR*(I) (CGYGACAGCCANTCKCTATTG) para a

amplificação de um fragmento interno ao gene *NodC* com aproximadamente 980 pb (LAGUERRE et al., 2001). A amplificação consistiu de uma etapa inicial de desnaturação de 94°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 55°C por 45 segundos e 72 °C por 1 minuto e extensão final de 72 °C por 1 minuto.

Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (1,5%) a 100 V por 80 minutos, a visualização do gel se deu por meio de um transluminador com luz UV.

Devido as diferenças nas proporções de isolados que amplificaram genes simbióticos nos diferentes sistemas de uso, foi realizado o teste de qui-quadrado, para verificar se as diferenças são significativas. Os isolados que apresentaram amplificação de pelo menos um dos genes simbióticos foram selecionados para avaliação da diversidade.

#### **4.2.4 Avaliação da diversidade dos isolados bacterianos**

Os isolados selecionados pela amplificação de fragmento de genes simbióticos tiveram os dados da caracterização codificados em uma matriz binária (0 - negativo e 1 - positivo). Com esta, foram gerados dendogramas de similaridade dos isolados nos diferentes sistemas de uso de terra, também foram gerados para cada espécie um dendograma com todos os isolados. Adotou-se o método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) e o coeficiente de similaridade de Jaccard. Os resultados das análises de clusters foram usados para calcular os índices de riqueza (Margalef), diversidade (Shannon H), dominância (Simpson 1-D) e uniformidade ou equitabilidade (Pielou J) para os sistemas de uso da terra, onde cada grupo morfológico com 100% de similaridade foi considerado como uma unidade taxonômica operacional. O programa Past (palaeontological statistics) foi utilizado para o cálculo dos índices (HAMMER et al., 2001).

#### **4.2.5 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e análises filogenéticas**

De cada grupo fenotípico, um isolado escolhido aleatoriamente teve seu gene 16S rRNA amplificado e sequenciado para determinação do seu posicionamento taxonômico. O gene 16S rRNA foi amplificado usando os primers universais 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) e 1492 R (TACGGYTACCTTGTTACGACTT) (WEISBURG et al.,1991). As reações de PCR foram ajustadas para 50 µl (1X tampão

de reação, 2,0 mmol L<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mmol L<sup>-1</sup> de cada dNTP, 1 U de Taq DNA polimerase, e 0,25 μmol L<sup>-1</sup> de cada primer). A amplificação consistiu de uma etapa inicial de desnaturação de 94°C por 4 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação (94 °C por 1 minuto), anelamento (60°C por 45 segundos), extensão (72 °C por 2 min) e um passo de extensão final de 72 °C por 5 min. Os produtos de PCR amplificados foram enviados para purificação e sequenciamento na empresa Macrogen, em Seul, Coréia do Sul. O sequenciamento foi realizado na plataforma ABI 3037 xl (Applied Biosystems, EUA) utilizando o iniciador 27F, seguindo os protocolos da empresa prestadora de serviços.

As sequências foram utilizadas para comparação com aquelas disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) utilizando o algoritmo (BLASTn). As sequências mais semelhantes, assim como as sequências de estirpes tipo foram selecionadas para o alinhamento e construção das árvores filogenéticas.

O alinhamento foi feito utilizando o algoritmo CrustalW e as árvores construídas utilizando o método de agrupamento Neighbour-Joining com o algoritmo de Kimura 2 com o auxílio do programa Mega 7.0 (TAMURA et al., 2013).

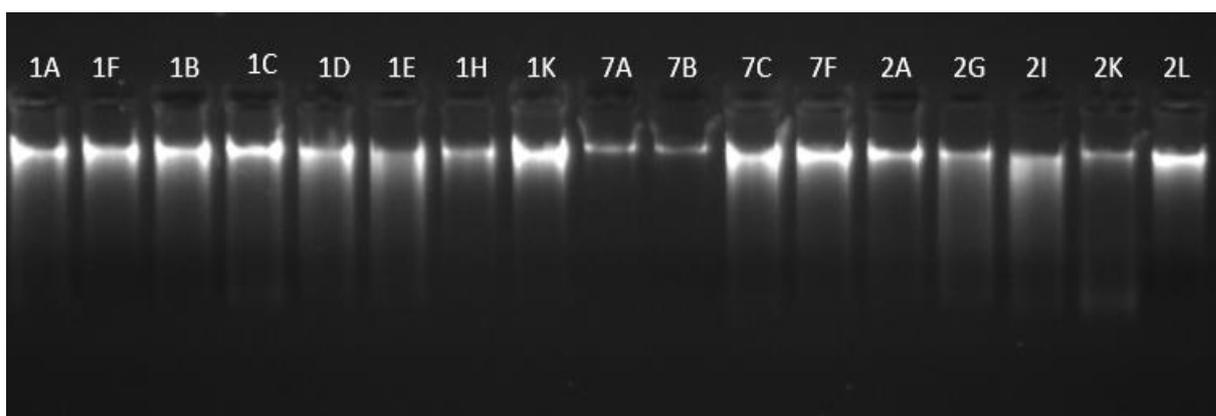
## 4.3 Resultados e Discussão

### 4.3.1 Obtenção dos isolados bacterianos dos nódulos das leguminosas

Dos nódulos coletados no experimento de planta-isca foram obtidos 160 isolados bacterianos de sabiá. Destes, 73 foram oriundos do Luvissole e 87 do Argissolo. Do Luvissole, 23 foram obtidos do solo sob caatinga, 17 do monocultivo e 33 da agrofloresta. Do Argissolo, 22 foram obtidos de consórcio, 37 da caatinga e 28 do monocultivo. Dos nódulos de leucena foram obtidos 213 isolados. Destes, 53% foram provenientes do Luvissole e 47% do Argissolo. No Luvissole foram observados 40, 23 e 50 isolados oriundos dos solos da caatinga, monocultivo e agrofloresta, respectivamente. Para o Argissolo foram obtidos 27, 35 e 38 isolados das áreas de caatinga, monocultivo e consórcio, respectivamente (Tabelas 4 e 5).

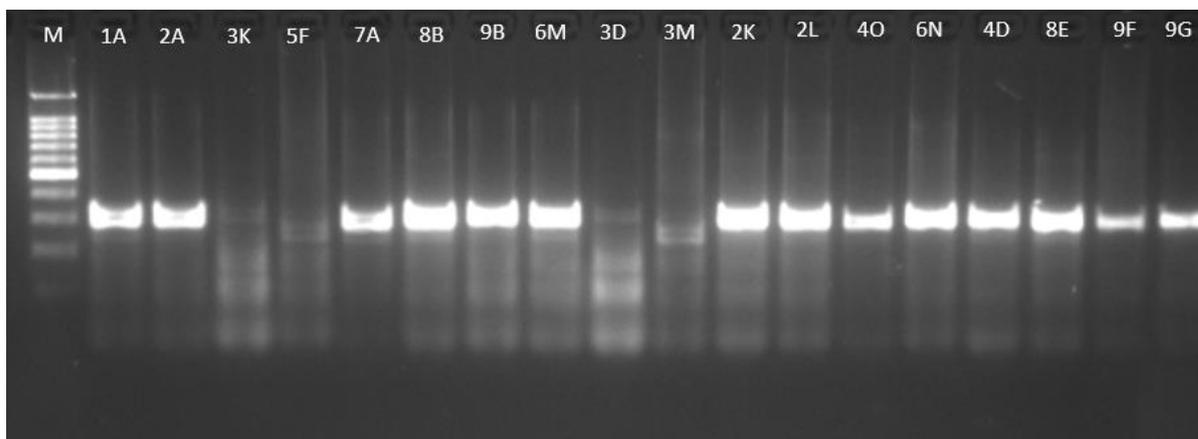
### 4.3.2 Amplificação simultânea de fragmentos dos genes *nifH* e *nodC* como ferramenta para a seleção preliminar das bactérias

Todas as bactérias tiveram seu DNA extraído, na sequência a qualidade da extração foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose. Na Figura 2 observa-se que o processo de extração foi realizado corretamente e que o DNA não se encontrava degradado, sendo isto evidenciado pela presença de uma única banda íntegra de alto peso molecular na parte superior do gel e sem a presença de rastros.



**Figura 2.** Avaliação da qualidade da extração do DNA de alguns isolados utilizados no estudo por meio da eletroforese em gel de agarose a 0,8 % por 30 min a 80 v, foi utilizado em cada poço 2,0  $\mu$ L do DNA de cada isolado

Nas avaliações de amplificação simultânea dos dois genes, dentre os 160 isolados de sabiá, 104 amplificaram apenas o gene *nifH* (Figura 3), nenhum isolado amplificou simultaneamente *nifH* + *nodC*. Para os 213 isolados de leucena, 142 amplificaram apenas o *nifH* e 02 os dois genes simultaneamente.



**Figura 3.** Amplificação do gene *nifH* (M = marcado de peso molecular 100pb) em isolados de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.)

O predomínio de isolados bacterianos que amplificam somente o gene *nifH* utilizando a técnica Duplex também foi verificado em trabalhos conduzidos por Silva (2015) e Rodrigues (2016) ao estudar a amplificação destes genes simbióticos em jurema-preta. Essa espécie, assim como o sabiá, pertence ao gênero *Mimosa*, que tem se destacado na literatura por sua alta afinidade em realizar simbiose com  $\beta$ -rizóbios (TAULÉ et al., 2012; ARAÚJO et al., 2017; DALL'AGNOI et al., 2017). O par de iniciadores utilizados no presente estudo foram *NodCF* (AYGTHGTYGAYGACGGTTC) e *NodCR* (I) (CGYGACAGCCANTCKCTATTG) desenhado para amplificação em  $\alpha$ -rizóbios, isso pode ter resultado na ausência de amplificação dos genes *nodC* dos isolados de sabiá. Para a leucena, tem-se observado uma maior afinidade em estabelecer simbiose com  $\alpha$ -rizóbios dos gêneros *Rhizobium* (PEREYRA et al., 2015), *Mesorhizobium* (RANGEL et al., 2017), *Sinorhizobium* (XU et al., 2013), *Bradyrhizobium* (WANG et al., 1999), *Allorhizobium*, (FLORENTINO et al., 2009), sendo assim era de se esperar a amplificação simultânea dos dois genes simbióticos, isto pode sugerir que a leucena também pode apresentar alta afinidade com  $\beta$ -rizóbios nativos do Semiárido nordestino, contudo estudos mais refinados são necessários para confirmar esta hipótese.

Quanto à utilização da técnica Duplex como estratégia de seleção, pode-se afirmar que constitui uma ferramenta útil, contudo a ausência da amplificação de um dos genes no presente estudo indica que mais trabalhos devem ser realizados para a determinação de um conjunto adequado de iniciadores.

Nas Tabelas 4 e 5 encontram-se os testes de qui-quadrado para as frequências observadas e esperadas para proporção de isolados bacterianos de nódulos de sabiá e leucena oriundos de diferentes sistemas de uso da terra que amplificaram fragmentos de genes simbióticos. Foi evidenciado que os diferentes usos não promoveram diferenças na frequência das bactérias que amplificaram *nifH* e/ou *nodC*.

Os 104 isolados bacterianos de sabiá e os 144 de leucena que amplificaram pelo menos um dos fragmentos de genes simbióticos foram selecionados, e tiveram suas características fenotípicas usadas na avaliação da diversidade apresentadas no presente trabalho.

**Tabela 4.** Teste de qui-quadrado para as frequências observadas e esperadas para proporção de isolados bacterianos de nódulos de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) oriundos de diferentes sistemas de uso da terra que amplificaram fragmentos de genes simbióticos

Sistema de uso	Amplificaram Observada (Esperada)	Não Amplificaram	Total	Proporção (%)
<i>Luvissolo</i>				
Caatinga	17 (14,95)	6 (8,05)	23	73,91
Agrofloresta	17 (21,45)	16 (11,55)	33	51,52
Agricultura	11 (11,05)	6 (5,95)	17	64,71
<i>Argissolo</i>				
Caatinga	26 (24,05)	11 (12,95)	37	70,27
Consórcio	17 (14,30)	5 (7,70)	22	77,27
Agricultura	16 (18,20)	12 (9,80)	28	57,14
Total	104	56	160	64,37

**Tabela 5.** Teste de qui-quadrado para as frequências observadas e esperadas para proporção de isolados bacterianos de nódulos de leucena *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit) oriundos de diferentes sistemas de uso da terra que amplificaram fragmentos de genes simbióticos

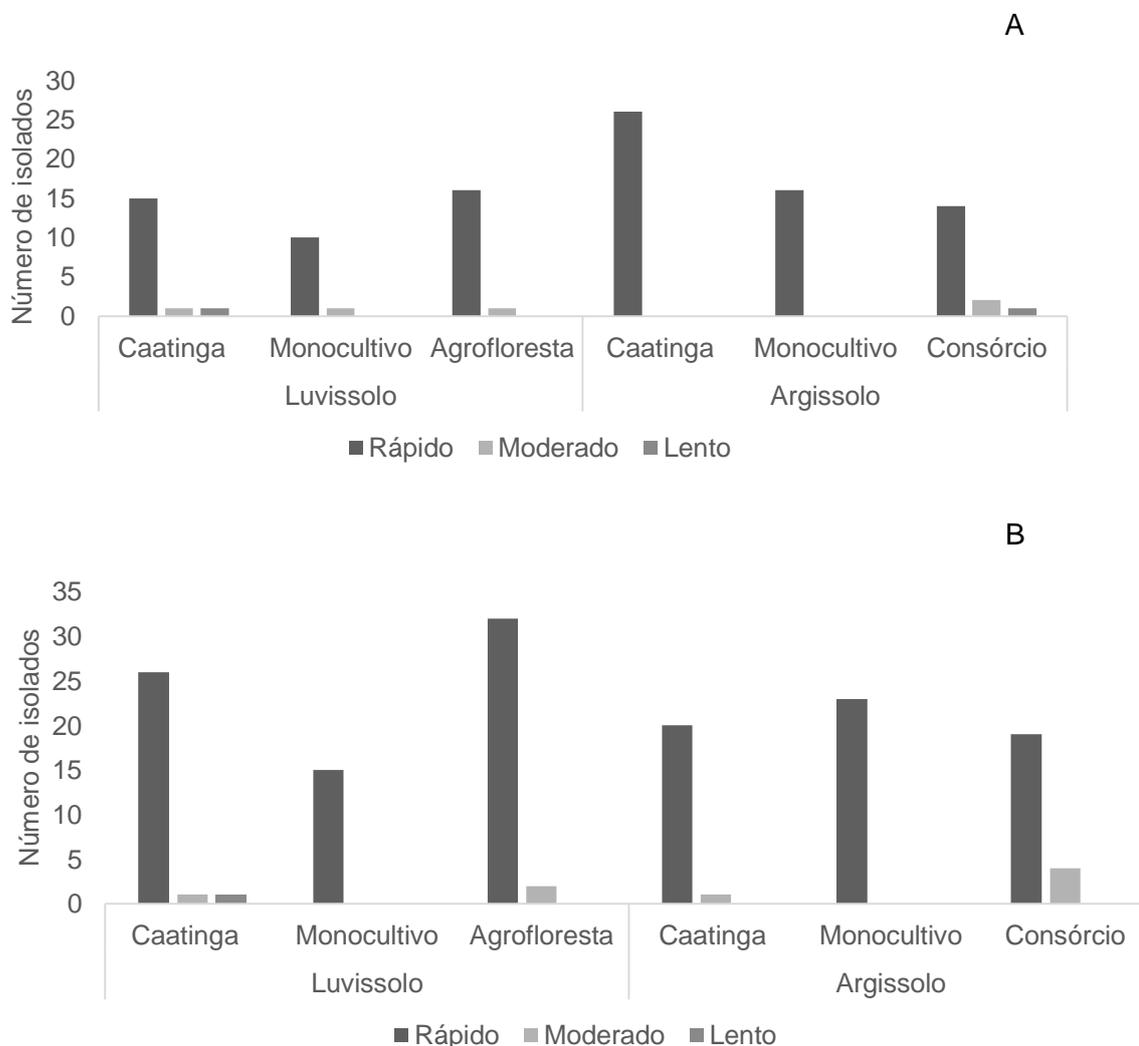
Sistema de uso	Amplificaram Observada (Esperada)	Não Amplificaram	Total	Proporção (%)
<i>Luvissole</i>				
Caatinga	28 (27,04)	12 (12,92)	40	70,00
Agrofloresta	34 (33,80)	16 (16,20)	50	65,22
Agricultura	15 (15,55)	8 (7,45)	23	68,00
<i>Argissolo</i>				
Caatinga	21 (18,25)	6 (8,75)	27	62,96
Consórcio	23 (25,69)	15(12,31)	38	60,53
Agricultura	23 (23,66)	12 (11,34)	35	62,86
Total	144	69	213	67,61

#### 4.3.3 Caracterização fenotípica

As colônias de isolados em meio YMA obtidos dos nódulos de leucena e sabiá foram diferenciadas com base no tempo de crescimento em três categorias: rápidas – aquelas que produzem crescimento moderado e abundante em até três dias, intermediárias, entre 4 e 5 dias, e lentas as que cresceram após 6 dias. De uma maneira geral, os isolados obtidos no presente estudo apresentaram crescimento rápido. Dos 104 isolados de sabiá que amplificaram fragmentos de genes simbióticos, apenas 7 (6,7%) apresentaram crescimento após três dias. Na comparação entre os sistemas de uso, a proporção de isolados de sabiá que evidenciaram crescimento rápido foi maior no Argissolo sob caatinga. Em Leucena, dos 144 isolados, 94% foram de crescimento rápido, tendo sido a agrofloresta o sistema de uso que apresentou o maior número de isolados com esta característica (Figura 4).

A predominância de bactérias de crescimento rápido para rizóbios isolados de leguminosas arbóreas do gênero *Mimosa spp.* cultivadas em regiões tropicais já foi relatado na literatura. Martins et al. (2015), em trabalho conduzido com *Mimosa caesalpiniiifolia* cultivada em diferentes solos do Nordeste brasileiro, verificaram que os 47 isolados rizobianos obtidos apresentaram crescimento em até três dias. Teixeira et al. (2010) realizaram a caracterização de rizóbios nativos da caatinga com a capacidade de nodular *Mimosa tenuiflora* e observaram a totalidade dos isolados

dessas espécies com crescimento rápido. Isolados bacterianos de nódulos de *Mimosa artemisiana* oriundos do Semiárido paraibano também apresentaram crescimento rápido em 68% de uma coleção de 50 isolados (PAULO et al., 2014).



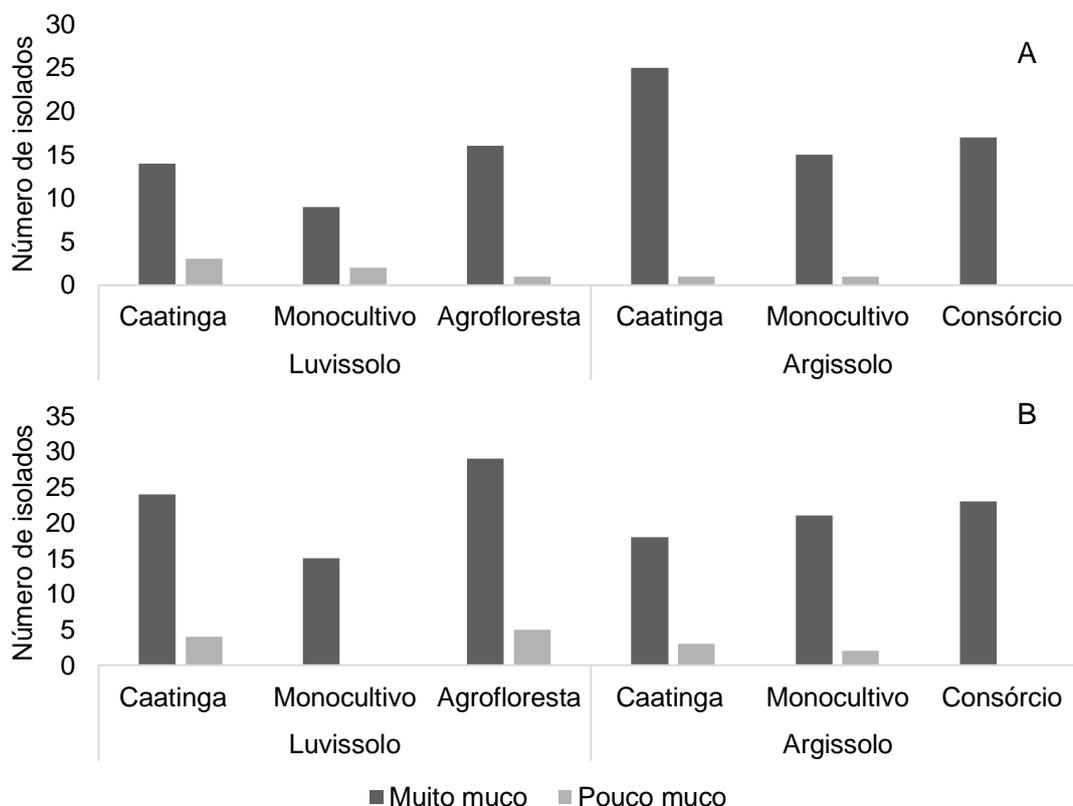
**Figura 4.** Distribuição de isolados de nódulos de duas leguminosas arbóreas em função do tempo de crescimento em YMA. (A) sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth.) e (B) leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.)

O gênero *Mimosa* spp. no bioma Caatinga é frequentemente nodulado por  $\beta$ -rizóbios pertencentes ao gênero *Paraburkholderia* spp. (anteriormente *Burkholderia*), isso foi observado por Reis Junior et al. (2010) em estudo da nodulação e da fixação biológica de nitrogênio em várias espécies do gênero *Mimosa* nos biomas Cerrado e Caatinga. Espécies de rizóbio do gênero supracitado, como *Burkholderia sabiae* e *B. nodosa* apresentam características de crescimento rápido, o que pode explicar a maior frequência de isolados com esta característica.

O tempo de crescimento dos isolados de leucena corrobora os resultados de Bala et al. (2003), que em estudo conduzido em áreas de regiões tropicais da Ásia, África e América, verificaram que os rizóbios isolados de leucena eram predominantemente de crescimento rápido. Shetta, Al-Shaharani e Abdel-Aal (2011) avaliaram as características fenotípicas de isolados de nódulos de leucena em Riyadh na Arábia Saudita, observaram que a maioria dos isolados apresentavam hábito de crescimento em até três dias. Em contraposição, Boakye, Lawson e Danso (2016) caracterizar rizóbios de leguminosas arbóreas em Gana, e observaram para leucena o predomínio de rizóbios de crescimento lento.

A ocorrência de rizóbios de crescimento rápido ou lento parece estar relacionada com aspectos ambientais, pois em trabalhos de isolamento de rizóbios de caupi, jacatupé e soja em solos da região Semiárida e da Zona da Mata de Pernambuco, Stamford et al. (1996) observaram que 100% dos isolados da Zona da Mata apresentaram crescimento lento, enquanto que 90% dos isolados da região semiárida tiveram crescimento rápido. A capacidade de crescer rapidamente em regiões semiáridas parece constituir uma estratégia de sobrevivência das bactérias, já que são mais tolerantes à seca do que as de crescimento lento (MARTINS et al., 1997). Além de ser uma vantagem competitiva, já que que isolados de crescimento rápido tendem a aumentar sua população mais rapidamente em curto espaço de tempo de período chuvoso quando comparados aos isolados de crescimento lento (VAN GESTEL et al., 1991).

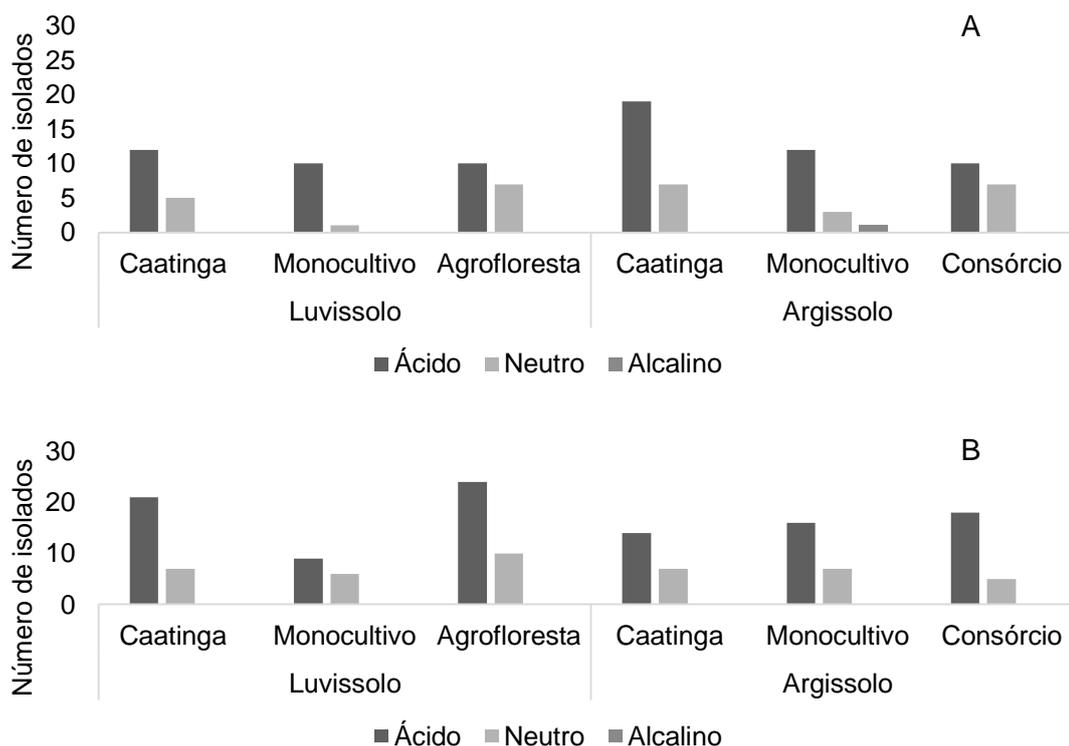
A característica de alta produção de muco (exopolissacarídeos) vem sendo descrita por vários autores como um mecanismo envolvido no processo de adaptação e sobrevivência dos rizóbios em distintas condições edafoclimáticas (FREITAS et al., 2007), como por exemplo, condições de temperatura elevada (SILVA et al., 2007). A grande capacidade de produção de muco nos isolados de sabiá (92%) e leucena (90%) pode estar relacionada a estresse ambiental, possibilitando a sobrevivência nos solos dos quais foram isolados (Figura 5).



**Figura 5.** Distribuição de isolados de nódulos de duas leguminosas arbóreas em função da produção de muco (exopolissacarídeos). (A) sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) e (B) leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.)

Com base na alteração do pH, os isolados foram classificados como de reação ácida, neutra ou alcalina. Observou-se que as duas leguminosas foram noduladas por isolados com os três diferentes tipos de reação. Contudo, a maioria acidificou o meio, totalizando 70% dos isolados de sabiá e 71% de leucena (Figura 6).

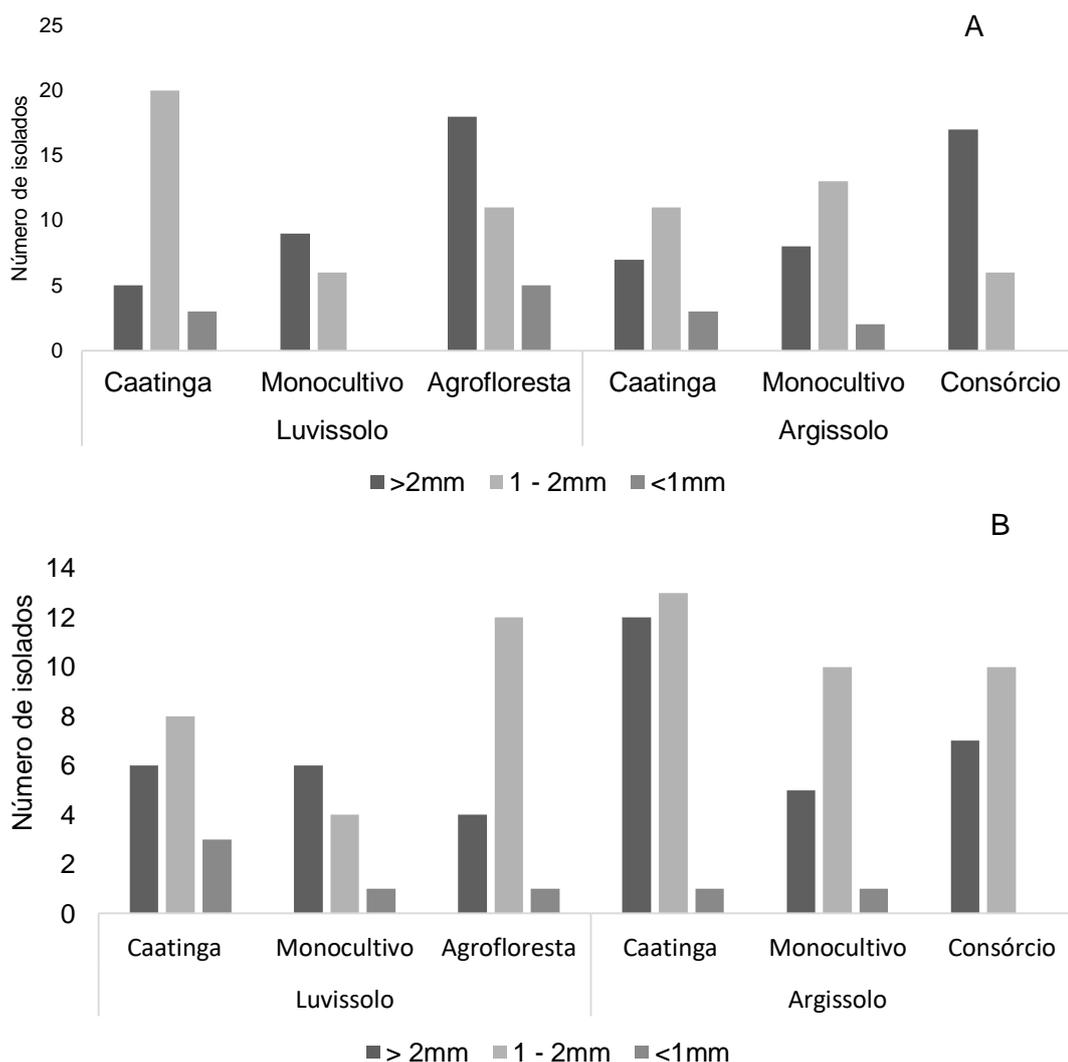
A acidificação do meio YMA de isolados rizobianos de nódulos de *Mimosa* spp. tem sido relatada na literatura. Saturno e Andrade (2015) observaram que 61% dos isolados de *Mimosa scabellia* obtidos de diferentes sistemas de uso da terra no Paraná acidificam o meio YMA. Para esta mesma espécie, Brocardo et al. (2015) verificaram resultados semelhantes. Freitas et al. (2014) caracterizaram rizóbios de *Mimosa tenuiflora* e *Mimosa paraibana* em solos sob vegetação de caatinga e constataram que os isolados obtidos, em sua maioria, apresentam reação ácida.



**Figura 6.** Distribuição de isolados de nódulos de duas leguminosas arbóreas em função da alteração do pH em meio YMA. (A) sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) e (B) leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.)

Há relatos na literatura da acidificação do meio YMA por rizóbios que nodulam *L. leucocephala* por Shetta, Al-Shaharani e Abdel-Aal (2011) na região de Riyadh na Arábia Saudita e por Nascimento (2013) com rizóbios de leucena capturados de diferentes coberturas vegetais no Semiárido brasileiro.

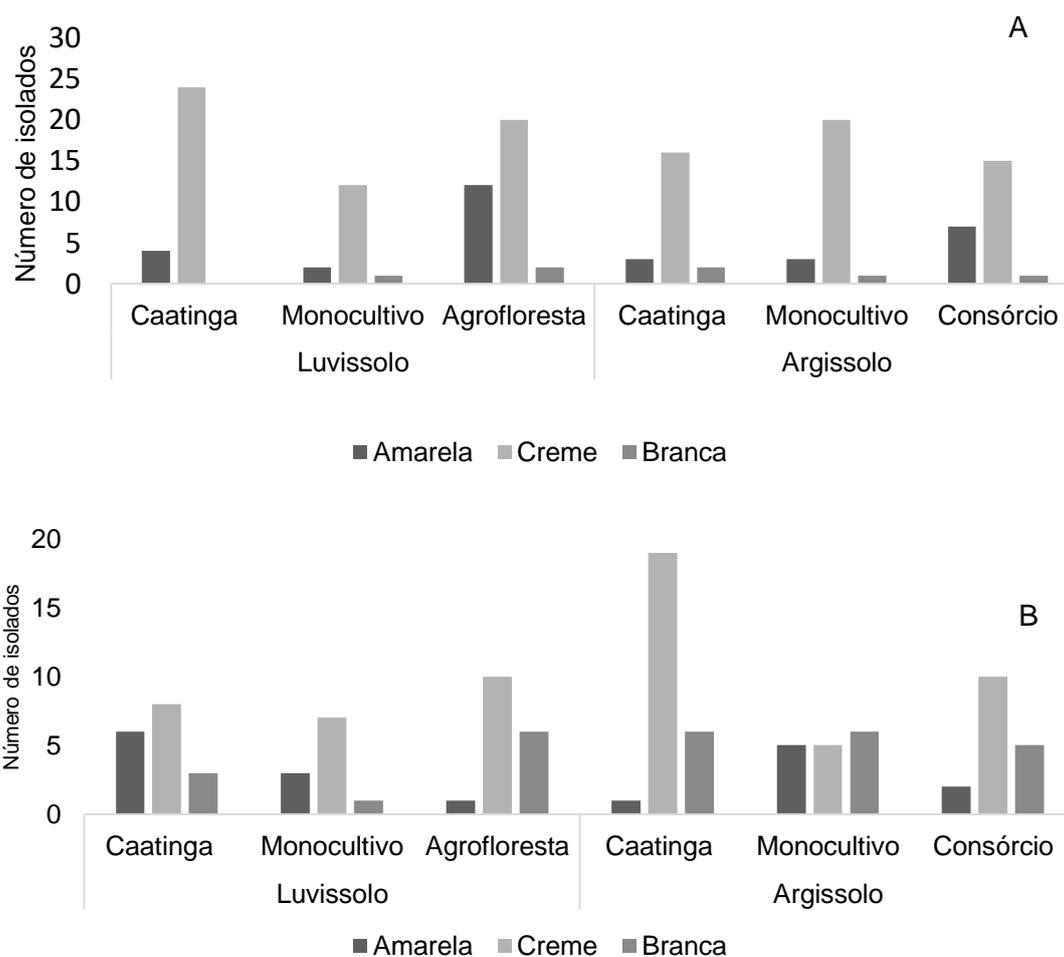
Para o sabiá, quanto ao tamanho das colônias, 7 isolados (6,7 %) apresentaram colônias com diâmetro inferior a 1 mm, 57 isolados (54,8%) entre 1 e 2 mm e 40 isolados (38,5%) com diâmetro superior a 2 mm. Os isolados de leucena, em sua maioria (67 isolados), apresentaram diâmetro das colônias entre 1 e 2 mm, 64 acima de 2 mm e 13 isolados com colônias inferiores a 1 mm (Figura 7). As colônias de rizóbios muito pequenas, com diâmetro inferior a 1,0 mm, são classificadas como puntiformes e estão comumente associadas às bactérias que apresentam superfície seca e que não produzem muco. Colônias com diâmetro entre 1 a 2 mm tem sido relatada como as que aparecem com mais frequência (SANTOS et al., 2007).



**Figura 7.** Distribuição de isolados de nódulos de duas leguminosas arbóreas em função do diâmetro da colônia em meio YMA. (A) sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) e (B) leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.)

Segundo Howieson e Dilworth (2016), os rizóbios podem desenvolver colônias de cor branca, creme, amarela e rósea. Conforme se observa na Figura 8, os isolados de sabiá e leucena desenvolveram cores branca, amarela e creme, não apresentando nenhum isolado a coloração rósea. Dos isolados de sabiá, 17% dos isolados apresentaram coloração amarela, 57% creme e 26% brancas. Em leucena, 21% isolados desenvolveram colônias amarelas, 74% cremes e 5% brancas.

No que se refere a forma e aparência das colônias nos isolados de Sabiá foi observado que a maioria tinha forma circular (86%) e aparência heterogênea (64%). Em leucena, 46% apresentam forma irregular e 31% com aparência homogênea.



**Figura 8.** Distribuição de isolados de nódulos de duas leguminosas arbóreas em função da cor de suas colônias nos diferentes sistemas de uso da terra. (A) sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) e (B) leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.)

#### 4.3.4 Avaliação da diversidade

A partir da caracterização fenotípica, os isolados foram agrupados pelas seguintes características: reação de pH, tempo de crescimento, diâmetro, cor da colônia e produção de muco. Esta classificação permitiu a formação em média de 3,25 (caatinga); 3,50 (agrofloresta) e 4,00 (monocultivo) grupos de isolados de sabiá no Luvissole. Para a mesma espécie, quando cultivada em Argissolo, verificou-se a formação de 4,00; 3,75 e 3,25 grupos para os sistemas de caatinga, consórcio e monocultivo, respectivamente. Em leucena cultivada no Luvissole, foram formados 4,75 grupos em monocultivo, 4,00 na caatinga e 5,25 na agrofloresta. O cultivo desta espécie no Argissolo permitiu a obtenção de 4,00 (consórcio); 3,75 (monocultivo) e 4,50 (caatinga) grupos (Tabela 6).

Na Tabela 6 estão apresentados o número de isolados, número de grupos, e os índices de diversidade de Shannon – Weaver ( $H'$ ), Riqueza de Margalef, equitabilidade de Pielou ( $J$ ) e Dominância de Simpson. Verificou-se para os isolados das duas leguminosas estudadas, nos solos amostrados tanto sob caatinga quanto nos cultivados, semelhanças na riqueza, dominância, abundância e uniformidade (Tabela 6). Tais resultados demonstram a capacidade dos solos amostrados em manter o grupo funcional sob condições de mudanças de manejo, sugerindo estabilidade quanto à fixação de  $N_2$ .

Por meio dos índices de Shannon e Weaver, verificou-se baixa diversidade de grupos morfológicos quando comparados com conduzidos na Zona da Mata de Pernambuco (CALHEIROS, 2012; SANTOS et al., 2017), o que possivelmente está relacionado às características particulares da região Semiárida, em proporcionar a sua biodiversidade, condições de constante estresse, seja de temperatura ou de baixa precipitação pluvial. Estas condições podem afetar a sobrevivência dos rizóbios nestes locais e é possível que a baixa diversidade observada seja uma indicação de que populações rizobianas estão sendo selecionadas em decorrência dos estresses ambientais que estão submetidas.

Os resultados de diversos trabalhos relacionados com mudanças no sistema de uso de terra têm demonstrado que não se podem fazer generalizações sobre as respostas dos micro-organismos do solo às alterações de uso, uma vez que, dependendo da situação, a mudança pode ter efeito prejudicial, não exercer nenhum efeito ou até mesmo ser benéfico à diversidade (JESUS et al., 2005; CALHEIROS, 2012; NASCIMENTO, 2013; SANTOS et al., 2017).

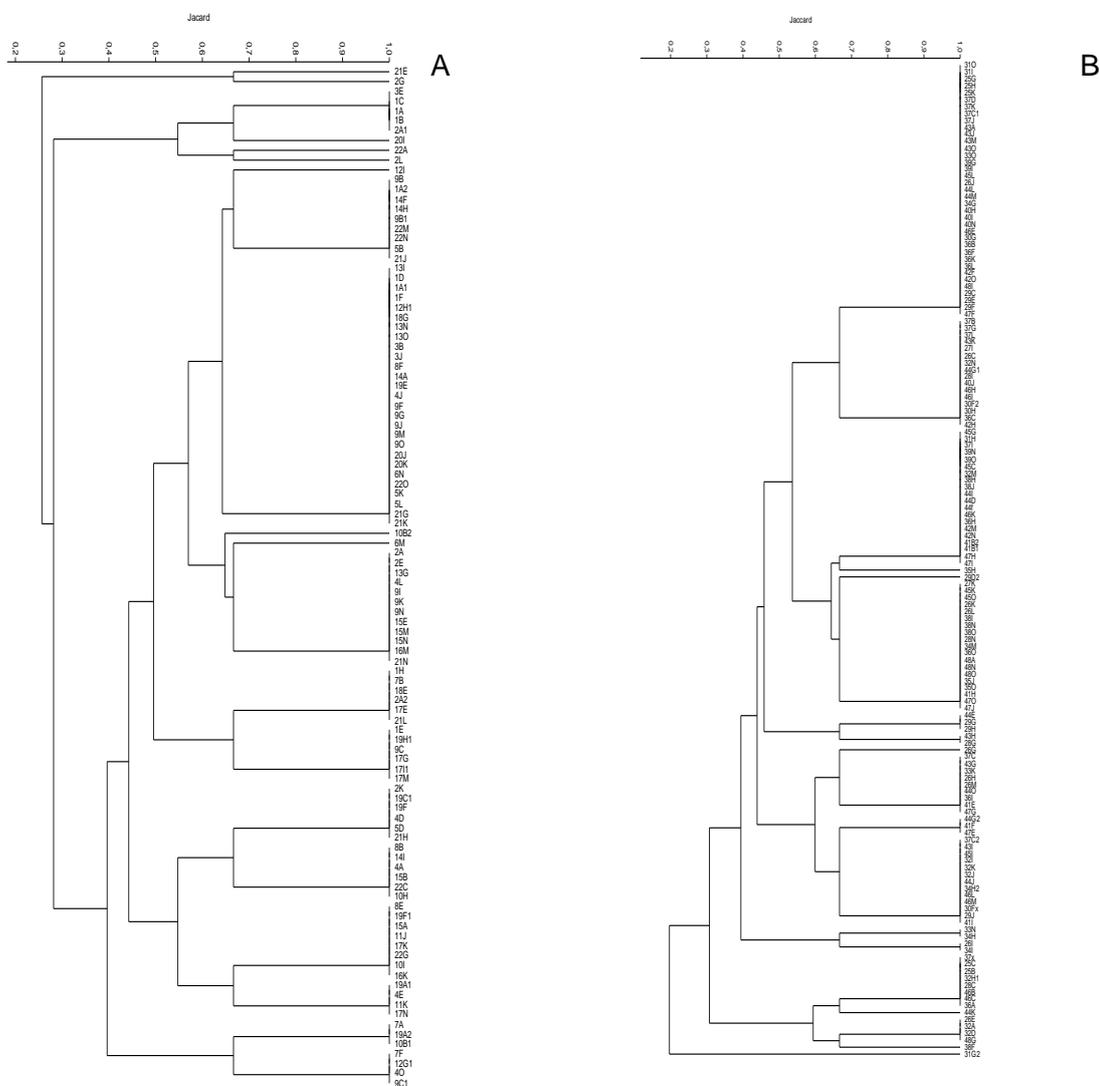
Jesus et al. (2005), em estudo conduzido em diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia, demonstraram que as comunidades rizobianas das áreas de pastagem e de agricultura estavam entre as que apresentaram maior diversidade de bactérias que nodulam *siratro* sugerindo, assim, que a conversão do sistema de uso da terra não compromete a diversidade para aquelas condições. Os autores justificaram os resultados pelo fato das áreas supracitadas serem circundadas, na paisagem, por extensas manchas de florestas, que devem servir como fonte de inóculo para colonização de áreas previamente desmatadas.

**Tabela 6.** Número de grupos, índices de dominância de Simpson, diversidade de Shannon, riqueza de Margalef e equitabilidade de Pielou de bactérias isoladas de nódulos de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) e leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.) cultivadas em amostras de solos provenientes de diferentes sistemas de uso da terra no Semiárido brasileiro

Variáveis	Sistema de uso da terra					
	Luvissole			Argissolo		
	Caatinga	Agrofloresta	Monocultivo	Caatinga	Consórcio	Monocultivo
	-----Sabiá-----					
Número de Grupos	3,25 ± 2,00	3,50 ± 2,73	4,00 ± 1,84	4,00 ± 2,91	3,75 ± 2,72	3,25 ± 2,39
Simpson	0,35 ± 0,16	0,36 ± 0,24	0,40 ± 0,31	0,36 ± 0,27	0,33 ± 0,22	0,39 ± 0,22
Shannon	1,09 ± 0,50	1,13 ± 0,73	1,16 ± 0,84	1,20 ± 0,80	1,22 ± 0,72	1,05 ± 0,68
Margalef	1,73 ± 0,30	1,69 ± 1,11	1,65 ± 1,31	1,64 ± 1,30	1,90 ± 0,89	1,70 ± 0,59
Pielou	0,98 ± 0,07	0,96 ± 0,06	0,89 ± 0,12	0,92 ± 0,09	0,98 ± 0,04	0,97 ± 0,08
	-----Leucena-----					
Número de Grupos	4,00 ± 2,91	5,25 ± 2,72	4,75 ± 4,18	2,75 ± 1,52	4,00 ± 2,25	3,75 ± 2,39
Simpson	0,35 ± 0,16	0,24 ± 0,17	0,31 ± 0,26	0,33 ± 0,25	0,23 ± 0,18	0,36 ± 0,12
Shannon	1,17 ± 0,64	1,59 ± 0,70	1,35 ± 0,95	1,26 ± 0,69	1,73 ± 1,15	1,16 ± 0,46
Margalef	1,52 ± 1,06	2,17 ± 1,31	2,06 ± 1,49	1,41 ± 0,78	1,69 ± 0,69	1,55 ± 0,78
Pielou	0,92 ± 0,08	0,94 ± 0,04	0,95 ± 0,08	0,99 ± 0,03	0,94 ± 0,04	0,91 ± 0,07

X ± Y, onde X = Médias e Y = Intervalo de confiança.

O agrupamento por espécie, sem levar em consideração o sistema de uso da terra permitiu, com 100% de similaridade, a formação de 20 grupos de isolados bacterianos de nódulos de sabiá, e 19 para leucena (Figura 9). Representantes destes grupos tiveram seu gene 16S rRNA amplificado e sequenciado.



**Figura 9.** Dendrograma das características fenotípicas de isolados de nódulos de duas leguminosas arbóreas que amplificaram fragmentos de genes simbióticos (A). *Mimosa caesalpinifolia* Benth., (B) *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit

#### 4.3.5 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e análises filogenéticas

A similaridade entre as bactérias avaliadas no sequenciamento do gene 16S rRNA e as depositadas no GenBank variou entre 92 e 99%. Entre as de leucena foram identificadas bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer/*

*Sinorhizobium* e *Burkholderia*, sendo a maioria pertencente ao gênero *Ensifer*. Em sabiá foram identificados rizóbios do gênero *Burkholderia* (Tabela 7 e 8).

Foi evidenciado que os isolados de leucena são na maioria pertencentes dos grupos das  $\alpha$ - proteobactérias. Essa preferência da leucena em nodular com gêneros de  $\alpha$ -rizóbios, tem sido evidenciada na literatura pela nodulação com bactérias dos gêneros *Rhizobium* (PEREYRA et al., 2015), *Mesorhizobium* (RANGEL et al., 2016), *Sinorhizobium* (XU et al., 2013), *Bradyrhizobium* (WANG et al., 1999). Para sabiá, foram confirmados os resultados de Reis Junior et al. (2010) e Martins et al. (2015) que demonstraram a preferência pela nodulação com  $\beta$ -rizóbios do gênero *Burkholderia*.

As árvores filogenéticas construídas a partir das sequências parciais do gene 16S rRNA dos 20 isolados de sabiá e 19 de leucena, encontram-se na Figura 11. Dos rizóbios de leucena, o isolado 36A apresentou agrupamento com *Rhizobium*, O 26G com *Mesorhizobium*, o 29D2 e 38F com *Burkholderia*. Das bactérias de nódulos de sabiá, os isolados 1D, 2G e 14I agruparam com *Burkholderia*. Vale ressaltar que a maioria dos isolados apresentaram similaridade baixa com as sequências depositadas no GenBank, e formaram grupos isolados. Estes resultados podem indicar que estas bactérias podem pertencer a novas espécies de rizóbios, contudo estudos mais refinados, como a análise de sequência de Multilocus (DELAMUTA et al., 2012), devem ser realizados para confirmar esta hipótese.

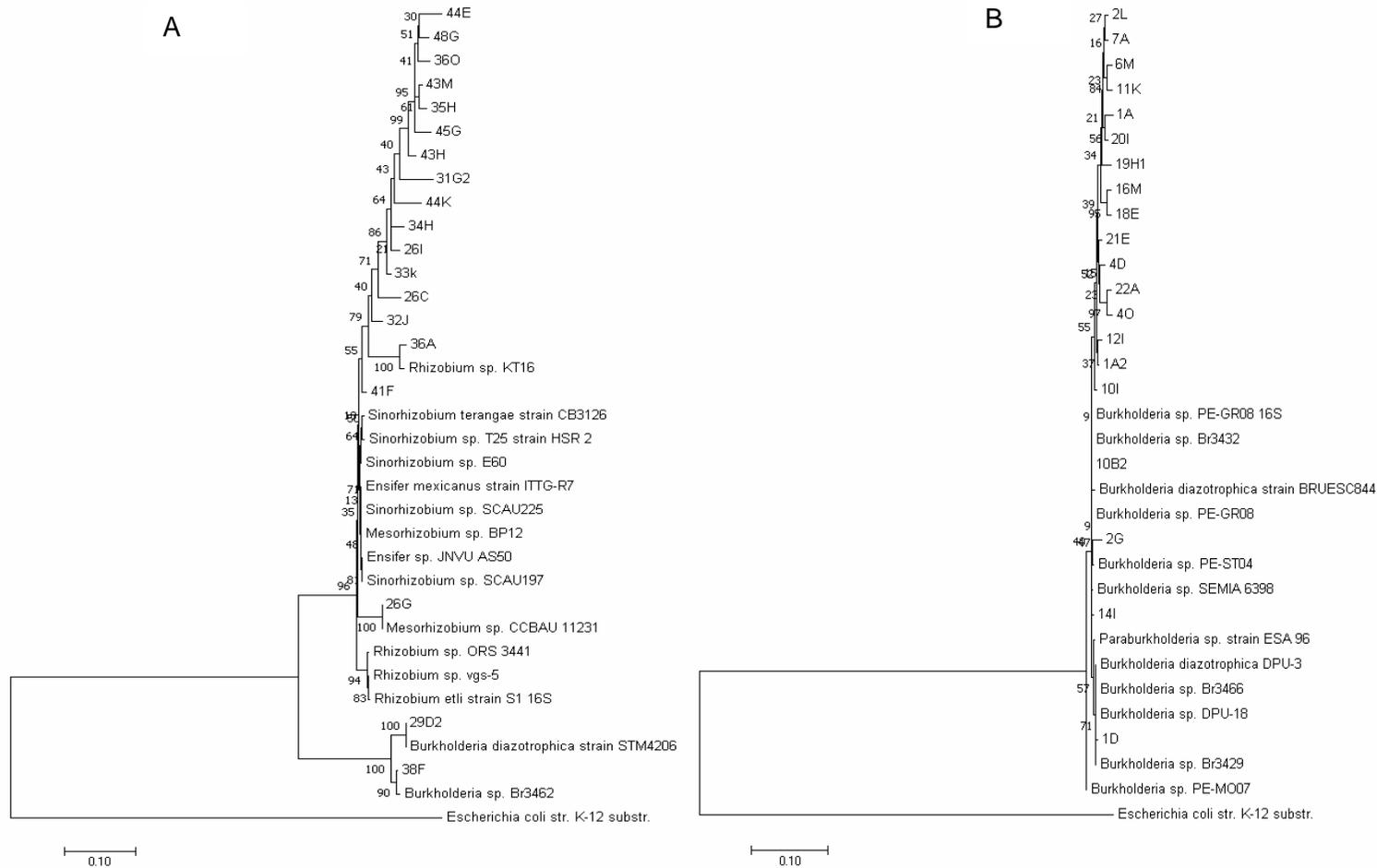
A maior tendência da leucena em reconhecer uma quantidade maior de gêneros de bactérias, é uma característica desejável em ambientes limitados, como a região semiárida. De acordo com Santos et al. (2007) a maior faixa hospedeira, pode possibilitar maiores benefícios da fixação simbiótica do  $N_2$ . Entretanto, pode acontecer de a simbiose ser compatível, mas ineficiente. Assim, junto com estudos de caracterização e diversidade, se faz necessária a investigação da eficiência simbiótica dos rizóbios nativos, pois constituem etapas fundamentais na seleção de estirpes eficientes para uso biotecnológico, em especial em ecossistemas naturais e agrícolas onde o aporte de tecnologias é baixo, como os usados pela agricultura familiar no Nordeste.

**Tabela 7.** Resultados da pesquisa de similaridade no GenBank com o programa Blast de 20 isolados de nódulos de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) cultivados em solos do Semiárido brasileiro sob diferentes usos da terra

Isolado	Local	Solo	Uso da terra	Acesso	NCBI	Similaridade (%)
21E	Belo Jardim	Argissolo	Consórcio	JN622132.1	<i>Burkholderia</i> sp. PE-GR08	97
2G	Serra Talhada	Luvissolo	Monocultivo	JN622118.1	<i>Burkholderia</i> sp. PE-ST04	95
1A1	Serra Talhada	Luvissolo	Caatinga	JN622118.1	<i>Burkholderia</i> sp. PE-ST04	97
20I	Belo Jardim	Argissolo	Caatinga	AY773188.1	<i>Burkholderia</i> sp. Br3432	95
22A	Belo Jardim	Argissolo	Monocultivo	AY904782	<i>Burkholderia</i> sp. SEMIA 6398	97
2L	Serra Talhada	Luvissolo	Monocultivo	JN622113.1	<i>Burkholderia</i> sp. PE-MO07	95
12I	Serra Talhada	Luvissolo	Caatinga	AY773188.1	<i>Burkholderia</i> sp. Br3432	97
1A2	Serra Talhada	Luvissolo	Caatinga	JN622132.1	<i>Burkholderia</i> sp. PE-GR08	98
1D	Serra Talhada	Luvissolo	Caatinga	EU287925.1	<i>Burkholderia diazotrophica</i> strain DPU-3	98
10B2	Belo Jardim	Argissolo	Consórcio	JN622132.1	<i>Burkholderia</i> sp. PE-GR08 16S	97
6M	Belo Jardim	Argissolo	Monocultivo	AY773188.1	<i>Burkholderia</i> sp. Br3432	98
16M	Belo Jardim	Argissolo	Consórcio	AY773195	<i>Burkholderia</i> sp. Br3466	94
18E	Serra Talhada	Luvissolo	Caatinga	EU294394	<i>Burkholderia</i> sp. DPU-18	97
19H1	Serra Talhada	Luvissolo	Agrofloresta	AY904782	<i>Burkholderia</i> sp. SEMIA 6398	97
4D	Belo Jardim	Argissolo	Agrofloresta	AY904782	<i>Burkholderia</i> sp. SEMIA 6398	96
14I	Serra Talhada	Luvissolo	Agrofloresta	JN622118.1	<i>Burkholderia</i> sp. PE-ST04	97
10I	Belo Jardim	Argissolo	Consórcio	AY773188.1	<i>Burkholderia</i> sp. Br3432	96
11K	Belo Jardim	Argissolo	Monocultivo	JN622132.1	<i>Burkholderia</i> sp. PE-GR08	96
7A	Serra Talhada	Luvissolo	Caatinga	JN622118.1	<i>Burkholderia</i> sp. PE-ST04	97
9C1	Belo Jardim	Argissolo	Caatinga	AY773188.1	<i>Burkholderia</i> sp. Br3432	96

**Tabela 8.** Resultados da pesquisa de similaridade no GenBank com o programa Blast de 19 isolados de nódulos de leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.) cultivados em solos do Semiárido brasileiro sob diferentes usos da terra

Isolado	Local	Solo	Uso da terra	Acesso	NCBI	Similaridade (%)
43M	Serra Talhada	Luvissolo	Caatinga	NR_115768.1	<i>Ensifer mexicanus</i> strain ITTG-R7	96
26C	Serra Talhada	Luvissolo	Agrofloresta	AF510388.1	<i>Rhizobium</i> sp. vgs-5	95
45G	Serra Talhada	Luvissolo	Monocultivo	KC759693.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. BP12	92
35H	Belo Jardim	Argissolo	Consórcio	NR_115768.1	<i>Ensifer mexicanus</i> strain ITTG-R7	94
29D2	Belo Jardim	Argissolo	Consórcio	FN908402.1	<i>Burkholderia diazotrophica</i>	98
36O	Belo Jardim	Argissolo	Monocultivo	KJ911896.1	<i>Ensifer</i> sp. JNVU AS50	95
44E	Serra Talhada	Luvissolo	Agrofloresta	NR_115768.1	<i>Ensifer mexicanus</i> strain ITTG-R7	96
43H	Serra Talhada	Luvissolo	Caatinga	JF330105.1	<i>Sinorhizobium</i> sp. SCAU213 16S	95
26G	Serra Talhada	Luvissolo	Agrofloresta	EU130444.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. CCBAU 11231	97
33K	Serra Talhada	Luvissolo	Monocultivo	NR_115768.1	<i>Ensifer mexicanus</i> strain ITTG-R7	95
41F	Belo Jardim	Argissolo	Consórcio	JF330104.1	<i>Sinorhizobium</i> sp. SCAU197	97
32J	Serra Talhada	Luvissolo	Agrofloresta	NR_115768.1	<i>Ensifer mexicanus</i> strain ITTG-R7	93
34H	Belo Jardim	Argissolo	Caatinga	NR_115768.1	<i>Ensifer mexicanus</i> strain ITTG-R7	93
26I	Serra Talhada	Luvissolo	Agrofloresta	KJ128392.1	<i>Sinorhizobium terangae</i> strain CB3126	99
36A	Belo Jardim	Argissolo	Monocultivo	KJ734007.1	<i>Rhizobium</i> sp. KT16	96
44K	Serra Talhada	Luvissolo	Agrofloresta	NR_115768.1	<i>Ensifer mexicanus</i> strain ITTG-R7	94
48G	Belo Jardim	Argissolo	Monocultivo	NR_115768.1	<i>Ensifer mexicanus</i> strain ITTG-R7	93
38F	Serra Talhada	Luvissolo	Agrofloresta	KJ128392.1	<i>Sinorhizobium terangae</i> strain CB3126	99
31G2	Serra Talhada	Luvissolo	Caatinga	NR_115768.1	<i>Ensifer mexicanus</i> strain ITTG-R7	93



**Figura 10.** Árvore filogenética construída a partir das sequências parciais do gene 16S rRNA dos isolados bacterianos de (A) leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit.) e (B) sabiá (*Mimosa caesalpinhiifolia* Benth.), e outras sequências de estirpes de rizóbios disponíveis no GenBank.

#### 4.4 Conclusões

Independentemente do sistema de uso da terra, a maioria dos isolados bacterianos de nódulos de sabiá e leucena em solos do semiárido apresentam crescimento rápido e reação ácida.

Os sistemas de uso da terra não influenciaram os índices diversidade, riqueza, dominância, equitabilidade e a frequência de isolados que amplificam fragmentos de genes simbióticos.

Nos sistemas de uso estudados, a leucena nodulou predominantemente com  $\alpha$ -rizóbios dos gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer*. Em sabiá a nodulação foi promovida por  $\beta$ -rizóbios do gênero *Burkholderia*.

## Referências

- ARAÚJO, K. S.; CARVALHO, F. D.; MOREIRA, F. M. S. *Bukholderia* strains promote *Mimosa* spp. growth but not *Macropitium atropurpureum*. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 48, n. 1, p. 41-48, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20170005>>.
- BALA, A.; MURPHY, P. J.; OSUNDE, A. O.; GILLER, K. E. Nodulation of tree legumes and the ecology of their native rhizobial populations in tropical soils. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 211-223, 2003. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(02\)00157-9](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(02)00157-9)>.
- BEUCHLE, R.; GRECCHI, R. C.; SHIMABUKURO, Y. E.; SELIGER, R.; EVA, H. D.; SANO, E.; ACHARD, F. Land cover changes in the Brazilian Cerrado and Caatinga biomes from 1990 to 2010 based on a systematic remote sensing sampling approach. **Applied Geography**, Kennesaw, v. 8, n. 1, p. 116-127, 2015. Disponível em: <[dx.doi.org/10.1016/j.apgeog.2015.01.017](http://dx.doi.org/10.1016/j.apgeog.2015.01.017)>.
- BOAKYE, E. Y.; LAWSON, I. Y. D.; DANSO, S. K. A. Characterization and diversity of rhizobia nodulating selected tree legumes in Ghana. **Symbiosis**, v. 69, n. 1, p. 89-99, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13199-016-0383-1>>.
- BRASILEIRO, R. S. Alternativas de desenvolvimento sustentável no semiárido nordestino: da degradação à conservação. **Scientia Plena**, Aracaju, v. 5, n. 5, p. 1-12, 2009.
- BROCADO, N. C. M. E.; STOCCO, P.; TRAMONTIN, A. L.; OLIVEIRA FILHO, L. C. I.; SANTOS, J. C. P. Diversidade cultural, morfológica e genética de diazotróficos isolados de nódulos de bracatinga. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 39, n. 5, p. 923-933, 2015.
- BUAINAIN, A. M.; GARCIA, J. R. Desenvolvimento rural do semiárido brasileiro: transformações recentes, desafios e perspectivas. **Confins Revue Franco-Brésilienne de Géographie**, Brasília, v. 19, n. 1, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.4000/confins.8633>>.
- CALHEIROS, A. S. **Diversidade e eficiência de isolados rizobianos para Calopogônio (*Calopogonium mucunoides*) originados de um argissolo sob diferentes coberturas vegetais**. 2012. 116f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.
- CHAER, G. M.; RESENDE, A. S.; CAMPELLO, E. F. C.; DE FARIA, S. M.; BODDEY, R. M. Nitrogen-fixing legume tree species for the reclamation of severely degraded lands in Brazil. **Tree Physiology**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 139-149, 2011. Disponível em: <<http://doi:10.1093/treephys/tpq116>>.

DALL'AGNOL, R. F.; BOURNAUD, C.; FARIA, S. M.; BÉNA, G.; MOULIN, L., HUNGRIA, M. Genetic diversity of symbiotic *Paraburkholderia* species isolated from nodules of *Mimosa pudica* (L.) and *Phaseolus vulgaris* (L.) grown in soils of the Brazilian Atlantic Forest (Mata Atlântica). **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 93, n. 4, p. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/femsec/fix027>>.

DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; MENNA, P.; BANGEL, E. V.; HUNGRIA, M. Multilocus sequence analysis (MLSA) of *Bradyrhizobium* strains: revealing high diversity of tropical diazotrophic symbiotic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 698-710, 2012.

DHAESE, P.; GREVE, H.; DECRAEMER, H.; SCHELL, J.; VAN MONTAGN, M. Rapid mapping of transposon insertion and deletion mutations in the large Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.7, p. 1837-1849, 1979.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de métodos de análises de solo**. 2.ed. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997. 212p.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília, DF: Embrapa Solos, 2013. 353 p.

FERNANDES JÚNIOR, P. I.; MORGANTE, C. V.; GAVA, C. A. T.; SANTOS, C. A. F.; CUNHA, J. B. A.; MARTINS, L. M. V. **Duplex PCR para a amplificação simultânea de fragmentos dos genes *nifH* e *nodC* em bactérias isoladas de nódulos de leguminosas**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2013. 6p. (Embrapa Semiárido, Comunicado Técnico).

FLORENTINO, L. A.; GUIMARÃES, A. P.; RUFINI, M., SILVA, K. D.; MOREIRA, F. M. D. S. *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 5, p. 667-676, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162009000500012>>.

FREITAS, A. D. S.; BORGES, W. L.; ANDRADE, M. M. M; SAMPAIO, E. V. S. B.; SANTOS, C. E. R. S; PASSOS, S. R.; XAVIER, G. R.; MULATO, B. M.; LYRA, M. C. C. P. Characteristics of nodule bacteria from *Mimosa* spp grown in soils of the Brazilian semiarid region. **African Journal of Microbiology Research**, Abuja, v. 8, n. 8, p. 788-796, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.5897/AJMR2013.6518>>

FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, C. L.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; LYRA, M. C. C. P. Caracterização de rizóbios isolados de Jacatupé cultivado em solo salino do estado de Pernambuco, Brasil. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 3, p.497-504, 2007.

FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SANTOS, C. E. R. S; FERNANDES, A. R. Biological nitrogen fixation in legume trees of the Brazilian caatinga. **Journal of Arid Environments**, Exeter, v. 74, n. 3, p. 344-349, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaridenv.2009.09.018>>.

FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SANTOS, C. E. R. S.; SILVA, A. F.; CARVALHO, R. Fixação biológica de nitrogênio no Semiárido Brasileiro. **Revista Brasileira de Geografia e Física**, Recife, v.8, p. 585-597, 2015.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, Amherst, v. 4. n. 1, p. 1-9, 2001.

HOWIESON, J. G., DILWORTH, M. J. **Working with rhizobia**. Canberra, Australian Centre for International Agricultural Research, 2016, 314 p.

JESUS, E. C.; MOREIRA, F. M. S.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. I. D.; OLIVEIRA, M. S. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 8, p.769-776, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2005000800006>>

LAGUERRE, G.; NOUR, S. M.; MACHERET, V.; SANJUAN, J.; DROUIN, P.; AMARGER, N. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. **Microbiology**, London, v. 147, n. 4, p. 981-993, 2001. Disponível em: <<http://doi:10.1099/00221287-147-4-981>>.

LIMA, K. D. R.; CHAER, G. M.; ROWS, J. R. C.; MENDONÇA, V.; RESENDE, A. S. Seleção de espécies arbóreas para revegetação de áreas degradadas por mineração de piçarra na caatinga. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 28, n. 1, p. 203-213, 2015.

MACEDO, M. O.; RESENDE, A. S.; GARCIA, P. C.; BODDEY, R. M., JANTALIA, C. P.; URQUIAGA, S.; FRANCO, A. A. Changes in soil C and N stocks and nutrient dynamics 13 years after recovery of degraded land using leguminous nitrogen-fixing trees. **Forest Ecology and Management**, New York, v. 255, n. 5, 2008. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.foreco.2007.11.007>>.

MACHADO, R. G.; SÁ, E. L. S.; OLDRA, S.; COSTA, M. D.; AGNOL, G. D.; SANTOS, N. D. S.; SILVA, W. R. Rhizobia isolation and selection for serradella (*Ornithopus micranthus*) in Southern Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, Abuja, v. 10, n. 45, p. 1894-1907, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5897/AJMR2016.8327>>.

MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. **Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de “rizóbio”**. Seropédica, EMBRAPA: CNPAB, 1997. 14p. (Embrapa-CNPAB. Comunicado Técnico, 19).

MARTINS, P. G. S.; LIRA JUNIOR, M. A.; FRACETTO, G. G. M; SILVA, M. L. R. B.; VINCENTIN, R. P. *Mimosa caesalpiniiifolia* rhizobial isolates from different origins of the Brazilian Northeast. **Archives of Microbiology**, Amsterdam, v. 197, n. 3, p. 459-469, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00203-014-1078-8>>.

MENEZES, K. A. S. **Caracterização fenotípica de bactérias isoladas de nódulos de leguminosas arbóreas cultivadas em solos do Semiárido**. 2013. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) – Universidade do Estado da Bahia, Juazeiro, 2013.

NASCIMENTO, L. S. R. **Diversidade de isolados bacterianos e sua influência na FBN em diferentes coberturas vegetais**. 2013. 109f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2013.

PAULO, P. F. M.; ANDRADE, A. P.; SILVA, D. S.; SOUZA, A. P.; DA SILVA, I. D. F.; SILVA, L. D. A. F.; RIBEIRO, A. B. Isolamento e Caracterização de Estirpes de Rizóbios da Leguminosa Jurema Branca (*Mimosa artemisiana*), Espécie de Potencial Forrageiro no Semiárido. **Revista Científica de Produção Animal**, Areia, v. 14, n. 2, p. 158-160, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/DOI:10.15528/2176-4158/rcpa.v14n2p158-160>>.

PEREYRA, G.; HARTMANN, H.; MICHALZIK, B.; ZIEGLER, W.; TRUMBORE, S. Influence of rhizobia inoculation on biomass gain and tissue nitrogen content of *Leucaena leucocephala* seedlings under drought. **Forests**, Basel, v. 6, n. 10, p. 3686-3703, 2015. Disponível em: <[doi:10.3390/f6103686](https://doi.org/10.3390/f6103686)>.

POLY, F.; MONROZIER, L. J.; BALLY, R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 152, n. 3, p. 95-103, 2001.

RANGEL, W. M.; THIJS, S.; MOREIRA, F. M. S.; WEYENS, N.; VANGRONSVELD, J.; VAN HAMME, J. D.; BOTTOS, E. M.; RINEAU, F. Draft genome sequence of *Mesorhizobium* sp. UFLA 01-765, a multitolerant, efficient symbiont and plant growth-promoting Strain Isolated from Zn-mining soil using *Leucaena leucocephala* as a trap plant. **Genome Announcements**, Washington, v. 4, n. 2, 2016. Disponível em: <[doi:10.1128/genomeA.00050-16](https://doi.org/10.1128/genomeA.00050-16)>.

REIS JUNIOR, F. B.; SIMON, M. F.; GROSS, E.; BODDEY, R. M.; ELLIOTT, G. N.; NETO, N. E.; LOUREIRO, F. M.; QUEIROZ, L. P.; SCOTTI, M. R.; CHEN, W. M.; NORÉN, A.; RUBIO, M. C.; FARIA, S. M.; BONTEMPS, C.; GOI, S. R.; YOUNG, J. P. W.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. **New Phytologist**, Lancaster, v. 186, n. 4, p. 934-946, 2010. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03267.x>>.

RESENDE, A. S.; CHAER, G. M.; CAMPELLO, E. F. C.; SILVA, A. P.; LIMA, K. D. R.; CURCIO, G. R. Uso de leguminosas arbóreas na recuperação de áreas degradadas. **Tópicos em Ciência do Solo**, Viçosa, v. 8, p. 71-92, 2013.

RODRIGUES, D. R. **Diversidade e eficiência em promoção do crescimento vegetal de bactérias de solos da Caatinga pernambucana oriundas de nódulos de leguminosas arbóreas nativas**. 2016. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.

SACRAMENTO, J. A. A. S. D.; ARAÚJO, A. C. D. M.; ESCOBAR, M. E. O.; XAVIER, F. A. D. S.; CAVALCANTE, A. C. R.; OLIVEIRA, T. S. D. Soil carbon and nitrogen stocks in traditional agricultural and agroforestry systems in the semiarid region of Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 37, n. 3, p. 784-795, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832013000300025>>.

SANTOS, C. E. R. E. S.; SILVA, V. S. G.; FREITAS, A. D. S.; SILVA, A. F.; BEZERRA, R. V.; LYRA, M. C. C. P.; FERREIRA, J. S. Prospecting of efficient rhizobia for peanut inoculation in a Planosol under different vegetation covers. **African Journal of Microbiology Research**, Abuja, v. 11, n. 4, p.123-131, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5897/AJMR2016.8355>>.

SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C. P.; RUNJANEK, N. G. L.; BORGES, W.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 2, n. 4, p. 249-256, 2007.

SATURNO, D. F.; ANDRADE, D. S. Diversidade de Rizóbios que Nodulam Bracatinga Isolado de Solos Cultivados e de Floresta. **Uniciências**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 26-30, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.17921/1415-5141.2015v19n1p%25p>>

SHETTA, N. D.; AL-SHAHARANI, T. S.; ABDEL-AAL, M. Identification and characterization of *Rhizobium* associated with woody legume trees grown under Saudi Arabia condition. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, Amman, v. 10, n. 3, p. 410-418, 2011.

SILVA, A. F. **Fixação biológica de nitrogênio em leguminosas nativas de áreas com diferentes tempos de regeneração da caatinga**. 2015. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2015.

SILVA, V. N.; SILVA, L. E. S. F.; FIGUEIREDO, M. V. B.; CARVALHO, F. G.; SILVA, M. L. R. B.; SILVA, A. J. N. Caracterização e seleção de populações nativas de rizóbios de solo da região semiárida de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiania, v. 37, n. 1, p. 16-21, 2007.

SOUZA, B. I.; MENEZES, R.; ARTIGAS, R. C. Desertification effects on the species composition of the Caatinga biome, Paraíba/Brazil. **Investigaciones Geográficas**, Alicante, v. 1, n. 88, p. 45-59, 2015. Disponível em: <[dx.doi.org/10.14350/ig.44092](http://dx.doi.org/10.14350/ig.44092)>.

STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S.; MEDEIROS, R.; FIGUEIREDO, M. V. B. Efeito de diferentes relações potássio magnésio no Jacatupé com inoculação com rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 20, n. 2, p. 49-54, 1996.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>>.

TAULÉ, C.; ZABALETA, M.; MAREQUE, C.; PLATERO, R.; SANJURJO, L.; SICARDI, M.; FRIONI, L.; BATTISTONI, F.; FABIANO, E. New betaproteobacterial rhizobium strains able to efficiently nodulate *Parapiptadenia rígida* (Benth.) Brenan. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 1, p. 1692-1700, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/AEM.06215-11>>.

TEIXEIRA, F. C. P.; BORGES, W. L.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Characterization of indigenous rhizobia from Caatinga. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo v. 41, n. 1, p. 201-208, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822010000100029>>.

VAN GESTEL, M.; LADD, J. N.; AMATO, M. Carbon and nitrogen mineralization from two soils of contrasting texture and microaggregate stability: influence of sequential fumigation, drying and storage. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford v. 23, n. 1, p.313-322, 1991. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0038-0717\(91\)90185-M](https://doi.org/10.1016/0038-0717(91)90185-M)>.

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

WANG, E. T.; ROMERO, J. M.; ROMERO, E. M. Genetic diversity of rhizobia from *Leucaena leucocephala* nodules in Mexican soils. **Molecular Ecology**, Austin, v. 8, n. 5, p. 711-724, 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-294X.1999.00608.x>>.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, n. 2, p.697–703, 1991.

XU, K. W.; PENTTINEM, P.; CHEN, Y. X.; CHEN, Q.; ZHANG, X. Symbiotic efficiency and phylogeny of the rhizobia isolated from *Leucaena leucocephala* in arid-hot river valley in Panxi, Sichuan, China. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 97, n. 2, p. 783-793, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/s00253-012-4246-2>>.



## **CAPÍTULO 03**

### **5 EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE RIZÓBIOS NATIVOS DE SOLOS DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO, SOB DIFERENTES USOS DA TERRA, PARA INOCULAÇÃO DE LEGUMINOSAS ARBÓREAS**

## Eficiência simbiótica de rizóbios nativos de solos do Semiárido brasileiro, sob diferentes usos da terra, para inoculação de leguminosas arbóreas

### Resumo

O manejo da fixação biológica de nitrogênio por meio da inoculação de rizóbios eficientes em leguminosas, pode elevar as quantidades de N<sub>2</sub> fixado, sendo uma importante estratégia para obtenção de nitrogênio em locais onde o aporte tecnológico é restrito. Assim, objetivou-se com o estudo caracterizar simbioticamente rizóbios nativos de solos (Argissolo e Luvisolo) do Semiárido brasileiro sob diferentes sistemas de uso: vegetação nativa (caatinga) e áreas com diferentes sistemas agrícolas (monocultivo e consórcio com várias espécies) e selecionar os isolados rizobianos mais eficientes em promover acúmulo de nitrogênio na biomassa aérea de *Mimosa caesalpinifolia* (Benth.) e *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.). Foram conduzidos dois experimentos em casa de vegetação (um para cada leguminosa) em delineamento de blocos casualizados, com três repetições, em vasos contendo substrato estéril (areia e vermiculita). Os tratamentos foram a) isolados nativos selecionados pela amplificação de fragmentos de genes simbióticos (104 para *M. caesalpinifolia* e 144 de *L. leucocephala*) b) uma estirpe recomendada para inoculação da leguminosa avaliada; c) um controle sem inoculação com rizóbios e sem adição de N; d) um controle sem rizóbios e com N-mineral. Os isolados foram classificados e agrupados de acordo com a eficiência em: <35% = ineficientes; 35–50% = pouco eficientes; 51-80% = eficientes; >80% = altamente eficientes. Verificou-se uma grande variação no potencial simbiótico dos rizóbios, evidenciado pela distribuição dos isolados em todas as classes de eficiência. Não se verificou efeito dos usos da terra na proporção de isolados eficientes. Os isolados altamente eficientes (ER > 80%), foram comparados entre si, com os controles e com a estirpe recomendada. Os isolados 25B, 26C, 36A, 36F, 43M, 45G, 45K e 46H de leucena e 1A, 1E, 4D, 6M e 7A de sabiá foram os mais eficientes, e tiveram o gene 16S do rRNA parcialmente sequenciado para determinar o posicionamento taxonômico. Ficou evidenciado que os isolados mais eficientes para leucena são pertencentes ao grupo dos  $\alpha$ -rizóbios com representantes dos gêneros *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, enquanto os isolados mais eficientes de sabiá tiveram maior similaridade com  $\beta$ -rizóbios do gênero *Burkholderia*.

Palavras-chaves: Agricultura sustentável. Fixação biológica de nitrogênio. Recuperação de áreas degradadas. Rizóbios nativos.

## Symbiotic efficiency of native rhizobia of Brazilian semi-arid soils, under different land uses, for inoculation of tree legumes

### Abstract

The management of biological nitrogen fixation by means of inoculation of efficient rhizobia in legumes can elevate as fixed N<sub>2</sub> values, being an important strategy to obtain nitrogen in places where the technological contribution is restricted. The objective of this study was to characterize symbiotically native rhizobia of soils (Argissolo and Luvisolo) of the Brazilian Semi-New under different systems of use: native vegetation (caatinga) and areas with different agricultural systems (monoculture and consortium and several species). A symbiotic efficacy for one evaluated by the inoculation of rhizobia in *Mimosa caesalpinifolia* (Benth.) and *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.) In order to select the most efficient for the inoculation of legumes. Two experiments were conducted in a greenhouse in a randomized block design, with three replications, in pots containing sterile substrate. The treatments were: a) native isolates selected by amplification of fragments of symbiotic genes (104 for *M. caesalpinifolia* and 144 of *L. leucocephala*) b) a recommended strain for inoculation of the evaluated legume; C) a control without inoculation with rhizobium and without addition of N; D) a control without rhizobia and with N-mineral (50 kg ha<sup>-1</sup> of N). The isolates were classified and grouped according to one station: <35% = inefficient; 35 - 50% = poorly efficient; 51-80% = efficient; > 80% = highly efficient. There was a great variation with no symbiotic potential among isolates 24 to 144%, evidenced by the distribution of these in all as efficiency classes. It is not possible to verify land use in the proportion of efficient isolates. The highly efficient isolates (ER> 80%) were compared to each other, with the controls and with the recommended strain. The isolates 25B, 26C, 36A, 36F, 43M, 45G, 45K and 46H of leucine and 1A, 1E, 4D, 6M and 7A of sage were the most efficient, presenting larger accumulations of N in the shoot, and had 16S rRNA gene partially sequenced to determine The taxonomic positioning. It was evidenced that the most efficient isolates for leucena belong to the group of genera with representatives of the genus *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, while the most efficient isolates of sage can be more similar to  $\beta$ -rhizobia of the genus *Burkholderia*.

Keywords: Sustainable agriculture. Biological nitrogen fixation. Land reclamation. Indigenous rhizobia.

## 5.1 Introdução

Na região Semiárida brasileira predominam sistemas agrícolas itinerantes, caracterizados por sucessivos ciclos de desmatamento da vegetação nativa, queima, cultivo e/ou superpastejo e abandono da área (MENEZES et al., 2012). Estas práticas, inseridas em solos que em sua maioria apresentam baixa disponibilidade de nitrogênio (N) e agricultores que praticamente não tem acesso a fertilizantes minerais (FREITAS et al., 2011), têm conduzido à degradação dos recursos naturais e a diminuição da fertilidade do solo (FRACETTO et al., 2012; SACRAMENTO et al., 2013).

O manejo da fixação biológica de nitrogênio (FBN), via introdução de leguminosas arbóreas, constitui uma opção para reduzir a degradação do solo e a fragilidade dos sistemas agrícolas e ecossistemas naturais da região (CHAER et al., 2011). Trabalhos têm demonstrado que, no Semiárido brasileiro, leguminosas arbóreas podem obter até mais da metade de seu N a partir da fixação biológica (FREITAS et al., 2010; NASCIMENTO, 2013) e, portanto, podem prover quantidades de N relevantes para os sistemas, diminuindo a necessidade de aplicação de fertilizantes nitrogenados, frequentemente o mais caro entre os fertilizantes comerciais (MARTINS et al., 2015a).

Leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit) e sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth.) são exemplos de leguminosas arbóreas que vem sendo utilizadas na recuperação de áreas degradadas e em sistemas agroflorestais na região Nordeste. A escolha destas espécies é devido suas características de rusticidade, rápido crescimento, alta produção de biomassa e, principalmente, habilidade de estabelecer simbiose com rizóbios (CHAER et al., 2011). Nascimento (2013) avaliou as taxas de fixação biológica destas espécies em solos do Semiárido brasileiro e verificou contribuições de até 99%, indicando elevado potencial dessas plantas para serem adotadas no manejo da FBN da região.

O sucesso no uso dessas espécies depende, em parte, da presença de rizóbios compatíveis na comunidade nativa do solo. Entretanto, pode acontecer que, mesmo na presença de diazotróficas compatíveis, e com a formação de nódulos nas plantas, a simbiose não seja eficiente (FAYE et al., 2007). A nodulação em *Mimosa tenuiflora*, por exemplo, embora tenha comprovado a compatibilidade simbiótica com a população rizobiana nativa, não garantiu a eficiência da simbiose em fixar nitrogênio,

evidenciado por baixas taxas de N fixado (SILVA et al., 2017). Trabalhos anteriores já relataram a presença de bactérias que nodulam *M. caesalpiniiifolia* e *L. leucocephala* em solos do Semiárido brasileiro (MARTINS et al., 2015b; SILVA et al., 2016), contudo a avaliação da eficiência simbiótica de rizóbios nativos ainda não foi relatada. Até o momento, trabalhos de eficiência simbiótica de rizóbios indígenas da região foram conduzidos, em sua maioria para leguminosas herbáceas, especialmente feijão-caupi (SILVA et al., 2008; MARINHO et al., 2017), estes estudos têm demonstrado que existe uma grande variação no potencial simbiótico dos isolados e que é possível isolar e selecionar dentro da população nativa, bactérias eficientes que garantam o suprimento de N das plantas.

Diferentes sistemas de uso da terra ou coberturas vegetais podem afetar a diversidade rizobiana (JESUS et al., 2005), possibilitando o favorecimento de populações diferenciadas com relação à eficiência simbiótica (SANTOS et al., 2017). Em calopogônio, CALHEIROS et al. (2013) verificaram diferenças na eficiência simbiótica de isolados em função do uso da terra, sendo o solo proveniente de bosque de sabiá o que proporcionou uma maior quantidade de isolados eficientes na produção de biomassa aérea e acúmulo de nitrogênio. Não existem trabalhos que relacionem a eficiência simbiótica de rizóbios de leucena e sabiá com diferentes usos da terra em solos do Semiárido brasileiro.

Este trabalho baseou-se na hipótese de que, em solos do Semiárido brasileiro, é possível a existência de populações nativas de bactérias nodulíferas eficientes na fixação de nitrogênio em plantas de sabiá e leucena, sendo a eficiência alterada pelo sistema de uso da terra.

Diante do exposto, objetivou-se avaliar a capacidade e eficiência simbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de nódulos de leucena e sabiá, cultivadas em solos do Semiárido brasileiro sob diferentes usos da terra, e selecionar os isolados mais eficientes no acúmulo de nitrogênio na parte aérea destas leguminosas.

## 5.2 Material e Métodos

### 5.2.1 Origem dos isolados

Foram conduzidos dois experimentos para avaliar a eficiência simbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio em associação com leguminosas arbóreas. Estas bactérias foram previamente isoladas de nódulos de leucena (*L. leucocephala*) e sabiá (*M. caesalpinifolia*) cultivadas em solos do Semiárido brasileiro sob diferentes usos da terra (caatinga e áreas com diferentes sistemas agrícolas) (SILVA et al., 2016). Foram obtidos 160 isolados de sabiá e 213 de leucena, os quais foram submetidos à amplificação de fragmentos de genes simbióticos (*nifH* e *nodC*) (CAPÍTULO 02), os que amplificaram ao menos um gene simbiótico foram selecionados para avaliar sua capacidade simbiótica no presente estudo. A distribuição dos isolados de acordo com os locais de origem encontra-se na Tabela 1.

**Tabela 1.** Distribuição do número de isolados de acordo com os usos da terra em que foram obtidos

	<i>M. caesalpinifolia</i>	<i>L. leucocephala</i>
<i>Luvissolo</i> (Serra Talhada)		
Caatinga	17	28
Monocultivo	11	15
Agrofloresta	17	34
<i>Argissolo</i> (Belo Jardim)		
Caatinga	26	21
Monocultivo	16	23
Consórcio	17	23

### 5.2.2 Experimento de eficiência simbiótica

Os dois ensaios foram conduzidos separadamente, sendo um com cultivo de leucena (*L. leucocephala*) e outro com sabiá (*M. caesalpinifolia*), em casa de vegetação do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), Recife, PE, (9°24'42" Lat. S, 40°30'23" Long. W).

Utilizou-se o delineamento de blocos ao acaso, com três repetições. Os tratamentos foram os isolados nativos, uma estirpe recomendada para inoculação da leguminosa avaliada; um controle sem inoculação com rizóbios e sem adição de N; e um controle sem rizóbios e com N-mineral (50 kg ha<sup>-1</sup>). Para o sabiá foram utilizados os 104 isolados nativos, e a estirpe recomendada BR3405 (*Burkholderia sabiae*). Para

leucena foram 144 isolados nativos e a estirpe recomendada foi a SEMIA 6069 (*Bradyrhizobium elkanii*). A adubação nitrogenada foi fornecida na forma de nitrato de amônio em dose única.

As leguminosas foram cultivadas em vasos plásticos de poliestireno com capacidade para 500 ml, preenchidos com areia e vermiculita autoclavadas (pressão de 1,5 atm. e temperatura de 120°C por 1 hora, duas vezes) na proporção de 2:1 (v:v) (MENEZES et al., 2017). A dormência de sabiá foi quebrada por meio de choque térmico, com água a temperatura de 80°C por cinco minutos, seguido da imersão em água a temperatura ambiente por 12 horas. Para leucena a dormência foi superada por meio de escarificação mecânica com lixa.

As sementes foram desinfestadas superficialmente em álcool a 95% (1 minuto) e hipoclorito de sódio 2% (5 minutos), sendo em seguida lavadas em água esterilizada e semeadas, no total de quatro sementes por vaso. Posteriormente, foi realizada a inoculação dos isolados bacterianos cultivados em YM líquido por três dias, à temperatura ambiente, sob agitação constante a 105 rotações por minuto (rpm). Cada semente recebeu 1 ml do inóculo (MENEZES et al., 2017). Quinze dias após a germinação, realizou-se o desbaste deixando uma planta por vaso. Para o fornecimento de nutrientes às plantas, aplicou-se a cada dois dias 50 ml de solução nutritiva (NORRIS; T'MANNETJE, 1964).

A plantas foram colhidas aos 90 dias, sendo avaliadas as seguintes variáveis: número de nódulos (NN), massa de matéria seca de nódulos (MSN), massa de matéria seca da parte aérea (MSPA) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA). O N acumulado na parte aérea foi calculado por meio da multiplicação da massa de matéria seca da parte aérea pelo teor de N.

A eficiência relativa das estirpes foi determinada como descrito por Calheiros et al. (2013), onde  $(Ef\%) = ANPA \text{ das plantas inoculadas} / ANPA \text{ de plantas não inoculadas}$  e que receberam N-mineral e depois convertidas em porcentagem. Com base nos resultados, os isolados foram classificados e agrupados de acordo com a escala de eficiência estabelecida por Koskey et al. (2017) em que: <35% = ineficiente; 35 – 50% = pouco eficiente; 51-80% = eficiente; >80% = altamente eficiente. Devido as diferenças na proporção de isolados eficientes nos sistemas de uso, foi realizado o teste de qui-quadrado, para verificar se as diferenças foram significativas.

Os isolados com eficiência relativa superior a 80% foram selecionados e tiveram suas variáveis NN, MSN, MSPA, ANPA e Ef% submetidas á análise de variância. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade (FERREIRA, 2011). Os valores das variáveis número de nódulos (NN) e massa de matéria seca de nódulos (MSN) foram previamente transformados pela fórmula  $(x+0,5)^{0,5}$ . Os coeficientes de correlação entre as variáveis estudadas foram calculados pelo Statistica 8.0 (Statsol).

### **5.2.3 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA dos isolados mais eficientes**

Os isolados mais eficientes do experimento de substrato estéril tiveram seu DNA extraído segundo metodologia de Dhaese et al. (1979), na sequência tiveram seu gene 16S rRNA amplificado e sequenciado para determinação do seu posicionamento taxonômico. O gene 16S rRNA foi amplificado usando os primers universais 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) e 1492 R (TACGGYTACCTTGTTACGACTT) (WEISBURG et al.,1991). As reações de PCR foram ajustadas para 50 µl (1X tampão de reação, 2.0 mmol L<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mmol L<sup>-1</sup> de cada dNTP, 1 U de Taq DNA polimerase, e 0.25 µmol L<sup>-1</sup> de cada primer). A amplificação consistiu de uma etapa inicial de desnaturação de 94°C por 4 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação (94 °C por 1 minuto), anelamento (60°C por 45 segundos), extensão (72 °C por 2 minutos) e um passo de extensão final de 72 °C por 5 minutos. Os produtos de PCR amplificados foram enviados para purificação e sequenciamento na empresa Macrogen, em Seul, Coréia do Sul. O sequenciamento foi realizado na plataforma ABI 3037 xl (Applied Biosystems, EUA) utilizando o iniciador 27F, seguindo os protocolos da empresa prestadora de serviços.

As sequências foram utilizadas para comparação com aquelas disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) utilizando o algoritmo (BLASTn). As sequências mais semelhantes serão apresentadas no presente estudo

## 5.3 Resultados e Discussão

### 5.3.1 Capacidade simbiótica

Os 104 isolados de nódulos de sabiá e 144 de leucena que tiveram amplificação positiva para pelo menos um gene simbiótico foram testados em casa de vegetação, dos quais 94 isolados de sabiá e 121 de leucena foram capazes de renodular a espécie hospedeira de origem. Não se constatou ocorrência de nodulação nas testemunhas absolutas (livres de inoculação e adubação nitrogenada) e nas plantas com fertilização nitrogenada, o que indica ausência de contaminação nos experimentos.

A presença de isolados de nódulos que não promovem a nodulação em seus hospedeiros de origem tem sido relatada na literatura (SILVA et al., 2012; XU et al., 2013; ARAÚJO et al., 2017). Tal fato pode estar relacionado aos genes de codificação da nitrogenase (*nif*) e da nodulação (*nod*) de alguns rizóbios serem codificados no plasmídeo. Esta característica confere a estes isolados, maior instabilidade genética, fazendo com que os genes da nodulação possam ser perdidos com o tempo (HOWIESON; DILWORTH, 2016). A não nodulação do hospedeiro de origem pode também estar ligada ao isolamento de organismos não simbiotes presentes na parte interna e externa dos nódulos radiculares durante o processo de isolamento/purificação, a exemplo de bactérias dos gêneros *Paenibacillus* e *Bacillus*, que são endofíticas de nódulos, mas não nodulíferas (COSTA et al., 2013; JARAMILLO et al., 2013).

### 5.3.2 Eficiência simbiótica

Os isolados que promoveram a nodulação foram separados em classes de acordo com a eficiência em: <35% = ineficientes; 35 – 50% = pouco eficientes; 51-80% = eficientes; >80% = altamente eficientes (Tabela 2). Dos isolados de *M. caesalpiniiifolia*, 23 foram ineficientes, 29 pouco eficientes, 26 eficientes e 16 altamente eficientes. Dos rizóbios de *L. leucocephala* foram 33 ineficientes, 35 pouco eficientes, 34 eficientes, 19 altamente eficientes. A eficiência variou de 23 a 144%, ficando claro que a nodulação positiva que comprove a compatibilidade simbiótica dos isolados não garante a eficiência destes em fixar nitrogênio e promover o desenvolvimento dos hospedeiros.

**Tabela 2.** Valores médios da eficiência relativa de isolados rizobianos de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) e leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.) oriundos de solos do Semiárido brasileiro sob diferentes usos da terra

	N. de isolados	Classes de eficiência						
		<35% eficiência	N. de isolados	35-50% eficiência	N. de isolados	51-80% eficiência	N. de isolados	>80% eficiência
<i>M. caesalpinifolia</i>								
<i>Luvisso</i> (Serra Talhada)								
Caatinga	2	33,85 ± 8,20	4	42,97 ± 8,43	6	70,75 ± 12,21	4	115,77 ± 31,52
Monocultivo	2	25,69 ± 13,60	5	45,20 ± 6,92	2	73,98 ± 23,77	1	87,29 ± 24,33
Agrofloresta	5	28,08 ± 7,87	5	45,78 ± 10,18	4	59,26 ± 8,98	2	85,71 ± 20,07
<i>Argissolo</i> (Belo Jardim)								
Caatinga	6	24,27 ± 5,66	7	43,43 ± 4,12	6	65,71 ± 13,26	5	99,58 ± 23,13
Monocultivo	4	33,45 ± 8,56	2	47,12 ± 18,05	4	68,35 ± 11,89	2	119,15 ± 55,56
Consórcio	4	29,21 ± 5,01	6	44,90 ± 8,02	4	68,00 ± 16,34	2	101,53 ± 34,26
<i>L. leucocephala</i>								
<i>Luvisso</i> (Serra Talhada)								
Caatinga	6	29,05 ± 5,47	8	43,30 ± 4,48	6	70,96 ± 7,32	4	109,87 ± 37,18
Monocultivo	3	23,09 ± 14,15	5	43,80 ± 7,22	4	62,58 ± 27,83	2	126,20 ± 55,19
Agrofloresta	9	29,30 ± 3,24	6	45,33 ± 5,80	9	66,09 ± 7,36	2	90,44 ± 53,85
<i>Argissolo</i> (Belo Jardim)								
Caatinga	4	24,35 ± 11,31	5	43,25 ± 5,39	4	70,45 ± 11,33	3	93,83 ± 46,69
Monocultivo	7	28,23 ± 4,45	5	45,18 ± 4,82	4	68,48 ± 21,15	6	99,14 ± 24,71
Consórcio	4	25,84 ± 9,08	6	47,08 ± 5,04	7	62,40 ± 10,91	2	84,59 ± 28,58

Média ± intervalo de confiança.

Com base na escala de classificação usada por Koskey et al. (2017) ficou evidente no nosso estudo que a minoria dos isolados são altamente eficientes e, embora estes representem menos de 20% do total de isolados avaliados, fornecem o indicativo de que solos do Semiárido brasileiro abrigam rizóbios eficientes na promoção do crescimento de *M. caesalpinifolia* e *L. leucocephala*. Trabalhos anteriores já relataram a presença de bactérias que nodulam estas leguminosas nestes locais (MARTINS et al., 2015b; SILVA et al., 2016), contudo a avaliação da eficiência simbiótica de rizóbios nativos ainda não foi relatada. Até o momento trabalhos de eficiência simbiótica de rizóbios indígenas da região tem sido direcionado para leguminosas herbáceas como o feijão-caupi (SILVA et al., 2008; MARINHO et al., 2017). Em outras regiões Semiáridas, como em Panxi na China, também foi demonstrada a presença de rizóbios nativos que nodulam *L. leucocephala* e, à semelhança do presente trabalho, predominaram os isolados ineficientes, totalizando cerca de dois terços do total (XU et al., 2013).

Os resultados do presente estudo são importantes, pois constituem a primeira tentativa de avaliar a eficiência simbiótica de isolados nativos de solos do Semiárido brasileiro na inoculação e promoção de crescimento de *M. caesalpinifolia* e *L. leucocephala* e, embora tenha sido um estudo em vaso com substrato estéril, permitem uma estimativa inicial da capacidade simbiótica dos isolados. Obviamente, em estudos usando solo, as condições são outras, com todas as possíveis limitações, principalmente de competitividade com outros micro-organismos. Contudo as elevadas eficiências de alguns isolados nativos servem como indicativo para demonstrar o potencial dessas bactérias para inoculação destas leguminosas.

As proporções de isolados eficientes de nódulos de *M. caesalpinifolia* variaram de 37,50% (consórcio no Argissolo) a 62,50 % (caatinga no Luvissole). Para as bactérias de *L. leucocephala* a variação foi de 41,67 % (caatinga no Luvissole) a 47,37% (consórcio no Argissolo). Entretanto, essas diferenças, não foram significativas, evidenciando assim, que no presente estudo, os sistemas de uso da terra não influenciaram na eficiência simbiótica (Tabela 3). Estes resultados contrastam com os observados por (CALHEIROS et al., 2013) que verificaram diferenças na proporção de isolados eficientes de calopogônio em função da cobertura vegetal.

**Tabela 3.** Teste de qui-quadrado para as frequências observadas e esperadas para proporção de rizóbios eficientes nativos de solos do Semiárido brasileiro sob diferentes usos da terra para inoculação de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) e leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.)

Sistema de uso	Eficientes Observada (Esperada)	Não Eficientes	Total	Proporção (%)
----- <i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth.-----				
<i>Luvissolo</i> (Serra Talhada)				
Caatinga	10 (7,15)	6 (8,05)	16	62,50
Monocultivo	3 (4,47)	7 (5,53)	10	30,00
Agrofloresta	6 (7,15)	10 (8,85)	16	37,50
<i>Argissolo</i> ( Belo Jardim)				
Caatinga	11 (10,72)	13 (13,28)	24	45,83
Monocultivo	6 (5,56)	6 (6,64)	22	50,00
Consórcio	6 (7,15)	10 (8,85)	16	37,50
Total	42	52	94	44,68
----- <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit.-----				
<i>Luvissolo</i> (Serra Talhada)				
Caatinga	10 (10,51)	14 (13,49)	24	41,67
Monocultivo	6 (6,13)	8 (7,87)	14	42,86
Agrofloresta	11 (11,39)	15 (14,61)	26	42,31
<i>Argissolo</i> ( Belo Jardim)				
Caatinga	7 (7,01)	9 (8,99)	16	43,75
Monocultivo	10 (9,64)	12 (12,36)	22	45,45
Consórcio	9 (8,32)	10 (10,68)	19	47,37
Total	53	68	121	43,80

Os isolados altamente eficientes (ER > 80%), foram comparados entre si, com os controles e com a estirpe recomendada. (Tabelas 4 e 5). Os resultados obtidos mostraram o elevado potencial da inoculação com rizóbios nativos, evidenciado pelo aumento significativo da nodulação (NN e MSN), crescimento vegetativo (MSPA) das plantas inoculadas. Alguns dos isolados nativos como o isolado 36F de *L. leucocephala*, apresentaram desempenho superior em todos os parâmetros simbióticos testados em comparação à estirpe recomendada ou aos controles, esses resultados corroboram trabalhos anteriores com outras leguminosas, tais como calopogônio e feijão-caupi (CALHEIROS et al., 2013; KOSKEY et al. 2017), que

demonstraram a elevada eficiência simbiótica de isolados nativos em comparação à estirpe recomendada e aos controles.

**Tabela 4.** Valores médios da massa de matéria seca da parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA), e da eficiência relativa dos diferentes isolados de rizóbios inoculados em sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.)

Tratamento	MSPA g planta <sup>-1</sup>	NN ----	MSN mg planta <sup>-1</sup>	ANPA g planta <sup>-1</sup>	ER (%) (%)
1A	1,96 a	21 c	73 b	39,76 a	130,79 a
1A2	1,19 c	13 c	23 d	26,46 b	86,86 b
1E	1,91 a	47 b	70 b	38,45 a	125,83 a
2G	1,31 c	23 c	39 c	26,80 b	87,29 b
3B	1,29 c	14 c	34 c	25,55 b	84,13 b
4A	1,20 c	15 c	34 c	24,95 b	81,74 b
4D	2,13 a	27 c	107 a	42,60 a	139,44 a
4O	1,36c	10 c	33 c	25,52 b	84,72 c
6M	1,98 a	50 b	102 a	39,30 a	127,95 a
7A	1,91 a	9 c	17 d	33,47 b	119,58 a
9B	1,76 b	14 c	24 d	33,47 a	109,21 b
10I	1,55 b	75 a	40 c	29,64 b	97,38 b
11K	1,60b	18 c	17 d	33,85 b	110,35 b
14A	1,39 c	40 b	49 c	26,76 b	87,28 b
15M	1,29 c	27 c	39 d	28,52 b	91,17 b
16M	1,86 a	28 c	76 b	31,25 a	102,77 b
C. absoluto	0,48 d	0	0	6,15 c	20,18 c
BR3405	0,75 d	26 c	20 d	13,57 c	34,35 c
C. nitrogenado	1,35 c	0	0	30,63 b	100,00 b
C.V (%)	12,58	55,47	35,33	15,56	15,36

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

A inoculação aumentou significativamente a biomassa área das duas leguminosas. Para o sabiá, os isolados 1A, 1E, 4D, 6M, 7A e 16M se destacaram em comparação aos demais tratamentos, em comparação a testemunha nitrogenada estes isolados apresentaram valores aproximadamente 50% superiores, foram 2,6 vezes maiores que as BR3405 e 4 vezes superiores que o controle absoluto. Para

leucena esse aumento também foi evidenciado para os isolados 25B, 26C, 36F, 43K, 45G, 45K e 46H, cuja média foi aproximadamente 4,2 vezes superior ao controle absoluto, 4X em relação a SEMIA 6069 e 1,3 vezes maior que o controle nitrogenado.

**Tabela 5.** Valores médios da massa de matéria seca da parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA), e da eficiência relativa dos diferentes isolados de rizóbios inoculados em leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit)

Tratamento	MSPA g planta <sup>-1</sup>	NN ----	MSN mg planta <sup>-1</sup>	ANPA g planta <sup>-1</sup>	ER (%)
25B	0,98 a	53 a	109 a	23,27 a	133,30 a
25G	0,63 b	39 a	68 b	13,72 b	81,63 b
26C	0,89 a	08 b	20 b	17,02 b	98,97 a
28G	0,80 b	27 a	37 b	14,82 b	81,96 b
29H	0,82 b	15 b	29 b	15,31 b	86,83 b
31H	0,65 b	38 b	56 b	14,00 b	80,75 b
32J	0,67 b	10 b	45 b	14,15 b	82,28 b
36A	0,85 b	33 a	74 a	18,00 b	104,32 a
36B	0,75 b	13 b	44 b	15,24 b	87,49 b
36F	1,16 a	29 a	102 a	24,88 a	144,90 a
36O	0,63 b	20b	40 b	13,64 b	80,88 b
40N	0,67 b	12 b	22 b	14,82 b	84,03 b
41I	0,72 b	18 b	39 b	14,36 b	82,34 b
42O	0,73 b	17 b	49 b	14,85 b	85,06 b
43K	1,03 a	36 a	68 b	20,61 a	117,45 a
45G	1,04 a	42 a	110 a	23,52 a	134,94 a
45K	0,99 a	22 b	54 b	19,67 a	112,92 a
46H	0,93 a	32 a	97 a	20,18 a	115,49 a
48I	0,79 b	17 b	54 b	15,31 b	87,32 b
C. absoluto	0,20 c	0	0	2,35 c	23,52 c
SEMIA 6069	0,24 c	17 b	35 b	5,16 c	29,62 c
C. nitrogenado	0,77 b	0	0	17,70 b	100,00 a
C.V (%)	19,91	54,51	35,57	22,74	23,94

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

Houve grande variação nos valores de número e matéria seca de nódulos (MSN), evidenciando que entre os isolados existem grandes diferenças na capacidade de formar nódulos. O sabiá nodulou mais abundantemente com o isolado 10I (75 nódulos), mas os nódulos foram pequenos e a biomassa total de nódulos foi de apenas 40 mg. Para leucena maior nodulação foi observada nos isolados 25B, 25G, 28G, 36A, 36F, 43K, 45K e 46H. A maior massa seca de nódulos dos isolados 4D e 6M de sabiá, e 25B, 36A, 36F, 45G e 46H para leucena pode ter refletido em maior taxa de fixação biológica de nitrogênio, evidenciada pela elevada biomassa das plantas inoculadas com estes isolados. Esses resultados se assemelham aos de Calheiros et al. (2013), que observaram diferenças na nodulação e no acúmulo de biomassa de calopogônio quando inoculados com diferentes isolados, verificando que os rizóbios que proporcionaram maior biomassa de nódulos eram também os que promoviam maior acúmulo de biomassa aérea.

O ANPA da planta foi utilizado para estimar a eficiência relativa da fixação biológica dos isolados nativos. Este método é relativamente fácil de ser utilizado e de baixo custo (KOSKEY et al., 2017), e mais adequado para uso em solos com baixos teores de nitrogênio (RONDON et al., 2007). Os maiores ANPA de *M. caesalpiniiifolia* foram obtidos com a inoculação dos isolados 1A, 1E, 4D, 6M, 7A e 16M. Em leucena esse comportamento foi verificado para os isolados 25B, 36F, 43K, 45G, 45K e 46H. Tendo em vista que o N acumulado destes tratamentos foram superiores à testemunha absoluta, considera-se que a maior proporção de N encontrada nas plantas é proveniente da FBN, visto que para as duas leguminosas, as sementes são muito pequenas, portanto, com pouca reserva.

Os isolados 25B, 26C, 36A, 36F, 43K, 45G, 45K e 46H de leucena e 1A, 1E, 4D, 6M e 7A de sabiá foram os mais eficientes, sendo bastante promissores quanto a FBN, podendo representar uma excelente estratégia para elevar as quantidades de N fixado em locais onde o aporte de tecnologia é baixo. Estudos em vasos com solo e em campo são necessários a fim de se comprovar o seu potencial para uso na composição de inoculantes microbianos para indicação nas espécies estudadas.

Foram obtidas correlações positivas e significativas para a maioria das variáveis (Tabela 6), sendo os maiores coeficientes de correlação obtidos para a ANPA e ER. A correlação significativa entre a biomassa de nódulos e biomassa aérea confirma a relação existente entre essas variáveis (ANTUNES et al., 2007). Além

disso, os resultados apoiam a afirmação feita por Delić et al. (2010) de que existe uma relação direta entre a biomassa de nódulos e acúmulo de nitrogênio das leguminosas. Nossos resultados concordam também com os de Unkovich; Baldock e Peoples (2010) que relataram uma forte correlação positiva entre a biomassa aérea e o acúmulo de nitrogênio.

**Tabela 6.** Matriz de correlação entre a massa de matéria seca da parte aérea (MSPA), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA), eficiência relativa, número de nódulos (NN) e massa seca de nódulos (MSN) dos rizóbios altamente eficientes (>80% de eficiência relativa) inoculados em *Mimosa caesalpinifolia* Benth e *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit

<i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth.				
	ANPA	ER	NN	MSN
MSPA	0,889*	0,871*	0,208	0,611*
ANPA		0,960*	0,169	0,579*
ER			0,177	0,610*
NN				0,436*
<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit				
	ANPA	ER	NN	MSN
MSPA	0.958*	0.934*	0.411*	0.643*
ANPA		0.958*	0.430*	0.690*
ER			0.429*	0.721*
NN				0.697*

\*: significativo a 5 %

### 5.3.3 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA dos isolados mais eficientes

A similaridade entre as bactérias avaliadas no sequenciamento do gene 16S rRNA e as do GenBank variou entre 91 e 98%. Para leucena foram identificadas bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer*. Em sabiá foram identificados rizóbios do gênero *Burkholderia* (Tabela 7).

Foi evidenciado que os isolados mais eficientes de leucena são pertencentes do grupo das  $\alpha$ - proteobactérias. Essa preferência da leucena em nodular com gêneros de  $\alpha$ -rizóbios tem sido relatada na literatura, evidenciada pela nodulação com bactérias dos gêneros *Rhizobium* (PEREYRA et al., 2015), *Mesorhizobium* (RANGEL et al., 2016), *Sinorhizobium* (XU et al., 2013), *Bradyrhizobium* (WANG et al., 2006), *Allorhizobium* (FLORENTINO et al., 2009). Para sabiá, foram confirmados os resultados de Reis Junior et al. (2010) e Martins et al. (2015b) que demonstraram a preferência pela nodulação com  $\beta$ -rizóbios do gênero *Burkholderia*.

**Tabela 7.** Resultados da pesquisa de similaridade no GenBank com o programa Blast dos isolados de nódulos de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) e *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit cultivados em solos do Semiárido brasileiro sob diferentes usos da terra

Isolado	Solo	Uso da terra	Acesso	NCBI	Similaridade (%)
-----( <i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth.)-----					
1A	Luvissolo	Caatinga	JN622118.1	<i>Burkholderia</i> sp. PE-ST04	97
1E	Luvissolo	Caatinga	EU287925.1	<i>Burkholderia diazotrophica</i> strain DPU-3	98
4D	Argissolo	Agrofloresta	AY904782	<i>Burkholderia</i> sp. SEMIA 6398	96
6M	Argissolo	Monocultivo	AY773188.1	<i>Burkholderia</i> sp. Br3432	98
7A	Luvissolo	Caatinga	JN622118.1	<i>Burkholderia</i> sp. PE-ST04	97
-----( <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit.)-----					
25B	Luvissolo	Caatinga	JQ659660.1	<i>Ensifer</i> sp. R3-711	93
26C	Luvissolo	Agrofloresta	AF510388.1	<i>Rhizobium</i> sp. vgs-5	95
36A	Argissolo	Monocultivo	KJ128392.1	<i>Sinorhizobium terangae</i> strain CB3126	99
36F	Argissolo	Monocultivo	KJ734007.1	<i>Rhizobium</i> sp. KT16	96
43K	Luvissolo	Caatinga	NR115768.1	<i>Ensifer mexicanus</i> strain ITTG-R7	96
45G	Luvissolo	Monocultivo	KC759693.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. BP12	92
45K	Luvissolo	Monocultivo	EU130444.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. CCBAU 11231	97
46H	Argissolo	Caatinga	JF450143.1	<i>Ensifer</i> sp. AC10a2	91

#### 5.4 Conclusões

Solos do Semiárido brasileiro abrigam rizóbios eficientes no crescimento e acúmulo de nitrogênio de *L. leucocephala* e *M. caesalpinifolia*.

Os usos da terra não exerceram efeito sobre o potencial simbiótico dos isolados avaliados.

A elevada eficiência simbiótica dos 25B, 26C, 36A, 36F, 43K, 45G, 45K e 46H de leucena e 1A, 1E, 4D, 6M e 7A de sabiá representam uma proposta interessante na indicação de estirpes eficientes para o estabelecimento dessas plantas.

## Referências

- ANTUNES, J. E. L.; GOMES, R. L. F.; LOPES, A. C. A; ARAÚJO, A. S. F.; LYRA, M. C. C. P.; FIGUEIREDO, M. D. V. B. Symbiotic efficiency of rhizobia isolated from nodules of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 35, n. 3, p. 751-757, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832011000300011>>.
- ARAÚJO, K. S.; CARVALHO, F. D.; MOREIRA, F. M. S. *Bukholderia* strains promote *Mimosa* spp. growth but not *Macroptilium atropurpureum*. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 48, n. 1, p. 41-48, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.5935/1806-6690.20170005>>.
- CALHEIROS, A. S.; LIRA JUNIOR, M. A.; SOARES, D. M.; FIGUEIREDO, M. D. V. B. Symbiotic capability of calopo rhizobia from an agrisoil with different crops in Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 37, n. 4, p. 869-876, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832013000400005>>.
- CHAER, G. M.; RESENDE, A. S.; CAMPELLO, E. F. C.; FARIA, S. M.; BODDEY, R. M. Nitrogen-fixing legume tree species for the reclamation of severely degraded lands in Brazil. **Tree Physiology**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 139-149, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/treephys/tpq116>>.
- COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F.; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L. D. V. M.; MOREIRA, F. M. S. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 9, p.1275-1284, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2013000900012>>.
- DELIĆ, D.; STAJKOVIĆ, O.; RASULIĆ, N.; KUZMANOVIĆ, D.; JOŠIĆ, D.; MILIČIĆ, B. Nodulation and N<sub>2</sub> fixation effectiveness of *Bradyrhizobium* strains in symbiosis with adzuki bean, *Vigna angularis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 2, p. 293-299, 2010 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132010000200007>>.
- DHAESE, P.; GREVE, H.; DECRAEMER, H.; SCHELL, J.; VAN MONTAGN, M. Rapid mapping of transposon insertion and deletion mutations in the large Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 7, p. 1837-1849, 1979.
- FAYE, A.; SALL, S.; CHOTTE, J. L.; LESUEUR, D. Soil bio-functioning under *Acacia nilotica* var. tomentosa protected forest along the Senegal River. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Ithaca, v. 79, n. 2, p. 35-44, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10705-007-9033-7>>.
- FRACETTO, F. J. C.; FRACETTO, G. G. M.; CERRI, C. C.; FEIGL, B. J.; NETO SIQUEIRA, M. Estoques de carbono e nitrogênio no solo cultivado com mamona na Caatinga. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 36, n. 5, p. 1545-1552, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832012000500019>>.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>>.

FREITAS, A. D. S.; SILVA, T. D.; MENEZES, R. S. C.; SAMPAIO, E. V. S. B.; ARAÚJO, E. R.; FRAGA, V. D. S. Nodulação e fixação de nitrogênio por forrageiras da caatinga cultivadas em solos do semiárido paraibano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, n. 9, p.1856-1861, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982011000900003>>.

FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SANTOS, C. E. R. S; FERNANDES, A. R. Biological nitrogen fixation in legume trees of the Brazilian caatinga. **Journal of Arid Environments**, Exeter, v. 74, n. 3, p. 344-349, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaridenv.2009.09.018>>.

FLORENTINO, L. A.; GUIMARÃES, A. P.; RUFINI, M., SILVA, K. D.; MOREIRA, F. M. D. S. *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 5, p. 667-676, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162009000500012>>.

HOWIESON, J. G., DILWORTH, M. J. **Working with rhizobia**. Canberra, Australian Centre for International Agricultural Research, 2016, 314 p.

JARAMILLO, P. M. D.; GUIMARÃES, A. A.; FLORENTINO, L. A.; SILVA, K. B.; NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S. Symbiotic nitrogen-fixing bacterial populations trapped from soils under agroforestry systems in the Western Amazon. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 70, n. 6, p. 397-404, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162013000600004>>.

JESUS, E. C.; MOREIRA, F. M. S.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. I. D.; OLIVEIRA, M. S. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 8, p. 769-776, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2005000800006>>.

KOSKEY, G.; MBURU, S. W.; NJERU, E. M.; KIMITI, J. M.; OMBORI, O.; MAINGI, J. M. Potential of Native Rhizobia in Enhancing Nitrogen Fixation and Yields of Climbing Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Contrasting Environments of Eastern Kenya. **Frontiers in plant science**, Lausanne, v. 8, n. 1, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00443>>.

MARINHO, R. D. C. N.; FERREIRA, L. D. V. M.; SILVA, A. F.; MARTINS, L. M. V.; NÓBREGA, R. S. A.; FERNANDES JÚNIOR, P. I. Symbiotic and agronomic efficiency of new cowpea rhizobia from Brazilian Semi-Arid. **Bragantia**, Campinas, v. 76, n. 2, p. 273-281, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1678-4499.003>>.

MARTINS, J. C. R.; FREITAS, A. D. S.; MENEZES, R. S. C.; SAMPAIO, E. V. D. S. B. Nitrogen symbiotically fixed by cowpea and gliricidia in traditional and agroforestry systems under semiarid conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 50, n. 2, p.178-184, 2015a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2015000200010>>.

MARTINS, P. G. S.; LIRA JUNIOR, M. A.; FRACETTO, G. G. M; SILVA, M. L. R. B.; VINCENTIN, R. P.; LYRA, M. C. C. P. *Mimosa caesalpinifolia* rhizobial isolates from different origins of the Brazilian Northeast. **Archives of Microbiology**, Amsterdam, v. 197, n. 3, p. 459-469, 2015 b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00203-014-1078-8>>.

MENEZES, K. A. S.; ESCOBAR, I. E. C.; RESENDE, A. C. Genetic Variability and Symbiotic Efficiency of *Erythrina velutina* Willd. root Nodule Bacteria from the Semi-Arid Region in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 41, n. 1, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/18069657rbcS20160302>>.

MENEZES, R. S. C.; SAMPAIO, E. V. S. B.; GIONGO, V; MARIN, A. M. P. Biogeochemical cycling in terrestrial ecosystems of the Caatinga Biome. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 72, n. 3, p. 643-653, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842012000400004>>.

NASCIMENTO, L. R. V. **Diversidade de isolados bacterianos e sua influência na FBN em diferentes coberturas vegetais**. 2013. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2013.

NORRIS, D. O.; T'MANNETJE, L. The symbiotic specialization of African *Trifolium* spp. in relation to their taxonomy and their agronomic use. **East African Agricultural and Forestry Journal**. Nairóbi, v. 29, n. 1, p. 214-35, 1964.

PEREYRA, G.; HARTMANN, H.; MICHALZIK, B.; ZIEGLER, W.; TRUMBORE, S. Influence of Rhizobia Inoculation on Biomass Gain and Tissue Nitrogen Content of *Leucaena leucocephala* Seedlings under Drought. **Forests**, Basel, v. 6, n. 10, p. 3686-3703, 2015. Disponível em: <[doi:10.3390/f6103686](https://doi.org/10.3390/f6103686)>.

RANGEL, W. M.; THIJS, S.; MOREIRA, F. M. S.; WEYENS, N., VANGRONSVELD, J.; VAN HAMME, J. D.; BOTTOS, E. M.; RINEAU, F. Draft genome sequence of *Mesorhizobium* sp. UFLA 01-765, a multitolerant, efficient symbiont and plant growth-promoting Strain Isolated from Zn-mining soil using *Leucaena leucocephala* as a trap plant. **Genome announcements**, Washington, v. 4, n. 2, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.00050-16>>.

REIS JUNIOR, F. B.; SIMON, M. F.; GROSS, E.; BODDEY, R. M.; ELLIOTT, G. N.; NETO, N. E.; LOUREIRO, F. M.; QUEIROZ, L.P.; SCOTTI, M. R.; CHEN, W. M.; NORÉN, A.; RUBIO, M. C.; FARIA, S. M., BONTEMPS, C.; GOI, S. R.; YOUNG, J. P. W.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. **New Phytologist**, Lancaster, v. 186, n. 4, p. 934-946, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03267.x>>.

RONDON, M. A.; LEHMANN, J.; RAMÍREZ, J.; HURTADO, M. Biological nitrogen fixation by common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) increases with bio-char additions. **Biology and Fertility of Soils**, Amsterdam, v. 43, n. 6, p. 699-708, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00374-006-0152-z>>.

SACRAMENTO, J. A. A. S.; ARAÚJO, A. C. D. M.; ESCOBAR, M. E. O.; XAVIER, F. A. D. S., CAVALCANTE, A. C. R.; OLIVEIRA, T. S. D. Soil carbon and nitrogen stocks in traditional agricultural and agroforestry systems in the semiarid region of Brazil. **Revista brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 37, n. 3, p. 784-795, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832013000300025>>.

SANTOS, C. E. R. S.; SILVA, V. S. G.; FREITAS, A. D. S.; SILVA, A. F.; BEZERRA, R. V.; LYRA, M. C. C. P.; FERREIRA, J. S. Prospecting of efficient rhizobia for peanut inoculation in a Planosol under different vegetation covers. **African Journal of Microbiology Research**, Abuja, v. 11, n. 4, p. 123-131, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5897/AJMR2016.8355>>.

SILVA, A. F.; FREITAS, A. D. S.; COSTA, T. L.; FERNANDES JUNIOR, P. I.; MARTINS, L. M. V.; SANTOS, C. E. R. S.; MENEZES, K. A. S.; SAMPAIO, E. V. S. B. Biological nitrogen fixation in tropical dry forests with different legume diversity and abundance. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Ithaca, v. 117, n. 2, p. 321-334, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10705-017-9834-1>>.

SILVA, K.; CASSETARI, A. S.; LIMA, A. S., BRANDT, E.; PINNOCK, E.; VANDAMME, P.; MOREIRA, F. M. S. Diazotrophic *Burkholderia* species isolated from the Amazon region exhibit phenotypical, functional and genetic diversity. **Systematic and applied microbiology**, Amsterdam, v. 35, n. 4, p. 353-362, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.04.001>>.

SILVA, R. P. D.; SANTOS, C. E. R. S.; LIRA JÚNIOR, M. A.; STAMFORD, N. P. Efetividade de estirpes selecionadas para feijão caupi em solo da região semiárida do sertão da Paraíba. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 3, n. 2, p.105-110, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5039/agraria.v3i2a21>>.

SILVA, V. S. G.; SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S.; STAMFORD, N. P.; SILVA, A. F.; LYRA, M.C.C.P. Systems of land use affecting nodulation and growth of tree legumes in different soils of the Brazilian semiarid area. **African Journal of Agricultural Research**, Abuja, v. 11, n. 40, p. 3966-3974, 2016. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.5897/AJAR2016.11603>>.

UNKOVICH, M. J.; BALDOCK, J.; PEOPLES, M. B. Prospects and problems of simple linear models for estimating symbiotic N<sub>2</sub> fixation by crop and pasture legumes. **Plant and Soil**, Amsterdam, v. 329, n. 2, p. 75-89, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11104-009-0136-5>>.

WANG, F. Q.; WANG, E. T.; ZHANG, Y. F.; CHEN, W. X. Characterization of rhizobia isolated from *Albizia* spp. in comparison with microsymbionts of *Acacia* spp. and *Leucaena leucocephala* grown in China. **Systematic and applied microbiology**, Amsterdam v. 29, n. 6, p. 502-517, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.12.010>>.

XU, K. W.; PENTTINEM, P.; CHEN, Y. X.; CHEN, Q.; ZHANG, X. Symbiotic efficiency and phylogeny of the rhizobia isolated from *Leucaena leucocephala* in arid-hot river valley in Panxi, Sichuan, China. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 97, n. 2, p. 783-793, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/s00253-012-4246-2>>.



## **CAPÍTULO 04**

### **6 EFICIÊNCIA DE RIZÓBIOS NATIVOS DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO NO CRESCIMENTO DE LEGUMINOSAS ARBÓREAS EM DIFERENTES SOLOS**

## Eficiência de rizóbios nativos do Semiárido brasileiro no crescimento de leguminosas arbóreas em diferentes solos

### Resumo

A inoculação de leguminosas arbóreas com rizóbios eficientes e competitivos, pode contribuir para elevar as quantidades de  $N_2$  fixado, sendo uma prática de suma importância para aquisição de nitrogênio em locais onde o aporte de tecnologia é baixo. Diante disso, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar a eficiência simbiótica de rizóbios de *Mimosa caesalpiniiifolia* (Benth.) e *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit, com a finalidade de selecionar os mais eficientes e competitivos para inoculação das espécies estudadas. Foram conduzidos dois experimentos (um para cada leguminosa) em delineamento em blocos casualizados, com três repetições, no esquema fatorial (7x3). Sendo 7 tratamentos de inoculação e 3 classes de solos: Os tratamentos de fertilização foram: a) 4 isolados nativos, obtidos a partir de nódulos de sabiá e leucena cultivadas em solos do Semiárido do Brasil; b) uma estirpe recomendada para inoculação da leguminosa avaliada; c) um controle sem inoculação com rizóbios e sem adição de N; d) um controle sem rizóbios e com N-mineral, na forma de nitrato de amônio. As classes de solo utilizadas foram Luvissole, Argissolo e Latossolo. A colheita das plantas foi realizada aos 90 dias para as duas espécies, sendo avaliadas as seguintes características: altura de plantas (ALT), diâmetro do colo (DIA), matéria seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e dos nódulos (MSN), número de nódulos (NN), concentração (CNPA) e acúmulo de N na parte aérea (ANPA) e eficiência da fixação de  $N_2$ . Os isolados 36F (*Rhizobium*) e 45G (*Mesorhizobium*) de leucena e 1E e 4D (*Burkholderia*) de sabiá mostraram-se bastante promissores quanto a FBN, pois evidenciaram elevada eficiência simbiótica (superior a 90%) e proporcionaram as maiores ALT, DIA, MSPA, ANPA.

Palavras-chaves: Agricultura sustentável. Fixação biológica de nitrogênio. *Leucaena leucocephala*. *Mimosa caesalpiniiifolia*. Simbiose.

## Effectiveness of native Rhizobia from the Brazilian semiarid region on tree legumes grown in different soils

### Abstract

The effectiveness of competitive rhizobia, can contribute to increase the biologic nitrogen fixation (BNF) such as practice of great importance in low technology region. This study aim to evaluate the symbiotic effectiveness of rhizobia to select the most efficient and competitive strains for *Mimosa* and *Leucaena* legume species. Two experiments were conducted (one for each species) with seven fertilization treatments and three soil classes (Luvisol, Ultisol and Oxisol). The fertilization treatments were: a) four native isolates, obtained from nodules of both legumes grown in Brazilian semiarid soils; b) recommended strain for each legume; c) control without rhizobia inoculation, without N fertilization; d) control without rhizobia, with N fertilization (50 kg ha<sup>-1</sup>). The plants were harvested at 90 days and determined the following characteristics: plant height, diameter, dry matter of shoots, roots and nodules, number of nodules, nitrogen concentration and accumulation in shoots, and efficiency of nitrogen fixation. The isolates 36F and 45G from *Leucaena* and the isolates 1E and 4D from *Mimosa* are very promising on Biologic Nitrogen Fixation (BNF), showed high symbiotic effectiveness (higher than 90%) and the selected strains provided the best characteristics (plant height, diameter, dry matter of shoot and nitrogen accumulation in shoots).

Keywords: Biological nitrogen fixation. *Leucaena leucocephala*. *Mimosa caesalpinifolia*. Sustainable agriculture. Symbiosis.

## 6.1 Introdução

O manejo adequado da fixação biológica de nitrogênio (FBN) é uma importante estratégia para promover a sustentabilidade e a segurança alimentar. Em regiões semiáridas, como as verificadas no Nordeste do Brasil, em que predominam solos com baixa disponibilidade de nitrogênio e sistemas agrícolas que não utilizam fertilizantes químicos, ficando as culturas dependentes do nitrogênio oriundo da mineralização da matéria orgânica, a FBN assume importância ainda maior (FREITAS et al., 2015). Nestes locais, após cultivos agrícolas sucessivos, o solo torna-se empobrecido, as áreas degradadas, e então são abandonadas para regeneração da vegetação natural. Nestas, o restabelecimento da fertilidade do solo, principalmente de nitrogênio, é necessário para que ocorra, de forma mais acelerada, a recomposição da vegetação (CHAER et al., 2011).

A principal via de entrada do N nestes locais é a FBN (FREITAS et al., 2015). Assim, uma alternativa viável e sustentável para sistemas agrícolas e reabilitação de áreas degradadas do semiárido é o plantio de leguminosas com habilidade de se associar simbioticamente com bactérias fixadoras de nitrogênio (CHAER et al., 2011; YUAN et al., 2016). Essas leguminosas podem ser utilizadas em sistemas agroflorestais e agrossilvipastoris, na produção de forragem de alta qualidade para a alimentação animal, na cobertura do solo contra erosão, produção de madeira e lenha, cercas vivas, árvores de sombra para as culturas de plantio, adubação verde e etc. (FREITAS et al., 2011; ESTRINGANA et al., 2013; MARTINS et al., 2015a).

A escolha de espécies arbóreas para uso em sistemas agroflorestais ou agrossilvipastoris deve levar em consideração as seguintes características: sistema radicular profundo, fácil estabelecimento no campo, crescimento rápido, elevada produção de biomassa, capacidade de FBN, altos teores de N e P na biomassa, biomassa de fácil decomposição (SOUZA et al., 2007, MARTINS et al., 2015b, SILVA et al., 2016). Entre as espécies que reúnem essas características merecem destaque a leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit) e o sabiá (*M. caesalpinifolia* Benth.).

O sucesso da inserção dessas leguminosas arbóreas no Semiárido nordestino depende, em grande parte, da presença de rizóbios nativos com capacidade de estabelecer simbiose. Como a leucena e o sabiá conseguem se associar com uma

ampla faixa de microssimbiontes, a nodulação natural nestas áreas geralmente é constatada. Entretanto, pode acontecer que, mesmo na presença de diazotróficas compatíveis e com a formação de nódulos nas plantas, a simbiose não seja eficiente (FAYE et al., 2007). A contribuição do N fixado em leguminosas arbóreas em simbiose com rizóbios nativos tem revelado taxas variadas de fixação (FREITAS et al., 2010), demonstrando assim a variabilidade na eficiência dos rizóbios indígenas e evidenciando a necessidade da inoculação de estirpes eficientes e competitivas para otimizar o processo (SOUZA et al., 2007; SILVA et al., 2017).

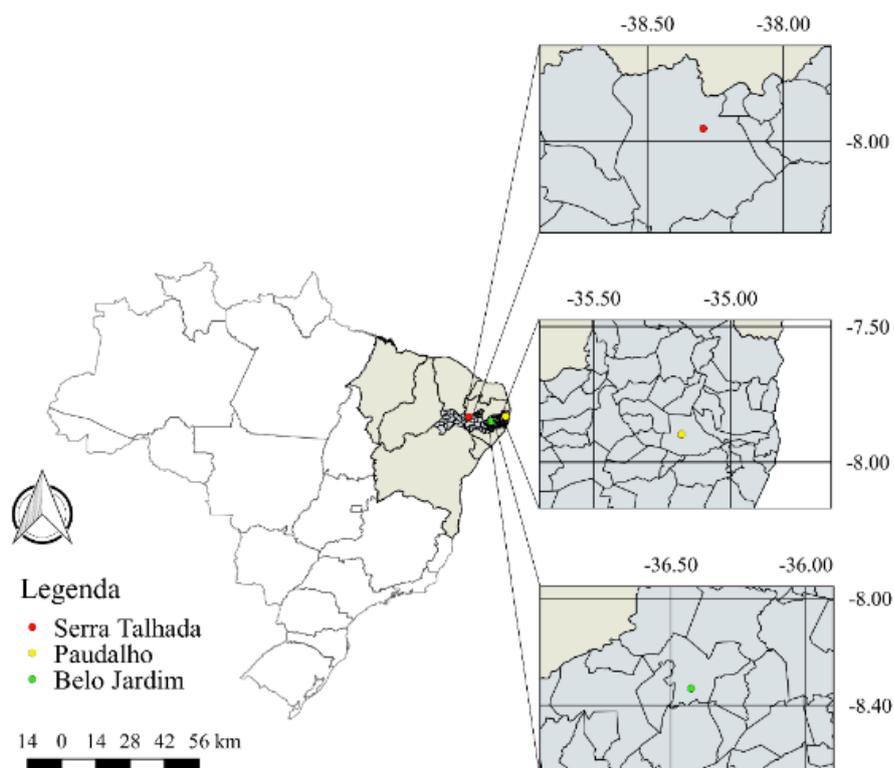
Nos últimos anos tem sido realizada a prospecção de rizóbios eficientes em várias leguminosas herbáceas em solos do Semiárido do Brasil, como amendoim (SIZENANDO et al., 2016); feijão-caupi (NASCIMENTO et al., 2010); feijão-fava (ANTUNES et al., 2011). Contudo, poucos trabalhos realizaram a prospecção de isolados nativos do Semiárido eficientes para inoculação de leguminosas arbóreas (MENEZES et al., 2017).

Assim, o objetivo do estudo foi avaliar a eficiência simbiótica de rizóbios nativos do Semiárido Nordestino, no crescimento de *L. leucocephala* e *M. caesalpiniiifolia* cultivados em solos do Nordeste brasileiro.

## 6.2 Material e Métodos

Foram conduzidos dois experimentos independentes, sendo um com cultivo de leucena e outro com sabiá, em casa de vegetação do Departamento de Agronomia (DEPA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

As leguminosas foram cultivadas em vasos contendo  $1 \text{ dm}^{-3}$  da camada superficial (0–20 cm) de solos coletados em áreas agrícolas de diferentes mesorregiões do estado de Pernambuco (Figura 1).



**Figura 1.** Municípios em que foram coletadas as amostras de solo utilizadas no experimento. Serra Talhada no Sertão, Belo Jardim no Agreste e Paudalho na Zona da Mata de Pernambuco

As amostras de solo, foram secas ao ar, destorroadas, peneiradas a 5 mm e adicionados aos vasos. A fim de preservar as condições originais dos solos não foi realizada correção com calcário nem realizada a aplicação de fertilizantes. As amostras foram submetidas a análises químicas e físicas (EMBRAPA, 1997), cujos resultados estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Atributos químicos e físicos dos solos e características dos municípios em que eles foram coletados

Características	Classes de Solo		
	Luvissolo (EMBRAPA, 2013)	Argissolo (EMBRAPA, 2013)	Latossolo (EMBRAPA, 2013)
pH	6.76 ± 0.12	6.28 ± 0.29	5.56 ± 0.32
C (g kg <sup>-1</sup> )	7.7 ± 2.4	8.4 ± 0.9	3.0 ± 0.5
P (mg dm <sup>-3</sup> )	106 ± 13.8	69 ± 11.7	8 ± 2.2
K <sup>+</sup> (mg dm <sup>-3</sup> )	292 ± 58	284 ± 42	135 ± 7.5
Ca <sup>2+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	2.85 ± 0.19	2.04 ± 0.92	1.34 ± 7.5
Mg <sup>2+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0.86 ± 0.23	0.89 ± 0.21	0.58 ± 0.12
Al <sup>3+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.11±0.03
H+ Al (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	2.15 ± 0.47	2.70 ± 0.63	2.91 ± 0.15
Areia (g kg <sup>-1</sup> )	772 ± 25	714 ± 18	525 ± 25
Silte (g kg <sup>-1</sup> )	100 ± 23	97± 11	103 ± 10
Argila (g kg <sup>-1</sup> )	128 ± 5	189± 7	372 ± 19
Município de coleta	Serra Talhada	Belo Jardim	Paudalho
Altitude (m)	429	608	86
Precipitação (mm)	716	660	1239
Meses com deficiência hídrica	6-7	4-5	3
Temperatura	24	24	24,6

Os dois experimentos foram instalados adotando o delineamento em blocos casualizados, com três repetições, no esquema fatorial (7x3), sendo avaliados 7 tratamentos de fertilização em 3 classes de solos: Os tratamentos foram inoculações com 4 isolados nativos, obtidos a partir de nódulos de sabiá e leucena cultivados em solos do Semiárido do Brasil (SILVA et al., 2016) e com uma estirpe recomendada para inoculação da leguminosa avaliada; um controle sem inoculação com rizóbio e sem adição de N; e um controle sem rizóbio e com N-mineral (50 kg ha<sup>-1</sup>), na forma de nitrato de amônio. As três classes de solos utilizadas foram Luvissolo, Argissolo e Latossolo.

Os isolados nativos avaliados no presente estudo foram selecionados anteriormente com base em suas capacidades de amplificarem fragmentos de genes

simbióticos *nifH* e *nodC* (Capítulo 2) e por apresentarem as maiores eficiências simbióticas em estudos conduzidos em substrato estéril (Capítulo 3). Para o sabiá foram utilizados os isolados 1A, 1D, 4D e 6M e a estirpe recomendada BR3405 (*Burkholderia sabiae*). Para leucena os isolados nativos usados foram 25B, 36F, 43K e 45G e a estirpe recomendada foi a SEMIA 6069 (*Bradyrhizobium elkanii*). As características fenotípicas, os locais e hospedeiro de origem encontram-se na Tabela 2.

**Tabela 2.** Isolados bacterianos oriundos de nódulos de leguminosas arbóreas utilizados no experimento

Identificação do isolado	Solo	Sistema de uso da terra	Características		
			TC <sup>1</sup>	pH <sup>2</sup>	Cor <sup>3</sup>
Bactérias isoladas de nódulos de <i>Leucaena leucocephala</i>					
25B ( <i>Ensifer</i> )	Luvissolo	Caatinga	Rápido	Ácida	Creme
36F ( <i>Rhizobium</i> )	Argissolo	Agricultura	Rápido	Ácida	Creme
43K ( <i>Ensifer</i> )	Luvissolo	Caatinga	Rápido	Neutra	Creme
45G ( <i>Mesorhizobium</i> )	Luvissolo	Agricultura	Rápido	Neutra	Creme
Bactérias isoladas de nódulos de <i>Mimosa Caesalpinifolia</i>					
1A ( <i>Burkholderia</i> )	Luvissolo	Caatinga	Rápido	Ácida	Creme
1E ( <i>Burkholderia</i> )	Luvissolo	Caatinga	Rápido	Ácida	Creme
4D ( <i>Burkholderia</i> )	Argissolo	Caatinga	Rápido	Neutra	Branca
6M ( <i>Burkholderia</i> )	Argissolo	Agricultura	Rápido	Neutra	Creme

<sup>1</sup>Tempo de crescimento. <sup>2</sup>Alteração do pH em meio de cultura. <sup>3</sup>Cor da colônia.

Sementes das leguminosas foram escarificadas mecanicamente com lixa e posteriormente desinfestadas superficialmente por imersão em álcool a 70% (1 minuto) e hipoclorito de sódio a 2% (5 minutos). Após o tratamento foi feita a semeadura (4 sementes por vaso), realizando-se desbaste para uma planta por vaso, aos 15 dias após a semeadura. A inoculação foi realizada por ocasião do plantio, utilizando-se 1mL do inoculante por semente. Para o preparo do inoculante, as bactérias foram riscadas em placas de Petri com meio de cultura contendo extrato de levedura, manitol e ágar (YMA) com indicador azul de bromotimol (MENEZES et al., 2017). Após o crescimento das colônias puras, foi retirada uma pequena quantidade da cultura bacteriana, que foi inoculada em 20mL de meio líquido YM em frascos de

penicilina, onde foram cultivados sob agitação constante a 105 rotações por minuto (rpm) por três dias.

Durante os experimentos, foi avaliado o crescimento das leguminosas por meio da mensuração da altura e o diâmetro do colo das plantas, com régua e um paquímetro digital, respectivamente. As medições foram realizadas aos 30, 60 e 90 dias após a semeadura. A colheita foi realizada aos 90 dias para as duas espécies. Foram determinados o número de nódulos e a biomassa seca da parte aérea, raízes e nódulos após a secagem em estufa a 65°C por 72 horas. A biomassa da parte aérea foi passada em moinho tipo Willey, sendo posteriormente quantificado o teor de nitrogênio, segundo Malavolta et al. (1997). O N total acumulado na parte aérea das plantas (ANPA) foi calculado pela multiplicação dos teores do nitrogênio e suas respectivas biomassas. A eficiência relativa das estirpes foi determinada como descrito por Calheiros et al. (2013),  $(Ef\%) = ANPA \text{ das plantas inoculadas } / ANPA \text{ de plantas não inoculadas e que receberam N-mineral e depois convertidas em porcentagem.}$

Os resultados de altura de plantas, diâmetro do colo, biomassa seca da parte aérea, raiz e nódulos, número de nódulos, e acúmulo de nitrogênio da parte aérea foram submetidas à análise de variância pelo Teste F. Os resultados de número de nódulos foram transformados para  $(x+1)^{1/2}$ . Para as variáveis em que o F foi significativo, compararam-se as médias pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade, sendo as análises estatísticas realizadas no programa computacional Sisvar (FERREIRA, 2011). Os coeficientes de correlação entre as variáveis estudadas foram calculados pelo Statistica 8.0 (Statsol).

### 6.3 Resultados e Discussão

Durante a condução do experimento as mudas de leucena e sabiá desenvolveram-se normalmente e apresentaram índice de sobrevivência de 100%. Aos 30 dias após a semeadura, as mudas das leguminosas apresentaram uniformidade, com média de altura de 14,9 e 13,3 cm para leucena e sabiá, respectivamente, sem diferenças significativas entre os tratamentos com e sem inoculação (Tabela 3). Nesta fase, a altura de leucena variou de 14,1 a 15,7 cm, enquanto as de sabiá apresentaram uma amplitude de 12,2 a 14,1 cm. Aos 60 dias após a semeadura, as plantas de leucena e sabiá apresentaram em média 28,2 cm e 27,2 cm, respectivamente, não foram verificadas diferenças significativas para inoculação. Contudo, aos 90 dias o crescimento das duas leguminosas foi influenciado pela inoculação. Para leucena verificou-se uma maior altura nas plantas inoculadas com os isolados 36F e 45G, que apresentaram 57 e 52 cm, respectivamente. Quanto ao sabiá, as plantas em que os isolados 1E e 4D foram inoculados não diferiram do controle nitrogenado e apresentaram as maiores alturas, superando a testemunha absoluta (Tabela 3).

Para o diâmetro do colo, as mudas das duas leguminosas foram semelhantes na avaliação realizada aos 30 dias após a semeadura, com média de diâmetro de 1,32 e 1,29 respectivamente para leucena e sabiá. Aos 60 dias, as mudas das leguminosas também não expressaram respostas à inoculação, e apresentaram um diâmetro médio de 2,44 em leucena e 1,94 cm no sabiá. Por outro lado, aos 90 dias, a inoculação influenciou o diâmetro das duas leguminosas. Em leucena, o crescimento em diâmetro foi favorecido pelos isolados 36F, 43K e 45G, cujas mudas apresentaram, respectivamente, 4,03; 4,11 e 4,02 mm, não diferindo estatisticamente do controle nitrogenado. No que se refere ao sabiá, os maiores diâmetros foram observados nas mudas inoculadas com os isolados 1E (3,78 mm) e 4D (3,84 mm), os quais não diferiram do diâmetro das plantas que receberam adubação nitrogenada.

**Tabela 3.** Medidas de altura e diâmetro de mudas de *Leucaena leucocephala* e *Mimosa Caesalpinifolia* crescendo em resposta à inoculação com rizóbios, aos 30, 60 e 90 dias após a semeadura

Isolados	Dias após o plantio					
	30	60	90	30	60	90
	Altura de plantas (cm)			Diâmetro de plantas (mm)		
<i>Leucaena leucocephala</i>						
25B	15,4	27,5	47,0 b	1,21	2,25	3,44 b
36F	14,1	29,6	57,2 a	1,32	2,42	4,03 a
43K	14,3	26,2	47,8 b	1,36	2,45	4,11 a
45G	15,5	31,4	52,6 a	1,29	2,55	4,02 a
SEMIA 6069	15,3	28,8	45,6 b	1,34	2,44	3,36 b
N mineral	15,7	29,3	47,8 b	1,34	2,62	4,01 a
Controle sem N	14,2	24,6	42,7 b	1,37	2,39	3,64 b
Média	14,9	28,2	47,2	1,32	2,44	3,79
CV (%)	12,8	18,16	14,6	10,50	9,46	7,85
<i>Mimosa caesalpinifolia</i>						
1A	12,9	26,6	43,6 b	1,27	1,87	3,53 b
1E	13,2	27,5	52,5 a	1,30	1,92	3,78 a
4D	14,1	29,5	49,0 a	1,32	1,94	3,84 a
6M	12,2	25,7	43,6 b	1,26	1,90	3,45 b
BR3405	13,6	28,3	40,8 b	1,30	1,98	3,48 b
N mineral	13,8	28	50,2 a	1,33	1,96	3,81 a
Controle sem N	13,4	24,5	38,8 b	1,27	1,82	3,46 b
Média	13,3	27,2	45,5	1,29	1,94	3,62
CV (%)	16,36	15,25	16,41	10,30	14,47	10,00

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott – Knott a 5% de probabilidade

A altura e o diâmetro de plantas têm sido variáveis frequentemente utilizadas em estudos de avaliação da eficiência simbiótica de rizóbios inoculados em leguminosas arbóreas (CECCON et al., 2012; RAMOS et al., 2013; PRIMIERI et al., 2016), pois constituem parâmetros que indicam a qualidade das mudas, o potencial de sobrevivência e crescimento após o transplante, de modo que as mais altas e com maiores diâmetros são as que normalmente são mais vigorosas e resistentes ao plantio em campo (CAIONE; LANGE; SCHONINGER, 2012). No presente estudo constatou-se que a prática da inoculação permitiu que as plantas obtivessem maior crescimento em altura e diâmetro quando comparadas às plantas que não foram inoculadas nem receberam N fertilizante. Entretanto, contrastes significativos só foram

observados na terceira avaliação (90 dias). As ausências de diferenças significativas nas duas primeiras avaliações podem estar relacionadas ao tempo necessário para o estabelecimento da simbiose (MENDES et al., 2008). De acordo com Nobre (2008), algumas leguminosas arbóreas necessitam de 20 a 30 dias para exibir indícios de nódulos radiculares, retardando o início do processo de FBN.

Nos três solos, a existência de populações de rizóbios nativos compatíveis foi demonstrada pela nodulação natural das duas leguminosas arbóreas nos tratamentos que não foram inoculados (Tabela 4). Aparentemente, essas populações variam em tamanho de acordo com o solo, evidenciado pelas diferenças de nodulação entre estes. Para leucena a nodulação foi mais abundante no Latossolo (32 nódulos), mas não diferiu da nodulação apresentada no Argissolo (24 nódulos). No sabiá, as maiores nodulações foram obtidas nas mudas cultivadas no Argissolo (18 nódulos). No que se refere à inoculação, as plantas de leucena apresentaram em média 23 nódulos, sem contrastes significativos entre os tratamentos com e sem inoculantes. Por outro lado, a nodulação de sabiá foi favorecida pela inoculação com o isolado 6M, cujas mudas tinham 21 nódulos, seguido do isolado 1A, com 15 nódulos. Os demais tratamentos não diferiram entre si. As biomassas dos nódulos de leucena foram influenciadas pela inoculação, com o isolado 45G proporcionando a maior biomassa (47 mg planta<sup>-1</sup>). No sabiá, a biomassa de nódulos não foi influenciada pela inoculação.

Estudos têm demonstrado que a nodulação é afetada por diversos fatores relacionados à planta, ao microsimbionte e às condições de clima. É lógico que, na ausência de populações nativas de bactérias capazes de nodular determinada espécie vegetal, a simbiose não se estabelece. Geralmente, populações de rizóbios capazes de nodular leguminosas são abundantes em solos de regiões de onde as espécies são nativas (BALA et al., 2003). Deste modo, era de se esperar a presença de nódulos nas mudas de *M. caesalpinifolia* inclusive nas não inoculadas, já que a espécie é nativa do Nordeste brasileiro. Contudo, a leucena é uma espécie exótica, nativa da América Central, e mesmo assim apresentou nodulação em todos os solos. Possivelmente, isto se deve à alta promiscuidade desta espécie, que é capaz de estabelecer simbiose com rizóbios dos gêneros *Rhizobium* (PEREYRA et al., 2015), *Mesorhizobium* (RANGEL et al., 2016), *Sinorhizobium* (XU et al., 2014), *Bradyrhizobium* (WANG et al., 2006), *Allorhizobium* e *Cupriavidus* (FLORENTINO et al., 2009).

**†Tabela 4.** Valores médios do número e biomassa seca de nódulos de mudas de *Leucaena leucocephala* e *Mimosa caesalpinifolia* cultivadas em diferentes solos (Argi = Argissolo, Lat = Latossolo, Luv = Luvisolo) do Nordeste brasileiro, em função da inoculação com rizóbios nativos da região Semiárida do Brasil

Isolados	Classes de solo			Média	Classes de solo			Média
	Argi	Lat	Luv		Argi	Lat	Luv	
	-----Número de nódulos-----				----Biomassa seca de nódulos (mg planta <sup>-1</sup> )			
	<i>Leucaena leucocephala</i>							
25B	21	36	11	23	39	35	37	37 b
36F	18	33	16	21	37	36	33	32 b
43K	26	33	13	24	33	42	19	31 b
45G	31	42	12	30	55	38	47	47 a
SEMIA 6069	26	27	14	22	38	39	21	32 b
N mineral	21	20	10	17	29	26	11	22 b
C. absoluto	24	30	26	27	30	39	35	35 b
Média	24 A	32 A	14 B	23	32	34	36	34
CV (%)	30,78				35,16			
	<i>Mimosa caesalpinifolia</i>							
1A	20	9	17	15 b	40	24	62	42
1E	13	6	4	8 c	39	30	19	29
4D	14	7	4	8 c	50	31	25	34
6M	29	8	27	21 a	81	35	59	58
BR3405	17	5	6	9 c	55	28	31	35
N mineral	17	5	4	8 c	53	23	21	36
C. absoluto	16	3	6	8 c	48	13	33	31
Média	18 a	6 c	10 b	11	52 A	26 B	35 B	38
CV (%)	26,83				32,47			

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste de Scott - Knott a 5% de probabilidade

Não foram observadas diferenças significativas com relação à matéria seca das raízes (MSR) entre os tratamentos, sugerindo que os isolados não exerceram influência sobre o crescimento radicular das duas leguminosas (Tabela 5). Foram obtidos valores médios de 2,29 e 1,03 g planta<sup>-1</sup> para leucena e sabiá, respectivamente. Ausência de respostas da inoculação sobre o desenvolvimento de raízes de leguminosas tem sido frequentemente relatada na literatura (ANTUNES et al., 2011; CALHEIROS et al., 2015). Isso pode estar relacionado à menor exigência de nitrogênio das raízes (20% do N das plantas) em relação à parte aérea (ARAÚJO, 2004), resultando em respostas menos pronunciadas. Além disso, o pequeno volume

de solo utilizado nos vasos (1 dm<sup>3</sup>) pode ter limitado o crescimento do sistema radicular, evitando assim efeitos significativos.

**Tabela 5.** Valores médios da biomassa seca de raízes e da parte aérea de mudas de *Leucaena leucocephala* e *Mimosa caesalpinifolia* cultivadas em diferentes solos (Argi = Argissolo, Lat = Latossolo, Luv = Luvisolo) do Nordeste brasileiro, em função da inoculação com os isolados de rizóbio nativos da região Semiárida do Brasil

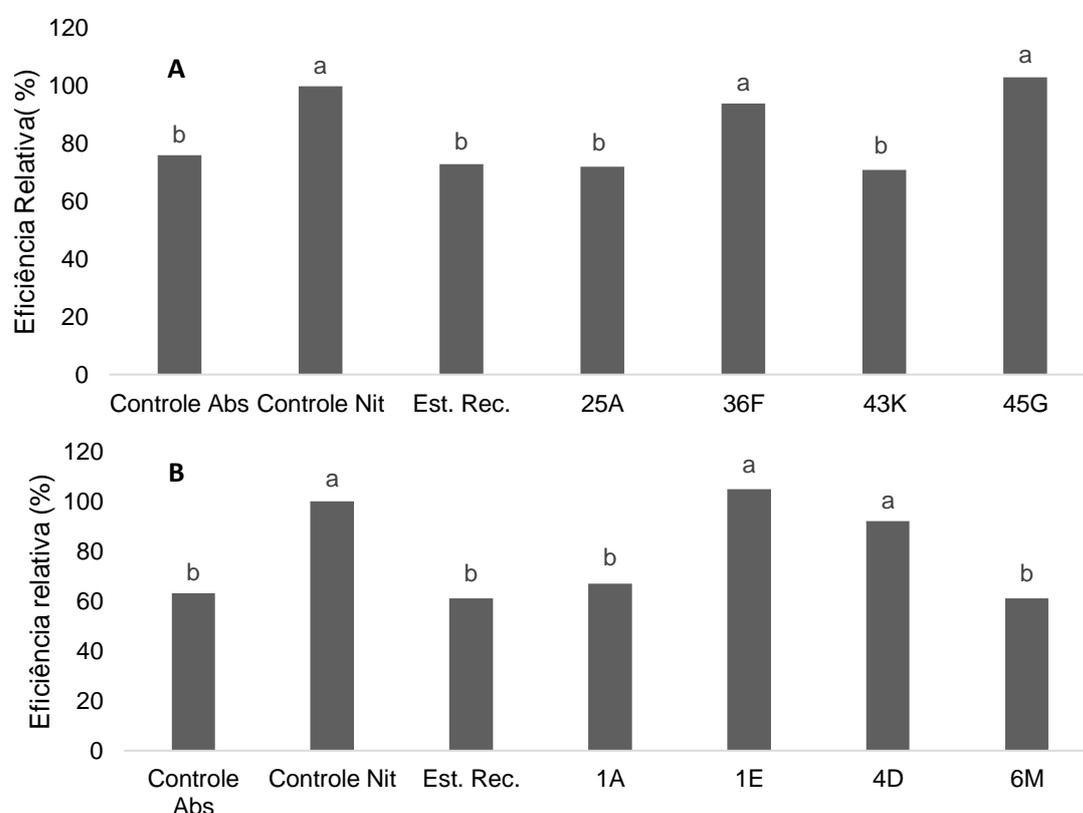
Isolados	Classes de solo			Média	Classes de solo			Média
	Argi	Lat	Luv		Argi	Lat	Luv	
<i>Leucaena leucocephala</i>								
	----Biomassa de raízes (g planta <sup>-1</sup> )-----				-----Biomassa aérea (g planta <sup>-1</sup> )-----			
25B	2,43	2,15	2,57	2,39	2,84 bA	2,03 bA	2,56 bA	2,48 b
36F	2,58	2,20	2,63	2,47	3,72 aA	2,72 aB	3,15 aB	3,20 a
43K	2,46	2,03	2,09	2,19	2,94 bA	1,93 bB	2,47 bA	2,45 b
45G	2,94	2,10	2,30	2,44	3,83 aA	3,28 aA	3,69 aA	3,60 a
SEMIA 6069	3,29	1,79	1,90	2,33	2,71 bA	2,38 bA	2,50 bA	2,53 b
N mineral	2,44	1,87	1,85	2,05	3,89 aA	3,04 aB	3,63 aA	3,52 a
C. absoluto	2,96	2,00	1,45	2,13	2,94 bA	2,12 bA	2,68 bA	2,58 b
Média	2,11	2,02	2,73	2,29	3,27 A	2,50C	2,95 B	2,91
CV (%)			22,08				14,56	
<i>Mimosa caesalpinifolia</i>								
1A	0,95	0,76	1,31	1,00	1,95 bA	1,22 bA	1,52 bA	1,57 b
1E	0,93	1,32	0,95	1,06	2,91 aA	2,10 aB	2,34 aB	2,45 a
4D	1,11	0,98	1,09	1,06	2,63 aA	1,92 aA	2,27 aA	2,27 a
6M	0,89	0,92	0,87	0,89	1,61 bA	1,17 bA	1,56 bA	1,45 b
BR3405	1,16	0,81	1,33	1,10	1,76 bA	1,30 bA	1,50 bA	1,52 b
N mineral	1,13	0,86	1,39	1,12	2,89 aA	2,13 aA	2,51 aA	2,51 a
C. absoluto	1,23	0,89	0,89	1,00	1,80 bA	1,24 bA	1,60 bA	1,55 b
Média	1,06	0,93	1,12	1,03	2,22 A	1,85 C	1,90 B	1,90
CV (%)			28,26				18,27	

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste de Scott - Knott a 5% de probabilidade

Foram observadas as maiores médias da biomassa aérea em leucena quando inoculadas com os isolados 36F e 45G, que não diferiram do controle nitrogenado e foram superiores as médias dos demais tratamentos (Tabela 5). As respostas mais pronunciadas para o isolado 36F foram verificadas nas mudas crescidas no Argissolo, que apresentaram 3,72 g. Para sabiá, a inoculação também influenciou na biomassa aérea, sendo favorecidas as plantas inoculadas com os isolados 1E e 4D que apresentaram em média 2,45 e 2,27 g planta<sup>-1</sup>, nestas as maiores biomassas foram

verificadas no Argissolo. Pereyra et al. (2015) avaliaram o efeito da inoculação de rizóbios sob o crescimento de leucena e obtiveram produções de massa variando de 3,2 a 4,9 g planta<sup>-1</sup>, portanto superiores aos verificados no presente estudo. Tavares, Franco e Silva (2016) avaliaram a produção de mudas de sabiá inoculadas com a estirpe BR3405, verificaram uma biomassa de 1,08 g planta<sup>-1</sup>, cerca de 50% inferior aos obtidos no presente trabalho. A avaliação da MSPA representa um bom indicativo do estado nutricional das plantas, e constitui umas das características mais utilizadas na seleção de estirpes para composição de inoculantes, devido a sua alta correlação com a eficiência simbiótica (ANTUNES et al., 2011; CALHEIROS et al., 2015).

Não foi constatado efeito da inoculação sobre os teores de nitrogênio na biomassa aérea das duas leguminosas, sendo observadas médias de 2,01 dag kg<sup>-1</sup> em sabiá e 1,86 dag kg<sup>-1</sup> leucena. Contudo, devido às diferenças observadas na produção de biomassa aérea, houve efeito significativo no acúmulo de nitrogênio na parte aérea (Tabela 6) e os isolados 36F e 45G em leucena, e 1E e 4D para sabiá foram os que proporcionaram maior acúmulo de N e foram altamente eficientes na FBN com eficiência relativa superior a 90%, não diferindo dos tratamentos fertilizados com nitrogênio (Figura 2).



**Figura 2.** Eficiência relativa de isolados rizobianos inoculados em leucena (A) e sabiá (B).

**Tabela 6.** Valores médios dos teores e acúmulo de nitrogênio da parte aérea de mudas de *Leucaena leucocephala* e *Mimosa caesalpinifolia* cultivadas em diferentes solos (Argi = Argissolo, Lat = Latossolo, Luv = Luvisolo) do Nordeste brasileiro, em função da inoculação com os isolados de rizóbios nativos da região Semiárida do Brasil

Isolados	Classes de solo			Média	Classes de solo			Média
	Argi	Lat	Luv		Argi	Lat	Luv	
<i>Leucaena leucocephala</i>								
	---Teor de nitrogênio (dag kg <sup>-1</sup> )----				--Acúmulo de nitrogênio na parte aérea (mg planta <sup>-1</sup> )			
25B	1,91	1,92	1,87	1,90	54,24	38,93	47,71	46,96 b
36F	1,91	2,01	1,74	1,89	71,25	54,40	55,23	60,29 a
43K	2,01	1,73	1,88	1,87	59,30	33,09	46,59	46,33 b
45G	1,80	1,85	1,76	1,80	70,70	60,59	64,99	65,43 a
SEMIA 6069	1,81	1,77	1,89	1,82	49,92	42,25	47,44	46,55 b
N mineral	1,88	1,81	1,79	1,83	73,45	55,22	64,95	64,54 a
C.absoluto	1,95	1,76	2,00	1,91	57,19	37,58	53,84	49,54 b
Média	1,90	1,84	1,85	1,86	62,2 A	46,0 C	54,3 B	54,23
CV (%)	8,60				17,02			
<i>Mimosa caesalpinifolia</i>								
1A	1,94	2,02	2,04	2,00	42,33	24,74	30,83	32,63 b
1E	2,14	1,95	2,11	2,07	61,98	41,12	49,46	50,85 a
4D	1,93	1,97	2,03	1,97	50,95	37,49	46,03	44,82 a
6M	2,01	2,03	2,20	2,08	32,35	23,81	34,47	30,21 b
BR3405	2,02	1,88	2,02	1,98	35,28	24,27	29,98	29,84 b
N mineral	2,13	1,91	1,84	1,96	59,68	41,02	48,42	49,71 a
C.absoluto	1,84	1,92	2,04	1,93	33,54	24,00	33,14	30,23 b
Média	1,99	1,95	2,05	2,01	45,1 A	30,9 C	38,9 B	38,33
CV (%)	10,27				21,02			

\*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

Foram obtidas correlações positivas e significativas para a maioria das variáveis (Tabela 7), sendo os maiores coeficientes de correlação obtidos para a MSPA e ANPA. Correlações significativas e positivas entre a MSPA e acúmulo de N também foram obtidas por Calheiros et al. (2015), em estudos com isolados de calopogônio, e por Antunes et al. (2011), com isolados nativos de feijão-fava. Essas

correlações altas são esperadas, uma vez que o principal fator que define a quantidade de N acumulado é a quantidade de biomassa produzida pelas plantas.

**Tabela 7.** Coeficiente de correlação da altura de plantas aos 90 dias (ALT), diâmetro das plantas aos 90 dias (DIA), número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), parte aérea (MSPA), raízes (MSR) m concentração de nitrogênio na parte aérea (ANPA), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ACN) das mudas de *Leucaena leucocephala* e *Mimosa caesalpinifolia*

Variáveis	DIA	NN	MSN	MSPA	MSR	CNPA	ANPA	Ef
<i>Leucaena leucocephala</i>								
ALT	0.583*	0.058	0.300*	0.669*	0.240	-0.048	0.623*	0.359*
DIA		0.016	0.085	0.637*	0.164	-0.060	0.584*	0.427*
NN			0.701*	0.149	-0.233	-0.105	0.111	0.292*
MSN				0.263*	-0.031	-0.225	0.187	0.261*
MSPA					0.012	-0.064	0.935*	0.789*
MSR						-0.050	-0.028	-0.069
CNPA							0.285*	0.189
ACN								0.820*
<i>Mimosa caesalpinifolia</i>								
ALT	0.683*	0.249*	0.419*	0.744*	0.151	0.003	0.703*	0.439*
DIA		0.404*	0.443*	0.660*	0.188	0.012	0.619*	0.290*
NN			0.808*	0.134	-0.135	0.140	0.181	-0.087
MSN				0.241	-0.046	-0.054	0.212	-0.021
MSPA					0.058	-0.002	0.945*	0.706*
MSR						0.028	0.059	-0.069
CNPA							0.312*	0.183
ACN								0.714*

Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t.

Esses resultados demonstram a possibilidade de selecionar, dentro da diversidade natural, estirpes de rizóbios nativos e adaptados ao Semiárido nordestino capazes de estabelecer uma simbiose efetiva. A obtenção de tais isolados é fundamental para inoculação de leguminosas arbóreas, por contribuir para o aumento das quantidades de N<sub>2</sub> fixado, sendo uma prática de suma importância para aquisição de nitrogênio em locais cujos os solos são pobres em nutrientes e matéria orgânica e onde a utilização de fertilizantes químicos é inacessível à maioria dos agricultores.

## 6.4 Conclusão

Os isolados 36F (*Rhizobium*) e 45G (*Mesorhizobium*) de leucena e 1E e 4D (*Burkholderia*) de sabiá mostraram-se bastante promissores quanto a FBN, podendo representar uma excelente estratégia para elevar as quantidades de N fixado em locais onde o aporte de tecnologia é baixo. Apesar de ter sido um estudo em vasos, os resultados obtidos servem como indicativo para demonstrar o potencial da inoculação de estirpes nativas eficientes e competitivas no estímulo de crescimento dessas leguminosas arbóreas. Estudos em campo são necessários a fim de se comprovar o seu potencial para uso na composição de inoculantes microbianos para indicação nas espécies estudadas.

## Referências

- ANTUNES, J. E. L.; GOMES, R. L. F.; LOPES, A. C. A.; ARAÚJO, A. S. F.; LYRA, M. C. C. P.; FIGUEIREDO, M. V. B. Symbiotic efficiency of rhizobia isolated from nodules of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 35, n. 3, p. 751-757, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832011000300011>>.
- ARAÚJO, E. S. **Estimativa da quantidade de N acumulada pelo sistema radicular da soja e sua importância para o balanço de N do solo**. 2004. 101p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2004.
- BALA, A.; MURPHY, P. J.; OSUNDE, A. O.; GILLER, K. E. Nodulation of tree legumes and the ecology of their native rhizobial populations in tropical soils. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 211-223, 2003. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(02\)00157-9](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(02)00157-9)>.
- CAIONE, G.; LANGE, A.; SCHONINGER, E. L. Crescimento de mudas de *Schizolobium amazonicum* (Huber ex Ducke) em substrato fertilizado com nitrogênio, fósforo e potássio. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 40, n. 94, p. 213-221, 2012.
- CALHEIROS, A. S.; LIRA JUNIOR, M. A.; ANDRADE, M.; SANTOS, M. V. F.; LYRA, M. C. C. P. Symbiotic effectiveness and competitiveness of calopo rhizobial isolates in an argissolo vermelho-amarelo under three vegetation covers in the dry forest zone of Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 39, n. 2, p. 367-376, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/01000683rbc20140393>>.
- CECCON, E.; ALMAZO, A. R.; ROMERO, E. M.; TOLEDO, I. The effect of inoculation of an indigenous bacterium on the early growth of *Acacia farnesiana* in a degraded area. **Cerne**, Lavras, v. 18, n. 1, p. 49-57, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0104-77602012000100007>>.
- CHAER, G. M.; RESENDE, A. S.; CAMPELLO, E. F. C.; FARIA, S. M.; BODDEY, R. M. Nitrogen-fixing legume tree species for the reclamation of severely degraded lands in Brazil. **Tree Physiology**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 139-149, 2011. Disponível em: <<http://doi:10.1093/treephys/tpq116>>.
- EMBRAPA. **Manual de métodos de análises de solo**. Rio de Janeiro: Embrapa CNPS, 1997. 212 p.
- EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: Embrapa, 2013. 353 p.
- ESTRINGANA, G. P.; BLÁZQUEZ, A. N.; MARQUES, M. J.; BIENES, R.; GONZÁLEZ, A. F.; ALEGRE, J. Use of Mediterranean legume shrubs to control soil erosion and runoff in central Spain. A large-plot assessment under natural rainfall conducted during the stages of shrub establishment and subsequent colonization. **Catena**, Frankfurt, v. 102, n. 4, p. 3-12, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.catena.2011.09.003>>.

FAYE, A.; SALL, S.; CHOTTE, J. L.; LESUEUR, D. Soil bio-functioning under *Acacia nilotica* var. *tomentosa* protected forest along the Senegal River. **Nutrient Cycling in Agroecosystems** v. 79, n. 1, p. 35-44, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10705-007-9093-7>>.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>>.

FLORENTINO, L. A.; GUIMARÃES, A. P.; RUFINI, M.; SILVA, K. D.; MOREIRA, F. M. S. *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.66, n.5, 2009. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162009000500012>>.

FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SANTOS, C. E. R. S.; SILVA, A. F.; CARVALHO, R. Fixação biológica de nitrogênio no Semiárido Brasileiro. **Revista Brasileira de Geografia e Física**, Recife, v.8, p. 585-597, 2015.

FREITAS, A. D. S.; SILVA, T. D.; MENEZES, R. S. C.; SAMPAIO, E. V. S. B.; ARAÚJO, E. R.; FRAGA, V. D. S. Nodulação e fixação de nitrogênio por forrageiras da caatinga cultivadas em solos do semiárido paraibano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, n. 9, p. 1856-1861, 2011.

FREITAS, A.D.S.; SAMPAIO, E.V.S.B.; SANTOS, C.E.R.S; FERNANDES, A.R. Biological nitrogen fixation in legume trees of the Brazilian caatinga. **Journal of Arid Environments**, Exeter, v. 74, n. 3, p. 344-349, 2010. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaridenv.2009.09.018>>.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: POTAFÓS, 1997. 319 p.

MARTINS, J. C. R.; FREITAS, A. D. S. D.; MENEZES, R. S. C.; SAMPAIO, E. V. D. S. B. Nitrogen symbiotically fixed by cowpea and gliricidia in traditional and agroforestry systems under semiarid conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 50, n. 2, p.178-184, 2015a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2015000200010>>.

MARTINS, P. G. S.; LIRA JUNIOR, M. A.; FRACETTO, G. G. M; SILVA, M. L. R. B.; VINCENTIN, R. P. *Mimosa caesalpiniiifolia* rhizobial isolates from different origins of the Brazilian Northeast. **Archives of Microbiology**, Amsterdam, v. 197, n. 3, p. 459-469, 2015 b. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1007/s00203-014-1078-8>>.

MENDES, M. M. C.; CHAVES, L. F. C.; PONTES NETO, T. P.; SILVA, J. A. A.; FIGUEIREDO, M. V. B. Crescimento e sobrevivência de mudas de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) Inoculadas com micro-organismos simbiotes em condições de campo. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 23, n. 2, p. 309-320, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5902/198050989277>>.

MENEZES, K. A. S.; ESCOBAR, I. E. C.; FRAIZ, A. C. R.; MARTINS, L. M. V.; FERNANDES JÚNIOR, P. I. Genetic Variability and Symbiotic Efficiency of *Erythrina velutina* Willd. Root Nodule Bacteria from the Semi-Arid Region in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 41, n.1, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/18069657rbcS20160302>>.

NASCIMENTO, L.R.V.; SOUSA, C.A.; SANTOS, C. E., FREITAS, A. D., & VIEIRA, I. M. Eficiência de isolados de rizóbios nativos do agreste paraibano em caupi. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 5, n. 1, p. 36-42, 2010.

NOBRE, A. P. **Respostas de mudas de *Gliricidia sepium* à aplicação de nitrogênio e fósforo**. 2008. 56 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2008.

PEREYRA, G.; HARTMANN, H.; MICHALZIK, B.; ZIEGLER, W.; TRUMBORE, S. Influence of Rhizobia Inoculation on Biomass Gain and Tissue Nitrogen Content of *Leucaena leucocephala* Seedlings under Drought. **Forests**, Basel, v. 6, n. 10, p. 3686-3703, 2015. Disponível em: <[doi:10.3390/f6103686](https://doi.org/10.3390/f6103686)>.

PRIMIERI, S.; COSTA, M. D.; STROSCHEIN, M. R. D.; STOCCO, P.; SANTOS, J. C. P.; ANTUNES, P. M. Variability in symbiotic effectiveness of N<sub>2</sub> fixing bacteria in *Mimosa scabrella*. **Applied Soil Ecology**, Giessen, v. 102, p. 19-25, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.01.018>>.

RAMOS, D. B. P.; SOUZA, L. A. G. Seleção de estirpes de rizóbios para formação de mudas de leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam) De Wit.) em Argissolo Vermelho Amarelo. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Pelotas, v. 8, n. 1, p.28-39, 2013.

RANGEL, W. M.; THIJS, S.; MOREIRA, F. M. S.; WEYENS, N., VANGRONSVELD, J.; VAN HAMME, J. D.; BOTTOS, E. M.; RINEAU, F. Draft genome sequence of *Mesorhizobium* sp. UFLA 01-765, a multitolerant, efficient symbiont and plant growth-promoting Strain Isolated from Zn-mining soil using *Leucaena leucocephala* as a trap plant. **Genome announcements**, Washington, v. 4, n. 2, 2016. Disponível em: <[doi:10.1128/genomeA.00050-16](https://doi.org/10.1128/genomeA.00050-16)>.

SILVA, A. F.; FREITAS, A. D. S.; COSTA, T. L.; FERNANDES JUNIOR, P.I.; MARTINS, L. M. V.; SANTOS, C. E. R. S.; MENEZES, K. A. S.; SAMPAIO, E. V. S. B. Biological nitrogen fixation in tropical dry forests with different legume diversity and abundance. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Ithaca, v. 117, n. 1, p. 321-334, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10705-017-9834-1>>.

SILVA, V. S. G.; SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S.; STAMFORD, N. P.; SILVA, A. F.; LYRA, M. C. C. P. Systems of land use affecting nodulation and growth of tree legumes in different soils of the Brazilian semiarid area. **African Journal of Agricultural Research**, Abuja, v. 11, n. 40, p. 3966-3974, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5897/AJAR2016.11603>>.

SIZENANDO, C. I. T.; RAMOS, J. P. C.; FERNANDES-JUNIOR, P. I.; LIMA, L. M.; FREIRE, R. M. M.; SANTOS, R. C. Agronomic efficiency of *Bradyrhizobium* in peanut under different environments in Brazilian Northeast. **African Journal of Agricultural Research**. Abuja, v. 11, n. 37, p. 3482-3487, 2016. Disponível em: <DOI: 10.5897/AJAR2016.11294>.

SOUZA, L. A. G.; NETO, E. B.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P. Desenvolvimento e nodulação natural de leguminosas arbóreas em solos de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 2, p. 207-217, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2007000200009>>.

TAVARES, S.R. L.; FRANCO, A. A.; SILVA, E. M. S. Produção de mudas de sabiá *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. noduladas e micorrizadas em diferentes substratos. **Holos**, Natal, v. 7, n. 1, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.15628/holos.2016.3933>>.

WANG, F. Q.; WANG, E. T.; ZHANG, Y. F.; CHEN, W. X. Characterization of rhizobia isolated from *Albizia* spp. in comparison with microsymbionts of *Acacia* spp. and *Leucaena leucocephala* grown in China. **Systematic and applied microbiology**, Amsterdam v. 29, n. 6, p. 502-517, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.12.010>>.

XU, K. W.; ZHANG, X. P.; CHEN, Y. X.; ZHOU, D. H. Genetic diversity of the rhizobia isolated from *Leucaena leucocephala* in Panzhihua City. **Microbiology China**, v. 41, n. 6, 2014. Disponível em: <DOI: 10.13344/j.microbiol.china.130868>.

YUAN, Z. Q.; YU, K. L.; EPSTEIN, H.; FANG, C.; LI, J. T.; LIU, Q. Q.; GAO, W.J.; LI, F. M. Effects of legume species introduction on vegetation and soil nutrient development on abandoned croplands in a semi-arid environment on the Loess Plateau, China. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 541, n.3, p. 692-700, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.108>>.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo fornecem informações relevantes de cunho científico e também técnico prático que poderão auxiliar no manejo dos sistemas agrícolas praticados no Semiárido de Pernambuco, por meio da geração de tecnologias que venham proporcionar o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável, promovendo também a recuperação ambiental, impedindo o avanço da desertificação, fenômeno que pode vir a ser um dos maiores problemas da região Nordeste Brasileira.

Por meio da inoculação com rizóbios espera-se um melhor estabelecimento das leguminosas arbóreas em consórcio com os cultivos característicos do semiárido pernambucano e uma melhoria da fertilidade do solo. Estimulando dessa forma, uma agricultura ecológica com uso de insumos biológicos, diminuindo a utilização dos produtos químicos que apresentam efeito prejudicial ao meio ambiente e a qualidade de vida dos pequenos e médios produtores rurais do Semiárido pernambucano.

A tese pretende ainda contribuir no desenvolvimento de inoculantes biológicos específicos para as condições edafoclimáticas da região Semiárida brasileira, que proporcionarão um melhor aproveitamento da agricultura local, gerando empregos e renda, contribuindo dessa forma com a diminuição do êxodo rural e a marginalização dos agricultores nos grandes centros urbanos.

O estudo terá continuidade em nível de campo com a implantação de um sistema agroflorestal no município de Serra Talhada, para que se possa avaliar o comportamento dos isolados selecionados quanto a adaptabilidade as condições edafoclimáticas, competitividade e eficiência simbiótica.