

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO**

JÉSSICA RAFAELLA DE SOUSA OLIVEIRA

**SIMBIOSE ENTRE *Crotalaria* spp. E BACTÉRIAS NATURALMENTE
ESTABELECIDAS EM SOLOS DA ZONA DA MATA DE
PERNAMBUCO**

**Recife
2021**

Jéssica Rafaella de Sousa Oliveira

Engenheira agrônoma

Simbiose entre *Crotalaria* spp. e bactérias de nódulos naturalmente estabelecidas em solos da Zona da Mata de Pernambuco

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 Doutora em Ciência do Solo

Orientadora

Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas

Coorientadores

Dra. Mariangela Hungria da Cunha

Dra. Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos

**Recife
2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

O48s

Oliveira, Jéssica Rafaella de Sousa
Simbiose entre *Crotalaria* spp. e bactérias naturalmente estabelecidas em solos da zona da mata de Pernambuco /
Jéssica Rafaella de Sousa Oliveira. - 2021.
100 f. : il.

Orientador: Ana Dolores Santiago de Freitas.
Coorientador: Mariangela Hungria da Cunha.
Inclui referências e apêndice(s).

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo,
Recife, 2021.

1. Simbiose. 2. ARDRA. 3. Leguminosa. 4. Fixação biológica de nitrogênio. 5. *Crotalaria* spp. I. Freitas, Ana Dolores
Santiago de, orient. II. Cunha, Mariangela Hungria da, coorient. III. Título

CDD 631.4

JÉSSICA RAFAELLA DE SOUSA OLIVEIRA

Simbiose entre *Crotalaria* spp. e bactérias de nódulos naturalmente estabelecidas em solos da Zona da Mata de Pernambuco

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 Doutora em Ciência do Solo.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2021

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mario de Andrade Lira Junior
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Lindete Míria Vieira Martins
Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr. Jakson Leite
Instituto Federal do Pará

Dr. Diogo Paes da Costa
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

*Aos meus amados pais, Jailton Orlando de Oliveira e Maria da
Conceição Nolácio de Sousa Oliveira; ao meu irmão, José
Orlando de Oliveira Neto, à minha tia, Maria das Graças
Nolácio de Sousa, e ao meu noivo, Ernesto Rodrigues da Silva
Neto, por estarem ao meu lado durante toda a caminhada, me
ensinando quão real é o sentido do amor.*

DEDICO

Se tu podes crer, tudo é possível ao que crê.

Marcos 9:23

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me conceder o dom da vida, guiar e iluminar os meus passos para que eu chegasse até aqui; enfim, por tudo que tenho, tudo que sou e por todo amor dedicado a mim, mesmo em meio a falhas e fraquezas. Obrigada, Deus.

A minha Avó, **Zita Nolácio** (in memoriam), que continuará presente em meu ser eternamente. Por todo amor, cuidado e zelo sem limites. Refugio-me de tua saudade nas lembranças, teu brilho não me deixa cair na escuridão. Essa conquista é nossa.

Aos meus Pais, **Jailton Orlando de Oliveira e Maria da Conceição Nolácio de Sousa Oliveira**, que são a razão da minha existência, por toda dedicação, confiança, ensinamentos, apoio e amor com a minha vida. Pelas pessoas EXCEPCIONAIS que vocês são para mim, pela presença em todos os momentos, por ser o meu rumo, meus exemplos, meus heróis, meus PAIS. É POR VOCÊS, PARA VOCÊS, SÓ POR VOCÊS.

A minha Tia, **Maria das Graças**, pela pessoa que és em minha vida por todo amor que tens a mim, por nunca medir esforços pelo meu melhor, por me pegar no colo e me ter como filha.

Ao meu irmão, **Orlando Oliveira**, pela parceria, amor, apoio e incentivo. Por estar presente mesmo que a distância nos separasse. “E se o tempo for te levar, eu sigo essa hora e pego carona pra te acompanhar”.

Ao meu noivo, amigo e companheiro, **Ernesto Neto**, por todo amor, parceria, apoio e incentivo nas minhas decisões, atenção e pela PACIÊNCIA durante toda a trajetória.

De modo especial, à Dr^a. **Ana Dolores Santiago de Freitas**, passaria linhas e linhas tentando descrever o quão você foi além de orientadora. Amiga, mãe, conselheira, prestativa, condutora... resumo meu agradecimento de maneira clara; sem você, com certeza a caminhada teria sido mais árdua, obrigada por ser calma em todo caos. Não há palavras que descrevam a profissional e EXEMPLO DE MULHER que és. Obrigada.

A minha ex-orientadora Prof^a. Dr^a. **Júlia Kuklinsky-Sobral** (in memoriam), por ter feito parte da minha formação, pela disponibilidade, atenção e carinho sincero. Não pensei estar escrevendo isso tão cedo, mas tua partida deixou feridas que se transformaram em saudades...Onde quer que eu vá, levarei seu exemplo comigo, obrigada por dividi-lo comigo.

A minha querida e amada co-orientadora **professora Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos**, pelo carinho e convivência desde o mestrado. Obrigado pela amizade e ensinamentos, você é excepcional, Carol.

A Dr^a. **Mariangela Hungria da Cunha**, na pessoa de coorientadora do meu trabalho, pelo aceite e disponibilidade.

As Dr^s **Maria do Carmo Catanho e Luiza Bastos** agradeço também por toda amizade, oportunidades e ensinamentos de valiosas contribuições nessa reta final.

Aos bolsistas **Karla Emmanuele, Maria Eduarda, Daianete Mourato, Romário Mendes e Aline Fernandes**, pela amizade e suporte em várias etapas do trabalho, serei sempre grata.

Ao Grupo de Fixação Biológica de Nitrogênio – GFBN da UFRPE: **Alekssandro Ferreira, Augusto Cesar, Vinicius Gomes, Ítalo Oliveira, Sueide Karina, Layane Barbosa, Pablo Acácio, Andressa Oliveira, Juscelia Ferreira, Edilândia Dantas, Leandro Reis, Maryanna Vital e Flaviano Oliveira**.

Ao LGBM- **Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana**, lugar onde dei início a minha vida acadêmica, pelo acolhimento apoio e amizade.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – **EMBRAPA**, na pessoa do Dr. **Paulo Ivan Fernandes Júnior**, pela parceria na realização da pesquisa.

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco, **IPA**, na pessoa do Dr. **José de Paula**, pela parceria, por toda estrutura e assistência fornecida durante a condução da tese.

A todos os professores que fizeram parte da minha formação desde a Educação Infantil ao Ensino Médio, sou feliz por ter tido essa base bem alicerçada.

A todos os professores que me ensinaram na educação de nível superior, para que assim eu pudesse seguir em frente na minha vida profissional, muito obrigada.

As turmas “**Terceirão 2008**” e “**Agronomia 2009.2**”, pelos momentos, pelas amizades, pelo despertar da saudade, muito obrigada.

A **Maria do Socorro Santana**, pelos bons momentos, risos, ensinamentos, força, e abraços calorosos. A todos os demais funcionários da pósgraduação.

A todos os professores da pós-graduação, pelo incentivo e valiosos ensinamentos, em especial, aos que tive oportunidade de conviver.

Aos demais amigos da pós-graduação, agradeço pela convivência e pelo apoio.

Aos professores da banca examinadora, pela participação e valorosas sugestões atribuídas a este trabalho.

Aos meus queridos amigos (**Hiarajany Ferreira, Edilândia Dantas, Izabelli Cavalcanti, Dariane Gonçalves, Marielly Nayane, Tays Botelho, Tiago Lima, Francis Henrique, Tiago Oliveira, Eduardo Santana**) que não deixaram com que a distância nos

separasse, pelo apoio, pelos conselhos, e por me trazer aconchego nas horas precisas. Vocês são memoráveis.

A **UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS/UFRPE**, por me proporcionar a realização da minha graduação.

A **UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO** e demais órgãos de fomento, pela oportunidade apoio na pós-graduação. Agradeço a todas as pessoas que passaram por minha vida, as quais contribuíram de forma direta ou indiretamente para minha formação.

MUITO OBRIGADA

Simbiose entre *Crotalaria* spp. e bactérias de nódulos naturalmente estabelecidas em solos da Zona da Mata de Pernambuco

RESUMO

O Brasil experimenta o maior sucesso de uso da fixação biológica de nitrogênio (FBN) em sistemas agrícolas e, recentemente, vem se posicionando no cenário internacional com a descrição de novas espécies de rizóbios. A diversidade de combinações de tipos e coberturas de solo tornam a Zona da Mata de Pernambuco uma região com grande potencial para estudos de ecologia de rizóbios e para buscas de novas estirpes elites para a fixação biológica de nitrogênio (FBN). Este trabalho tem como objetivo estimar a ocorrência e a diversidade de bactérias de nódulos de diferentes espécies do gênero *Crotalaria* para disponibilização de uma coleção e futura obtenção de inoculantes recomendáveis para adubação verde em solos da Zona da Mata de Pernambuco. Inicialmente, foi realizada uma amostragem representativa das diferentes condições edafoclimáticas da Zona-da-Mata de Pernambuco, englobando solos dos principais tipos e usos de solo na região, em pontos definidos de acordo com os requisitos classe e cobertura vegetal do solo. As classes de solo foram selecionadas no 1º nível categórico, a saber: ARGISSOLO, LATOSSOLO e GLEISSOLO, que, juntas, representam em torno de 85% dos solos da região. Quatro tipos de coberturas vegetais, que são as predominantes na Zona-da-Mata de Pernambuco, foram definidos: 1) cultivo com cana-de-açúcar; 2) capoeira; 3) outros usos agropecuários e 4) vegetação nativa (mata). A ocorrência natural de populações de bactérias capazes de formar nódulos com três espécies de *Crotalaria* spp., assim como o desenvolvimento das plantas cultivadas nas amostras de solos coletadas foram determinados em experimentos realizados em vasos em casa de vegetação. Este experimento também foi utilizado como ensaio de plantas iscas para isolar bactérias de nódulos das plantas cultivadas nas amostras de solo representativas de cada situação. Foi obtida uma coleção de 505 isolados de nódulos, que foi caracterizada fenotipicamente em meio de cultura YMA. Em isolados representativos dos grupos fenotípicos utilizados, foi traçado um perfil genético inicial das populações naturalmente estabelecidas nos solos estudados, por meio da avaliação da variabilidade genética dos isolados utilizando as técnicas de BOX-PCR e Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA). A análise conjunta dos perfis de restrição do 16S rRNA, obtida a partir das endonucleases: *Alu* I, *Xba* I, *Apa* I, *Xho* I, *Rsa* I, *Hae* III e *Nde* I permitiu a formação de grupos de isolados com similaridade, e de acordo com a distribuição das estirpes referência, consistiu na separação dos isolados nas classes de solos. Este agrupamento aponta variabilidade genética dos isolados e indica uma possível existência de grupos taxonômicos, dentre os isolados obtidos, ainda não conhecidos pela literatura.

Palavras-chave: Simbiose. ARDRA. Leguminosa. Fixação biológica de nitrogênio. *Crotalaria* spp.

Simbiose entre *crotalaria* spp. E rizóbios naturalmente estabelecidos em solos da zona da mata de Pernambuco

ABSTRACT

Brazil is experiencing the greatest success in the use of biological nitrogen fixation (FBN) in agricultural systems and, recently, has been positioning itself on the international scene with the description of new species of rhizobia. The diversity of combinations of types and soil cover makes the Zona da Mata of Pernambuco a region with great potential for studies of rhizobia ecology and for the search for new elite strains for biological nitrogen fixation (FBN). This project aims to estimate the occurrence and diversity of nodule bacteria from different species of the *Crotalaria* genus to make a collection available for obtaining inoculants for recommendation for green manure in soils in the Zona da Mata of Pernambuco. Initially, a representative sampling of the different edaphoclimatic conditions of the Zona-da-Mata de Pernambuco was carried out, encompassing soils of the main types and uses of soil in the region, at points defined according to the class requirements and soil cover. The soil classes were selected at the 1st categorical level, namely: ARGISSOLO, LATOSSOLO and GLEISSOLO, which together represent about 85% of the region's soils. Four types of vegetation cover, which are predominant in the Zona-da-Mata de Pernambuco, were defined: 1) cultivation with sugarcane; 2) capoeira; 3) other agricultural uses and 4) native vegetation (forest). The natural occurrence of populations of bacteria capable of forming nodules with three species of *Crotalaria* spp., As well as the development of plants grown in the collected soil samples were determined in experiments carried out in pots in a greenhouse. This experiment was also used as a bait plant test to isolate nodule bacteria from plants grown in soil samples representative of each situation. A collection of 505 nodule bacteria was obtained, which was characterized phenotypically in YMA culture medium. In isolates representative of the phenotypic groups used, an initial genetic profile of the populations naturally established in the studied soils was traced, through the evaluation of the genetic variability of the isolates using the techniques of BOX-PCR and Restriction Analysis of Amplified Ribosomal DNA (ARDRA). The joint analysis of the restriction profiles of the 16S rRNA, obtained from the endonucleases: Alu I, Xba I, Apa I, Xho I, Rsa I, Hae III and Nde I allowed the formation of groups of isolates with similarity, and according to with the distribution of the strains, it consisted of the separation of the isolates in the soil classes. This grouping points to genetic variability of the isolates and indicates a possible existence of taxonomic, among the isolates obtained, not yet known in the literature.

Keywords: Symbiosis. ARDRA. Leguminous. Biological nitrogen fixation. *Crotalaria* spp.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Informações dos locais de amostragem de solo da Zona da Mata de Pernambuco, Brasil	44
Tabela 2. Atributos físicos das amostras de solos coletadas em diferentes tipos e coberturas de solo da Zona-daMata de Pernambuco, Brasil	56
Tabela 3. Caracterização química das amostras de solos coletadas em diferentes tipos e coberturas de solo da Zona-da-Mata de Pernambuco, Brasil	60
Tabela 4. Sítios de corte das enzimas utilizadas na Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA)	53
Tabela 5. Total de isolados de crotalária cultivadas em solos e diferentes tipos e coberturas de solo da Zona-da-Mata de Pernambuco, Brasil	70
Tabela 6. Proporções (%) das características de modificação do pH em meio de cultura e de produção de exopolissacarídeos de isolados de <i>Crotalaria juncea</i> e <i>Crotalaria spectabilis</i> cultivadas em solos da Zona-daMata de Pernambuco	71
Tabela 7. Proporções (%) das características de modificação do pH em meio de cultura e de produção de exopolissacarídeos de isolados de <i>Crotalaria juncea</i> e <i>Crotalaria spectabilis</i> originados de Argissolos, Latossolos ou Gleissolos da Zona-da-Mata de Pernambuco sob diferentes usos	73

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Imagens correspondentes as coberturas vegetais, A) Cana-de-açúcar; B) Capoeira; C) Vegetação Nativa e D) Outros usos agropecuários, presente na Zona-da-Mata pernambucana45
- Figura 2. Distribuição dos pontos de coleta na Zona-da-Mata Pernambucana46
- Figura 3. Desenho da parcela experimental. A área destacada representa os pontos que foram amostrados em subamostras, para composição da amostra composta47
- Figura 4. Apresentação geral do experimento conduzido com crotalaria para acessar comunidades rizobianas nativas de solos da Zona-da-Mata de Pernambuco, Brasil49
- Figura 6. Análise da Massa seca da parte área x Massa seca de raiz de três espécies de Crotalária cultivadas em diferentes solos da zona da Mata de Pernambuco.65
- Figura 7. Análise da Biomassa total x Número de nódulos de três espécies de Crotalária cultivadas em diferentes solos da zona da Mata de Pernambuco.66
- Figura 8. Análise da Massa seca de nódulos x Número de nódulos de três espécies de Crotalária cultivadas em diferentes solos da zona da Mata de Pernambuco.67
- Figura 9. Análise da Massa seca da parte área x Massa seca de raiz de três espécies de Crotalária cultivadas em solos com diferentes coberturas vegetais na zona da Mata de Pernambuco.68
- Figura 10. Análise da Biomassa Total x Número de nódulos de três espécies de Crotalária cultivadas em solos diferentes coberturas vegetais na zona da Mata de Pernambuco.69
- Figura 11. Análise da Massa seca de nódulos x Número de nódulos de três espécies de Crotalária cultivadas em solos com diferentes coberturas vegetais na zona da Mata de Pernambuco.70
- Figura 12. Amplificação dos fragmentos de DNA dos isolados pela técnica BOX-PCR em isolados de nódulos de Crotalária. Fragmento amplificado utilizando o primer BOX para rizóbios. Os números correspondem aos isolados selecionados. O marcador molecular (M) utilizado foi o de 100pb DNA ladder.75
- Figura 13. Árvore filogenética (Coeficiente de Correlação Pearson) construída com base em sequências parciais da técnica BOX-PCR de 150 sequências de bactérias isoladas

	da crotalária cultivadas em solos com diferentes coberturas vegetais na zona da Mata de Pernambuco.	76
Figura 14.	Perfis de restrição do fragmento do gene 16S rRNA de isolados de nódulos de crotalária cultivadas em solos com diferentes coberturas vegetais na zona da Mata de Pernambuco.	77
Figura 15.	Perfis de restrição do fragmento do gene 16S rRNA de isolados de nódulos de crotalária cultivadas em solos com diferentes coberturas vegetais na zona da Mata de Pernambuco. Enzimas: Nde I (A), <i>Apa</i> I (B), <i>Xba</i> I (C) e <i>Xho</i> I(D).	78
Figura 16.	Perfis de restrição do fragmento do gene 16S rRNA de isolados de nódulos de crotalária cultivadas em solos com diferentes coberturas vegetais na zona da Mata de Pernambuco. Enzimas: <i>Alu</i> I (E), <i>Hae</i> III (F) e <i>Rsa</i> I (G).	79
Figura 17.	Árvore filogenética (Coeficiente de Correlação Pearson) construída com base em sequências parciais da técnica ARDRA de 47 sequências de bactérias isoladas da crotalária cultivadas em solos com diferentes coberturas vegetais na zona da Mata de Pernambuco.	80

LISTA DE SIGLAS

FBN- Fixação Biológica de Nitrogênio

MSPA- Massa seca da parte aérea

MSR- Massa seca de raiz

BT- Biomassa Total

NN- Número de nódulos

MSN- Massa seca de nódulos

MEN- Massa específica de nódulos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
1.1 Hipóteses	28
1.2 Objetivo geral	28
1.3 Objetivos específicos.....	28
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1 A Zona-da-Mata de Pernambuco	29
2.2 O gênero Crotalaria: aspectos gerais	29
2.3 O elemento Nitrogênio	31
2.4 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)	32
2.5 A adubação verde.....	37
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1 Escolha dos pontos, amostragem e caracterização físico-química dos solos.....	43
3.2 Experimento para observação da nodulação natural e desenvolvimento das espécies de crotalária	48
3.3 Isolamento e caracterização dos isolados em meio de cultura	50
3.4 Avaliação da variabilidade genética dos isolados	51
3.4.1 Extração de DNA.....	51
3.4.2 Amplificação dos fragmentos de DNA por BOX-PCR.....	52
3.4.3Análise de restrição do DNA Ribossomal Amplificado – ARDRA.....	52
3.6 Análise de dados	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1 Caracterização físico-química dos solos.....	55
4.2 Desenvolvimento das espécies de Crotalária e observação da nodulação natural	64
4.3 Características fenotípicas das bactérias de nódulos	70
4.4 Agrupamento fenotípico por BOX-PCR e 16S.....	73
.....	75
4.5 Diversidade genética de nódulos de crotalária utilizando ARDRA.....	77
5 CONCLUSÕES	82
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
7 APÊNDICES	97

1 INTRODUÇÃO

Devido a sua disponibilidade de recursos hídricos, condições edafoclimáticas favoráveis, eventual demanda de mão-de-obra e vantagens locacionais, A Zona da Mata de Pernambuco é considerada como uma das regiões de grande potencial econômico do Nordeste. Os índices pluviométricos relevantes e a regularidade na distribuição de chuvas estimula o estabelecimento da exploração da agricultura na região, principalmente a cultura canavieira e o setor sucro-alcooleiro de modo geral, que é uma das atividades agrícolas de maior importância no estado.

Desde os tempos da colonização, o setor canavieiro exerce uma forte pressão sobre a cobertura vegetal nativa da mesorregião da Mata Pernambucana, ocasionando profundas alterações na vegetação original. Atualmente, a vegetação nativa encontra-se restrita a reduzidos fragmentos de matas, tendo poucos indícios de remanescentes de área nativa, ocorrendo, em geral, matas secundárias de extensão e estágios sucessionais diversos, distribuídos de forma esparsa por toda área do litoral sul de Pernambuco, com poucas áreas ao norte, conduzindo a uma situação crítica, uma vez que desequilibra a biodiversidade da região. Diante disso, estudos têm sido desenvolvidos objetivando maior atenção do setor agrícola à conservação dos recursos naturais.

O nitrogênio utilizado em sistemas agrícolas é produzido com utilização de combustíveis fósseis, sendo, por isso, considerado um forte emissor de CO₂ e de óxido nitroso para a atmosfera. O aumento da concentração destes gases na atmosfera terrestre contribui para um dos principais problemas ambientais da atualidade, as mudanças climáticas. Do ponto de vista ecológico, a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) atende a preocupação da sociedade com a preservação ambiental, visto que é um processo que ocorre naturalmente sem a necessidade de manipulação, fato que minimiza o uso de insumos agrícolas nitrogenados. Assim, a simbiose entre as bactérias diazotróficas e leguminosas é vista como uma importante alternativa à fertilização química em culturas agrícolas.

Por ser uma alternativa tecnológica para aumentar a produtividade agrícola, reduzir o uso de insumos onerosos e minimizar os gases do efeito estufa, contribuindo para uma agricultura mais sustentável, a FBN foi incluída no plano ABC (Agricultura de Baixo Carbono) do Governo Federal como parte do compromisso internacional assumido pelo Brasil, em 2009, para reduzir as emissões de gases do efeito estufa entre 36 e 39% até 2020. O objetivo definido para o programa ABC foi a ampliação do uso da FBN em 5,5 milhões de hectares de cultivo,

em substituição ao uso de fertilizantes nitrogenados. Um dos parâmetros utilizados para monitorar as reduções de emissão de GEE pela ampliação do uso de FBN serão as mudanças no uso do solo, com implantação de culturas que utilizem a FBN. Atualmente, o Ministério da Agricultura estuda a edição de um novo Plano ABC.

A adoção de práticas de manejo que favoreçam o processo de FBN são estratégias para alcançar as metas do plano ABC. Para o estabelecimento dessas práticas, é fundamental o conhecimento dos diversos fatores que interferem nas quantidades de N fixadas nas diversas combinações de condições ambientais e de manejo nos principais sistemas de produção. Dentro dessas práticas de manejo, a utilização de leguminosas como adubos verdes, juntamente com culturas de maior interesse agrícola, é uma tecnologia que pode propiciar a substituição ou a complementação da adubação mineral, além de representar uma fonte de matéria orgânica e proporcionar uma proteção física ao solo, garantindo a sustentabilidade dos sistemas.

O cultivo de adubos verdes é uma prática utilizada para adicionar matéria orgânica e nitrogênio aos sistemas, além de proporcionar proteção física ao solo. Devido à capacidade de fixar nitrogênio atmosférico por meio da simbiose com bactérias diazotróficas, as leguminosas são as espécies mais utilizadas como plantas de cobertura. Para a recomendação das espécies a serem utilizadas como adubos verdes em determinada região, deve-se procurar combinações dos fatores que atendam às exigências locais, dando-se preferência àquelas que produzam maior volume de biomassa, estejam menos sujeitas a pragas e doenças e que possuam sementes relativamente uniformes e fáceis de semear, manualmente ou por meio de máquinas, além de terem capacidade de aportar quantidades importantes de N atmosférico.

As crotalárias apresentam características interessantes para utilização como adubação verde, atingindo altos rendimentos de matéria seca e capacidade de absorver grande parte de sua nutrição nitrogenada a partir da simbiose com rizóbios. O gênero *Crotalaria*, que compreende cerca de 600 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, tem como destaque a espécie *Crotalaria juncea* que, apesar de origem indiana, é adaptada às regiões tropicais do planeta, apresentando bom desempenho em solos menos estruturados, arenosos e com baixa fertilidade natural. Apresenta um bom sistema radicular, melhorando a infiltração de água e boa capacidade de fixar nitrogênio e promover elevada reciclagem de vários nutrientes no perfil do solo, contribuindo para aumento de rendimento nos cultivos posteriores. Apesar desse potencial simbiótico, estudos sobre a ocorrência de rizóbios, desenvolvimento de nódulos e potencial de fixar nitrogênio estão restritos a algumas regiões e espécies. Embora existam relatos da utilização de *Crotalaria juncea* como adubo verde em canaviais da Zona-da-Mata de Pernambuco, são escassas as informações sobre o desempenho de outras espécies do gênero e

sobre a diversidade e eficiência de microssimbiontes nativos de solos da região.

A diversidade de micro-organismos em ecossistemas naturais é um fator que deve ser levado em conta para melhor compreensão das relações ecológicas e evolutivas de cada estirpe microbiana, e pelo fato que a complexidade das interações entre rizóbios e características edáficas podem alterar tais populações. Para se conhecer de maneira satisfatória as populações de rizóbios provenientes de leguminosas, é necessário adquirir simbiontes do habitat natural. Esta diversidade pode ser avaliada através de características morfológicas, bioquímicas, fisiológicas e genéticas.

O avanço da tecnologia tem proporcionado que a diversidade de isolados rizobianos seja acessada por meio técnicas que envolvem o estudo do DNA microbiano. Essas técnicas são embasadas nas reações de PCR (reação em cadeia da polimerase) proporcionam consideráveis avanços no conhecimento da diversidade e taxonomia dos rizóbios, permitindo uma vasta quantidade de cópias de um determinado gene, ou uma região de interesse, além de detecção de sua presença e utilização deste produto em análises complementares. A técnica de BOX-PCR permite a amplificação de fragmentos com tamanhos diferentes e não apenas um amplicon. Nesta técnica os perfis gerados na amplificação são analisados em géis de agarose, permitindo a comparação de um grande número de estirpes de rizóbio (TORRES-JÚNIOR et al., 2014).

Diante do exposto, a aplicação de metodologias que objetivem analisar a diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio e seu potencial de promoção de crescimento vegetal em espécies de *Crotalaria* são de grande importância, visto que podem resultar na obtenção de estirpes que promovam o desenvolvimento das plantas e sua capacidade de aportar N atmosférico aos sistemas. A caracterização fenotípica dos isolados de rizóbios é a etapa inicial do processo de avaliação dessa biodiversidade, trazendo informações não somente culturais mas também sobre o perfil metabólico das coleções rizobianas, como seu potencial na promoção de crescimento de plantas.

1.1 Hipóteses

- 1) Populações de bactérias naturalmente estabelecidas em solos da Zona-da-Mata de Pernambuco são repositórios de estirpes capazes de formar simbiose com espécies do gênero *Crotalaria*.
- 2) Solos de diferentes classes e sob diferentes manejos apresentam diferenças em suas populações de bactérias naturalmente estabelecidas capazes de nodular *Crotalaria* spp.
- 3) Diferentes espécies de *Crotalaria* apresentam diferentes capacidade de produção de biomassa e de preferência quanto a seus microssimbiontes.

1.2 Objetivo geral

Estimar a ocorrência e a diversidade de bactérias de nódulos de diferentes espécies do gênero *Crotalaria* para disponibilização de uma coleção e futura obtenção de inoculantes recomendáveis para adubação verde em solos da Zona da Mata de Pernambuco.

1.3 Objetivos específicos

- Realizar uma amostragem de solos representativos das diferentes condições edafoclimáticas da Zona-da-Mata de Pernambuco, englobando os principais tipos e usos na região, em pontos definidos de acordo com os requisitos classe e cobertura vegetal.

- Observar a ocorrência natural de populações de bactérias capazes de formar simbiose com três espécies de *Crotalaria* spp. e o desenvolvimento das plantas cultivadas nos solos das principais situações de classes de solo e tipos de cobertura vegetal da Zona-da-Mata de Pernambuco.

- Obter uma coleção de bactérias de nódulos capazes de nodular *Crotalaria* spp cultivadas nas amostras de solo coletadas nas diferentes situações estudadas (classe e cobertura vegetal do solo).

- Determinar as características em meio de cultura dos isolados da coleção obtida.

- Determinar características genéticas de bactérias de nódulos de *Crotalaria* spp. naturalmente estabelecidas em solos da Zona-da-Mata de Pernambuco.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Zona-da-Mata de Pernambuco

A Zona-da-Mata de Pernambuco é composta por 43 municípios, ocupando uma área geográfica de 8.738 km², que corresponde a 8,9% do território estadual (ANCORA, 2010). Considerada como “Domínio dos Mares de Morro”, é uma região determinada por formações onduladas (PERNAMBUCO, 2018). Devido a sua disponibilidade de recursos hídricos, condições edafoclimáticas favoráveis, eventual demanda de mão-de-obra e vantagens locais, é considerada como uma das regiões de grande potencial econômico do Nordeste (IPA, 2005; PEREIRA et al., 2013). Estudos objetivando a avaliação do uso adequado do solo na Zona da Mata de Pernambuco apontam que mais da metade apresenta disponibilidade para ser explorada por atividades agrícolas (ARAÚJO FILHO et al., 2000; MAPA, 2010). Os índices pluviométricos são relevantes, com precipitações entre 1066 e 2144 mm ano⁻¹ (APAC, 2017). A regularidade na distribuição de chuvas, com precipitação pluviométrica satisfatória durante grande parte do ano (NÓBREGA et al., 2015; APAC 2017), estimula o estabelecimento da exploração da agricultura na região, principalmente a cultura canavieira e o setor sucroalcooleiro de modo geral, que é uma das atividades agrícolas de maior importância no estado (SIMÕES NETO et al., 2012).

Segundo Pereira et al. (2013), desde os tempos da colonização, o setor canavieiro exerce uma forte pressão sobre a cobertura vegetal nativa da mesorregião da Mata Pernambucana, ocasionando profundas alterações na vegetação original. Atualmente, a vegetação nativa encontra-se restrita a reduzidos fragmentos de matas, tendo poucos indícios de remanescentes de área nativa, ocorrendo, em geral, matas secundárias de extensão e estágios sucessionais diversos, distribuídos de forma esparsa por toda área do litoral sul de Pernambuco, com poucas áreas ao norte, conduzindo a uma situação crítica, uma vez que desequilibra a biodiversidade da região (SACRAMENTO et al., 2007). Diante disso, estudos têm sido desenvolvidos objetivando maior atenção do setor agrícola à conservação dos recursos naturais (SILVA, 2017).

2.2 O gênero *Crotalaria*: aspectos gerais

As crotalárias apresentam características interessantes para utilização como adubação verde (KAE et al., 2014), atingindo altos rendimentos de matéria seca (MANGARAVITE et

al., 2014). Pereira et al. (2016), analisando resíduos de decomposição e liberação de nutrientes, apresentaram o potencial da adubação verde em relação ao seu fornecimento de nutrientes para as culturas, indicando que espécies do gênero *Crotalaria* apresentaram maior aptidão nos processos de decomposição, liberação e persistência de nutrientes no solo. Diniz et al. (2014) explanam que a decomposição da matéria seca e a mineralização do nitrogênio são oriundas de fatores como a relação C/N, o teor de N e também as relações com fatores que envolvem solo, clima e atividade da microbiota. Estes fatores podem sofrer alterações conforme o manejo aplicado na área, a forma de aplicação do adubo verde e o grau de revolvimento do solo; concluindo que a taxa de decomposição da matéria seca e a mineralização do nitrogênio se deram de formas mais rápidas em adubos verdes que utilizavam *Crotalaria*.

O gênero *Crotalaria*, que compreende cerca de 600 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, tem como destaque a espécie *Crotalaria juncea* que, apesar de origem indiana, é adaptada às regiões tropicais do planeta, apresentando bom desempenho em solos menos estruturados, arenosos e com baixa fertilidade natural (SAMPAIO et al., 2016). Apresenta um bom sistema radicular, melhorando a infiltração de água e boa capacidade de fixar nitrogênio e promover elevada reciclagem de vários nutrientes no perfil do solo, contribuindo para aumento de rendimento nos cultivos posteriores (SODRÉ FILHO et al., 2004).

É uma leguminosa que gera iúmeros benefícios, sendo altamente eficaz no processo de aporte de nitrogênio por meio da fixação biológica (SILVA et al., 2009), e nas trocas benéficas com o sistema (LOSS et al., 2014). Diversas espécies de *Crotalaria* têm sido utilizadas nos sistemas com finalidade de adubação verde; Teodoro et al. (2011) apontam que em decorrência do ciclo curto da cultura e suas espécies, como *Crotalaria juncea*, *Crotalaria spectabilis* e *Crotalaria ochroleuca* se tornam viável ecologicamente e rentável financeiramente, a inserção das mesmas em sistemas de cultivo com sucessão e rotação de culturas nas áreas agricultáveis. Ainda em pesquisa de Teodoro et al. (2011), analisou-se os aspectos agrônômicos de leguminosas na adubação verde, percebendo-se que houve um acúmulo de 13,9 t ha⁻¹ de biomassa seca de *Crotalaria juncea*, repercutindo no acúmulo de 514; 27; 165; 123; 111 kg ha⁻¹ de N, P, K, Ca e Mg, respectivamente, sendo assim, neste caso é possível afirmar a forte contribuição da introdução dessa espécie.

Outro relato científico averiguando o potencial dessa cultura para adubação verde foi desenvolvido por Oliveira et al. (2008) que enfatizou a importância da introdução da *Crotalaria juncea* nos cultivos, uma vez que comparada á outras leguminosas, apresentou maior acúmulo de biomassa e nitrogênio, em média de 6,5 t ha⁻¹ e 178 kg ha⁻¹, respectivamente.

Massad et al. (2014) evidencia a *Crotalaria juncea* como uma cultura precoce e de rápida disponibilidade na ciclagem de nutrientes; afirmando que a cultura decompõe e mineraliza a biomassa de forma mais instantânea, levando em média 38 dias para liberar metade do conteúdo de nitrogênio, incrementando a produtividade das culturas que estão sendo rotacionadas em sucessão com a Crotalária.

Como outras espécies da família das leguminosas, as crotalárias apresentam a capacidade de se beneficiar da FBN por meio do processo simbiótico com bactérias do grupo dos rizóbios (SILVA et al., 2009). Conforme Aserse et al. (2012), cepas de *Bradyrhizobium* são os simbiontes mais comuns em isolados provenientes de espécies de *Crotalaria*, porém, algumas cepas de *Methylobacterium* e *Burkholderia* também foram encontradas nodulando diferentes espécies do gênero. Apesar desse potencial simbiótico, estudos sobre a ocorrência de rizóbios, desenvolvimento de nódulos e potencial de fixar nitrogênio estão restritos a algumas regiões e espécies. Embora existam relatos da utilização de *Crotalaria juncea* como adubo verde em canaviais da Zona-da-Mata de Pernambuco, são escassas as informações sobre o desempenho de outras espécies do gênero e sobre a diversidade e eficiência de microssimbiontes nativos de solos da região.

2.3 O elemento Nitrogênio

O nitrogênio é o elemento mais abundante na atmosfera terrestre (estoque estimado em $3,9 \times 10^{21}$ g de N 78% do seu volume) e é um nutriente de fundamental importância para todos os seres vivos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). É um gás com forma química muito estável, e devido a sua baixa reatividade que é oriunda da ligação covalente que existe entre os átomos da molécula, impossibilitando que as plantas e animais utilizem esse gás de forma direta (BRADY; WEIL, 2013). O processo de conversão do N_2 em formas disponíveis aos organismos vivos ocorre por meio de processos naturais, sendo eles: descargas elétricas e Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN); podendo ser realizado também de forma sintética (Haber-Bosch).

Nas plantas, é responsável por inúmeras reações, além de fazer parte da estrutura da clorofila, de enzimas e proteínas. Por ser elemento essencial, seu balanço afeta a formação de raízes, a fotossíntese, a produção e translocação de fotoassimilados e a taxa de crescimento entre folhas e raízes, sendo o crescimento foliar primeiramente afetado, sua deficiência gera diminuição do crescimento das plantas e da produtividade (TAIZ; ZIEGER, 2009). É considerado um dos elementos que mais restringe o crescimento das plantas, sendo cada vez mais necessário a adoção de fertilizantes nitrogenados como insumos agrícolas, e dessa forma,

o custo de produção aumenta de forma expressiva para o agricultor.

Diversos estudos são desenvolvidos a fim de encontrar a fonte mais adequada do elemento (LORENSINI et al., 2014; MARCON et al., 2017), a dose mais viável (VASCONCELOS et al., 2015; LIMA et al., 2016) e a época mais adequada de aplicação do elemento (SOUZA et al., 2012a; NASCENTE et al., 2017), aplicando essas buscas a diferentes culturas com a finalidade de se obter o melhor aproveitamento e, conseqüentemente, reduzir os custos de produção.

É válido ressaltar que afora o custo produtivo, esses insumos agrícolas geram um desequilíbrio ambiental, e por esse motivo vêm-se priorizando a Fixação Biológica de Nitrogênio como uma maneira alternativa visto que seja um processo de baixo custo e ecologicamente correto.

2.4 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)

Na atmosfera, o N se encontra na forma gasosa (N_2), não disponível para a maioria dos vegetais, que absorvem N do solo principalmente nas formas de NH_4^+ ou de NO_3^- . Assim, as plantas dependem do N da matéria orgânica do solo ou da adição de fertilizantes nitrogenados.

Através de processos de fixação (espontânea, industrial e biológica), nos quais é quebrada a tripla ligação da molécula de N_2 , este nutriente pode ser disponibilizado aos vegetais. A fixação espontânea ocorre através da ação de raios. No processo de fixação industrial do N_2 , os impactos ambientais são bastante significativos em função da utilização de combustíveis fósseis como fonte de energia, o que contribui com a emissão de gases do efeito estufa. As espécies da família das leguminosas, no entanto, podem conseguir uma parte ou a totalidade de sua nutrição nitrogenada diretamente do ar, devido às suas associações simbióticas com bactérias diazotróficas (conhecidas como rizóbios) que invadem os pêlos radicais formando nódulos onde o nitrogênio livre do ar é convertido em nitrogênio fixado para assimilação ou estocagem pela planta, no processo conhecido como fixação biológica do nitrogênio (FBN) (SANTOS et al., 2008).

A relação entre as leguminosas e os rizóbios é tão íntima que se pode considerar esta associação uma nova forma de vida. Esse seleto grupo de plantas desenvolveu um meio eficiente de suprir suas necessidades ou suas demandas de nitrogênio e obter vantagem evolucionária sobre a maioria dos demais organismos vivos. A complexidade dos tecidos dos nódulos e o transporte vascular, indicam uma longa coevolução entre as duas partes e uma prova disto é o grande sucesso ecológico e evolucionário da família Leguminosae (ALLEN; ALLEN,

1981).

Inicialmente, os rizóbios foram classificados em uma única família, a Rhizobiaceae, contudo, a partir do emprego de técnicas de biologia molecular conduzidos com os genes RNA ribossomais (RNAr), os genes 16S RNAr passaram a ser a molécula ideal para estimar as relações filogenéticas entre as bactérias e sua posição taxonômica, o que ocasionou mudanças importantes na taxonomia das bactérias. Desde então, os rizóbios foram subdivididos nas famílias Rhizobiaceae, incluindo os gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Phyllobacteriaceae* com os gêneros *Allorhizobium* syn. *Rhizobium* e *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobiaceae* com o gênero *Bradyrhizobium* e *Hiphomicrobiaceae* com o *Azorhizobium*, todos pertencentes a ordem Rhizobiales, membros da classe alfa(α)-proteobactéria.

Novas estirpes que contêm simbioses fixadores de N em leguminosas incluem os gêneros *Methylobacterium*, *Devosia*, *Ochrobactrum* e *Phyllobacterium*, também, pertencentes a classe das α -proteobactérias (WILLEMS, 2006). Além destes, foi proposto que estirpes dos gêneros *Burkholderia*, *Ralstonia* e *Cupriavidus*, membros da classe das β -proteobactérias, também, poderiam formar nódulos e fixar N₂ com leguminosas, e tais bactérias passaram a ser conhecidas como β -rizóbios (MOULIN et al., 2001).

A FBN também vem sendo estudada em gramíneas. No Brasil, estes estudos foram iniciados há mais de 40 anos sob a liderança da pesquisadora Johanna Döbereiner que publicou diversos trabalhos sobre o assunto. Durante este período de pesquisas, grandes avanços ocorreram, como a descoberta de diversas bactérias diazotróficas associadas às gramíneas, como as rizosféricas (*Beijerinckia fluminensis* e *Azotobacter paspali*), associativas (*Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*) e as endofíticas (*Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Glucanoacetobacter diazotrophicus*, *Burkholderia brasilensis* e *B. tropica*), e estudos com inoculação de cereais com bactérias diazotróficas apontam que as endofíticas tem maior potencial pra a FBN (BALDANI; BALDANI, 2005).

Nos últimos anos, a FBN em gramíneas tem conquistado destaque em pesquisas, principalmente, com cana-de-açúcar e arroz irrigado, entre outras culturas. Alguns genótipos de culturas de gramíneas têm apresentado contribuições significativas do processo de FBN, gerando interesse por novos estudos (BODDEY et al., 1995; DÖBEREINER, 1997; COELHO et al., 2003; SHRESTA; MASKEY, 2005; SANTI et al., 2013).

Do ponto de vista energético, a FBN também é um processo dispendioso, só que ocorre em temperatura ambiente e pressão atmosférica, utilizando energia celular na forma de ATP. O exemplo mais bem sucedido mundialmente no que diz respeito à FBN é a economia relacionada

ao não uso de fertilizantes nitrogenados na cultura da soja no Brasil. As quantidades de N fixadas em algumas das principais culturas são estimadas em 33 kg ha⁻¹ ano⁻¹ em solos sob cultivo de arroz, 25 kg ha⁻¹ ano⁻¹ na cultura da cana-de-açúcar, 23 kg ha⁻¹ ano⁻¹ na cultura do feijoeiro comum e algo em torno de 176 kg ha⁻¹ ano⁻¹ na cultura da soja.

O nitrogênio utilizado em sistemas agrícolas é considerado um forte emissor de óxido nítrico para a atmosfera. O aumento da concentração deste gás na atmosfera terrestre contribui para um dos principais problemas ambientais da atualidade, as mudanças climáticas. Do ponto de vista ecológico, a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) atende a preocupação da sociedade com a preservação ambiental, visto que é um processo que ocorre naturalmente sem a necessidade de manipulação, fato que minimiza o uso de insumos agrícolas nitrogenados, que são tidos como grandes responsáveis pela produção antrópica de N₂O, um dos principais gases do efeito estufa (BERGSTROM et al., 2001).

Assim, a simbiose entre as bactérias diazotróficas e leguminosas é vista como uma importante alternativa à fertilização química em culturas agrícolas (FREITAS et al., 2014). Por ser uma alternativa tecnológica para aumentar a produtividade agrícola, reduzir o uso de insumos onerosos e minimizar os gases do efeito estufa, contribuindo para uma agricultura mais sustentável, a FBN foi incluída no plano ABC (Agricultura de Baixo Carbono) do Governo Federal como parte do compromisso internacional assumido pelo Brasil, em 2009, para reduzir as emissões de gases do efeito estufa entre 36 e 39% até 2020. O objetivo definido para o programa ABC foi a ampliação do uso da FBN em 5,5 milhões de hectares de cultivo, em substituição ao uso de fertilizantes nitrogenados, valendo salientar que não inclui a fixação biológica de nitrogênio na soja, esta que, por sua vez é considerada como linha básica já existente. Um dos parâmetros utilizados para monitorar as reduções de emissão de GEE pela ampliação do uso de FBN serão as mudanças no uso do solo, com implantação de culturas que utilizem a FBN.

A adoção de práticas de manejo que favoreçam o processo de FBN são estratégias para alcançar as metas do plano ABC. Para o estabelecimento dessas práticas, é fundamental o conhecimento dos diversos fatores que interferem nas quantidades de N fixadas nas diversas combinações de condições ambientais e de manejo nos principais sistemas de produção. Dentro dessas práticas de manejo, a utilização de plantas de cobertura entre as fileiras de plantio de culturas perenes é uma tecnologia que pode propiciar a substituição ou a complementação da adubação mineral, além de representar uma fonte de matéria orgânica e proporcionar uma proteção física ao solo, garantindo a sustentabilidade dos sistemas.

A associação entre leguminosa e microrganismo envolve a formação de nódulos

radiculares (LOSS et al., 2014), no interior dos quais o N_2 atmosférico é convertido em amônia (NH_3) e incorporado em diferentes formas de N orgânico disponível para as plantas (EPSTEIN; BLOOM, 2006; MANGARAVITE et al., 2014). Este processo de FBN é mediado pelo complexo enzimático nitrogenase, constituído por uma ferro-proteína, que se liga a ATP e atua como doador de elétrons, chamada de dinitrogenase redutase; e uma ferro-molibdênio-proteína, que contém o sítio de redução do substrato, a dinitrogenase (HOWARD et al., 2013).

Essa simbiose entre macro e microssimbionte envolve uma troca mútua de benefícios, de maneira que a planta assimila o amônio (NH_4^+) que é formado a partir da NH_3 fornecida pelas bactérias e, em troca, fornece os carboidratos provenientes da atividade fotossintética como fonte de energia (LINDSTRÖM et al., 2010; BOYD; PETERS, 2013). Durante o estabelecimento dessa associação simbiótica, a bactéria migra para o sistema radicular das plantas em resposta quimiostática, atração por substâncias químicas secretadas pelas raízes. Tais compostos químicos tem a capacidade de promover a ativação de genes responsáveis pelo processo de nodulação, os genes *nod*, resultando na síntese de fatores de nodulação (fatores Nod). Plantas leguminosas em particular respondem a um Fator Nod específico (TAIZ; ZEIGER, 2013). Ao se estabelecer nas raízes de plantas compatíveis, as bactérias levam ao desenvolvimento de estruturas de raízes especializadas chamadas nódulos, nos quais as bactérias se diferenciam em bacteróides e catalisam a redução de N_2 em amônia (FERGUSON et al., 2010).

A atividade dos nódulos depende não somente da otimização de fatores climáticos e nutricionais, mas também da presença de rizóbios potencialmente eficazes no sistema rizosférico das leguminosas, para que se tenha uma interação satisfatória entre a bactéria e a planta (TAIZ; ZEIGER, 2009). A grande maioria das leguminosas são conhecidas por nodular com α -proteobacteria, enquanto que as β -proteobacteria, mesmo em menor escala, também conseguem nodular com algumas espécies, principalmente pertencentes a subfamília Mimosoideae (ELLIOTT et al., 2007; ANGUS et al., 2013; SILVA et al., 2012; BOURNAUD et al., 2013). A presença de cepas rizobianas que não sejam compatíveis e eficazes comprometem diretamente a fixação do nitrogênio atmosférico, por isso estudos para selecionar rizóbios com maior capacidade de FBN e eficiência para uma determinada espécie cultivada em determinada área tem sido promissora (LIMA et al., 2012).

A diversidade de microrganismos em ecossistemas naturais é um fator que deve ser levado em conta para melhor compreensão das relações ecológicas e evolutivas de cada estirpe microbiana, e pelo fato que a complexidade das interações entre rizóbios e características

edáficas podem alterar tais populações (LOMBARDI et al., 2009). Para se estabelecer de maneira satisfatória os rizóbios provenientes de leguminosas, é necessário adquirir simbionte do habitat natural ocupado pelas mesmas (HUANG et al., 2016). Esta diversidade pode ser avaliada através de características morfológicas, bioquímicas, fisiológicas e genéticas (MOREIRA, 2008).

Diante do exposto, a aplicação de metodologias que objetivem analisar a diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio e seu potencial de promoção de crescimento vegetal em espécies de *Crotalaria* são de grande importância, visto que podem resultar na obtenção de estirpes que promovam o desenvolvimento das plantas e sua capacidade de aportar N atmosférico aos sistemas. A caracterização fenotípica dos isolados de rizóbios é a etapa inicial do processo de avaliação dessa biodiversidade, trazendo informações não somente culturais, mas também sobre o perfil metabólico das coleções rizobianas, como seu potencial na promoção de crescimento de plantas. Desse modo, avaliar mecanismos de promoção de crescimento vegetal, tolerância a estresses abióticos, por exemplo, é um processo que pode indicar a variabilidade fenotípica das coleções, bem como apontar para a capacidade destes microrganismos de tolerar condições de estresses abióticos no campo (INDRASUMUNAR et al., 2011; FERNANDES JÚNIOR et al., 2012; REJILI et al., 2012).

Em solos com pouca disponibilidade de fósforo (P), as bactérias fixadoras de nitrogênio podem auxiliar também na captura desse nutriente. O P, assim como o N, é um nutriente essencial para os vegetais, devido a sua participação na molécula de ATP (adenosina trifosfato) e no funcionamento do metabolismo celular (SOUZA et al., 2015). Nos solos, o P apresenta-se, em sua grande maioria, em formas que as plantas não conseguem acessar (YADAV et al., 2014). Bactérias que tem a capacidade de solubilizar fosfatos são uma alternativa potencialmente viável de fornecimento do elemento às plantas.

Os fitohormônios produzidos pelos vegetais promovem o desenvolvimento celular, o AIA (ácido indol-acético) é um dos mais comuns, atuando diretamente no sistema radicular das plantas, promovendo maior absorção de nutrientes e relações benéficas entre plantas e comunidade microbiana (HAYAT et al., 2010). Algumas bactérias também são capazes de produzir o AIA, tendo estudos comprovados com estirpes de diversos gêneros, como o *Rhizobium* por exemplo (RUBIO-CANALEJAS et al, 2016).

O avanço da tecnologia tem proporcionado que a diversidade de isolados rizobianos seja acessada por meio técnicas que envolvem o estudo do DNA microbiano (BARCELLOS; HUNGRIA, 2010). Essas técnicas são embasadas nas reações de PCR (reação em cadeia da polimerase), descrita por Kary Mullis (1983), e proporcionam consideráveis avanços no

conhecimento da diversidade e taxonomia dos rizóbios, permitindo uma vasta quantidade de cópias de um determinado gene, ou uma região de interesse, além de detecção de sua presença e utilização deste produto em análises complementares. A técnica de BOX-PCR (VERSALOVIC et al., 1994) permite a amplificação de fragmentos com tamanhos diferentes e não apenas um amplicon. Nesta técnica os perfis gerados na amplificação são analisados em géis de agarose, permitindo a comparação de um grande número de estirpes de rizóbios (TORRES-JÚNIOR et al., 2014).

A amplificação de fragmentos dos genes *nifH* e *nodC*, foi proposto primeiramente por Mothapo et al. (2013), através do PCR, indicando a presença da FBN, sendo considerada uma alternativa a atividades laboriosas usadas em sua comprovação. Devido aos avanços nos estudos de sequenciamento do gene 16S rRNA, que conforme Woese et al. (1991) é considerado como uma região de alta conservação nas bactérias, foi gerada uma obrigatoriedade na descrição de espécies bacterianas, de modo que a nodulação em leguminosas, que antes era considerada como critério essencial, se tornasse um critério secundário (RIVAS et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2015).

2.5 A adubação verde

O cultivo de adubos verdes, em consórcio (PAULINO et al., 2009) ou sucessão a cultura principal (OJIEN et al., 2014), é uma prática utilizada para adicionar matéria orgânica (STEENWERTH; BELINA, 2008) e nitrogênio aos sistemas (ZOTARELLI et al., 2012), além de proporcionar proteção física ao solo (PERIN et al., 2010; TEODORO et al., 2011; GUARESCHI et al., 2012; CARVALHO et al., 2013; CORRÊA et al., 2014). Devido à capacidade de fixar nitrogênio atmosférico por meio da simbiose com bactérias diazotróficas, as leguminosas são as espécies mais utilizadas como plantas de cobertura (OJIEN et al., 2014; MASSAD et al., 2014; KOKALIS-BURELLE et al., 2017). Para a recomendação das espécies a serem utilizadas como adubos verdes em determinada região, deve-se procurar combinações dos fatores que atendam às exigências locais, dando-se preferência àquelas que produzam maior volume de biomassa, estejam menos sujeitas a pragas e doenças e que possuam sementes relativamente uniformes e fáceis de semear, manualmente ou por meio de máquinas (BARRETO; FERNANDES, 2001).

A adubação verde é uma prática agrícola que têm atingido grande espaço no cenário agrícola, destacando-se com seu êxito para o fornecimento de matéria orgânica ao solo em curto espaço de tempo. Pode ser realizada com espécies de leguminosas, de gramíneas assim como

de outras famílias de ordem botânica (HARDARSON; ATKINS, 2003). Assim como fora dito, as leguminosas são comumente utilizadas, devido serem fontes adicionais de nitrogênio (N) ao solo em função do alto teor de compostos nitrogenados em sua biomassa e à capacidade de fixação simbiótica do N do ar por bactérias específicas, conhecidas como rizóbios (MASCARENHAS et al., 2014).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é a principal via de incorporação do N₂ à biosfera, sendo responsável por cerca de 65% da entrada total de N na terra. É estimado que de 44 a 66 milhões de toneladas métricas de N₂ são fixados pelas leguminosas de importância agrícola numa escala anual, e outros 3 a 5 milhões de toneladas métricas são fixados por leguminosas em serviços ecossistêmicos naturais (GRAHAM; VANCE, 2003).

Para a agricultura nacional, há muitas espécies de adubos verdes que têm capacidade de adaptação às distintas condições agroclimáticas do Brasil, contribuindo com a manutenção da biodiversidade, redução de custos agrícolas assim como minimização de riscos ambientais e econômicos, além da promoção efetiva da sustentabilidade. As leguminosas são as espécies mais indicadas como adubos verdes, por causa da possibilidade da redução ou até da eliminação da adubação nitrogenada mineral. Em complemento, várias outras espécies como gramíneas (Poaceae), crucíferas e compostas, estão prontamente dispostas a esta prática, sendo conhecidas de forma comum como plantas que realizam cobertura no solo (WUTKE et al., 2007, 2009).

Plantas com finalidade de adubação verde e incremento de cobertura vegetal no solo vêm sendo fortemente empregadas, ainda que de maneira pouco científica, por diferentes civilizações de agricultores e usuários da terra, como uma alternativa para diversificar e melhorar o potencial produtivo das áreas agrícolas nas diferentes regiões do mundo. Dados históricos apontam que civilizações antigas, tais como romanos, gregos, chineses e outros povos da Antiguidade, já faziam uso da prática do adubo verde com sucesso (FLORENTIN et al., 2001).

Apontamentos históricos elucidam que a civilização chinesa foi a primeira a empregar a adubação verde objetivando a manutenção da fertilidade do solo. Não há relatos precisos da data em que essa prática foi iniciada, mas sabe-se que, na dinastia Chou (1134-247 a.C.), começaram a ser empregados, como adubos verdes, os restos de cultura e vegetação natural dos campos cultivados. No Brasil, os adubos verdes são conhecidos e utilizados há pelo menos 100 anos (ROSSI; CARLOS, 2014).

O cultivo de plantas com finalidade de adubação verde como cobertura de solo é uma prática bastante difundida em todo o Brasil, e são utilizadas espécies de diferentes adaptações climáticas, com destaque para as espécies leguminosas, que normalmente apresentam altos

teores de N em seus tecidos no período da floração, o que pode significar uma contribuição acima de $150 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ de N, com um percentual de 60% a 80% do N proveniente da FBN (GILLER, 2001).

Para Zotarelli (2000), apenas a introdução de uma leguminosa para adubação verde na rotação de culturas poderia contribuir de forma significativa para o aumento de N no solo, podendo até mesmo permitir redução da fertilização com nitrogênio. Vários estudos têm sido realizados com a finalidade de avaliar e estimar a contribuição da adubação verde para o solo e as culturas de interesse.

A utilização de espécies que não são leguminosas na adubação verde contribui na redução das perdas de N, por meio da imobilização temporária do N em sua biomassa. A adubação verde, quando realizada em consórcio com leguminosas e gramíneas, pode entregar uma combinação de resíduos com características favoráveis, não somente à proteção do solo, mas também pela baixa taxa de decomposição das gramíneas, devido a sua elevada relação C/N, mas também, à nutrição das plantas pelo aporte de N pelas leguminosas via FBN (BARTOLINI et al., 2000).

Castro et al. (2004) quantificaram a FBN pela utilização de adubos verdes em pré-cultivo e consorciados com berinjela, sendo estabelecidas parcelas com crotalária (*Crotalaria juncea* L.), milho (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) e vegetação espontânea antes do plantio da berinjela. Após 60 dias de cultivo, a FBN respondeu por 53% do N da crotalária. A FBN das leguminosas consorciadas variou com os pré-cultivos, situando-se entre 20% e 90% do N acumulado na planta. O uso de leguminosas contribuiu de forma significativa para o fornecimento de N para a berinjela, que se beneficiou do N da adubação verde em pré-cultivo e consórcio, embora não tenha havido aumento de sua produtividade.

Ricci et al. (2005) analisaram, em um sistema orgânico de produção, cultivado no município de Valença, Rio de Janeiro, a contribuição da *Crotalaria juncea* L. (crotalária) no crescimento e estado nutricional de seis cultivares de café e analisaram de forma quantitativa o aporte de biomassa vegetal e de N via FBN. O cultivo da crotalária proporcionou o aporte de 16 t ha^{-1} de matéria seca e a reciclagem de 444 kg ha^{-1} de N. A FBN proporcionou um aporte de N superior a 200 kg ha^{-1} de N, assim a crotalária mostrou ser uma alternativa para o produtor fertilizar os sistemas orgânicos com N.

Em solo do Cerrado, Torres et al. (2005) demonstraram que a decomposição e a liberação de nitrogênio de resíduos culturais de plantas de cobertura são bastante variáveis de acordo com a espécie de adubo verde. O milho apresentou a maior produção de massa seca.

Dentre as leguminosas, a maior produção foi da crotalária. As espécies que apresentaram maior velocidade de decomposição foram a crotalária e guandu.

Adubação orgânica com esterco e/ou crotalária foi estudada por Silva et al. (2007) em um cultivo de batata (*Solanum tuberosum* L.) no Agreste paraibano, com o objetivo de quantificar a produtividade da batata e o estoque de nutrientes no solo. Os tratamentos crotalária e crotalária + esterco aumentaram o N total do solo em 76% e 63%, respectivamente, mas não aumentaram o teor dos outros nutrientes. Apesar da adição de 15 t ha⁻¹ de esterco ter proporcionado os maiores aumentos nos nutrientes do solo, as maiores produtividades de tubérculos foram observadas quando o plantio e a incorporação de crotalária foram combinados com a adição de 7,5 t ha⁻¹ de esterco.

Perin et al. (2009) estudaram o efeito da cobertura viva, formada por leguminosas herbáceas perenes (amendoim forrageiro – *Arachis pintoii* Krapov. & W.C. Greg., cudzu tropical – *Pueraria phaseoloides* (Roxb.) Benth. e siratro – *Macroptilium atropurpureum* (Moc. & Sessé ex DC.) Urb.) sobre a produção de bananeira cultivar Nanicão, no município de Seropédica, Rio de Janeiro. Todas as leguminosas proporcionaram maior crescimento das bananeiras, maior número de folhas emitidas e maior proporção de cachos colhidos que os tratamentos com vegetação espontânea (com e sem N-fertilizante).

Paulino et al. (2009) estudaram a FBN e a transferência do N fixado em gliricídia (*Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp.), crotalária (*Crotalaria juncea* L.) e feijão-guandu anão (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) para mangueira e graviola. A gliricídia apresentou maior potencial de FBN (80%), seguida da crotalária (64,5%) e do feijão-guandu (45%). A gliricídia e a crotalária destacaram-se na transferência de N para as frutíferas. A quantidade de N fornecida foi superior à demandada pelas espécies frutíferas.

Nas condições de São Luís (MA), Sousa et al. (2009) demonstraram que a mucuna-cinza (*Mucuna cinereum* Piper & Tracy) tem maior potencial para cobertura do solo e supressão das plantas espontâneas que o feijão-de-porco (*Canavalia ensiformes* (L.) DC.), mas essa última espécie apresentou maior produtividade de biomassa.

Silva et al. (2009) estudaram o aproveitamento, pelo milho (*Zea mays* L.), do N proveniente da uréia, de restos culturais da crotalária (*Crotalaria juncea* L.) e do milheto (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.), e do solo, em função da adubação nitrogenada e fosfatada. Os tratamentos utilizaram uma combinação de quatro doses de N na forma de uréia (com ou sem marcação com ¹⁵N); quatro doses de P, na forma de superfosfato triplo; e dois tipos de adubo verde, com ou sem marcação com ¹⁵N (crotalária e milheto). Foram avaliados a produtividade de matéria seca, a quantidade de N acumulado e o aproveitamento do N pelo

milho. O aumento da dose de N aplicada ao solo proporcionou aumento na quantidade de N proveniente do fertilizante na parte aérea do milho e reduziu a eficiência de aproveitamento do nutriente. A maior parte do N acumulado nas plantas de milho foi proveniente do fertilizante mineral, seguida pelo N do solo e dos adubos verdes. O aproveitamento do N proveniente da crotalária, pelo milho, foi maior que o do N do milheto. A assimilação do N proveniente da uréia e dos adubos verdes aumentou com a aplicação de P.

Giongo et al. (2011) avaliaram a taxa de decomposição de matéria seca e liberação de carbono e nutrientes provenientes de coquetéis vegetais cultivados no semiárido brasileiro (Petrolina, PE). Os coquetéis vegetais foram constituídos de espécies leguminosas (calopogônio - *Calopogonium mucunoide* Desv., crotalárias - *Crotalaria juncea* L. e *Crotalaria spectabilis* Roth, feijão de porco - *Canavalia ensiformes* (L.) DC., guandu - *Cajanus cajan* (L.) Huth, e lab lab - *Dolichos lablab* L.) e não leguminosas (gergelim - *Sesamum indicum* L., girassol - *Helianthus annuus* L., mamona - *Ricinus communis* L., milheto - *Penisetum americanum* (L.) Leeke e sorgo - *Sorghum vulgare* (L.) Moench). Os coquetéis apresentaram taxas de decomposição e de liberação de nutrientes similares para C, N, P, K, Mg, Zn, Fe e B; e a partir da média dos valores de k para todos os coquetéis pôde ser observado que a liberação de macronutrientes foi maior para K, N e Ca, seguida de Mg e P, e de micronutrientes foi maior para Fe, Mn e Cu, seguida de Zn e B.

A partir da aplicação de quatro combinações de coquetéis vegetais com o subsequente plantio de melão, Pimentel et al. (2011) testaram a resposta da macrofauna edáfica, carbono da biomassa microbiana, respiração do solo, quociente metabólico e carbono lábil de solo fumigado em Neossolo Flúvico, na região semiárida brasileira (Juazeiro, BA). Os maiores teores de carbono da biomassa microbiana e carbono lábil de solo fumigado foram obtidos aos 117 dias após o plantio, e o carbono da biomassa microbiana correlacionou-se inversamente com a respiração do solo e com o quociente metabólico, que apresentaram aumento a partir de 215 dias após o plantio. Aos 354 dias após plantio, a macrofauna edáfica apresentou maior densidade, riqueza, diversidade e uniformidade, com as formigas e os besouros sendo seus principais representantes.

Apesar da relativa abundância de literatura sobre o uso de adubos verdes, poucas informações são encontradas na literatura para as condições do nordeste do Brasil. Alguns trabalhos vêm sendo realizados com a utilização de coquetéis vegetais como adubação verde, nos quais espécies de plantas de cobertura, principalmente leguminosas e gramíneas, são utilizadas em conjunto e quando atingem o estágio de florescimento pleno são cortadas e

depositadas sobre o solo (GIONGO et al., 2011; PIMENTEL et al., 2011, 2012; FERREIRA NETO, 2013). Dessa maneira, a necessidade de informações sob adubos verdes na zona da mata de Pernambuco se faz necessária, devido a importância da pesquisa local, gerando dados e conhecimento global relacionado ao serviço ecossistêmico ambiental gerado por essa prática agrícola. Ainda menos, conhecido nessa região, é o potencial de aporte de N fixado por *Crotalaria* spp., tanto em simbiose com rizóbios naturalmente estabelecidos nos solos como com bactérias selecionadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Escolha dos pontos, amostragem e caracterização físico-química dos solos.

Para a realização de uma amostragem representativa das diferentes condições edafoclimáticas da Zona-da-Mata de Pernambuco, foram coletados solos em áreas dos principais tipos e usos da região, definidas de acordo com dois requisitos, classe de solo e cobertura vegetal. Os pontos amostrais foram definidos fazendo uso da base de dados do projeto “Impactos de mudanças climáticas sobre a cobertura e uso da terra em Pernambuco: geração e disponibilização de informações para o subsídio a políticas públicas”, fomentado pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). As classes de solo coletadas foram determinadas de acordo com o Zoneamento Agroecológico do Estado de Pernambuco - ZAPE, sendo selecionadas as 3 principais classes de solo no 1º nível categórico que ocorrem na região (ARGISSOLO, LATOSSOLO e GLEISSOLOS), conforme a tabela 1. Essas classes de solo foram selecionadas para a execução do projeto porque correspondem às principais manchas de solos que cobrem a área da Zona-da-Mata de Pernambuco na escala de 1:100.000 e, juntas, representam em torno de 85% dos solos da região (ARAÚJO FILHO et al., 2000). Para cada classe de solo definida, foram selecionados três pontos diferentes para a amostragem, sempre que possível em municípios diferentes, para evitar uma falsa repetição dos tipos de solo.

Tabela 1. Informações dos locais de amostragem de solo da Zona da Mata de Pernambuco, Brasil

Classes de solo	Municípios de coleta	Temperatura média anual (°C)	Precipitação média anual (mm)*
Argissolo	Itambé	25,2	1147
Argissolo	Macaparana	24,0	1070
Argissolo	Vitória de Santo Antão	25,4	1300
Latossolo	Palmares	23,5	2731
Latossolo	Paudalho	25,8	1804
Latossolo	Escada	24,0	1309
Gleissolo	Goiana	24,9	1924
Gleissolos	Ipojuca	24,9	2063
Gleissolos	Tamandaré	17,1	1526

*Precipitação média anual calculada com base nas normas climatológicas (Climate-data-Org, 2021)

Quatro tipos de coberturas vegetais, que são as predominantes na Zona-da-Mata de Pernambuco, foram definidos: 1) cultivo com cana-de-açúcar; 2) capoeira; 3) outros usos agropecuários e 4) vegetação nativa (mata) (Figura 1.). A metodologia utilizada para determinação da cobertura vegetal nos pontos amostrais foi baseada na interpretação visual de imagens de satélite, envolvendo elementos de reconhecimento (tonalidade, cor e textura), embasadas em imagens das estações chuvosa e seca da região, acompanhada por validação em campo. Para diferenciação dessas áreas com diferentes coberturas vegetais, levou-se em consideração o tamanho (comprimento, largura, área e perímetro), o padrão e a forma das áreas delimitadas.

Para o reconhecimento da cobertura vegetal, foram utilizadas as cenas do sensor ccd1xs do satélite CBERS 2B (cena órbita 147 e ponto 110), com data de passagem em 03 de janeiro de 2017, para a imagem da época seca e o sensor LIS3 do satélite IRS P6 ou Resourcesat-1 da Índia (cena órbita 337 e ponto 082), com data de passagem em 04 de março de 2018, para a época chuvosa. Para o sensor ccd1xs (CBERS 2B) foram selecionadas as bandas multiespectrais 2 (520 – 590 nm), 3 (630 – 690 nm) e 4 (770 – 890 nm). Para o sensor LIS3 foram selecionadas as bandas: 1 (520 – 590 nm), 2 (620 – 680 nm) e 3 (770 – 860 nm).

Dessa forma, as imagens referentes às coberturas vegetais foram sobrepostas aos mapas de diferentes tipos de solo, objetivando-se, com essa técnica, a seleção de pontos amostrais em diferentes municípios da Zona-da-Mata pernambucana, maximizando sua distribuição por toda área. Além disso, com o auxílio de pedólogos, foi realizada a conferência se o ponto amostral correspondia ao tipo de solo classificado e vegetação selecionada.

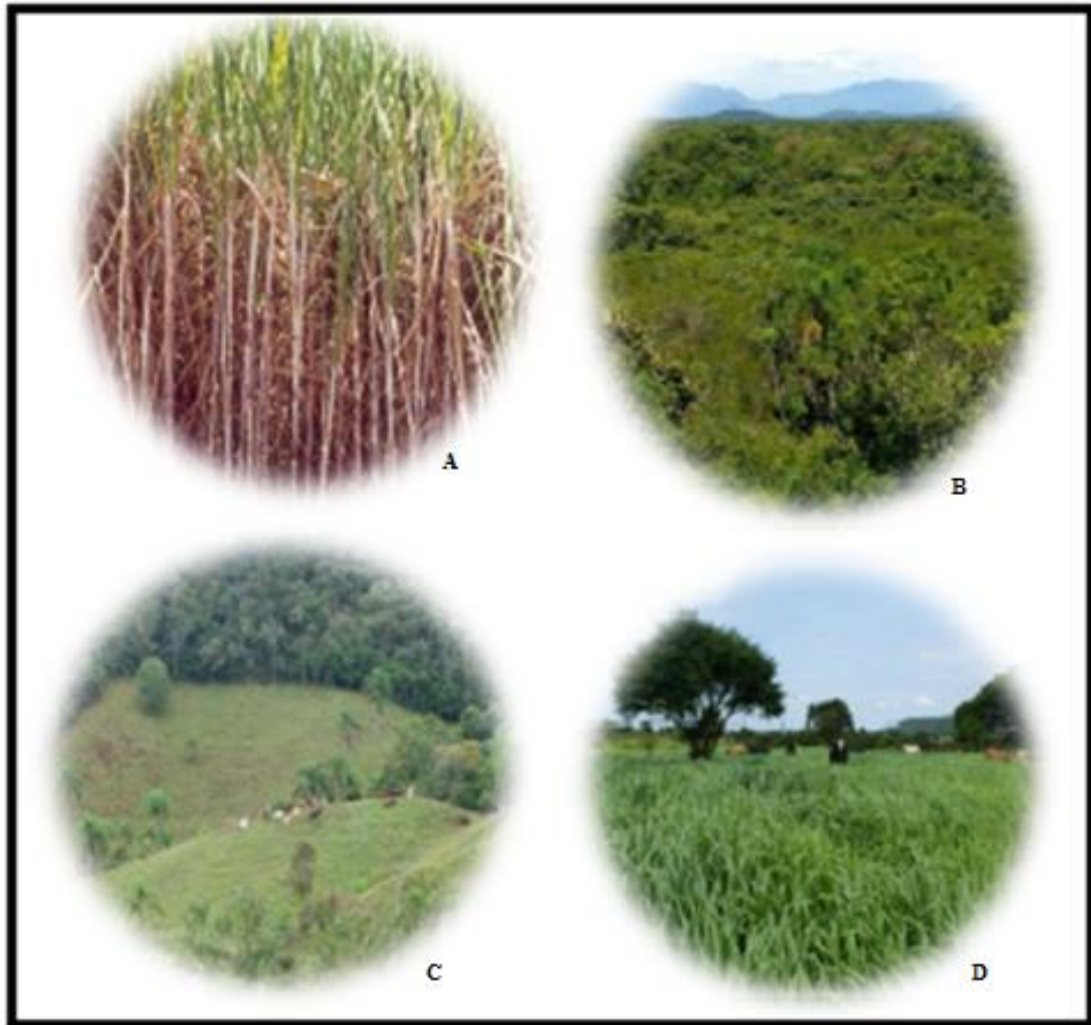


Figura 1. Imagens correspondentes as coberturas vegetais, A) Cana-de-açúcar; B) Capoeira; C) Vegetação Nativa e D) Outros usos agropecuários, presente na Zona-da-Mata pernambucana

Além disso, buscou-se selecionar áreas preferencialmente em diferentes municípios de forma que elas pudessem ficar relativamente bem distribuídas por toda Zona-da-Mata de Pernambuco (Figura 2).

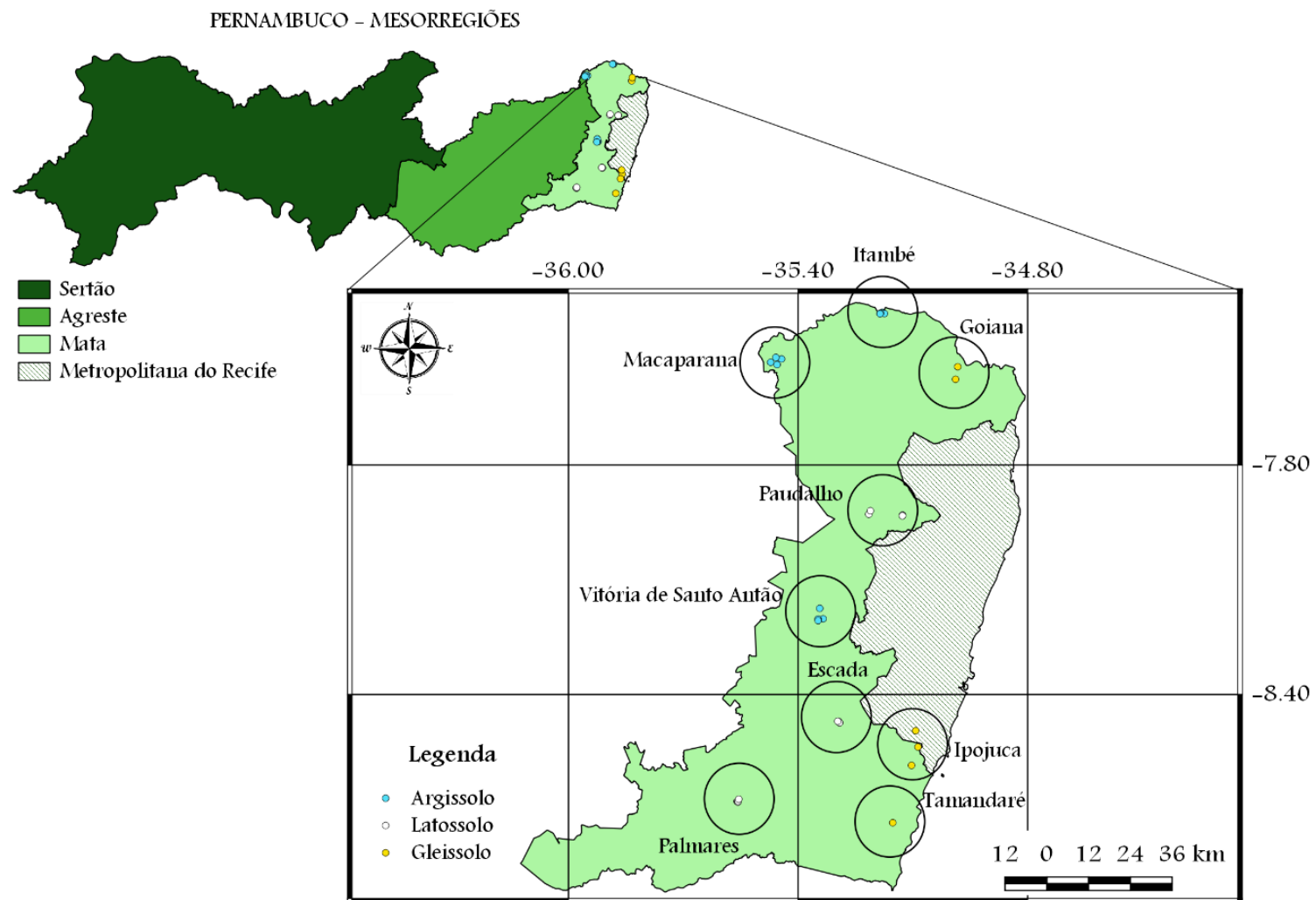


Figura 2. Distribuição dos pontos de coleta na Zona-da-Mata Pernambucana

Foram realizadas viagens a campo para verificar se a cobertura vegetal ocorrente nas áreas era o mesmo tipo de vegetação selecionado nas imagens, assim como se o local escolhido correspondia ao tipo de solo esperado, sendo conferido por pedólogos. A escolha das áreas amostrais foi feita com o apoio da equipe da Associação de Plantas do Nordeste-APNE, Recife-PE. É válido ressaltar que no momento de amostragem, os proprietários ou trabalhadores e habitantes das propriedades nos quais os pontos amostrais foram alocados, foram também consultados em relação ao histórico de uso dos locais. Nenhum dos locais selecionados nas coberturas de vegetação nativa, mata e capoeira passaram por queima em anos recentes ou tiveram cortes rasos, embora não seja possível precisar o tempo exato em que estavam sem perturbação antrópica; a queima ocorreu apenas nas áreas amostrais da cobertura correspondente à cana-de-açúcar. Em situações em que os locais inicialmente selecionados não correspondiam ao critério adotado, uma nova área foi escolhida.

Para a amostragem, em cada área foram estabelecidas três parcelas com dimensões de 15 x 15 m e em cada parcela foram coletadas, em locais escolhidos ao acaso, três subamostras na camada de 0-20 cm para compor uma amostra composta da parcela (Figura 3). É válido ressaltar que não foram encontrados Gleissolos com situações de todas as coberturas vegetais. Sendo assim os pontos amostrais correspondentes aos Gleissolos estão restritos aos pontos de “cana-de-açúcar” e “outros usos agropecuários”. Antes de cada coleta, todas as ferramentas utilizadas foram esterilizadas por meio de lavagem com água e sabão, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio por 3 minutos e lavagem em água para retirada da solução de hipoclorito. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos apropriados, também previamente esterilizados.

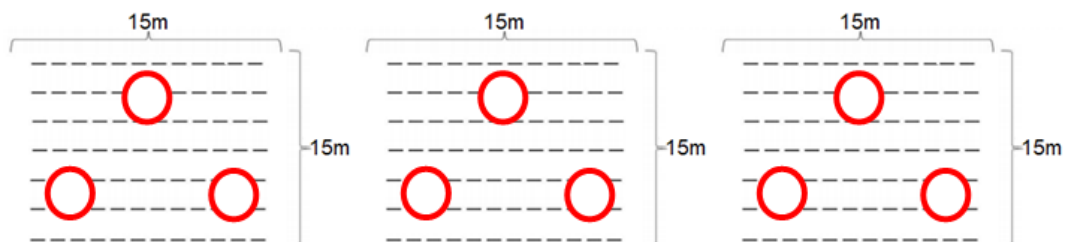


Figura 3. Desenho da parcela experimental. A área destacada representa os pontos que foram amostrados em subamostras, para composição da amostra composta

Após a coleta, os sacos plásticos identificados contendo as amostras foram armazenadas à temperatura ambiente pelo menor tempo possível, apenas o necessário para os procedimentos de secagem, destorroamento, homogeneização e peneiramento (peneira com malha de abertura

de 2 mm). Subamostras foram coletadas para determinação de atributos químicos e da granulometria dos solos. As análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Solos e Análise de Planta da Embrapa Semiárido, Petrolina, seguindo metodologias estabelecidas por Embrapa (2017).

Os atributos físicos determinados foram: granulometria (areia, silte e argila) pelo método da pipeta; densidade do solo (D_s), pelo método da proveta; densidade de partículas (D_p), pelo método do balão volumétrico. A determinação da granulometria permitiu a definição da classe textural de cada ponto amostral (Tabela 2).

Os atributos químicos analisados foram: condutividade elétrica (CE) (determinada após preparo da pasta de saturação); pH em água (proporção solo:água de 1:2,5); sódio (Na^+), potássio (K^+), fósforo (P) (extraídos com Mehlich-1 e dosados por fotometria de emissão de chama (Na^+ e K^+) e colorimetria (P)); cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}), alumínio (Al^{3+}) (extraídos com KCl 1 mol L⁻¹ e dosados por titulometria); acidez potencial (H+Al) (extraída com acetato de cálcio 0,5 mol L⁻¹ e dosada por titulometria), conforme tabela 3.

3.2 Experimento para observação da nodulação natural e desenvolvimento das espécies de crotalária

As populações de rizóbios das amostras de solos foram acessadas em ensaios de promoção de crescimento de plantas-isca em casa de vegetação, utilizando vasos de polietileno. O experimento foi realizado em casa de vegetação do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, conduzido em esquema fatorial, utilizando um delineamento em blocos casualizados. Para a captura dos isolados bacterianos de nódulos radiculares, cada amostra composta da parcela representou uma repetição do experimento em casa de vegetação.

Os tratamentos consistiram em três espécies de crotalária (*Crotalaria juncea* L., *Crotalaria ochroleuca* G. Don e *Crotalaria spectabilis* Roth), três classes de solo e quatro tipos de cobertura vegetal (Figura 4). O experimento foi totalizado em 270 unidades experimentais, considerando que para cada classe de solo foram utilizadas 3 repetições, com amostragens realizadas em diferentes municípios, e que para cada ponto amostral, também foram coletadas amostras em 3 parcelas demarcadas aleatoriamente em campo.

Antecedendo a semeadura das leguminosas, as sementes das três espécies de crotalária, obtidas comercialmente, foram desinfestadas superficialmente em álcool 98% por 30 segundos, hipoclorito de sódio 1% por 3 minutos (VINCENT, 1970; COSTA et al., 2014) e, em seguida, foram realizadas sucessivas lavagens em água destilada e autoclavada, para retirar o hipoclorito

de sódio. Foram plantadas quatro sementes por vaso (contendo 2 kg de solo), cada vaso correspondeu a uma unidade experimental. O processo de desbaste foi realizado 15 dias após o plantio, deixando-se uma planta por vaso. As plantas receberam água conforme sua necessidade hídrica, e o experimento foi conduzido até os 60 dias após a emergência para todas as espécies.

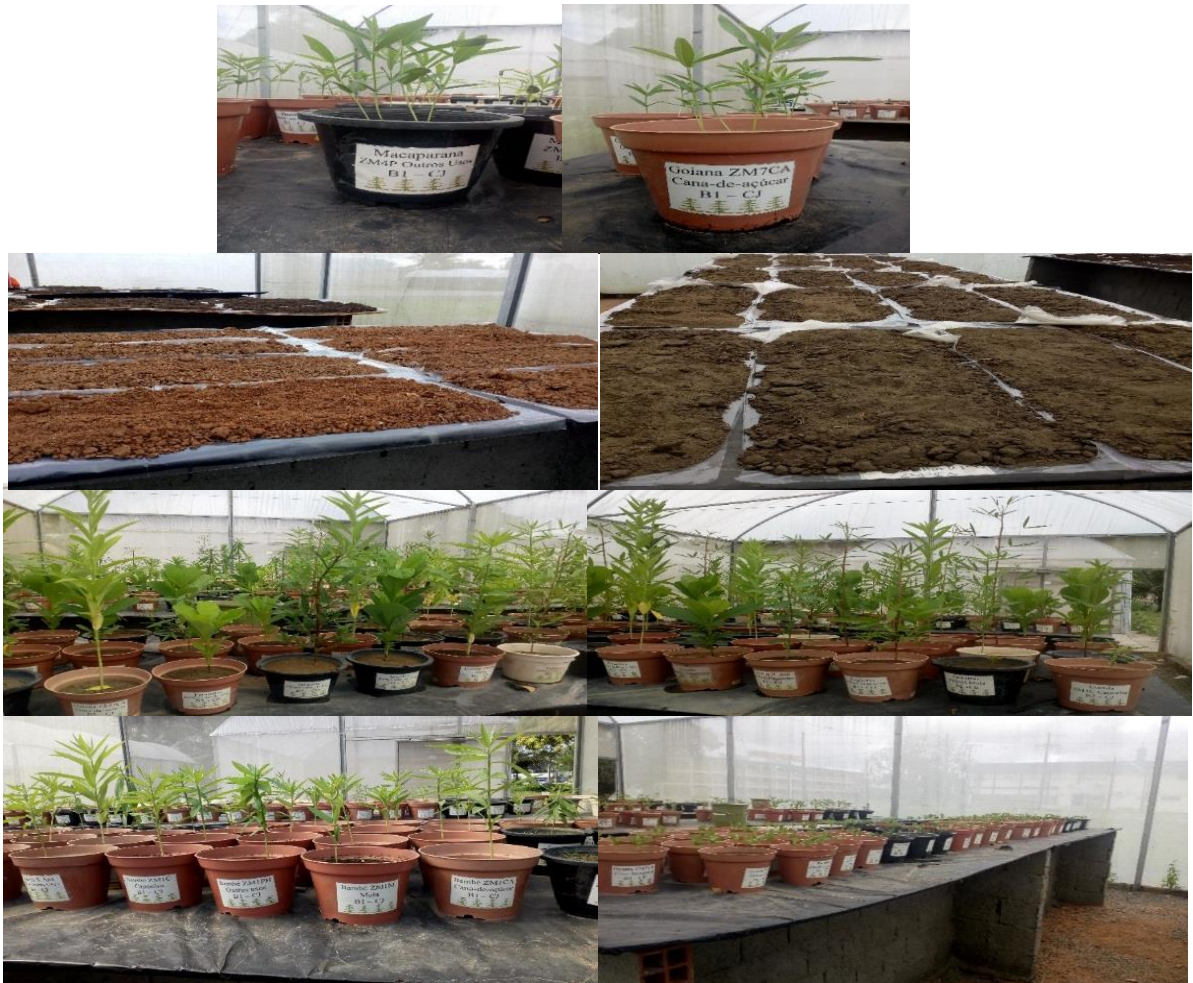


Figura 4. Apresentação geral do experimento conduzido com crotalaria para acessar comunidades rizobianas nativas de solos da Zona-da-Mata de Pernambuco, Brasil

Na coleta, a parte radicular da planta foi separada da parte aérea, ambas foram lavadas em água corrente. Os nódulos foram destacados, contados e acondicionados em recipientes contendo sílica gel, para conservação e posterior isolamento das bactérias.

As partes vegetativas (raízes e parte aérea) também foram acondicionadas em sacos de papel e submetidas à secagem em estufa de circulação forçada de ar a 65°C por 72 h, sendo posteriormente pesadas após obtenção de peso constante. A biomassa dos nódulos secos foi

determinada após o isolamento de bactérias endofíticas dos mesmos, processo que foi realizado com o objetivo de se obter uma coleção de microssimbiontes de crotalária nativos dos solos estudados.

3.3 Isolamento e caracterização dos isolados em meio de cultura

O isolamento de bactérias foi feito nos nódulos obtidos em raízes de *Crotaria juncea* e *Crotalaria spectabilis*. Para isolamento das bactérias, foram amostrados aleatoriamente 5 nódulos por planta coletada, que foram reidratados com água destilada autoclavada por 60 a 180 minutos. Em capela de fluxo laminar, os nódulos foram desinfestados superficialmente com etanol comercial por 30 segundos, para quebrar a tensão superficial, e hipoclorito de sódio (5%) por 5 minutos, para a desinfestação superficial. Em seguida foram lavados 10 vezes com água destilada e autoclavada para remover o hipoclorito de sódio. Com o auxílio de uma pinça, os nódulos foram rolados em uma parte da placa de Petri contendo meio YMA (pH 6.8) (VINCENT, 1970) com adição do corante vermelho Congo (SOMASEGARAN; HOBEN, 1994), para a certificação de que não havia nenhuma contaminação na parte externa dos nódulos. Posteriormente, com a mesma pinça, tais nódulos foram pressionados retirando o líquido contido em seu interior.

As placas foram incubadas em estufa tipo DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a uma temperatura de 28°C até o surgimento de colônias bacterianas. Após o aparecimento das colônias características, os isolados foram transferidos para placas de Petri contendo meio YMA com azul de bromotimol como indicador de pH e incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente, por um período de até 10 dias, sendo o aparecimento das colônias monitorado diariamente. Foram feitas sucessivas inoculações nesta fase para que fosse garantida a obtenção de culturas puras.

Após o processo de purificação, os isolados que não apresentaram contaminantes foram avaliados conforme características fenotípicas das colônias, em função do tempo de crescimento (rápido – colônias isoladas aparecem até três dias depois de repicadas; intermediário – colônias aparecem de quatro a seis dias; e lento – colônias aparecem depois de seis dias); quanto a reação de pH em meio de cultura (AC: ácida; AL: alcalina; N: neutra, o azul de bromotimol deixa o meio esverdeado em pH 6,8. Se as bactérias acidificarem o meio, este adquirirá a cor amarelada, enquanto que se alcalinizarem o meio, a coloração ficará azulada); transparência da colônia (opaca - quando não possui o brilho; translúcida - quando permite a passagem da luz através da placa; e transparente – quando além de permitir a passagem da luz,

percebe-se claramente o que tem do outro lado) e forma da colônia (circular ou irregular). Após sete dias da incubação, foi determinada a cor das colônias; presença de muco (sim ou não); quantidade de muco (muito ou pouco) e tipo de muco (viscoso, butírico ou floculoso). As características fenotípicas foram tabuladas e inseridas em uma planilha, esta que por sua vez foi transformada em uma matriz binária combinante entre 0 e 1 de forma positiva e negativa para os aspectos analisados, e dessa maneira foram construídos os dendrogramas de similaridade por agrupamento.

Após o processo de isolamento, identificação e caracterização, os isolados foram estocados em tubos de polipropileno (com capacidade para 1,5 mL) contendo 1,0 mL de meio YM com glicerina (25%), em ultrafreezer a -80°C, para estudos subsequentes.

3.4 Avaliação da variabilidade genética dos isolados

As etapas que envolveram a caracterização molecular (extração de DNA, amplificação de genes, análise de restrição e purificação) foram realizadas em isolados representativos dos grupos fenotípicos obtidos, no Laboratório de Biologia do Solo (LBS) do Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA, Recife. Todos os isolados estocados foram colocados para crescer em meio YMA para a verificação da pureza.

A variabilidade dos isolados bacterianos foi analisada por meio da técnica de BOX-PCR, que identificou perfis redundantes, possibilitando a redução de esforço no sequenciamento.

3.4.1 Extração de DNA

Os isolados foram cultivados em 5,0 mL de meio de cultura TY e incubados a 28°C sob agitação de 200 rpm durante o tempo de crescimento de cada isolado. Uma alíquota de 1,0 mL da suspensão de células foi transferida para tubos de polipropileno de 1,5mL, sendo centrifugados por 3 min a 13.000 rpm (MARTINS et al., 2015). O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi utilizado para extração do DNA genômico utilizando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Nº A1125, Promega), conforme recomendação do fabricante.

Os elementos Box do DNA genômico foram amplificados utilizando como iniciador o oligonucleotídeo BOX A1-R (5'CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'), que amplifica regiões palindrômicas e repetitivas do DNA cromossômico.

3.4.2 Amplificação dos fragmentos de DNA por BOX-PCR

A reação de amplificação foi realizada em volume de 25 µl foi composta de 2,5 ng de DNA genômico; 13 µl de água estéril; 10 mM de Tris-HCl; 2 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTP's; 1,5U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen™); 0,4 mM do primer. A amplificação foi realizada em um termociclador (Thermal Cycler – Applied Biosystems); Os ciclos adotados na amplificação foram os seguintes: um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 9 min, seguida por 30 ciclos de 1 min a 94 °C (anelamento), 1 min a 55 °C (extensão) e 5 min a 72 °C com uma etapa de alongamento final de 10 min a 72°C.

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5X, por eletroforese conduzida a 100 V durante aproximadamente 2 horas, visualizado em sob luz ultravioleta (UV) e fotografadas com o sistema de fotodocumentação (Loccus L. PTX biotecnologia).

O marcador molecular 1kb foi utilizado para comparação do tamanho das bandas. Com a separação desses fragmentos, foram obtidos perfis de bandas idênticas, sendo selecionados isolados (no mínimo um por perfil) para executar a confirmação do status de rizóbio.

3.4.3 Análise de restrição do DNA Ribossomal Amplificado – ARDRA

Para a amplificação, foram utilizados os primers 16S rDNA fD1 (‘AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3’) e rD1 (‘5 AAG GAG GTG ATC CAG CC 3’). Cada reação de amplificação de 25 µl foi composta de 2,5 ng de DNA genômico; 13 µl de água estéril; 10 mM de Tris-HCl; 2 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTP's; 2,5U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen™); 0,4 mM de cada primer.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (Thermal Cycler – Applied Biosystems). Os ciclos de amplificação constituíram-se de uma etapa inicial de 94 °C por 3 min., seguida de 30 ciclos de desnaturação a 92 °C por 50seg, uma etapa de anelamento a 57 °C por 50 seg. e uma etapa de extensão a 72 °C por 2 min. finalizando com uma última etapa de extensão a 72 °C por 7 min.

Os produtos de PCR foram quantificados em gel de agarose 1,2% (em torno de 1500 pb) em tampão TBE a 100V e purificados segundo Lyra (2001). As digestões com as endonucleases ocorreram *overnight* a 37 °C em um volume final de 20 µL, sendo 8 µl digeridos utilizando-se 10U das enzimas de restrição *Alu I*, *Xba I*, *Apa I*, *Xho I*, *Rsa I*, *Hae III* e *Nde I* (Invitrogen™) diluídas em 2,0 µl de tampão e 9 µl de água estéril destilada. Os sítios de corte

das enzimas de restrição estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Sítios de corte das enzimas utilizadas na Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA)

ENZIMAS	FONTE	SÍTIOS DE CORTE
<i>Alu I</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	5' AG-CT 3'
<i>Xba I</i>	<i>Xanthomonas badrii</i>	5' T-CTAGA 3'
<i>Apa I</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	5'- GGGCC-C - 3'
<i>Xho I</i>	<i>Xanthomonas holcicola</i>	5' C-TCGA G- 3'
<i>Rsa I</i>	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>	5'- GT-AC - 3'
<i>Hae III</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	5' – GG-CC – 3'
<i>Nde I</i>	<i>Neisseriade nitrificans</i>	5' CA-TATG 3'

Os produtos da digestão foram submetidos a eletroforese horizontal em gel de agarose (1,5%) a 100 V por 120 minutos, em tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5X. Para verificar o tamanho dos fragmentos, utilizou-se nas laterais dos géis, o marcador de peso molecular 1kb DNA (Amresco). Ao final da eletroforese, os géis foram documentados em fotodocumentador LPix-STi conforme descrito acima. As imagens dos géis foram analisadas com auxílio do programa BioNumerics 7.6 (Applied Maths), utilizando o coeficiente de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA para a construção do dendrograma de similaridade.

3.6 Análise de dados

As análises estatísticas foram realizadas com o programa computacional Assisat 7.7. Para as variáveis analisadas no experimento em casa-de-vegetação (número e biomassa de nódulos secos, número de folhas, biomassa da parte aérea seca, biomassa de raiz seca e acúmulo de N da parte aérea), foram submetidas à análise de variância (ANOVA) pelo Teste F e para aquelas em que o F for significativo, houve comparação entre as médias utilizando o teste de Tuckey a 5% de probabilidade. Além disso, foram realizados testes de correlação entre alguns parâmetros avaliados. Devido à ausência de todos os tipos de cobertura nos Gleissolos, essas análises foram realizadas considerando dois experimentos em arranjo fatorial. Primeiramente considerou-se um fatorial 3 x 2 x 4, sendo os tratamentos as três espécies de crotalária, duas classes de solo (Latosolo e Argissolo) e as quatro coberturas ou tipos de uso (cana-de-açúcar, capoeira, mata e outros usos). Para inclusão dos Gleissolos nas comparações, foi considerado um arranjo fatorial 3 x 3 x 2 (as três espécies de crotalária, os três tipos de solo e as duas

coberturas comuns a todos os solos). Em ambos os experimentos foram consideradas 3 repetições, sendo que a unidade experimental consistiu em três vasos.

A partir da caracterização morfológica dos isolados, foram construídas matrizes binárias (presença (1) e ausência (0) da característica) no aplicativo Excel do Office 2013. Estas matrizes foram importadas pelo software PAST versão 2.17 (HAMMER et al., 2001) a partir das quais foram gerados os dendrogramas de similaridade, utilizando o método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages) e o coeficiente de similaridade de Jaccard.

Quanto a genética, as sequências foram alinhadas com as de estirpes referência de espécies de rizóbio utilizando o programa ClustalW (THOMPSON et al., 1994) e árvores filogenéticas foram construídas usando o programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2011). Testes de modelos de substituição de nucleotídeos foram feitos no MEGA 5 para selecionar o modelo que melhor se ajusta ao conjunto de sequências alinhadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização físico-química dos solos.

Os atributos físicos e químicos dos solos Argissolos, Latossolos e Gleissolos, coletados em diferentes municípios da Zona-da-Mata são apresentados nas Tabelas 2 e 3. Observa-se que os valores dos atributos variaram de acordo com a classe de solo. Os atributos físicos apresentaram menor variação.

Tabela 2. Atributos físicos das amostras de solos coletadas em diferentes tipos e coberturas de solo da Zona-da-Mata de Pernambuco, Brasil

Município/Solo	Cobertura vegetal	Ds (g cm ⁻³)	Dp (g cm ⁻³)	Porosidade %	Areia %	Silte %	Argila %
GOIANA/ GLEISSOLO	Outros usos Agropecuários	1,208	2,475	51,176	299,84	611,47	88,68
GOIANA/ GLEISSOLO	Outros usos Agropecuários	1,024	2,34	56,249	103,96	646,95	249,1
GOIANA/ GLEISSOLO	Outros usos Agropecuários	1,144	2,415	52,65	205,18	702,73	92,08
GOIANA/ GLEISSOLO	Cana-de-açúcar	1,131	2,369	52,292	20,78	445,33	532,9
GOIANA/ GLEISSOLO	Cana-de-açúcar	1,14	2,368	51,858	35,99	432,12	531,9
GOIANA/ GLEISSOLO	Cana-de-açúcar	1,167	2,262	48,432	22,65	445,56	531,8
PAUDALHO / LATOSSOLO	Cana-de-açúcar	1,466	2,564	42,819	754,24	153,27	92,48
PAUDALHO / LATOSSOLO	Cana-de-açúcar	1,483	2,53	41,374	733,5	160,91	105,6
PAUDALHO / LATOSSOLO	Cana-de-açúcar	1,489	2,526	41,067	752,23	136,48	111,3
PAUDALHO / LATOSSOLO	Mata nativa	1,344	2,473	45,689	689,92	261,69	48,38
PAUDALHO / LATOSSOLO	Mata nativa	1,317	2,528	47,921	705	251,31	43,68
PAUDALHO / LATOSSOLO	Mata nativa	1,264	2,463	48,695	662,14	285,07	52,78
PAUDALHO / LATOSSOLO	Outros usos Agropecuários	1,419	2,556	44,504	720,61	250,5	28,88
PAUDALHO / LATOSSOLO	Outros usos Agropecuários	1,437	2,502	42,59	734,88	249,93	15,18
PAUDALHO / LATOSSOLO	Outros usos Agropecuários	1,449	2,552	43,222	689,64	278,97	31,38
PAUDALHO / LATOSSOLO	Capoeira	1,217	2,522	51,742	475,9	491,61	32,48
PAUDALHO / LATOSSOLO	Capoeira	1,192	2,452	51,416	440,05	456,06	103,9
PAUDALHO / LATOSSOLO	Capoeira	1,211	2,426	50,079	471,43	509,18	19,38
TAMANDARÉ/ GLEISSOLO	Outros usos Agropecuários	1,215	2,48	51,026	671,87	264,34	60,78
TAMANDARÉ/ GLEISSOLO	Outros usos Agropecuários	1,189	2,421	50,904	561,31	359,7	78,98
TAMANDARÉ/ GLEISSOLO	Outros usos Agropecuários	1,108	2,348	52,802	533,92	423,19	42,88
VITÓRIA / ARGISSOLO	Capoeira	1,408	2,488	43,428	635,44	286,27	78,28
VITÓRIA / ARGISSOLO	Capoeira	1,396	2,426	42,472	685,07	239,44	75,48
VITÓRIA / ARGISSOLO	Capoeira	1,387	2,46	43,639	636,47	269,14	94,38
VITÓRIA / ARGISSOLO	Mata nativa	1,243	2,458	49,434	629,64	189,37	181

(Continua)

Tabela 2. Atributos físicos das amostras de solos coletadas em diferentes tipos e coberturas de solo da Zona-da-Mata de Pernambuco, Brasil

VITÓRIA / ARGISSOLO	Mata nativa	1,249	2,491	49,878	648,73	183,08	168,2
VITÓRIA / ARGISSOLO	Mata nativa	1,193	2,437	51,081	658,01	213,1	128,9
VITÓRIA / ARGISSOLO	Outros usos Agropecuários	1,434	2,537	43,5	730,6	199,81	69,58
VITÓRIA / ARGISSOLO	Outros usos Agropecuários	1,463	2,62	44,191	841,71	124	34,28
VITÓRIA / ARGISSOLO	Outros usos Agropecuários	1,417	2,506	43,482	782,48	129,63	87,88
VITÓRIA / ARGISSOLO	Cana-de-açúcar	1,406	2,533	44,487	669,83	252,58	77,58
VITÓRIA / ARGISSOLO	Cana-de-açúcar	1,363	2,498	45,44	640,4	247,91	111,7
VITÓRIA / ARGISSOLO	Cana-de-açúcar	1,348	2,529	46,717	723,88	184,03	92,08
ITAMBÉ / ARGISSOLO	Outros usos Agropecuários	1,168	2,393	51,198	290,38	600,93	108,7
ITAMBÉ / ARGISSOLO	Outros usos Agropecuários	1,158	2,384	51,422	375,68	529,43	97,88
ITAMBÉ / ARGISSOLO	Outros usos Agropecuários	1,223	2,402	49,106	562	342,31	95,68
ITAMBÉ / ARGISSOLO	Capoeira	1,231	2,41	48,925	504,73	386,38	108,9
ITAMBÉ / ARGISSOLO	Capoeira	1,202	2,342	48,674	473,39	418,82	107,8
ITAMBÉ / ARGISSOLO	Capoeira	1,2	2,398	49,968	365,99	481,02	153
ITAMBÉ / ARGISSOLO	Mata nativa	1,297	2,416	46,307	606,72	333,89	61,38
ITAMBÉ / ARGISSOLO	Mata nativa	1,254	2,448	48,762	546,78	319,53	133,7
ITAMBÉ / ARGISSOLO	Mata nativa	1,315	2,474	46,848	656,88	201,63	141,5
ITAMBÉ / ARGISSOLO	Cana-de-açúcar	1,321	2,511	47,386	647,35	133,56	219,1
ITAMBÉ / ARGISSOLO	Cana-de-açúcar	1,346	2,481	45,741	655,38	2,735	341,9
ITAMBÉ / ARGISSOLO	Cana-de-açúcar	1,362	2,517	45,887	580,47	1,145	418,4
MACAPARANA/ ARGISSOLO	Capoeira	1,165	2,393	51,306	421,47	156,14	422,4
MACAPARANA/ ARGISSOLO	Capoeira	1,226	2,425	49,443	402,45	343,56	251
MACAPARANA/ ARGISSOLO	Capoeira	1,194	2,426	50,791	416,45	453,06	130,5
MACAPARANA/ ARGISSOLO	Outros usos Agropecuários	1,202	2,344	48,734	298,63	604,78	96,58
MACAPARANA/ ARGISSOLO	Outros usos Agropecuários	1,211	2,402	49,582	387,56	452,75	159,7
MACAPARANA/ ARGISSOLO	Outros usos Agropecuários	1,201	2,36	49,145	403,08	399,93	197

(Continua)

Tabela 2. Atributos físicos das amostras de solos coletadas em diferentes tipos e coberturas de solo da Zona-da-Mata de Pernambuco, Brasil

MACAPARANA/ ARGISSOLO	Cana-de-açúcar	1,282	2,437	47,394	487,65	281,26	231,1
MACAPARANA/ ARGISSOLO	Cana-de-açúcar	1,264	2,429	47,952	435,57	4,649	559,8
MACAPARANA/ ARGISSOLO	Cana-de-açúcar	1,203	2,42	50,285	502,32	263,19	234,5
MACAPARANA/ ARGISSOLO	Mata nativa	1,241	2,456	49,462	378,11	416	205,9
MACAPARANA/ ARGISSOLO	Mata nativa	1,15	2,45	53,089	288,35	500,66	211
MACAPARANA/ ARGISSOLO	Mata nativa	1,169	2,471	52,697	385,22	298,99	315,8
ESCADA / LATOSSOLO	Capoeira	1,142	2,448	53,358	505,77	113,54	380,7
ESCADA / LATOSSOLO	Capoeira	1,162	2,469	52,95	483,9	1,511	514,5
ESCADA / LATOSSOLO	Capoeira	1,108	2,496	55,609	417,77	159,44	422,8
ESCADA / LATOSSOLO	Mata nativa	1,147	2,298	50,069	412,18	348,83	238
ESCADA / LATOSSOLO	Mata nativa	1,112	2,457	54,757	495,95	286,16	217,9
ESCADA / LATOSSOLO	Mata nativa	1,124	2,415	53,476	387,57	360,04	252,4
ESCADA / LATOSSOLO	Cana-de-açúcar	1,146	2,471	53,614	462,2	276,61	258,2
ESCADA / LATOSSOLO	Cana-de-açúcar	1,138	2,412	52,844	375,54	298,47	326
ESCADA / LATOSSOLO	Cana-de-açúcar	1,106	2,488	55,539	370,44	278,47	351,1
ESCADA / LATOSSOLO	Outros usos Agropecuários	1,209	2,523	52,073	559,47	206,84	233,7
ESCADA / LATOSSOLO	Outros usos Agropecuários	1,178	2,512	53,116	505,09	238,92	256
ESCADA / LATOSSOLO	Outros usos Agropecuários	1,22	2,518	51,537	576,72	205,59	217,77
IPOJUCA / GLEISSOLO	Cana-de-açúcar	1,174	2,39	50,89	307,16	383,85	309
IPOJUCA / GLEISSOLO	Cana-de-açúcar	1,085	2,387	54,564	185,26	412,65	402,1
IPOJUCA / GLEISSOLO	Cana-de-açúcar	1,053	2,371	55,574	183,75	452,66	363,6
IPOJUCA / GLEISSOLO	Outros usos Agropecuários	0,933	2,377	60,749	213,19	603,52	183,3
IPOJUCA / GLEISSOLO	Outros usos Agropecuários	0,903	2,393	62,291	100,31	632,6	267,1
IPOJUCA / GLEISSOLO	Outros usos Agropecuários	1,069	2,469	56,717	333,89	501,92	164,2
IPOJUCA / GLEISSOLO	Cana-de-açúcar	0,97	2,264	57,149	30,57	582,74	383,7
IPOJUCA / GLEISSOLO	Cana-de-açúcar	1,081	2,444	55,78	337,72	418,49	243,8
IPOJUCA / GLEISSOLO	Cana-de-açúcar	1,028	2,382	56,827	186,24	523,97	249,8

(Continua)

Tabela 2. Atributos físicos das amostras de solos coletadas em diferentes tipos e coberturas de solo da Zona-da-Mata de Pernambuco, Brasil

		(Conclusão)					
PALMARES /LATOSSOLO	Capoeira	1,174	2,45	52,106	472,33	385,18	142,5
PALMARES /LATOSSOLO	Capoeira	1,172	2,462	52,402	458,53	383,08	158,4
PALMARES /LATOSSOLO	Capoeira	1,207	2,559	52,859	449,81	344,8	205,4
PALMARES /LATOSSOLO	Mata nativa	1,042	2,416	56,887	455,18	330,73	214,1
PALMARES /LATOSSOLO	Mata nativa	1,07	2,442	56,195	411,58	336,53	251,9
PALMARES /LATOSSOLO	Mata nativa	1,111	2,457	54,783	382,93	339,88	277,2
PALMARES /LATOSSOLO	Outros usos Agropecuários	1,243	2,371	47,591	320,5	495,31	184,2
PALMARES /LATOSSOLO	Outros usos Agropecuários	1,302	2,468	47,271	505,86	380,25	113,9
PALMARES /LATOSSOLO	Outros usos Agropecuários	1,403	2,512	44,147	591,15	318,06	90,78
PALMARES /LATOSSOLO	Cana-de-açúcar	1,352	2,466	45,19	601,14	240,37	158,5
PALMARES /LATOSSOLO	Cana-de-açúcar	1,321	2,458	46,275	586,31	243,6	170,1
PALMARES /LATOSSOLO	Cana-de-açúcar	1,249	2,341	45,869	528,45	242,54	160,4

Tabela 3. Caracterização química das amostras de solos coletadas em diferentes tipos e coberturas de solo da Zona-da-Mata de Pernambuco, Brasil

Município/Solo	Cobertura vegetal	C.E dS m ⁻¹	pH(H ₂ O)	P mg dm ⁻³	Al	K	Na	Ca	Mg	H+Al
							(cmolc dm ⁻³)			
GOIANA/ GLEISSOLO	Outros usos Agropecuários	1,15	4,3	28,07	0,29	0,15	4,6	2,4	0,6	8,4
GOIANA/ GLEISSOLO	Outros usos Agropecuários	1,12	4	18,28	0,37	0,23	5,1	3,1	2,1	14,9
GOIANA/ GLEISSOLO	Outros usos Agropecuários	1,96	3,9	25,12	0,31	0,2	3,9	2,6	1,8	10,8
GOIANA/ GLEISSOLO	Cana-de-açúcar	1,72	4,8	5,39	0,23	0,98	8,8	6,8	0,35	6
GOIANA/ GLEISSOLO	Cana-de-açúcar	0,79	4,7	9,35	0,32	0,48	6,5	6	0,6	7,7
GOIANA/ GLEISSOLO	Cana-de-açúcar	0,84	4,5	6,83	0,29	0,53	7,8	7	1,2	10,1
PAUDALHO / LATOSSOLO	Cana-de-açúcar	0,48	4,4	14,68	0,08	0,12	0,7	0,35	0,6	6,7
PAUDALHO / LATOSSOLO	Cana-de-açúcar	0,56	4,7	12,3	0,12	0,16	1	0,5	0,45	2,6
PAUDALHO / LATOSSOLO	Cana-de-açúcar	0,52	4,7	11,29	0,14	0,17	0,8	0,3	0,45	3,8
PAUDALHO / LATOSSOLO	Mata nativa	0,26	4,9	6,76	0,4	0,19	2,4	1,2	0,25	2,4
PAUDALHO / LATOSSOLO	Mata nativa	0,79	5,1	8,2	0,4	0,21	3,2	1,5	0,25	2,4
PAUDALHO / LATOSSOLO	Mata nativa	0,91	5	5,96	0,38	0,21	2,2	1,4	0,2	2,4
PAUDALHO / LATOSSOLO	Outros usos Agropecuários	0,52	5	5,24	0,09	0,13	1,4	0,6	0,2	2,4
PAUDALHO / LATOSSOLO	Outros usos Agropecuários	0,39	5,3	6,04	0,1	0,12	2,2	0,9	0,1	2,2
PAUDALHO / LATOSSOLO	Outros usos Agropecuários	0,53	5	7,55	0,11	0,14	1,8	0,9	0,1	1,9
PAUDALHO / LATOSSOLO	Capoeira	1,21	4,7	9,35	0,56	0,22	3,9	2,1	0,2	2,4
PAUDALHO / LATOSSOLO	Capoeira	1,28	4,4	8,05	0,4	0,2	2,9	1,7	0,2	2,9
PAUDALHO / LATOSSOLO	Capoeira	1,16	4,4	5,96	0,44	0,19	1,8	1	0,25	3,1
TAMANDARÉ/ GLEISSOLO	Outros usos Agropecuários	0,42	4,8	9,49	0,55	0,18	0,6	0,25	0,6	6,2
TAMANDARÉ/ GLEISSOLO	Outros usos Agropecuários	0,79	4,4	8,99	0,48	0,16	0,6	0,3	0,9	8,2
TAMANDARÉ/ GLEISSOLO	Outros usos Agropecuários	0,48	4,4	7,69	0,14	0,11	0,9	0,4	1,05	8,6
VITÓRIA / ARGISSOLO	Capoeira	0,36	4,4	10,43	0,13	0,11	0,9	0,3	0,85	8,2
VITÓRIA / ARGISSOLO	Capoeira	0,54	4,3	8,2	0,29	0,17	0,4	0,2	0,75	7,9
VITÓRIA / ARGISSOLO	Capoeira	0,93	4,2	7,76	0,29	0,18	0,5	0,25	0,65	6,7

(Continua)

Tabela 3. Caracterização química das amostras de solos coletadas em diferentes tipos e coberturas de solo da Zona-da-Mata de Pernambuco, Brasil

VITÓRIA / ARGISSOLO	Mata nativa	0,25	3,9	7,62	0,26	0,17	0,5	0,3	0,95	8,4
VITÓRIA / ARGISSOLO	Mata nativa	0,76	4	7,91	0,3	0,17	0,5	0,25	0,85	8,2
VITÓRIA / ARGISSOLO	Mata nativa	1,08	4	6,97	0,26	0,13	0,5	0,25	1,15	10,1
VITÓRIA / ARGISSOLO	Outros usos Agropecuários	0,95	4,8	8,2	0,23	0,14	0,9	0,35	0,25	2,9
VITÓRIA / ARGISSOLO	Outros usos Agropecuários	0,93	5	11,87	0,59	0,18	0,5	0,25	0,2	2,6
VITÓRIA / ARGISSOLO	Outros usos Agropecuários	0,49	4,6	17,7	0,55	0,16	0,9	0,45	0,3	3,1
VITÓRIA / ARGISSOLO	Cana-de-açúcar	0,93	5,7	7,04	0,41	0,17	2,6	1,2	0	1,7
VITÓRIA / ARGISSOLO	Cana-de-açúcar	1,09	4,3	41,04	0,18	0,14	1,2	0,7	0,7	9,1
VITÓRIA / ARGISSOLO	Cana-de-açúcar	0,97	5,5	32,61	0,23	0,13	3,3	1,4	0	1,9
ITAMBÉ / ARGISSOLO	Outros usos Agropecuários	0,56	4,1	39,38	0,15	0,1	1,2	0,6	1,8	12
ITAMBÉ / ARGISSOLO	Outros usos Agropecuários	0,91	4,6	8,92	0,47	0,2	1,2	0,7	1,35	11,5
ITAMBÉ / ARGISSOLO	Outros usos Agropecuários	0,54	4,4	11,8	0,84	0,25	1,1	0,6	0,9	8,2
ITAMBÉ / ARGISSOLO	Capoeira	0,66	4,5	23,18	0,87	0,26	2,6	1,1	0,35	2,9
ITAMBÉ / ARGISSOLO	Capoeira	0,97	4,5	8,56	0,45	0,16	3,6	1,4	0,35	3,4
ITAMBÉ / ARGISSOLO	Capoeira	1,02	4,3	9,64	0,44	0,18	1,4	0,7	1,15	10,6
ITAMBÉ / ARGISSOLO	Mata nativa	0,61	4,4	4,02	0,26	0,12	3,2	2,3	0,3	2,9
ITAMBÉ / ARGISSOLO	Mata nativa	0,58	4,4	7,62	0,33	0,13	1,9	1,3	0,65	7,7
ITAMBÉ / ARGISSOLO	Mata nativa	0,67	4,5	6,47	0,34	0,14	3,2	2	0,3	3,4
ITAMBÉ / ARGISSOLO	Cana-de-açúcar	0,89	5	10,5	0,34	0,15	2,6	1,2	0,1	1,2
ITAMBÉ / ARGISSOLO	Cana-de-açúcar	0,31	5,5	8,7	0,19	0,07	3,4	2	0,05	2,9
ITAMBÉ / ARGISSOLO	Cana-de-açúcar	0,41	5,6	8,92	0,26	0,09	3,9	1,8	0	2,2
MACAPARANA/ ARGISSOLO	Capoeira	0,19	4,8	5,32	0,2	0,07	3,9	2	0,15	2,9
MACAPARANA/ ARGISSOLO	Capoeira	0,44	4,7	3,3	0,23	0,13	3,8	1,9	0,4	4,3
MACAPARANA/ ARGISSOLO	Capoeira	0,34	4,6	3,95	0,28	0,17	3,9	1,9	0,2	3,1
MACAPARANA/ ARGISSOLO	Outros usos Agropecuários	0,57	4,8	8,34	0,67	0,2	3	2,1	0,15	3,1
MACAPARANA/ ARGISSOLO	Outros usos Agropecuários	0,27	4,9	6,25	0,45	0,17	1,8	0,9	0,6	6,7

(Continua)

Tabela 3. Caracterização química das amostras de solos coletadas em diferentes tipos e coberturas de solo da Zona-da-Mata de Pernambuco, Brasil

MACAPARANA/ ARGISSOLO	Outros usos Agropecuários	0,49	4,8	6,54	0,48	0,17	1,8	1	0,45	5,5
MACAPARANA/ ARGISSOLO	Cana-de-açúcar	0,51	4,5	7,12	0,36	0,16	1,9	1,2	0,55	6,5
MACAPARANA/ ARGISSOLO	Cana-de-açúcar	0,39	4,7	3,95	0,36	0,15	1,9	1,3	0,25	3,1
MACAPARANA/ ARGISSOLO	Cana-de-açúcar	0,26	4,9	8,34	0,45	0,17	3,6	1,5	0,15	2,6
MACAPARANA/ ARGISSOLO	Mata nativa	0,41	4,9	6,25	0,44	0,17	2,3	1,2	0,1	2,4
MACAPARANA/ ARGISSOLO	Mata nativa	0,74	4,9	6,54	0,55	0,2	2	1,1	0,15	2,9
MACAPARANA/ ARGISSOLO	Mata nativa	0,78	4,7	7,12	0,4	0,14	1,4	0,7	0,2	5,3
ESCADA / LATOSSOLO	Capoeira	0,32	4,4	3,08	0,15	0,08	0,7	0,3	1,83	8,9
ESCADA / LATOSSOLO	Capoeira	0,23	4,3	2,94	0,15	0,1	0,9	0,4	1,6	8,9
ESCADA / LATOSSOLO	Capoeira	0,32	4,2	4,24	0,17	0,11	0,9	0,5	1,5	8,2
ESCADA / LATOSSOLO	Mata nativa	0,89	3,6	4,74	0,14	0,1	0,4	0,25	2,7	16,3
ESCADA / LATOSSOLO	Mata nativa	0,74	3,8	28,79	0,13	0,13	0,4	0,3	1,6	8,9
ESCADA / LATOSSOLO	Mata nativa	0,96	3,7	3,8	0,12	0,09	0,4	0,2	2,35	14,9
ESCADA / LATOSSOLO	Cana-de-açúcar	0,51	5,4	5,6	0,22	0,11	3,2	1,8	0,1	4,1
ESCADA / LATOSSOLO	Cana-de-açúcar	0,74	4,5	6,18	0,31	0,16	2,1	0,9	0,45	6,5
ESCADA / LATOSSOLO	Cana-de-açúcar	0,72	3,9	6,4	0,31	0,14	0,7	0,4	1,7	8,9
ESCADA / LATOSSOLO	Outros usos Agropecuários	0,32	4,3	8,77	0,19	0,1	0,7	0,3	1,05	9,6
ESCADA / LATOSSOLO	Outros usos Agropecuários	0,36	4,4	8,99	0,16	0,1	1,2	0,6	1,05	9,4
ESCADA / LATOSSOLO	Outros usos Agropecuários	0,39	4,2	4,88	0,34	0,12	0,7	0,3	0,8	8,6
IPOJUCA / GLEISSOLO	Cana-de-açúcar	0,24	4,9	53,57	0,27	0,11	2,4	1,6	0,5	8,2
IPOJUCA / GLEISSOLO	Cana-de-açúcar	0,27	4,9	50,54	0,16	0,08	2,7	1,3	0,4	7,4
IPOJUCA / GLEISSOLO	Cana-de-açúcar	0,29	4,5	65,43	0,2	0,09	2,1	1,1	1	9,6
IPOJUCA / GLEISSOLO	Outros usos Agropecuários	0,82	5	47,09	0,76	0,36	3,2	1,8	0,3	6,5
IPOJUCA / GLEISSOLO	Outros usos Agropecuários	0,71	4,8	34,48	0,43	0,26	2,6	1,4	0,55	10,1
IPOJUCA / GLEISSOLO	Outros usos Agropecuários	0,43	4,8	18,21	0,39	0,15	1,5	0,7	0,65	10,6
IPOJUCA / GLEISSOLO	Cana-de-açúcar	0,31	4,8	25,26	0,86	0,21	2,7	1,1	0,65	11
IPOJUCA / GLEISSOLO	Cana-de-açúcar	0,42	5,4	23,54	0,94	0,22	3,2	1,3	0,15	5,3

(Continua)

Tabela 3. Caracterização química das amostras de solos coletadas em diferentes tipos e coberturas de solo da Zona-da-Mata de Pernambuco, Brasil

											(Conclusão)
IPOJUCA / GLEISSOLO	Cana-de-açúcar	0,38	5,17	20,08	0,96	0,22	3,4	1,3	0	5,3	
PALMARES /LATOSSOLO	Capoeira	0,51	4,8	3,73	0,35	0,1	1,6	0,5	0,55	8,9	
PALMARES /LATOSSOLO	Capoeira	0,49	4,7	6,61	0,38	0,11	0,7	0,4	0,8	9,6	
PALMARES /LATOSSOLO	Capoeira	0,23	4,6	7,19	0,14	0,08	0,7	0,3	1,1	10,6	
PALMARES /LATOSSOLO	Mata nativa	0,54	3,8	11,37	0,19	0,09	0,7	0,15	2,9	13,7	
PALMARES /LATOSSOLO	Mata nativa	0,52	3,8	6,9	0,15	0,07	0,5	0,15	3,4	15,8	
PALMARES /LATOSSOLO	Mata nativa	0,38	3,7	6,9	0,15	0,06	0,5	0,25	3,4	15,4	
PALMARES /LATOSSOLO	Outros usos Agropecuários	0,31	5,3	14,82	0,37	0,13	2,4	1,6	0,2	4,1	
PALMARES /LATOSSOLO	Outros usos Agropecuários	0,26	5,6	22,31	0,4	0,1	3,8	1,7	0	2,9	
PALMARES /LATOSSOLO	Outros usos Agropecuários	0,17	5,1	6,18	0,13	0,06	1,4	0,7	0,15	4,1	
PALMARES /LATOSSOLO	Cana-de-açúcar	0,16	5,6	2,87	0,1	0,05	3,1	1,3	0	2,9	
PALMARES /LATOSSOLO	Cana-de-açúcar	0,15	5,2	5,03	0,14	0,07	1,8	1,1	0,3	6,5	
PALMARES /LATOSSOLO	Cana-de-açúcar	0,16	5,3	3,38	0,12	0,07	2,1	1,15	0,25	5,3	

4.2 Desenvolvimento das espécies de Crotalária e observação da nodulação natural

É válido ressaltar as análises dos dados foram realizadas de duas formas, uma delas (comparativo entre duas classes de solos e as coberturas vegetais presentes) é apresentada a seguir.

Analisando-se a Massa seca da parte aérea (MSPA), em um comparativo dois (Argissolo e Latossolo) dos solos estudados, o único tratamento que foi significativo a 1% de probabilidade foi a classe do solo, os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas. As plantas que foram cultivadas em Argissolo obtiveram um melhor desenvolvimento quando comparadas às que foram cultivadas em Latossolo.

Fato semelhante é expresso na Massa seca de Raiz (MSR), onde os tratamentos não foram significativos, exceto o tratamento classe de solo, apresentando diferença significativa a 1% de probabilidade. As espécies cultivadas em Latossolo apresentaram menores índices de massa seca de raiz que as cultivadas em Argissolo. Ambas análises apresentaram coeficiente de variação menor que 50%; o que pode ser expresso na Figura 6, por meio do R^2 apresentado.

No parâmetro de análise da Biomassa Total (BT), os dados foram comuns aos da MSPA e MSR; desse modo, tem-se que o maior valor expresso de biomassa total ocorreu nas plantas cultivadas em Argissolo. As demais variáveis (cobertura do solo, espécie e classe de solo) não apresentaram diferenças significativas em suas interações.

RIUTTA et al. (2012) analisam que o acúmulo de biomassa da cultura influencia diretamente na decomposição e mineralização do elemento nitrogênio. Este fato é relacionado com o maior contato do tecido vegetal com a superfície do solo, aumentando de forma considerável a atividade microbiana e acelerando o processo decompositor (REZENDE et al., 1999; MEYER III et al., 2011).

Esse acúmulo de biomassa por parte da cultura é dependente de processos biológicos que são influenciados por condições de clima, manejo e solo; e no caso das leguminosas, mesmo sendo complexa a dinâmica do nitrogênio, consegue estabelecer uma relação C/N no tecido das plantas que comandam a taxa decompositória (AMADO et al., 2012; AITA; GIACOMINI, 2003; MATOS et al., 2011). Tais estudos apontam que num sistema de consórcio de leguminosas e gramíneas a biomassa aportada pelas culturas têm influência direta na decomposição dos resíduos de acordo com a proporção que fora aportada.

O estudo apresentado aponta que, a quantidade de biomassa de cada espécie pode influenciar diretamente no padrão de decomposição e mineralização, assim também no aporte de nutrientes ao solo.

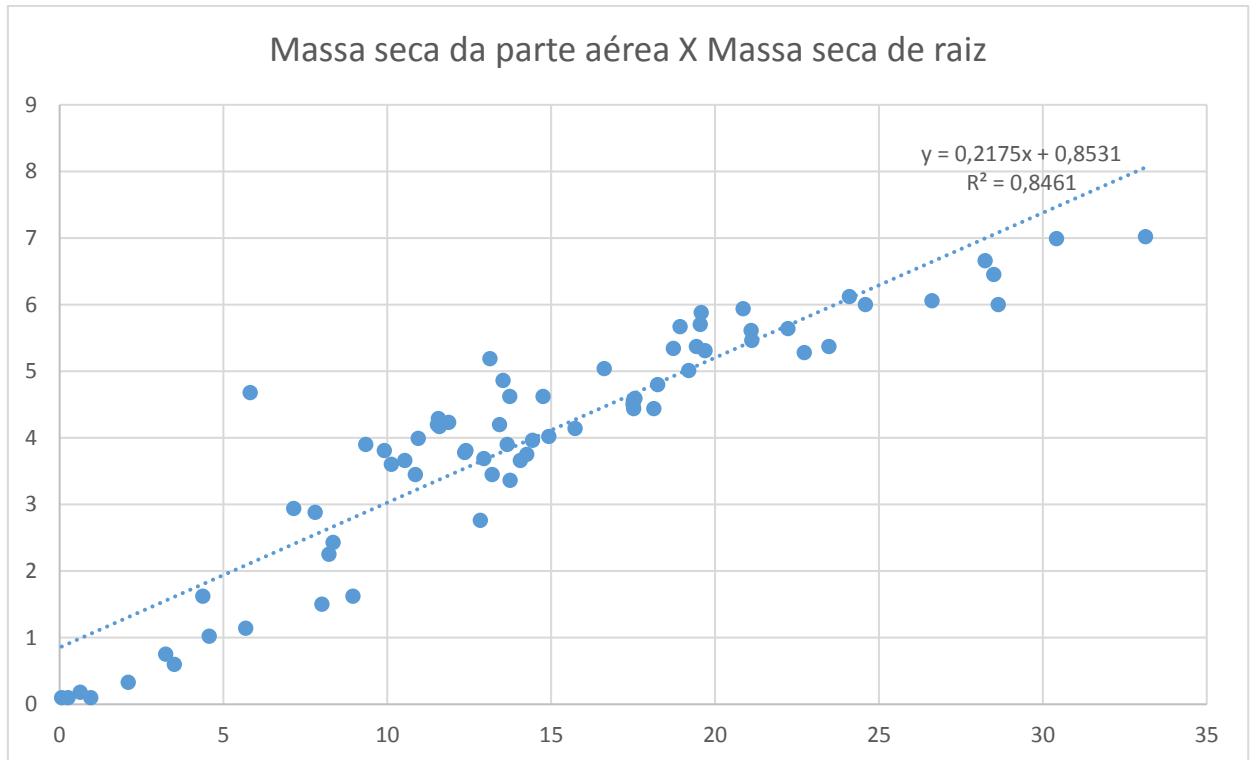


Figura 6. Análise da Massa seca da parte aérea x Massa seca de raiz de três espécies de Crotalaria cultivadas em diferentes solos da zona da Mata de Pernambuco

A análise que expressa o quantitativo de nodulação (Número de Nódulos -NN) dessas espécies apresentou resultados significativos para interação tripla (cobertura do solo, espécie cultivada e classe de solo), e também, de forma isolada para a variável cobertura. As plantas referentes ao tratamento cobertura do solo em “outros usos agropecuários” apresentaram em média 20 nódulos por planta, apresentando índice significativamente maior que no tratamento cobertura em “mata”, com apenas 13 nódulos por planta. As demais coberturas apresentaram valores intermediários. Na Figura 7, é apresentado um gráfico que correlaciona o comportamento associativo entre as variáveis BT e NN.

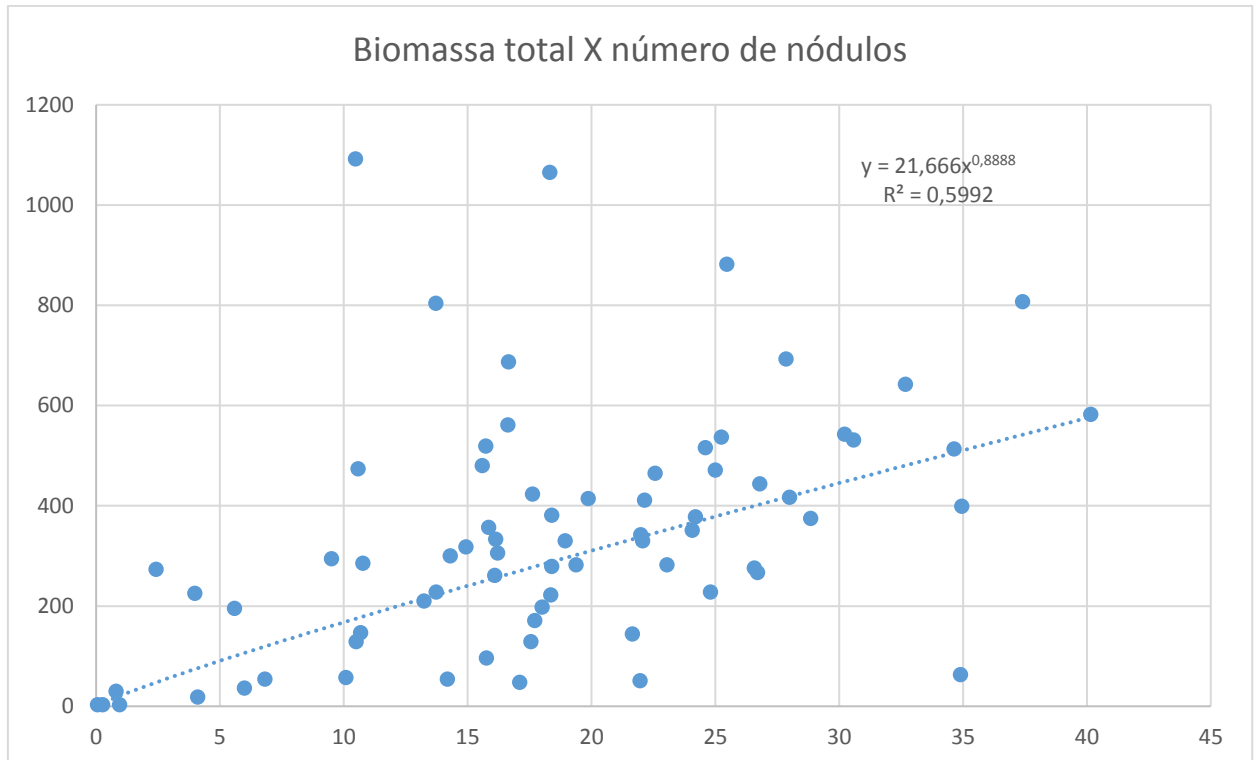


Figura 7. Análise da Biomassa total x Número de nódulos de três espécies de Crotalária cultivadas em diferentes solos da zona da Mata de Pernambuco

A massa seca de nódulos (MSN) apresentou resultados significativamente maiores nas plantas cultivadas em Argissolo que em Latossolo. Nos demais fatores e interações analíticas não houve diferenças significativas.

A massa específica de nódulos (MEN) não foi influenciada significativamente por nenhuma das interações nem fatores analisados. A avaliação da correlação entre a Massa seca dos nódulos e seu quantitativo de nodulação é expressa na Figura 8.

É válido ressaltar que em todas as análises anteriormente expostas foram adequadas a um fatorial que englobava interações das variáveis e análise das variáveis isoladas; enfatiza-se também que nestas análises foram inseridas duas classes, das três classes de solos estudadas, visto que o Gleissolo não dispunha de todas as condições de coberturas vegetais do solo que os demais solos apresentaram.

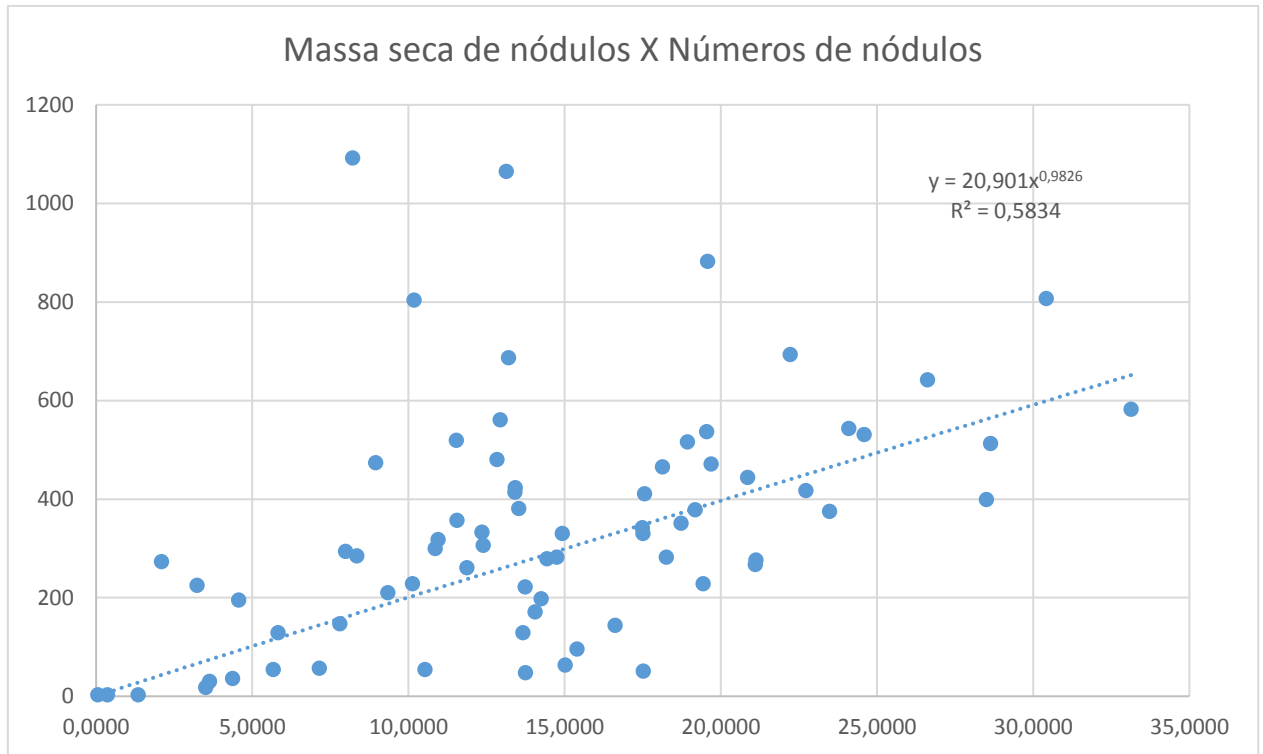


Figura 8. Análise da Massa seca de nódulos x Número de nódulos de três espécies de Crotalária cultivadas em diferentes solos da zona da Mata de Pernambuco

A partir de então, faremos uma análise fatorial com as mesmas variáveis analisadas anteriormente, estando num agrupamento das três classes de solo em diferentes coberturas vegetais.

A massa seca da parte aérea apresentou diferença significativa a 1% de probabilidade apenas no fator cobertura vegetal. Tal parâmetro foi significativamente superior na variável cobertura do solo em “outros usos agropecuários” quando comparado ao tratamento cobertura em “cana -de-açúcar”. Nesse parâmetro as espécies de crotalária não têm se apresentado diferentes, tendo comportamento uniforme para todas as análises feitas.

Comumente ao fator MSPA, a Massa seca de raiz só expressou diferença significativa nos tipos de cobertura do solo, destacando-se a cobertura em “outros usos agropecuários” como superior.

Os coeficientes de variação apresentado nas análises são condizentes com o coeficiente de determinação exposto no gráfico (Figura 9).

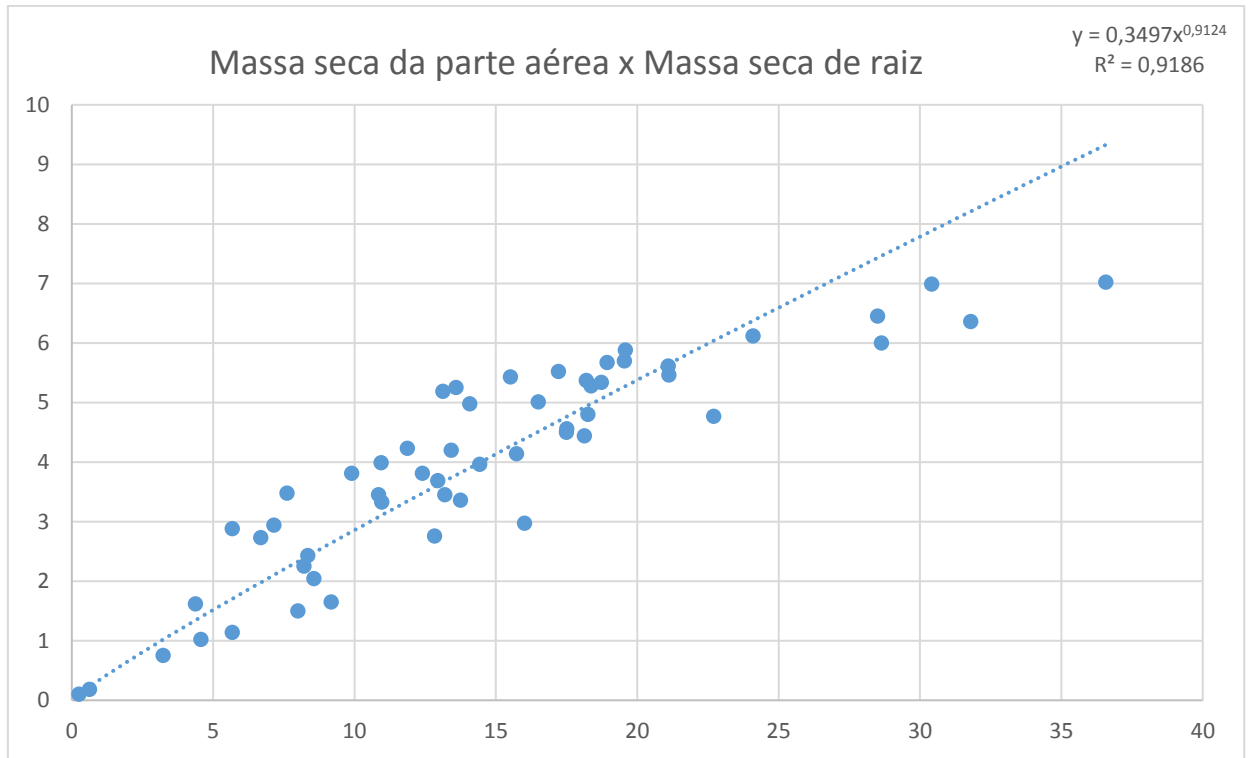


Figura 9. Análise da Massa seca da parte aérea x Massa seca de raiz de três espécies de Crotalaria cultivadas em solos com diferentes coberturas vegetais na zona da Mata de Pernambuco.

A Biomassa total apresentou diferença significativa apenas no segundo fator, cobertura vegetal, onde a variável “outros usos agropecuários” foi superior aos demais tratamentos.

Já o quantitativo de nodulação apresentou diferença significativa para cobertura vegetal e na interação dos três fatores analisados; a correlação é expressa na Figura 10.

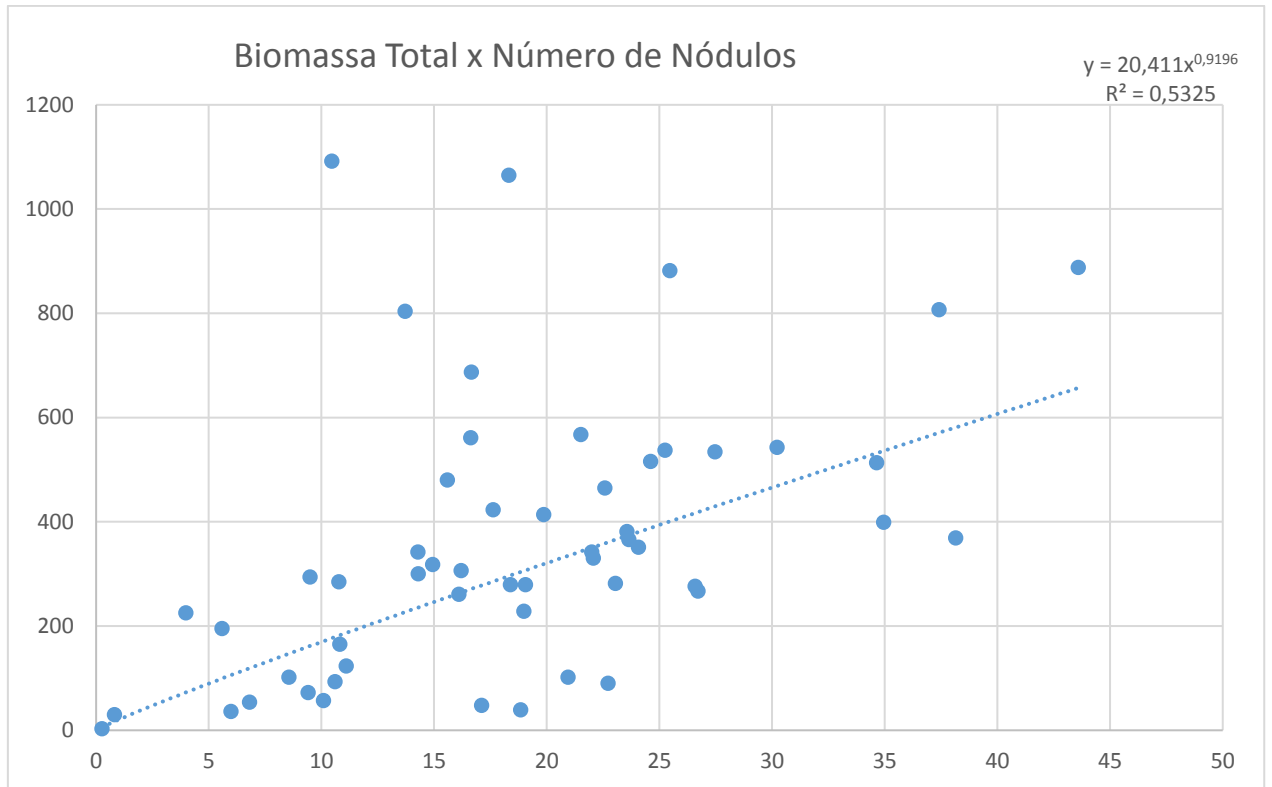


Figura 10. Análise da Biomassa Total x Número de nódulos de três espécies de Crotalária cultivadas em solos com diferentes coberturas vegetais na zona da Mata de Pernambuco

A massa seca de nódulos apresentou diferença significativa a 1% de probabilidade no aspecto cobertura do solo, evidenciando que a variável “cana-de-açúcar” foi inferior aos dados obtidos na variável “outros usos agropecuários”. E para massa específica de nódulos, nenhum dos tratamentos analisados apresentaram diferenças significativas (Figura 11).

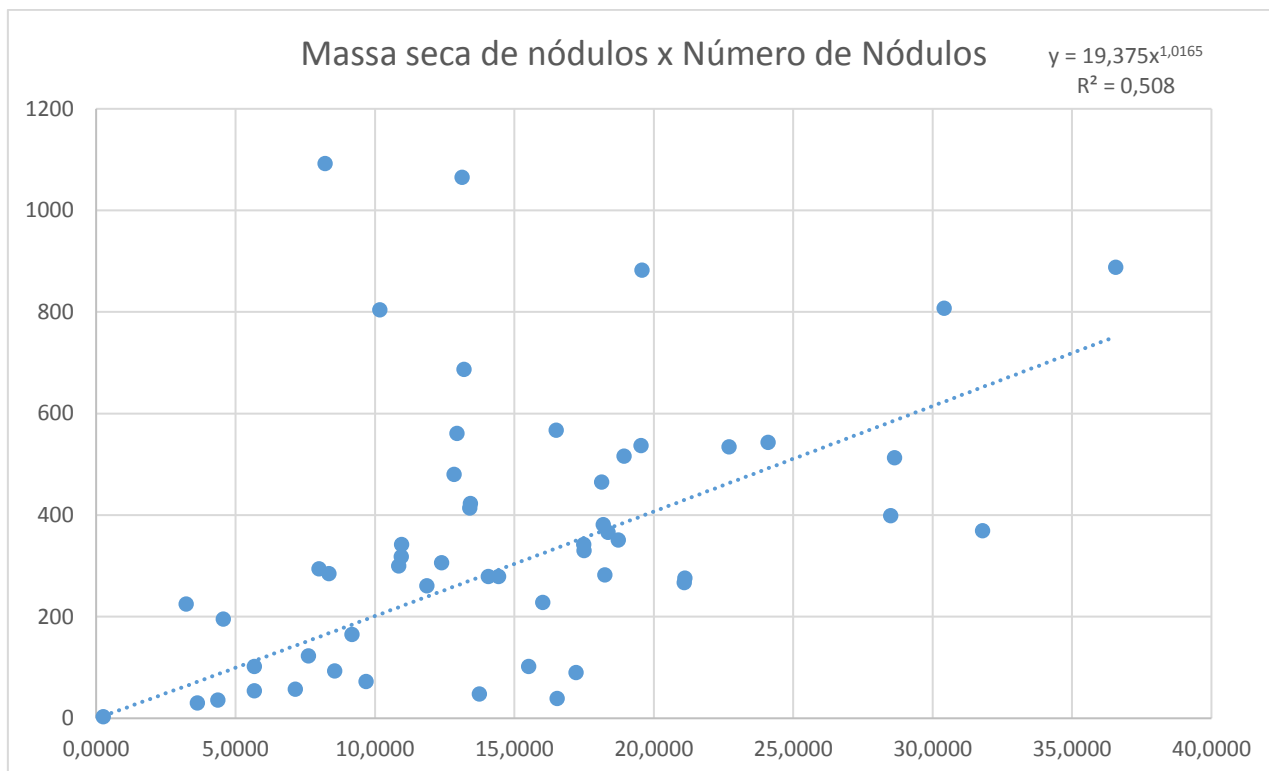


Figura 11. Análise da Massa seca de nódulos x Número de nódulos de três espécies de *Crotalaria* cultivadas em solos com diferentes coberturas vegetais na zona da Mata de Pernambuco

4.3 Características fenotípicas das bactérias de nódulos

Foram obtidos 505 isolados a partir dos nódulos de *C. spectabilis* e *C. juncea* (Tabela 5), em quase totalidade de crescimento rápido. Este número variou entre os tratamentos em função da ocorrência de nódulos em todos os tratamentos e de mais de um isolado por nódulo.

Tabela 5. Total de isolados de crotalaria cultivadas em solos e diferentes tipos e coberturas de solo da Zona-da-Mata de Pernambuco, Brasil

COBERTURA	SPECTABILIS			JUNCEA		
	LATOSSOLO	ARGISSOLO	GLEISSOLO	LATOSSOLO	ARGISSOLO	GLEISSOLO
MATA	11	29	-	12	18	-
CANA	21	33	39	19	16	32
CAPOEIRA	19	23	-	10	26	-
OUTROS USOS	28	48	30	31	32	28

Analisando as características gerais das colônias, em sua maioria foram de crescimento rápido. As colônias apresentaram cores normalmente associadas a rizóbios, variando entre incolor, creme e amarelo. Tais características são evidenciadas de maneira comum para microsimbiontes de diferentes espécies de leguminosas em solos do Brasil (TEIXEIRA et al., 2010; FREITAS et al., 2014), onde este mecanismo desenvolvido por elas torna-se uma prática de adaptação em virtude das diferentes condições edafoclimáticas que a zona geográfica do país possui.

A predominância de isolados com rápido crescimento em nódulos de leguminosas não é somente evidenciada em crotalária, fator que também é expresso em nódulos de feijão-caupi quando cultivados em diversas regiões, seja elas no semiárido, cerrado ou floresta (SILVA et al., 2007; CHAGAS-JÚNIOR et al., 2013; CHAGAS-JÚNIOR; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2010; TEIXEIRA et al., 2010; SHETTA; AL-SHAHARAN; ABDEL-AAL, 2011; FREITAS et al., 2014).

Com base da alteração do pH, 83% delas foram produtoras de ácido em meio de cultura, 11% apresenta metabolismo que alcaliniza o meio e 6% não altera o pH do meio YM (Tabela 6). Na literatura tem sido verificado que isolados que acidificam o meio de cultura geralmente apresentam crescimento rápido (FREITAS et al., 2014), condizendo com os resultados obtidos no presente estudo.

As proporções entre colônias secas e colônias que produzem exopolissacarídeos foram semelhantes.

Tabela 6. Proporções (%) das características de modificação do pH em meio de cultura e de produção de exopolissacarídeos de isolados de *Crotalaria juncea* e *Crotalaria spectabilis* cultivadas em solos da Zona-da-Mata de Pernambuco

pH do meio de cultura / produção de muco	<i>Crotalaria juncea</i>			<i>Crotalaria spectabilis</i>			Totais		
	secas	com muco	total	secas	com muco	total	secas	com mudo	Total
Acido	47	30	77	36	53	88	41	43	83
Alcalino	12	4	16	5	2	7	8	3	11
Neutro	6	1	7	2	2	5	4	2	6
Total	65	35	100	43	57	100	52	48	100

As bactérias de nódulos das duas espécies de leguminosas estudadas apresentam predominâncias de características distintas. Para ambas as espécies a predominância foi de

isolados de metabolismo que alcaliniza o meio de cultura (Tabela 6), com proporção maior para *C. spectabilis*. A maior parte dos isolados de *C. juncea* (65%) formam colônias secas em meio YMA, enquanto os isolados de *C. spectabilis* são predominantemente produtores de exopolissacarídeos. Para ambas as espécies os percentuais de isolados com reação neutra de pH foram baixos, sendo que, entre estes, houve predominância de colônias secas para *C. juncea*.

Entre os Argissolos, os tipos culturais predominantes entre os isolados são os de pH ácido (82%), percentual mais ou menos constante para todas as coberturas (Tabela 7). Neste solo, a predominância é de isolados com produção de exopolissacarídeos para as coberturas cana-de-açúcar e outros usos agroecuatoriais. Entre a minoria de isolados que alcalinizam o meio ou o deixam neutro, os isolados de colônias secas apresentam maiores proporções que os produtores de muco, principalmente os originários dos solos sob cobertura de capoeira ou outros usos. Nos Latossolos e Gleissolos é observada a mesma tendência de isolados de metabolismo ácido, e as proporções entre isolados produtores ou não de exopolissacarídeos são semelhantes para todos os tipos de cobertura do solo.

Tabela 7. Proporções (%) das características de modificação do pH em meio de cultura e de produção de exopolissacarídeos de isolados de *Crotalaria juncea* e *Crotalaria spectabilis* originados de Argissolos, Latossolos ou Gleissolos da Zona-da-Mata de Pernambuco sob diferentes usos

Solo/cobertura	Ácido			Alcalino			Neutro		
	Seca	Muco	Total	Seca	Muco	Total	Seca	Muco	Total
Argissolo									
Mata	40	49	89	4	0	4	4	2	6
Cana	35	53	88	4	0	4	6	2	8
Capoeira	43	31	73	12	0	12	8	6	14
Outros usos	28	51	79	11	3	14	6	1	8
Totais	35	47	82	8	1	9	6	3	9
Latossolo									
Mata	48	39	87	4	9	13	0	0	0
Cana	48	30	78	8	10	18	0	5	5
Capoeira	43	39	82	11	4	14	4	0	4
Outros usos	42	39	81	5	7	12	5	2	7
Totais	45	37	81	7	7	14	3	2	5
Gleissolo									
Cana	44	48	92	3	6	8	0	0	0
Outros usos	41	41	82	14	0	14	4	0	4
Total	43	45	88	8	3	11	2	0	2

4.4 Agrupamento fenotípico por BOX-PCR e 16S

A técnica de exploração de elementos BOX mostrou-se útil para a diferenciação de bactérias no nível de cepa (BINDE et al., 2009; de BRUIJIN et al., 1992; LAGUERRE et al., 1997; MENNA et al., 2009), sendo aplicada para avaliar a diversidade genética de nódulos de bactérias de crotalária cultivadas em solos sob diferentes coberturas vegetais na zona-da-mata de Pernambuco.

Dos nódulos coletados no experimento de planta-isca foram obtidos 505 isolados de nódulos de crotalária. Em virtude de realizar um agrupamento mais eficaz na triagem dos isolados, foi desenvolvido o dendrograma de agrupamento fenotípico (Apêndices). Posteriormente aplicou-se a técnica de BOX-PCR como um marcador simbiótico para analisar essa diversidade (MEYER et al., 2016; SANTOS et al., 2017; TAMPAKAKI et al., 2017;

COSTA et al., 2017).

Uma vez que os genomas rizobianos são conhecidos por seus altos teores de Guanina/Citosina, utilizou-se um iniciador com nucleotídeos rico em guanina e citosina para maximizar o número de possíveis locais para a amplificação. Todos os isolados foram submetidos à amplificação do BOX-PCR (Figura 12), sendo a primeira triagem realizada como critério de seleção. Dos 505 isolados, 150 foram selecionados para a amplificação do BOX-PCR. Desse total de BOX-PCR, 47 isolados foram agrupados, sendo eles de Latossolo, Gleissolo e Argissolo.

O nível de semelhança do padrão BOX-PCR entre as cepas nos clusters separados variou entre os isolados. Uma vez que os resultados de BOX-PCR revelaram a presença de 47 padrões únicos de DNA entre os isolados estudados. Esses mesmos isolados selecionados a partir do agrupamento foram utilizados para análises posteriores.

Sequências quase completas (1500 bp) do rRNA 16S gene foram obtidas para todas as cepas estudadas, agrupando-se em todos os tipos de solos ocorrentes na zona-da-mata do estado pernambucano. As semelhanças entre os grupos de isolados são expressas de acordo com a classe do solo em que estes estão presentes no solo, indicando uma repetibilidade e precisão para uma construção filogenética destes isolados (HILLIS et al., 1993; SOLTIS et al., 2003) sendo ainda necessário que a identidade das espécies estudadas passem por estudos mais aprofundados (RIVAS et al., 2009; YARZA et al., 2014).

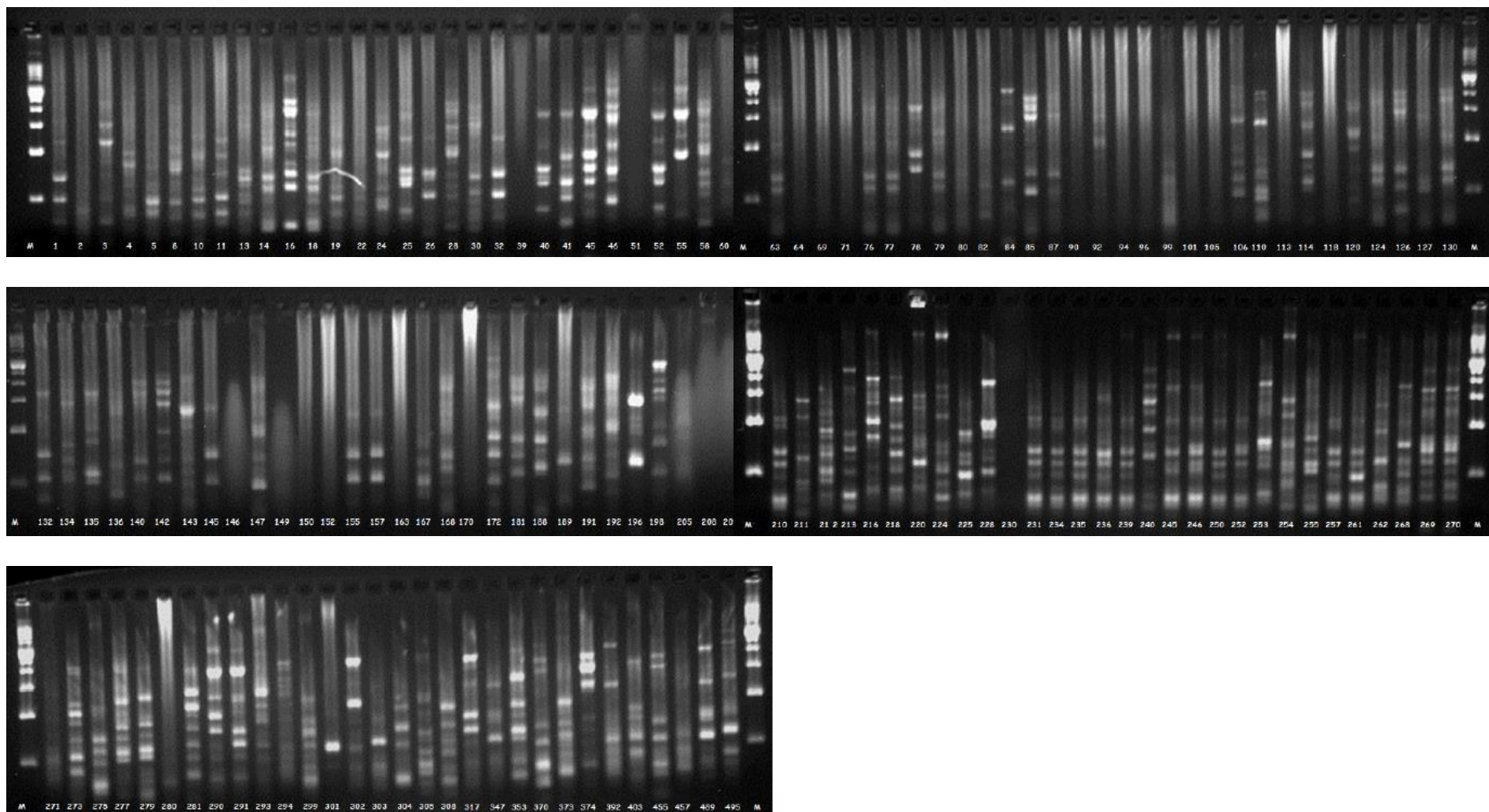


Figura 12. Amplificação dos fragmentos de DNA dos isolados pela técnica BOX-PCR em isolados de nódulos de Crotalária. Fragmento amplificado utilizando o primer BOX para rizóbios. Os números correspondem aos isolados selecionados. O marcador molecular (M) utilizado foi o de 100pb DNA ladder.

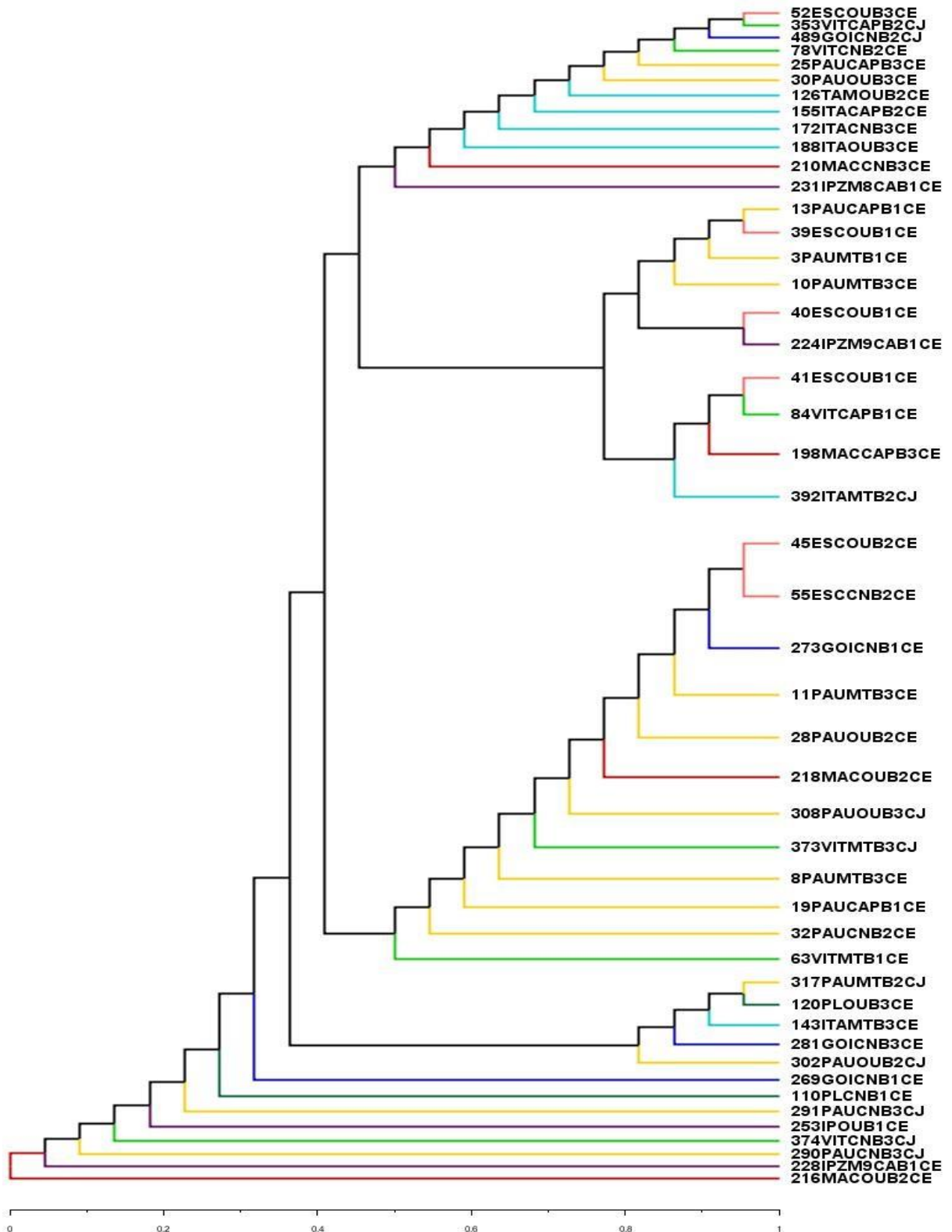


Figura 13. Árvore filogenética (Coeficiente de Correlação Pearson) construída com base em seqüências parciais da técnica BOX-PCR de 150 seqüências de bactérias isoladas da crotalária cultivadas em solos com diferentes coberturas vegetais na zona da Mata de Pernambuco

4.5 Diversidade genética de nódulos de crotalária utilizando ARDRA

Os 47 isolados obtidos no BOX-PCR foram submetidos à Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA), para que fosse avaliado a diversidade genética. A análise conjunta desses perfis genéticos de restrição do 16S rRNA (Figura 14) fora obtida das endonucleases *Alu* I, *Xba* I, *Apa* I, *Xho* I, *Rsa* I, *Hae* III e *Nde* I de corte frequente (Figura 15 e 16). Esta técnica permitiu a formação de grupos de isolados com similaridade, e de acordo com a distribuição das estirpes referência, consistiu na separação dos isolados nas classes de solos (Figura 17).

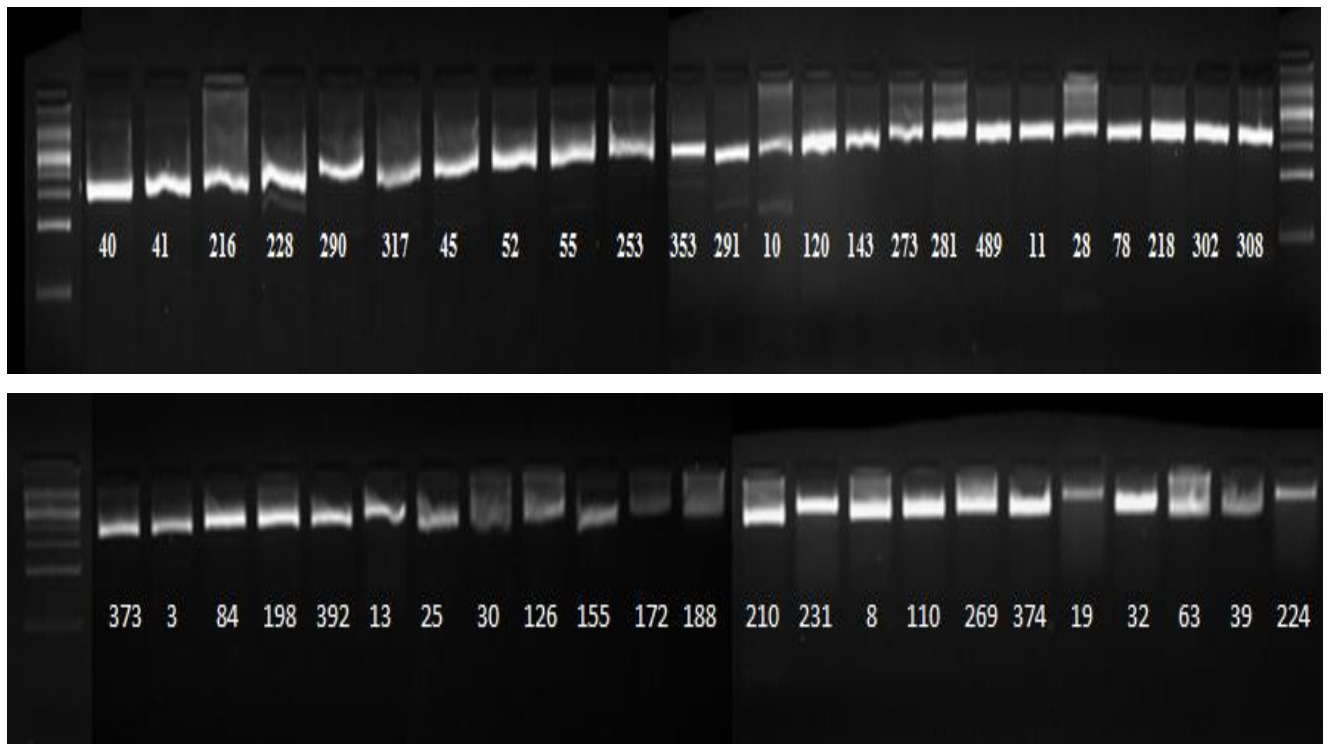


Figura 14. Perfis de restrição do fragmento do gene 16S rRNA de isolados de nódulos de crotalária cultivadas em solos com diferentes coberturas vegetais na zona da Mata de Pernambuco

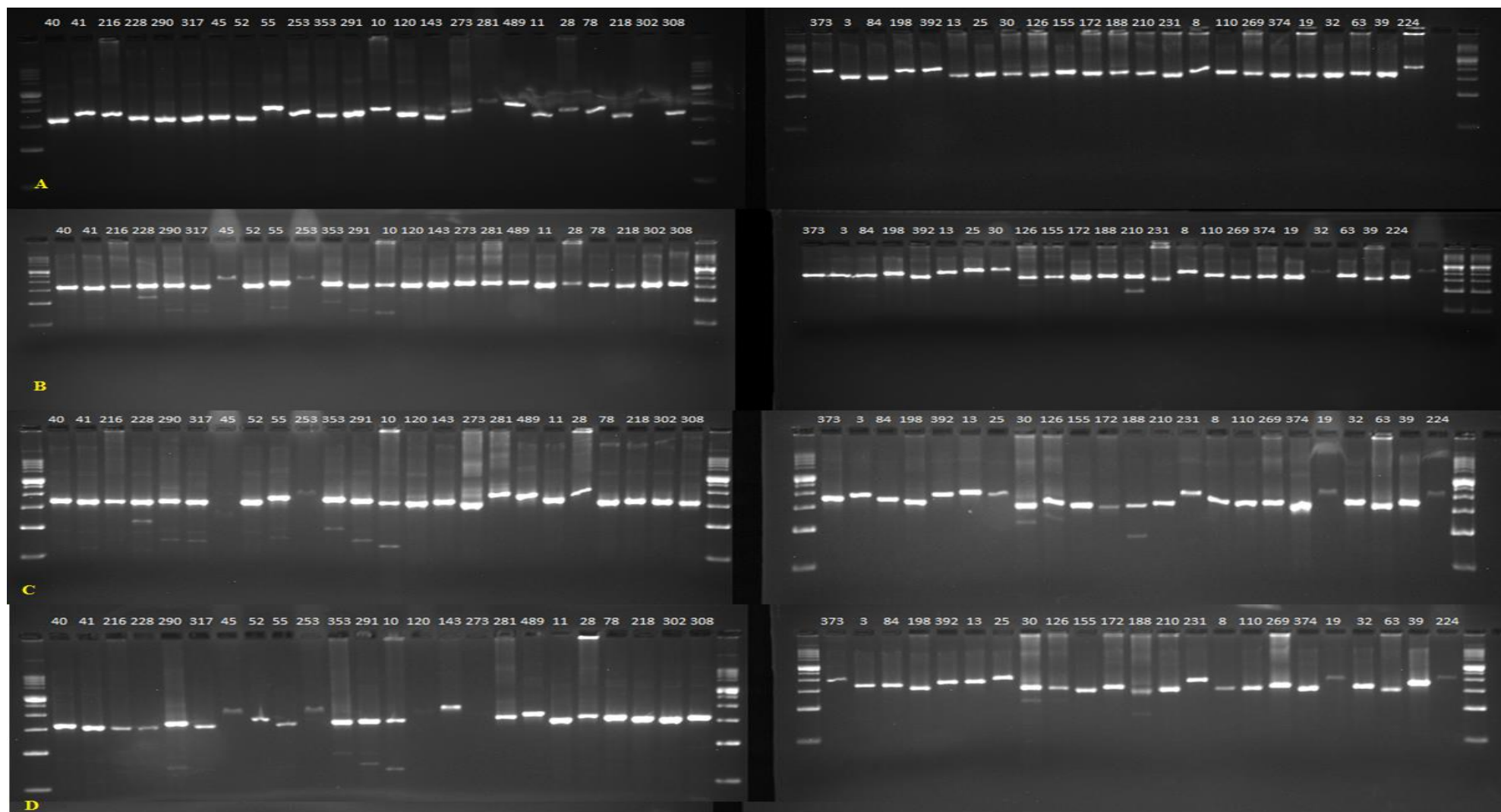


Figura 15. Perfis de restrição do fragmento do gene 16S rRNA de isolados de nódulos de crotalária cultivadas em solos com diferentes coberturas vegetais na zona da Mata de Pernambuco.
Enzimas: Nde I (A), Apa I (B), Xba I (C) e Xho I(D)

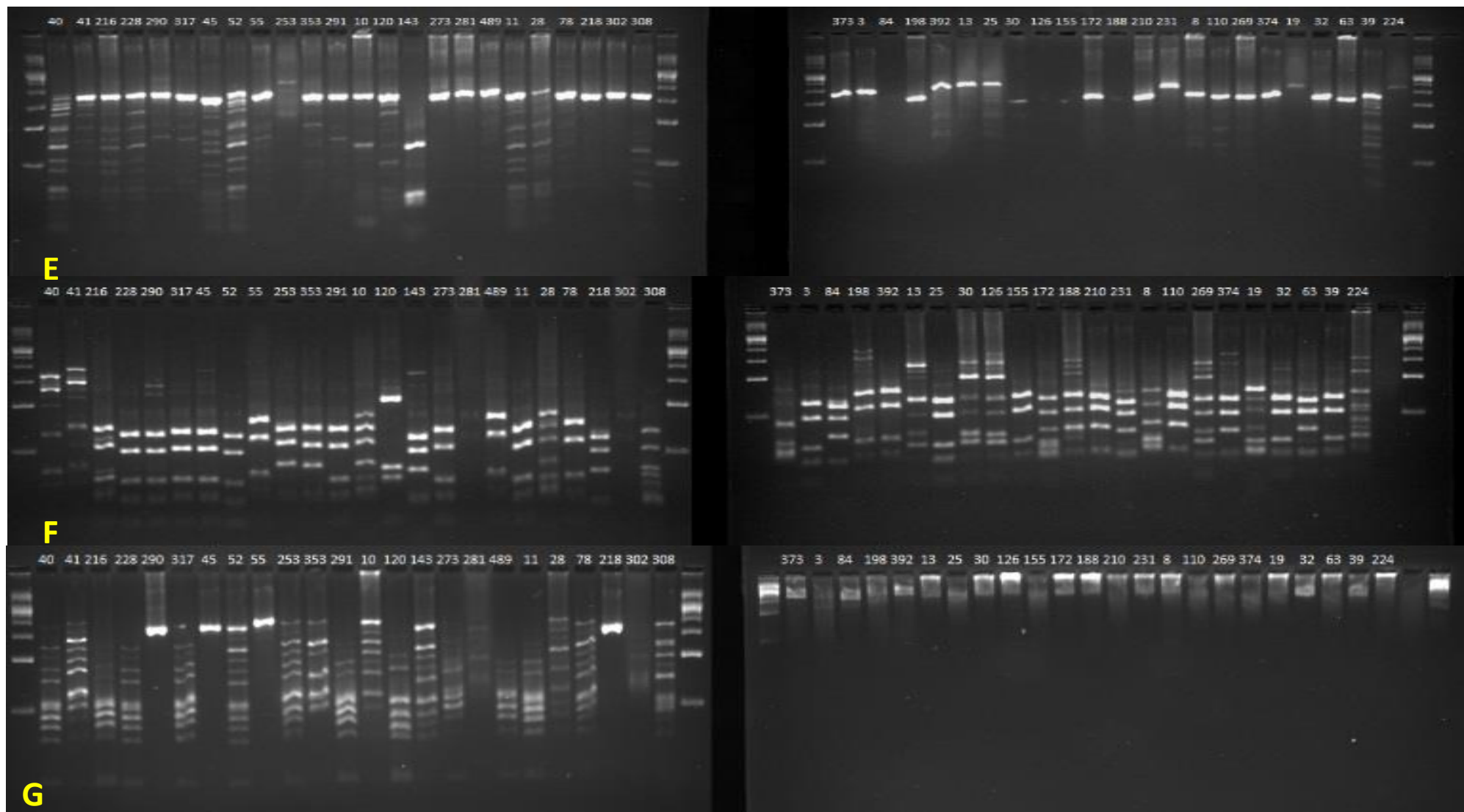


Figura 16. Perfis de restrição do fragmento do gene 16S rRNA de isolados de nódulos de crotalária cultivadas em solos com diferentes coberturas vegetais na zona da Mata de Pernambuco.
Enzimas: *Alu* I (E), *Hae* III (F) e *Rsa* I (G).

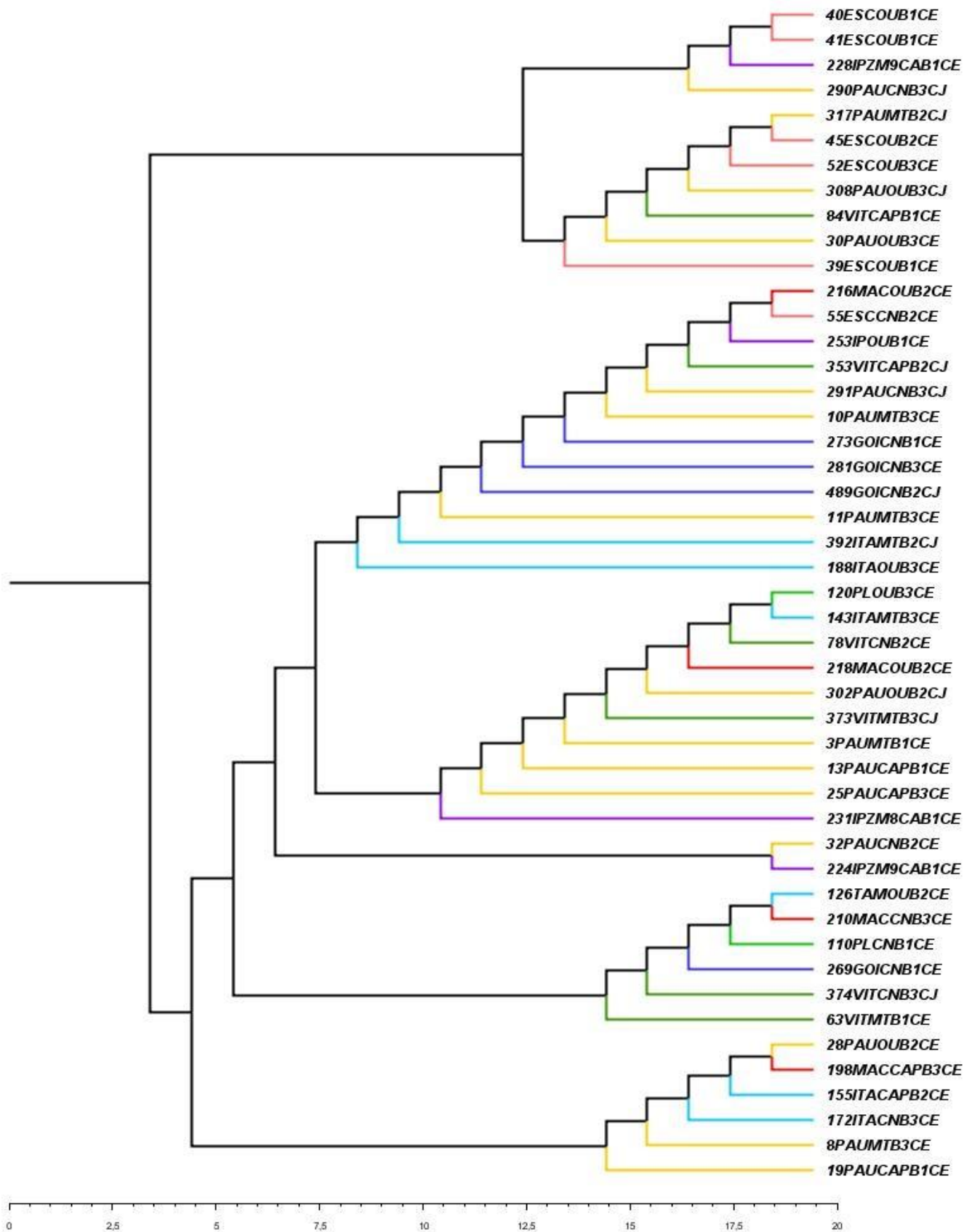


Figura 17. Árvore filogenética (Coeficiente de Correlação Pearson) construída com base em seqüências parciais da técnica ARDRA de 47 seqüências de bactérias isoladas da crotalária cultivadas em solos com diferentes coberturas vegetais na zona da Mata de Pernambuco

Ambos os grupos foram representados por isolados nativos de todas as classes de solo estudadas (Argissolo, Gleissolo e Latossolo).

No entanto, as duas classes de solo com maior representatividade em número de isolados foram Latossolo e Argissolo. Do total de 47 isolados, aproximadamente 80,8% foram obtidos dessas duas classes. Em seguida temos o Gleissolo com apenas 19 % dos isolados representados no agrupamento de isolados de nódulos de crotalaria nativos de solos sob diferentes coberturas vegetais na zona-da-mata de Pernambuco. É visto que nas classes de solos há uma diversidade de microrganismos presentes, porém não tão expressiva quando comparada á outras situações edafoclimáticas, que apresentam grande variabilidade genética em decorrência dos mecanismos de adaptação do ambiente (LEITE et al., 2009).

A técnica de ARDRA, utilizando as sete enzimas acima descritas, foi suficiente para diferenciar geneticamente os isolados agrupados, mas é válido salientar que o sequenciamento desses isolados se faz necessário para que o perfil de identidade dos mesmos possa ser acessados e descrito num maior nível de precisão, e a partir dos resultados obtidos no sequenciamento o caráter filogenético da técnica seja eficaz. Diversos relatos acadêmicos apontam que a técnica de ARDRA consiste na presença ou ausência de sítios de restrição dentro do “amplicon” e o sequenciamento realiza a comparação das basas nas sequencias ditas; com isso, torna-se ainda mais importante que em estudos posteriores sejam realizados o sequenciamento dessas bactérias.

5 CONCLUSÕES

Os solos decorrentes na Zona-da-Mata de Pernambuco possuem uma comunidade microbioana fenotipicamente e genotipicamente diversa;

Espécies de crotalária são potencialmente capazes de serem recomendadas para técnica de adubação verde, uma vez que sua produção de biomassa atingiu níveis satisfatórios;

Populações de isolados de nódulos de crotalária nativos de solo sob difentes coberturas vegetais em solos da Zona-da-mata de Pernambuco diferem-se em função do solo;

Populações de isolados de nódulos de crotalária nativos de solo sob difentes coberturas vegetais em solos da Zona-da-mata de Pernambuco apresentam perfis genéticos medianamente diversos com indivíduos que tem potencialidades ainda não descritas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITA, C.; GIACOMINI, S.J. Decomposição e liberação de nitrogênio de resíduos culturais de plantas de cobertura de solo solteiras e consorciadas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.27, p.601-612, 2003.
- ALLEN, O. N.; ALLEN, E. K. The leguminosae: a source book of characteristics use and nodulation. **Wisconsin Press**. 1981, 812p.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 3389-3402,1997.
- AMADO, T. J. C.; MIELNICZUK, J.; AITA, C. Recomendação de adubação nitrogenada para o milho no RS e SC adaptada ao uso de culturas de cobertura do solo, sob sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v.26, p.241-248, 2012.
- ANCORA – A zona da Mata de Pernambuco (Textos em foco). http://www.ancora.org.br/textos/011_jansen-mafra.html. 17 Ago. 2010.
- ANGUS, A.A.; LEE, A.; LUM, M.R.; SHEHAYEB, M.; HESSABI, R.; FUJISHIGE, N.A.; YERRAPRAGADA, S.; KANO, S.; SONG, N.; YANG, P.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; FARIA, S.M.; DAKORA, F.D.; WEINSTOCK, G.; HIRSCH, A. M. Nodulation and effective nitrogen fixation of *Macropitium atropurpureum* (siratiro) by *Burkholderia tuberum*, a nodulating and plant growth promoting beta-proteo-bacterium, are influenced by environmental factors. **Plant Soil**, Dordrecht, v.369, p.543–562. 2013.
- APAC – Agência Pernambucana de Águas e Clima. Disponível em: <<http://www.apac.pe.gov.br/>>. Acesso em: 03 de novembro de 2017.
- ARAÚJO FILHO, J. C.; BURGOS, N.; LOPES, O. F.; SILVA, F. H. B. B.; MEDEIROS, L. A. R.; MELO FILHO, H. F. R.; PARAHYBA, R. B. V.; CAVALCANTI, A. C.; OLIVEIRA NETO, M. B.; SILVA, F. B. R.; LEITE, A. P.; SANTOS, J. C. P.; SOUSA NETO, N. C.; SILVA, A. B.; LUZ, L. R. Q. P.; LIMA, P. C.; REIS, R. M. G.; BARROS, A. H. C. Levantamento de reconhecimento de baixa e média intensidade dos solos do estado de Pernambuco. **Boletim de Pesquisa Embrapa Solos**, n. 11, 2000.
- ASERSE, A.A., L.A. RÄSÄNEN, F. ASEFFA, A. HAILEMARIAM, AND K. LINDSTRÖM. Phylogenetically diverse groups of *Bradyrhizobium* isolated from nodules of *Crotalaria* spp., *Indigofera* spp., *Erythrina brucei* and *Glycine max* growing in Ethiopia. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 65, p. 595–609, ano 2012.
- BARCELLOS, F. G.; HUNGRIA, M. Técnicas moleculares aplicadas ao estudo de diversidade e à identificação de bactérias e fungos de interesse agrícola. In: Biotecnologia aplicada à agricultura: Textos de apoio e protocolos experimentais. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Recife, PE: Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA), 2010.
- BARRETO, A. C.; FERNANDES, M. F. Recomendações técnicas para o uso da adubação verde em solos de tabuleiros costeiros. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2001, 24p.

BERGSTROM, D. W., TENUTA, M.; BEAUCHAMP, E. G. Nitrous oxide production and flux from soil under sod following application of different nitrogen fertilizers.

Communications in Soil Science and Plant Analysis, Nova York, v. 32, p. 553-570, 2001.

BERRAQUERO, F. R.; BAYA, A. M.; CORMENZANA, A. R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars**

Pharmaceutica, Granada, v. 17, p. 399-406, 1976.

BINDE, D.R., MENNA, P., BANGEL, E.V., BARCELLOS, F.G., HUNGRIA, M. (2009) rep-PCR fingerprinting and taxonomy based on the sequencing of the 16S rRNA gene of 54 elite commercial rhizobial strains. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 83, 897–908.

BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. B. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Developments in Plant and Soil Sciences**, v.65, p.195-209, 1995.

BOURNAUD, C.; DE FARIA, S.M.; DOS SANTOS, J.M.F.; TISSEYRE, P.; SILVA, M.; CHAINTREUIL, C.; GROSS, E.; JAMES, E.K.; PRIN, Y.; MOULIN, L. *Burkholderia* Species Are the Most Common and Preferred Nodulating Symbionts of the *Piptadenia* Group (Tribe Mimoseae). **PLoS One**, San Francisco, v. 8, e63478. 2013.

BOYD, E.S.; PETERS, J.W. New insights into the evolutionary history of biological nitrogen fixation. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne v. 4. doi: 10.3389/fmicb.2013.00201. 2013.

BRASIL, M. A., PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Plano setorial de mitigação e de adaptação às mudanças climáticas para a consolidação de uma economia de baixa emissão de carbono na agricultura : plano ABC (Agricultura de Baixa Emissão de Carbono). MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. Brasília: MAPA: 173 p. 2012.

BRADY, N. C.; WEIL, R. R. Elementos da natureza e propriedades dos solos. 3. ed. Porto Alegre: Bookman, 2013. 716 p.

de BRUIJIN, F.I. (1992) Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacterial. **Appl. Environ. Microbiol.** 58, 2180–2187.

BURLE, M. L., Carvalho, A. M., Amabile, R. F., & Pereira, J. (2006). Caracterização das espécies de adubo verde In: Carvalho, A. M., & Amabile, R. F. (Eds.). Cerrado adubação verde. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 71-142.

CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Anais da XII reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE). Londrina: Embrapa, 2007. 212p. (Embrapa Soja. Documentos, 290).

CARVALHO, W. P.; CARVALHO, G. J.; ABBADE NETO, D. O.; TEIXEIRA, L. G. V. Desempenho agrônômico de plantas de cobertura usadas na proteção do solo no período de pousio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.48, n.2, p.157-166, 2013.

CASTRO, C. M.; ALVES, B. J. R.; ALMEIDA, D. L.; RIBEIRO, R. L. D. Adubação verde como fonte de nitrogênio para a cultura da berinjela em sistema orgânico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.8, p.779-785, 2004.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, N. A. Phenotypic characterization of rhizobia strains isolated from Amazonian soils and symbiotic efficiency in cowpea. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, p. 161-169, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v32i1.90010.4025/actasciagron.v32i1.900>>.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A. DE; CASTRO, H. G. DE; CORNELIO, G. D. L.; SANTOS, G. R. DOS; CHAGAS, L. F. B. COSTA, J. D. L. Isolation and phenotypic characterization of rhizobia that nodulate cowpea in the Cerrado in Tocantins State, Brazil. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 4, n. 3: p. 249-259, 2013.

COELHO, C. H. M.; MEDEIROS, A. F. A.; POLIDORO, J. C.; XAVIER, R. P.; RESENDE, A.; QUESADA, D. M.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R.; URQUIAGA, S. Identificação de genótipos de cana-de-açúcar quanto ao potencial de contribuição da fixação biológica de nitrogênio. **Agronomia**, v. 37, n. 2, p. 37 - 40, 2003.

CORRÊA, A.L.; ABOUD, A.C.S.; GUERRA, J.G.M.; DE AGUIAR, L.A.; RIBEIRO, R.L.D. Green manure by intercropping crotalaria with baby corn before kale under organic management. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61, n. 6, p. 956, 2014.

COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; SILVA, A. F. T.; FERREIRA, L. V. M.; NÓBREGA, J. C. A.; MOREIRA, F. M. S. Resposta de duas cultivares de feijão-caupi à inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio em ambiente protegido. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 9, n. 4, p. 489-494, 2014.

COSTA, E. M.; GUIMARÃES, A. A.; VICENTIN, R. P.; RIBEIRO, P. R. A.; LEÃO, A. C. R.; BALSANELLI, E.; LEBBE, L.; AERTS, M.; WILLEMS, A.; MOREIRA, F. M. S. *Bradyrhizobium brasilense* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium isolated from Brazilian tropical soils. **Archives of Microbiology**, Amsterdam, v. 199, p. 1211–1221, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00203-017-1390-1>>.

CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J.M.; MONTEIRO, A.M.; SANDBERG, G. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture médium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasiliense*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54: p.2833-2837, 1988.

DINIZ, E.R.; VARGAS T.O.; PEREIRA, W.D.; GUEDES, A.F.; SANTOS, R.H.S.; PETERNELLI, L.A. Decomposição e mineralização do nitrogênio proveniente do adubo verde *Crotalaria juncea*. **Científica**, Jaboticabal 42(1): 51-59, 2014.

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 29, n. 36, p. 771-774, 1997.

EMPRESA PERNAMBUCANA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - IPA. **Proposta para um programa de desenvolvimento sustentável da Zona da Mata de Pernambuco** (Versão revista e ampliada). Recife, 2005. 76p.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Brasília, DF: Embrapa Solos, 2009. 627p.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Manual de métodos de análise de solo. 3. ed. Brasília: DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2017. 574p.

ELLIOTT, G.N.; CHEN, W.M.; CHOU J.H.; WANG. H.C.; SHEU. S.Y.; PERIN, L.; REIS, V.M.; MOULIN. L.; SIMON, M.F.; BONTEMPS, C. *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa spp.* and fixes nitrogen ex planta. **New Phytologist**, Nova Jersey, v. 173, p. 168–180. 2007.

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

FERNANDES JUNIOR, P.I.; LIMA, A.A.; PASSOS, S.R.; GAVA, C.A.T.; OLIVEIRA, J.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R. Phenotypic diversity and amylolytic activity of fast growing rhizobia from pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) MILLSP.). **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 1604-1612, 2012.

FERGUSON, B. J.; INDRASUMUNAR, A.; HAYASHI, S.; LIN, Y.-H.; LIN, M.-H.; REID, D.; GRESSHOFF, P.M. Molecular Analysis of Legume Nodule Development and Autoregulation. **Journal of Integrative Plant Biology**, Nova Jersey 52 (1): 61–76, 2010.

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**, Lagos, v. 8, p. 788-796. 2014.

GIONGO, V.; MENDES, A. M. S.; CUNHA, T. J. F.; GALVÃO, S. R. S. Decomposição e liberação de nutrientes de coquetéis vegetais para utilização no Semiárido brasileiro. **Revista Ciência Agronômica**, v.42, n.3, p.611-618, 2011.

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Legumes: importance and constraints to greater utilization. **Plant and Soil**, v.131, n.3, p.872-877, 2003.

GUARESCHI, R. F.; PEREIRA, M. G.; PERIN, A. Deposição de resíduos vegetais, matéria orgânica leve, estoque de carbono e nitrogênio e fósforo remanescente sob diferentes sistemas de manejo no cerrado goiano. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 36, p. 909-920, 2012.

GUIMARÃES, A.A.; FLORENTINO, L.A.; ALVES ALMEIDA, K.; LEBBE, L.; BARROSO SILVA, K.; WILLEMS, A.; DE SOUZA MOREIRA, F.M. High diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from several legume species and land uses in Brazilian tropical ecosystems. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 38, n. 6, p. 433–441. 2015.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics softwarepackage for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, Amherst, v. 4, n. 1, p9, 2001.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazônica**, Amazônia, v. 34, p. 343-357, 2004.

HARDARSON, G.; ATKINS, C. Optimising biological N₂ fixation by legumes in farming systems. **Plant and Soil**, v.252, p.41-54, 2003.

HAYAT, S. R.; ALI, U.; AMARA, R.; KHALID, I. Ahmed Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals of Microbiology**, New York, v. 60, p. 579–598. 2010.

HILLIS, D.M., BULL, J.J. (1993) An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. **Syst. Biol.** 42, 182–192.

HOWARD, J.B.; KECHRIS, K.J.; REES, D.C.; GLAZER, A.N. Multiple Amino Acid Sequence Alignment Nitrogenase Component. Insights into Phylogenetics and Structure-Function Relationships, Nova Jersey, v. 8, n.9. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0072751>. 2013.

HUANG, CHENG-TAI., LIU, CHI-TE., CHEN, SHIANG-JIUUN., KAO, WEN-YUAN. Phylogenetic Identification, Phenotypic Variations, and Symbiotic Characteristics of the Peculiar Rhizobium, Strain CzR2, Isolated from *Crotalaria zanzibarica* in Taiwan. **Microbes and Environments**, Ibaraki, v. 31, N. 4, p.410-417, 2016.

INDRASUMUNAR, A.; DART, P.J.; MENZIES, N.W. Symbiotic effectiveness of *Bradyrhizobium japonicum* in acid soils can be predicted from their sensitivity to acid soil stress factors in acidic agar media. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v. 43, p.2046-52. 2011.

KAE, M., MASAE, T., TOSHIFUMI, M. AND TOHRU, M. Dual and Triple Intercropping: Potential Benefits for Annual Green Manure Production. Plant Production. **Science**. Oxford, 17(2): 194-201, 2014.

Kappes, C., & Zancanaro, L. (2015). Sistemas de consórcios de braquiária e de crotalárias com a cultura do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, 14(2), 219-234.

KOKALIS-BURELLE, N.; McSORLEY, R.; HUI WANG, K.; SAHA, S. K.; McGOVERN, R. J. Rhizosphere microorganisms affected by soil solarization and cover cropping in *Capsicum annuum* and *Phaseolus lunatus* agroecosystems. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, n.119, p.64–71, 2017.

Kunz, J. H., Bergonci, J. I., Bergamaschi, H., Dalmago, G. A., Heckler, B. M. M., & Comiran, F. (2007). Uso da radiação solar pelo milho sob diferentes preparos do solo, espaçamento e disponibilidade hídrica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 42(11), 1511-1520.

LAGUERRE, G.; ALLARD, M-R.; REVOY, F.; AMARGER, N. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR amplified 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 56–63. 1994.

LAGUERRE, G., VAN BERKUM, P., AMARGER, N., PREVOST, D. (1997) Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. **Appl. Environ. Microbiol.** 63, 4748–4758.

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**, New York, v.147, n.4, p.981-993, 2001.

LEITE, J., SEIDO, S. L., PASSOS, S. R., XAVIER, G. R., RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V. Biodiversity of rhizobia associated with cowpea cultivars in soils of the lower half of the São Francisco River Valley. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, p. 1215-1226, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832009000500015>>.

LIMA, A. A., FERNANDES JUNIOR, P. I., PASSOS, S. R., PAULO, F. S., NOSOLINE, S. M., FARIA, S. M., GUERRA, J. G. M., RUMJANEK, N. G., XAVIER, G. R. Diversidade e capacidade simbiótica de rizóbios isolados de nódulos de *Mucuna Cinza* e *Mucuna-Anã*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, n.36, p.337- 348, 2012.

LIMA, J. E. S.; NASCENTE, A. S; LEANDRO, W. M.; SILVEIRA, P. M. *Urochloa ruziziensis* responses to sources and doses of urea. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 20, n. 5, p. 401-407, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v20n5p401-407>>.

LINDSTRÖM, K.; MURWIRA, M.; WILLEMS, A.; ALTIER, N. The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 161, p. 453-463, 2010.

LOMBARDI, M. L. C. O.; MOREIRA, M.; AMBRÓSIO, L. A.; CARDOSO, E. J. B. N. Occurrence and host specificity of indigenous rhizobia from soils of São Paulo State, Brazil. **Scientia Agricola**, São Paulo, n.66, p. 543, 2009.

LORENSINI, F.; CERETTA, C. A.; BRUNETTO, G.; CERINI, J. B.; LOURENZI, C. R.; DE CONTI, A.; TIECHER, T. L.; SCHAPANSKI, D. E. Disponibilidade de nitrogênio de fontes minerais e orgânicas aplicadas em um Argissolo cultivado com videira. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61 n. 2, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0034-737X2014000200012>>.

LOSS, A.; PEREIRA, M. G.; PERIN, A.; ANJOS, L. H. C. Abundância natural de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ em sistemas de manejo conservacionista no cerrado. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, p. 604-615, 2014.

MANGARAVITE, J. C. S.; PASSOS, R. R.; ANDRADE, F. V.; BURAK D. L.; MENDONÇA, E. S. Phytomass production and nutrient accumulation by green manure species. **Revista Ceres**. Viçosa, n.61, p.732, 2014.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo (MAPA). Boletim técnico: biotecnologia agropecuária. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/home/>>. Acesso em: 23 de novembro de 2010.

MARCON, E. C.; ROMIO, S. C.; MACCARI, V. M.; KLEIN, C.; LÁJUS, C. R. Uso de diferentes fontes de nitrogênio na cultura da soja. **Revista Thema**, Pelotas, v. 14, n. 2, p. 298-308, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.15536/thema.14.2017.298-308.427>>.

MARTINS, P. G. S.; LIRA JÚNIOR, M. A.; BASTOS, M. L. R.; VICENTIN, R. P.; LYRA, M. C. C. P.; FRACETTO, G. G. M. *Mimosa caesalpinifolia* rhizobial isolates from different origins of the Brazilian Northeast. **Archives of Microbiology**, New York, v. 197, p. 459-469, 2015.

MASCARENHAS, H. A. A.; WUTK, E. B. Adubação, nutrição e fatores climáticos limitantes ao desenvolvimento dos adubos verdes. In: Lima Filho, O. F.; Ambrosano, E. J.; Rossi, F.; Carlos, J. A. D. (Ed.). **Adubação verde e plantas de cobertura no Brasil: fundamentos e prática**. Brasília, DF: Embrapa, v.1, 2014, 507p.

MASSAD, M. D.; OLIVEIRA, F. L.; FÁVERO, C.; DUTRA, T. R.; QUARESMA, M. A. L. Desempenho de milho verde em sucessão a adubação verde com crotalária, submetido a doses crescentes de esterco bovino, na caatinga mineira. **Magistra**, Cruz das Almas, v.26, p.326-336, 2014.

MASSAD, M. D., OLIVEIRA, F. L. DE, FÁVERO, C., DUTRA, T. R. & QUARESMA, M. A. (2017). Desempenho de milho verde em sucessão a adubação verde com crotalária, submetido a doses crescentes de esterco bovino, na caatinga mineira. **Magistra**, 26(3), 322-332.

MATOS, E. S.; MENDONÇA, E. S.; CARDOSO, I. M.; LIMA, P. C. ; FREESE, D. Decomposition and nutrient release of leguminous plants in coffee agroforestry systems. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.35, p.141-149, 2011.

MENNA, P., PEREIRA, A.A., BANGEL, E.V., HUNGRIA, M. (2009) Rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. **Symbiosis** 48, 120–130.

MEYER III, W.M.; OSTERTAG, R. ; COWIE, R.H. Macro-invertebrates accelerate litter decomposition and nutrient release in a Hawaiian rainforest. **Soil Biology & Biochemistry**, Philadelphia, v.43, p.206-211, 2011.

MEYER, S. E.; BRISCOE, L.; MARTÍNEZ-HIDALGO, P.; AGAPAKIS, C. M.; DE LOS SANTOS, P. E. DE; SESHADRI, R.; REEVE, W.; WEINSTOCK, G.; O'HARA, G.; HOWIESON, J. G.; HIRSCH, A. M. Symbiotic *Burkholderia* species show diverse arrangements of *nif/fix* and *nod* genes and lack typical high affinity cytochrome *cbb3* oxidase genes. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Burlington, v. 29, n. 6, p. 609–619, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1094/MPMI-05-16-0091-R>>.

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

MOREIRA, F.M.S. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosas. In: MOREIRA, F. M.S.; SIQUEIRA, J.O., BRUSSAARD, L. (eds) Biodiversidade do Solo em Ecossistemas Brasileiros, edn. Ufla, Lavras, p 621–680. 2008.

MOTHAPO, N.; GROSSMAN, J.M.; MAUL, J. Genetic diversity of resident soil rhizobia isolated from nodules of distinct hairy vetch genotypes, **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 64, p. 201-213, 2013.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. **Nature**, v.411, p. 948-950, 2001.

NASCENTE, A. S.; MONDO, V. H. V.; GONZAGA, A. C. O.; CARVALHO, M. C. S.; LACERDA, M. C. Doses e épocas de aplicação foliar de N afetando a produtividade de grãos do feijoeiro comum. **Revista Agrarian**, Dourados, v. 10, n. 37, p. 199-208, 2017.

NÓBREGA, R.S.; FARIAS, R. F.L.; DOS SANTOS, C.A. Variabilidade temporal e espacial da precipitação pluviométrica em Pernambuco através de índices de extremos climáticos. **Revista Brasileira de Meteorologia**, São José dos Campos, v.30, n.2, p. 171 - 180, 2015.

NORRIS, D. O.; DATE, R. A. Legume Bacteriology. In: SHAM, N.H.; BRYAN, W.W. (ed). Tropical Pasture Research – Principles and Methods. Hurley: **COMMONWEALTH BUREAU OF PASTURES AND FIELD CROPS**. p. 134-174, 1976.

NOVAIS RF de; SMYTH TJ. 1999. Fósforo em solo e planta em condições tropicais. Viçosa: UFV-DPS. 399p.

OJEM, J. O.; FRANKE A. C.; VANLAUWE B.; RIDDER N.; GILLER K. E. Benefits of legume-maize rotations: Assessing the impact of diversity on the productivity of smallholders in Western Kenya. **Field Crop Research**. Amsterdam, n.168, p.75-85, 2014.

OLIVEIRA, F. L.; FAVERO, C.; TEODORO, R. B.; GOSCH, M. S.; PADOVAN, M. P. Acúmulo de nutrientes e decomposição de resíduos de leguminosas em solos de cerrado do Estado do Tocantins, Brasil In: FertBio'2008, 2008, Londrina/PR. Anais... Londrina: Embrapa Soja:SBCS:IAPAR:UEL, 2008. CD-Rom.

PAULINO G. M; ALVES B. J. R; BARROSO D. G; URQUIAGA S.; ESPINDOLA J. A. A. Fixação biológica e transferência de nitrogênio por leguminosas em pomar orgânico de mangueira e gravioleira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.12, p.1598-1607, 2009.

PAYNE, G. W.; VANDAMME, P.; MORGAN, S. H.; LIPUMA, J. J.; COENYE, T.; WEIGHTMAN, A. J.; JONES, T. H.; MAHENTHIRALINGAM, E. Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 3917-3927, 2005.

PEREIRA L C; FONTANETTI A; BATISTA JN; GALVÃO JCC; GOULART PL. 2011. Comportamento de cultivares de milho consorciados com *Crotalaria juncea*: estudo preliminar. **Revista Brasileira de Agroecologia** 6:191-200.

PEREIRA, R. C. A.; SILVA, J. A.; BARBOSA, J. I. S. Aspectos florísticos de uma área da mata atlântica situada na microrregião da mata meridional do estado de pernambuco, brasil. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, vol. 10, p.280-307, 2013.

PEREIRA, N. S., SOARES, I.; MIRANDA, F. R. Decomposition and nutrient release of leguminous green manure species in the Jaguaribe-Apodí region, Ceará, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, n.46, p.970-975, 2016.

PERIN, A.; SANTOS, R. H. S.; CABALLERO, S. S. U.; GUERRA, J. G. M.; GUSMÃO, L. A. Acúmulo e liberação de P, K, Ca e Mg em crotalária e milho solteiros e consorciados. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 57, p. 274-281, 2010.

PERNAMBUCO. Governo do Estado. **Geografia de Pernambuco**. Disponível em: <<http://www.pe.gov.br/conheca/geografia/>>. Acesso em: 01 de novembro de 2020.

REIS JÚNIOR, F. B., TEIXEIRA, K. D. S., REIS, V. M. 2004. Análises de restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) em estudos de diversidade intra-específica de *Azospirillum amazonense* isolado de diferentes espécies de brachiaria. **Embrapa Cerrados**. Documentos. pp 41.

REJILI, M.; MAHDHI, M.; FTERICH, A.; DHAOUI, S.; GUEFRACHI, I.; ABDEDDAYEM, R.; MARS, M. Symbiotic nitrogen fixation of wild legumes in Tunisia: soil fertility dynamics, field nodulation and nodules effectiveness. **Agriculture Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 157, p. 60–69. 2012.

REZENDE, C. P.; CANTARUTTI, R. B.; BRAGA, J. M.; GOMIDE, J. A.; PEREIRA, J. M.; FERREIRA, E.; TARRÉ, R.; MACEDO, R.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S.; CADISCH, G.; GILLER, K. E.; BODDEY, R. M. Litter deposition and disappearance in Brachiaria pastures in the Atlantic forest region of the South of Bahia, Brazil. **Nutrient Cycling in Agroecosystem**, New York, v.54, p.99-112, 1999.

RICCI, M. S. F.; ALVES, B. J. R.; MIRANDA, S. C.; OLIVEIRA, F. F. Growth rate and nutritional status of an organic coffee cropping system. **Scientia Agricola**, v.62, n.2, p.138-144, 2005.

RIUTTA, T.; SLADE, E. M.; BEBBER, D. P.; TAYLOR, M. E.; MALHI, Y.; RIORDAN, P.; MACDONALD, D. W.; MORECROFT, M. D. Experimental evidence for the interacting effects of forest edge, moisture and soil macrofauna on leaf litter decomposition. **Soil Biology & Biochemistry**, Philidelphia, v.49, p.124-131, 2012.

RIVAS, R.; MARTENS, M.; DE LAJUDIE, P.; WILLEMS, A. Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. **Systematic Applied Microbiology**, Jena, v. 32, p. 101–110. 2009.

ROSSI, F.; Carlos, J. A. D. (Ed.). **Adubação verde e plantas de cobertura no Brasil: fundamentos e prática**. Brasília, DF: Embrapa, v.1, 2014, 507p.

RUBIO-CANALEJAS A.; CELADOR-LERA L.; CRUZ-GONZÁLEZ, X. *Rhizobium* as potential biofertilizer of *Eruca sativa*, In: Biological Nitrogen Fixation and Beneficial Plant-Microbe Interaction, **Springer**, Switzerland, p. 213–220, 2016.

RUIZ, H. A. Incremento da exatidão da análise granulométrica do solo por meio da coleta dasuspensão (silte + argila). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 29, p. 297-300,2005.

SACRAMENTO, A. C.; ZICKEL, C. S.; ALMEIDA JR., E. B. Aspectos florísticos da vegetação de restinga no litoral de Pernambuco. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, p. 1121-1130, 2007.

SAMPAIO, P. R. F.; MIRANDA, N. O.; MEDEIROS, J. F.; LIMA, R. M. S.; SANTOS, W. O. Necessidade hídrica da *Crotalaria juncea* L. em resposta à salinidade residual do solo. **Irriga**, Botucatu, v. 21, n. 2, p. 211-225, 2016.

SANTI, C.; BOGUS, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, v.111, p.1-25, 2013.

SANTOS, J. W. M.; SILVA, J. F.; FERREIRA, T. D. S.; DIAS, M. A. M.; FRAIZ, A. C. R.; ESCOBAR, I. E. C.; SANTOS, R. C.; LIMA, L. M.; MORGANTE, C. V.; FERNANDESJÚNIOR, P. I. Molecular and symbiotic characterization of peanut bradyrhizobia from the semi-arid region of Brazil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 121, p. 177–184, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.09.033>>.

SHEARER, G.; KOHL, D.H. N₂ fixation in field settings: estimations based on natural ¹⁵N abundance. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v.13, p.699-756, 1986.

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.

SHRESTA, R. K.; MASKEY, S. L. Associative nitrogen fixation in lowland rice. **Nepal Agriculture Research Journal**, v.6, p.112-121, 2005.

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.

SILVA, P. C. G.; FOLONI, J. S. S.; FABRIS, L. B.; TIRITAN, C. S. Fitomassa e relação C/N em consórcios de sorgo e milho com espécies de cobertura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 44, p. 1504-1512, 2009.

SILVA, K.; FLORENTINO, L.A.; DA SILVA, K.B.; DE BRANDT, E.; VANDAMME, P.; DE SOUZA MOREIRA, F.M. *Cupriavidus necator* isolates are able to fix nitrogen in symbiosis with different legume species. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 35, n. 3, p. 175–82. 2012.

SILVA, J. M. Revisão histórica da diversidade vegetal da Zona da Mata Norte de Pernambuco com ênfase no município de goiana. **Revista Espaço Acadêmico**, n.191, Abril/2017.

SIMÕES NETO, D.E.; OLIVEIRA, A.C.; ROCHA, A.T.; FREIRE, F.J.; FREIRE, M.B.G.S.; NASCIMENTO, C.W.A. Características agroindustriais da cana-de açúcar em função da adubação fosfatada, em solos de Pernambuco. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.16, p.347–354, 2012.

SODRÉ FILHO J.; CARDOSO N. A.; CARMONA R.; CARVALHO A.M. Phytomass and soil cover of sequential crops after maize in Cerrado region. **Brazilian Journal of Agricultural Research**, Recife, v.39, p.327–334, 2004.

SOLTIS, P.S., SOLTIS, D.E. (2003) Applying the bootstrap in phylogeny reconstruction. **Stat. Sci.** 18, 256–267.

SOMASEGARAN, P.; & HOBEN, J. H. Handbook for Rhizobia: Methods in legume Rhizobium technology. **Springer-Verlag**, New York, 1994. 450p.

SOUZA, J. A.; BUZETTI, S.; TARSITANO, M. A. A.; VALDERRAMA, M. Corn costs and profitability as a function of source, rate and application time of nitrogen. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, p. 321-329, 2012a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0034-737X2012000300005>>.

SOUZA, L. Q.; FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; MOURA, P. M.; MENEZES, R. S. C. How much nitrogen is fixed by biological symbiosis in tropical dry forests? 1. Trees and shrubs. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Ithaca, v. 94, p. 171-179, 2012b. Disponível em: <[doi:10.1007/s10705-012-9531-z](https://doi.org/10.1007/s10705-012-9531-z)>.

SOUZA, R.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**, Alto da Boa Vista, v. 38, n. 4, p. 401–419. 2015.

SOUZA M; COMIN JJ; LEGUIZAMÓN ES; KURTZ C; BRUNETTO G; JUNIOR VM; VENTURA B; CAMARGO AP. 2013. Matéria seca de plantas de cobertura, produção de cebola e atributos químicos do solo em sistema plantio direto agroecológico. **Ciência Rural** 43:21-27.

STEENWERTH, K., BELINA, K. M. Cover crops enhance soil organic matter, carbon dynamics and microbiological function in a vineyard agroecosystem. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, 40:359-369, 2008.

STEPKOWSKI, T.; MOULIN, L.; KRZYZANSKA, A.; MCINNES, A.; LAW, I. J.; HOWIESON, J. European origin of *Bradyrhizobium* populations infecting lupins and serradella in soils of Western Australia and South Africa. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 7041-7052, 2005.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASKAWA, N.; LATORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfato na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, Amazônia, v. 12, p. 12-22, 1982.

TAIZ, L.; ZEIGER E. Fisiologia Vegetal. 4a ed. Porto Alegre, Artmed. 848p, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 954p, 2013.

TAMPAKAKI, A. P.; FOTIADIS, C. T.; NTATSI, G.; SAVVAS, D. Phylogenetic multilocus sequence analysis of indigenous slow-growing rhizobia nodulating cowpea (*Vigna unguiculata* L.) in Greece. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 40, p. 179-189, 2017a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2017.01.001>>.

TAMPAKAKI, A.; FOTIADIS, C. T.; NTATSI, G.; SAVVAS, D. A novel symbiovar (aegeanense) of the genus *Ensifer* nodulates *Vigna unguiculata*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 97, p. 4314–4325, 2017b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jsfa.8281>>.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution** n.30, p.2725-2729, 2013.

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, p. 201-208, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822010000100029>>.

TEODORO, R. B.; OLIVEIRA, F. L.; SILVA, D. M. N.; FAVERO, C.; QUARESMA, M. A. L. Aspectos Agronômicos de Leguminosas para Adubação Verde no Cerrado do Alto Vale do Jequitinhonha. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.35, p.635 - 643, 2011.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W – improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TORRES-JÚNIOR, C.V.; LEITE, J.; SANTOS, C.E.R.S.; FERNANDES JÚNIOR, P.I.; ZILLI, J.E.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R. Diversity and symbiotic performance of peanut rhizobia from Southeast region of Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, Lagos, v. 8, p. 566-577. 2014.

UNKOVICH, M., HERRIDGE, D., PEOPLES, M., CADISCH, G., BODDEY, R., GILLER, K., ALVES, B., CHALK, P., 2008. Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems. **ACIAR**, Canberra, n.136, p.15-18, 2008.

VASCONCELOS, D. V.; AZEVEDO, B. M.; FERNANDES, C. N. V.; PINTO, O. R. O.; VIANA, T. V. A.; MESQUITA, J. B. R. Métodos de aplicação e doses de nitrogênio para a cultura do girassol. **IRRIGA**, Botucatu, v. 20, n. 4, p. 667-679, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.15809/irriga.2015v20n4p667>>.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v.5, p.25-40, 1994.

VINCENT, J. M. A. Manual for the practical study of root-nodule bacteria. Oxford: **Blackwell Science Publication**, 1970. 164p.

WEISBURG W. G., BARNS S. M., PELLETIER D. A., LANE D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Washington, n.173, p. 697–703. 10.1128/jb.173.2.697-703.1991.

WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: an overview. **Plant and Soil**, v.287, p.3-14, 2006.

WOESE, C. Prokaryote Systematics: Chapter 1. The Evolution of a Science. In: The prokaryotes. In: BALOWS, A. et al. (Ed.). The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria, ecophysiology, isolation, identification, applications. 2.ed. **Springer**, New York, v.1, p.3-18. 1991.

WUTKE, E. B.; AMBROSANO, E. J.; RAZERA, L. F.; MEDINA, P. F.; CARVALHO, L. H.; KIKUTI, H. (Coord.). **Bancos comunitários de sementes de adubos verdes: informações técnicas**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2007, 52p.

WUTKE, E. B.; TRANI, P. E.; AMBROSANO, E. J.; DRUGOWICH, M. I. **Adubação verde no Estado de São Paulo**. Campinas: CATI, 2009, 89p.

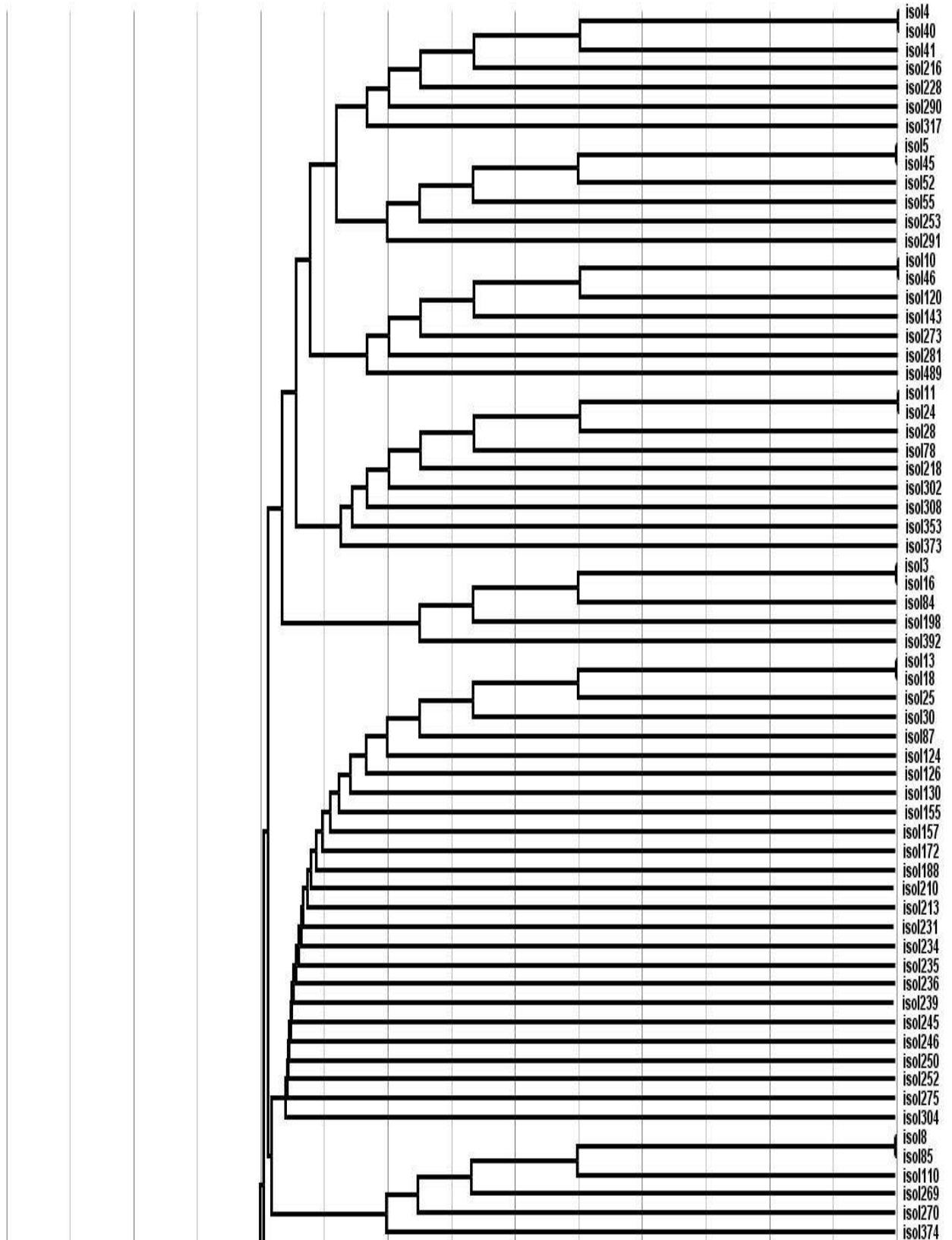
YADAV, J.; VERMA, J.P.; JAISWAL, D.K.; KUMAR, A. Evaluation of PGPR and different concentration of phosphorus level on plant growth, yield and nutrient content of rice (*Oryza sativa*). **Ecological Engineering**, Amsterdam, v. 62, p. 123–128. 2014.

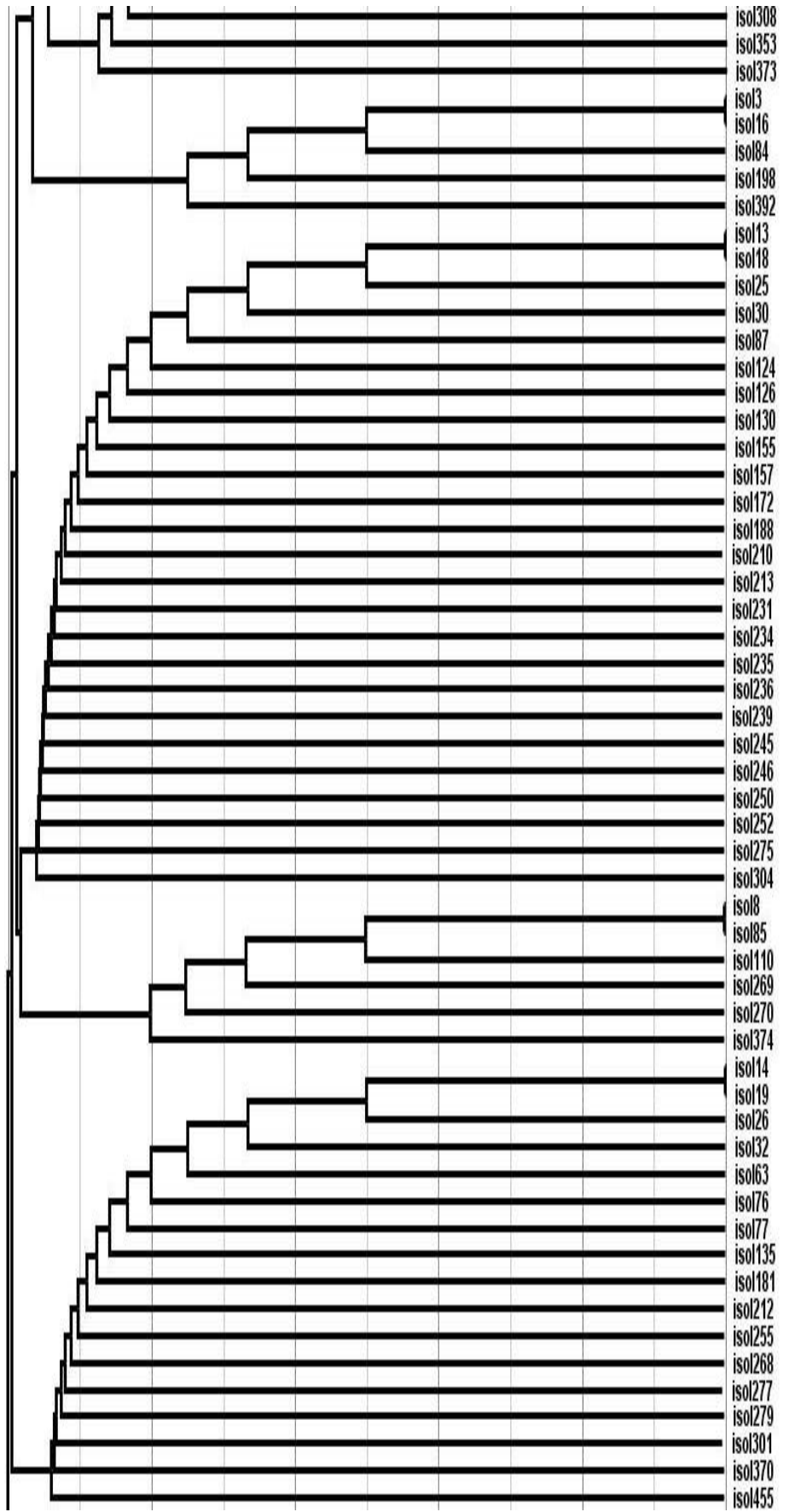
Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F.O., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Whitman, W.B., Euzéby, J., Amann, R., Rosselló-Móra, R. (2014) Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. **Nat. Rev. Microbiol.** 12, 635–645.

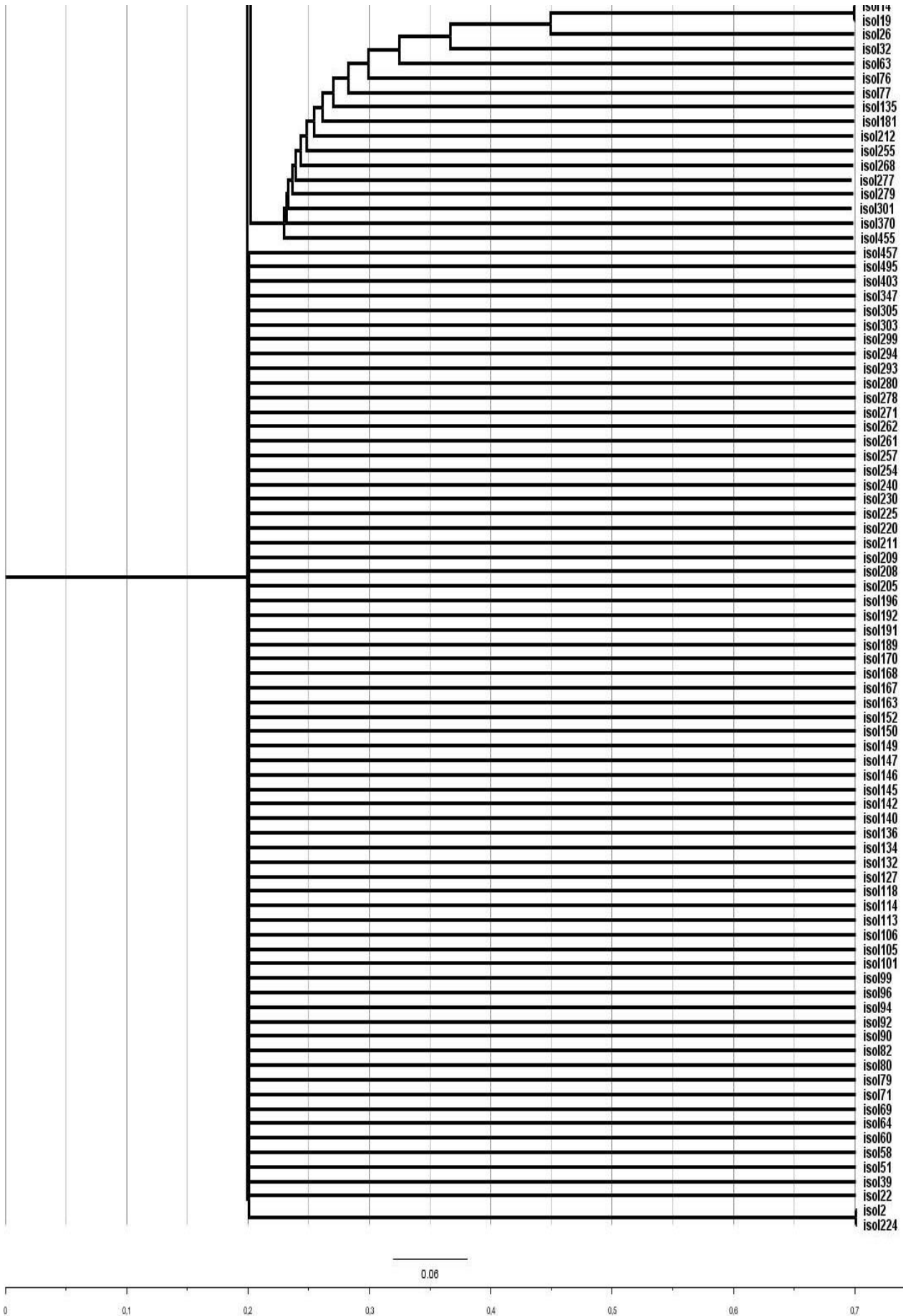
YOON, S. H.; HA S. M.; KWON S.; LIM J.; KIM Y.; SEO H.; CHUN J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, London, doi:10.1099/ijsem.0.001755, 2017.

ZOTARELLI L.; ZATORRE N. P.; BODDEY R. M.; URQUIAGA S.; JANTALIA C. P.; FRANCHINI J. C.; ALVES B. J. R. Influence of no-tillage and frequency of a green manure legume in crop rotations for balancing N outputs and preserving soil organic C stocks. **Field Crops Research**, Amsterdam, 132:185-195, 2012.

7 APÊNDICES - Dendrograma de similaridade genética de rizóbios de crotalária gerado a partir das características fenotípicas por uma matriz binária. Dendrograma construído utilizando o método UPGMA e o coeficiente de Jaccard.







**SIMBIOSE ENTRE *Crotalaria* spp. E BACTÉRIAS DE NÓDULOS
NATURALMENTE ESTABELECIDAS EM SOLOS DA ZONA DA
MATA DE PERNAMBUCO**

Recife, fevereiro de 2021.

Jéssica Rafaella de Sousa Oliveira

Orientada

Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas

Orientadora