N° 35

PPGCTA

UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

MARCOS RICARDO BARBOSA DA SILVA

EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE RIZÓBIOS PARA *ERYTHRINA VELUTINA* WILLD E *MIMOSA TENUIFLORA* POIR

Petrolina – PE

2021

MARCOS RICARDO BARBOSA DA SILVA

Eficiência simbiótica de rizóbios para *Erythrina velutina* Willd e *Mimosa tenuiflora* Poir

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, da Universidade de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientadora: Profa. Dra. Diana Signor Deon
Coorientador: Prof. Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior

Petrolina - PE

2021

Silva, Marcos Ricardo Barbosa da.

S586e Eficiência simbiótica de rizóbios para erythrina velutina willd e mimosa tenuiflora Poir. / Marcos Ricardo Barbosa da Silva. - Petrolina: do autor, 2021.

86f. ; il.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dra. Diana Signor Deor.

Coorientador: Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior.

Dissertação de Mestrado do Programa Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia Ambiental da Universidade de Pernambuco - Campus Petrolina, 2021.

Disponível também em CD-ROM.

1. Fixação biológica - nitrogênio. 2. Mulungu. 3. Jurema-preta. 4. Rhizombium. 5. Nodulação. I. Deor, Diana Signor; Fernandes Júnior, Paulo Ivan. II. Universidade de Pernambuco - Campus Petrolina - PPGCTA. III. Título.

CDD-632.32

Ficha Catalográfica elaborada pela Bibliotecária Maria Gorete Pereira e Silva, CRB 4/0796, Universidade de Pernambuco – Campus Petrolina.

SILVA, Marcos Ricardo Barbosa da. **Eficiência simbiótica de rizóbios para *Erythrina velutina* WILLD e *Mimosa tenuiflora* POIR**. Dissertação (Mestrado) apresentada à Universidade de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Aprovado em: 26/05/2021

Banca Examinadora

Prof. Dra. Diana Signor Deon — Instituição: Embrapa Semirárido

Julgamento: aprovado — Assinatura Diana Signor Deon

Prof. Dra. Maryluce Albuquerque da Silva Campos — Instituição: Universidade de Pernambuco

Julgamento: aprovado — Assinatura Maryluce A. da Silva Campos

Prof. Dra. Lindete Míria Vieira Martins — Instituição: Universidade do Estado da Bahia

Julgamento: aprovado — Assinatura Lindete Míria Vieira Martins

Prof. Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior — Instituição: Embrapa Semiárido

Julgamento: aprovado — Assinatura

Dedico este trabalho a Deus, a minha mãe Natalia, minha vó materna Georgina (*in memoriam*), meus avós paternos Maria e Simão (*in memoriam*), a meu pai, meus irmãos e amigos por todo incentivo e apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por toda força e bênçãos concedidas em todos os momentos da minha vida.

Agradeço a toda a minha família, a minha mãe Natalia, que batalhou muito, para eu hoje estar próximo da finalização do Mestrado, a meu pai Aldemir, a meus irmãos, primos e tios. A minha vó materna Georgina (*in memoriam*), que sempre me aconselhou e me ensinou a ser uma pessoa mais humilde e batalhadora. Aos meus avós paternos Maria e Simão (*in memoriam*), que sempre me incentivaram a não desistir dos meus sonhos, a me fazer ser uma pessoa com caráter e princípios.

A meus amigos Willams, Gisele, Cácia, Gessica, Flávia, Williãn, Mercia, João, Tailane e Fábio por todo apoio e compreensão todos esses anos. Também agradeço a meus amigos de infância. A todos que de alguma forma me deram forças a seguir em frente.

A meus amigos de turma do PPGCTA, que de alguma forma me ajudaram nesses dois anos. E também a todos os professores do Programa.

Agradeço a minha orientadora Drª Diana pelo apoio e orientações para a realização deste trabalho.

Também sou imensamente agradecido aos meus amigos da Embrapa, dos laboratórios de Microbiologia, Sementes e Melhoramento genético de forrageiras, por todos os momentos de ajuda e alegria durante os dois anos.

Agradeço aos pesquisadores Dr. Paulo Ivan, meu co-orientador, e a Drª. Barbara, que estavam disponíveis a me auxiliar quando precisei. Também agradeço a todos os funcionários da Embrapa Semiárido.

À Universidade de Pernambuco – *Campus* Petrolina, pela oportunidade de realização do curso.

À FACEPE, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

RESUMO

SILVA, Marcos Ricardo Barbosa da. **Eficiência simbiótica de rizóbios para *Erythrina velutina* Willd e *Mimosa tenuiflora* Poir**. 2021. 86 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Pernambuco, Petrolina, 2021.

A família das leguminosas é a maior em número de espécies endêmicas na Caatinga. Esta diversidade de leguminosas está associada a uma grande variedade de microssimbiontes. Duas espécies que possuem a capacidade de simbiose com essas bactérias são a *Erythrina velutina* Willd. *e a Mimosa teanuiflora* Poir*.* O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência simbiótica de diferentes estirpes de rizóbio para a produção de mudas de mulungu (*E. velutina*) e de jurema-preta (*M. tenuiflora*). Sendo assim, foram produzidos três artigos que contribuem diretamente para o alcance do objetivo geral: o artigo 1 é uma revisão sistemática com o titulo "O uso de bactérias fixadoras de nitrogênio em leguminosas (Fabaceae) em regiões semiáridas"; artigo 2 tem como titulo "Eficiência simbiótica de rizóbios para *Erythrina velutina* Willd" e o artigo 3 é intitulado "Eficiência simbiótica de rizóbios para *Mimosa tenuiflora* Poir". No primeiro artigo, observou-se que a maior parte dos trabalhos concentra-se no estudo de espécies herbáceas (69%) e arbóreas (26%) e que os principais gêneros de microrganismos estudados são *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Burkholderia.* Além disso, 71,4% dos artigos não fazem uso de bactéria de referência para comparação do desempenho de novos isolados e em 47,6% dos trabalhos também não é empregada uma testemunha nitrogenada. Os artigos 2 e 3 foram elaborados com base em experimentos realizados com *E. velutina* e *M. tenuiflora* em casa de vegetação na Embrapa Semiárido no município de Petrolina, PE. Foi realizada a avaliação de mudas em função do fornecimento de sete doses de NH_4NO_3, a fim de definir a dose de N a ser empregada como testemunha nitrogenada em experimentos de inoculação para cada uma das espécies avaliadas. Além disso, para cada espécie, foram conduzidos experimentos com a inoculação de diferentes estirpes de microrganismos fixadores de nitrogênio, além da cepa de referência e das testemunhas nitrogenada e absoluta. A inoculação de mudas de *E. velutina* mostrou que a maioria das variáveis analisadas apresentou diferença significativa entre as plantas inoculadas em relação às não inoculadas, destacando-

se como mais eficiente a estirpe ESA75. No ensaio com *M. tenuiflora*, todas as variáveis analisadas apresentaram o melhor desempenho das plantas inoculadas em relação às não inoculadas. Destacaram-se como eficientes as estirpes ESA637, ESA673, ESA671, ESA628, ESA629. As doses de N recomendadas como testemunha nitrogenada foram 95 mg/planta para *E. velutina* e 133 mg/planta para *M. tenuiflora*.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio; mulungu; jurema-preta; *Rhizobium*; nodulação.

ABSTRACT

SILVA, Marcos Ricardo Barbosa da**. Symbiotic efficiency of rhizobia for *Erythrina velutina* Willd and *Mimosa tenuiflora* Poir**. 2021. 86 f. Dissertation (Master) – University of Pernambuco, Petrolina, 2021.

The legume family is the largest in number of endemic species in the Caatinga. This diversity of legumes is associated with a wide variety of microsymbionts. Two species that have a capacity for symbiosis with these bacteria are *Erythrina velutina* Willd. and *Mimosa teanuiflora* Poir.. The objective of this work was to evaluate the symbiotic efficiency of different rhizobia strains for the production of mulungu (*E. velutina*) and black jurema (*M. tenuiflora*) seedlings. Thus, three articles were developed tocontribute to this objective: article 1 is a systematic review entitled “The use of nitrogen-fixing bacteria in legumes (Fabaceae) in semiarid regions”; article 2 is entitled “Rhizobia symbiotic efficiency for *Erythrina velutina* Willd” and article 3 is titled “Rhizobia symbiotic efficiency for *Mimosa tenuiflora* Poir”. In the first article, most of the selected works focused on the study of herbaceous (69%) and arboreal (26%) species and the main genera of microorganisms studied are Rhizobium, Bradyrhizobium and Burkholderia. In addition, 71.4% of the articles do not use a reference bacteria for comparison with the performance of new isolates and in 47.6% of the studies a nitrogen control was not used. Articles 2 and 3 were based on greenhouse experiments carried out with *E. velutina* and *M. tenuiflora* in a at Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. In order to define the dose of N that should be used as a nitrogen control in inoculation experiments for each of the evaluated species,seedlings were evaluated as a function of seven NH_4NO_3 doses,. Furthermore, for each species, experiments were carried out with the inoculation of different strains of nitrogen-fixing microorganisms, in addition to the reference strain and the nitrogenous and absolute controls. In inoculation of *E. velutina* experiment, most of the variables analyzed showed difference between the inoculated plants in relation to the non-inoculated ones, and the isolate ESA75 was the most efficient. In the experiment with *M. tenuiflora*, all the variables analyzed summarized the better performance of inoculated plants in relation to the non-inoculated. The most efficient isolates were ESA637, ESA673, ESA671, ESA628, ESA629. N doses recommended

as nitrogen control were 95 mg / plant for *E. velutina* and 133 mg / plant for *M. tenuiflora*.

Keywords: Biological nitrogen fixation; mulungu; jurema-preta; *Rhizobium*; nodulation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1 Fluxograma da seleção dos artigos 26

Figura 3.2 Gêneros de bactérias utilizadas nos artigos selecionados 32

Figura 3.3 Uso de Nitrogênio como testemunha nitrogenada nos artigos selecionados 33

Figura 4.1 Teste de germinação. A–Sementes de *Erythrina velutina*; B–Processo de assepsia; C–Câmara tipo BOD; D–Sementes com 7 dias na BOD 43

Figura 4.2 Substrato. A – Areia misturada com vermiculita, na proporção de 2:1; B – Sacos plásticos com o substrato misturado; C – Autoclave; D – Distribuição nos vasos 44

Figura 4.3 Visão do experimento de *Erythrina velutina* em casa de vegetação aos três meses após a semeadura 45

Figura 4.4 Caldo de cultivo. A – Reagentes para a solução de YM; B – Béquer com a solução no agitador magnético; C – Mesa agitadora; D – Inoculação das sementes 47

Figura 4.5 Efeitos de doses de N sobre a altura e o diâmetro do colmo de plantas de *Erythrina velutina* 51

Figura 4.6 Efeitos de doses de N sobre massa fresca e seca de raízes e de parte aérea de plantas de *Erythrina velutina* 52

Figura 4.7 Efeitos de doses de N número de folhas e teor de N na parte aérea de plantas de *Erythrina velutina* 53

Figura 4.8 Avaliação da eficiência de estirpes de rizóbio na promoção do crescimento de *Erythrina velutina*: P1 e P4: Testemunha absoluta, P2 e P5: testemunha nitrogenada, P3: ESA75 e P6: ESA90 54

Figura 5.1 Teste de germinação. A–Vagens de *Mimosa tenuiflora*; B–Sementes beneficiadas; C–Câmara tipo BOD; D–Sementes com 5 dias na BOD 69

Figura 5.2 Visão do experimento de *Mimosa tenuiflora* em casa de vegetação aos quatro meses após a semeadura 71

Figura 5.3 Efeitos de doses de N sobre massa fresca e seca de raízes e de parte aérea de plantas de *Mimosa tenuiflora* 75

Figura 5.4 Efeitos de doses de N no teor de N na parte aérea de plantas de *Mimosa tenuiflora* 76

Figura 5.5 Efeitos de doses de N sobre a altura de plantas de *Mimosa tenuiflora* 76

Figura 5.6 Avaliação da eficiência de estirpes de rizóbio na promoção do crescimento de *Mimosa tenuiflora*: P1 e P4: Testemunha absoluta, P2 e P5: testemunha nitrogenada, P3: ESA628 e P6: ESA671 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Porte de planta, funcionalidades e tempo de plantio de espécies leguminosas utilizadas nos artigos selecionados 28

Tabela 3.2 Identificação dos isolados microbianos utilizados nos artigos selecionados 31

Tabela 4.1 Efeitos de isolados microbianos sobre crescimento e desenvolvimento de plantas de *Erythrina velutina* 49

Tabela 4.2 Efeitos de diferentes isolados microbianos sobre altura (AL), diâmetro de caule (DC) e número de folhas (NF) ao longo do desenvolvimento de mudas de *Erythrina velutina* 56

Tabela 4.3 Efeitos de diferentes isolados microbianos sobre massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa fresca de raiz (MFR), massa seca de raiz (MSR), massa fresca (MF) total e de massa seca (MS) total de *Erythrina velutina* ao longo do desenvolvimento das mudas 58

Tabela 4.4 Produção média de número de nódulos e massa seca de nódulos ao longo do desenvolvimento de mudas de *Erythrina velutina* 59

Tabela 4.5 Efeitos de diferentes isolados microbianos sobre o teor de nitrogênio na parte aérea (TNPA) de *Erythrina velutina* ao longo do desenvolvimento das mudas 60

Tabela 5.1 Efeitos de isolados microbianos sobre o crescimento e desenvolvimento de plantas de *Mimosa tenuiflora* 74

Tabela 5.2 Efeitos de diferentes isolados microbianos sobre altura (AL), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa fresca de raiz (MFR), massa seca de raiz (MSR), ao longo do desenvolvimento de mudas de *Mimosa tenuiflora* 79

Tabela 5.3 Efeitos de diferentes isolados microbianos sobre massa fresca total, massa seca total e produção média de número de nódulos ao longo do desenvolvimento de mudas de *Mimosa tenuiflora* 80

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **17**

2 OBJETIVOS **19**

2.1 GERAL 19

2.2 ESPECÍFICOS 19

3 O USO DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO EM LEGUMINOSAS (*FABACEAE*) EM REGIÕES SEMIÁRIDAS **22**

3.1 RESUMO 22

3.2 INTRODUÇÃO 23

3.3 METODOLOGIA 24

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 25

3.5 CONCLUSÃO 33

3.6 REFERÊNCIAS 34

4 EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE RIZÓBIOS PARA *ERYTHRINA VELUTINA* WILLD **40**

4.1 RESUMO 40

4.2 INTRODUÇÃO 41

4.3 MATERIAL E METODOS 42

4.3.1 Teste de germinação *42*

4.3.2 Teste de doses de nitrogênio (testemunha nitrogenada) *43*

4.3.3 Avaliação da eficiência de rizóbios *45*

4.3.4 Análises estatísticas *47*

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 48

4.4.1 Teste de germinação *48*

4.4.2 Inoculação *48*

4.4.3 Doses de N mineral *49*

4.4.4 Avaliação de estirpes *53*

4.5 CONCLUSÕES 60

4.6 REFERÊNCIAS 61

5 EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE RIZÓBIOS PARA *MIMOSA TENUIFLORA* POIR **66**

5.1 RESUMO 66

5.2 INTRODUÇÃO 67
5.3 MATERIAL E METODOS 68
5.3.1 Teste de germinação 68
5.3.2 Teste de doses de nitrogênio (testemunha nitrogenada) 69
5.3.3 Avaliação da eficiência de rizóbios 70
5.3.4 Análises estatísticas 72
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 72
5.4.1 Teste de germinação 72
5.4.2 Inoculação 73
5.4.3 Doses de N mineral 74
5.4.4 Avaliação de estirpes 76
5.5 CONCLUSÕES 82
5.6 REFERÊNCIAS 83
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 86

1 INTRODUÇÃO

A Caatinga é um conjunto de florestas temporariamente secas e bosques que se estende por grande parte dos estados da região Nordeste do Brasil e parte do nordeste do estado de Minas Gerais, sendo limitada a leste pela Mata Atlântica, a oeste pela Floresta Amazônica e ao sul pelo Cerrado (AB'SABER, 1977). Estima-se que cerca de 41% da área da Caatinga não esteja antropizada e uma mínima parte (apenas 2%) protegida por unidades de conservação (PAIM & FRANÇA-ROCHA 2009).

A Caatinga possui características edafoclimáticas distintas em relação aos outros biomas brasileiros, como clima semiárido, com temperaturas relativamente altas e baixa umidade, com chuvas irregulares e mal distribuídas (VELLOSO et al., 2002).

A Caatinga possui uma flora mais diversificada que a Amazônia, com 3347 espécies, 962 gêneros e 153 famílias, das quais 526 espécies e 29 gêneros são endêmicos (FERNANDES, CARDOSO & QUEIROZ 2020). A família das leguminosas (Fabaceae) é a família com maior número de espécies endêmicas na Caatinga, com um total de 80, sendo também o grupo mais representativo (QUEIROZ, 2002). Esta diversidade de leguminosas está relacionada a uma grande variedade de microssimbiontes associados, como os rizóbios (CANTARELLA, 2007; MOREIRA, 2008; LIMA et al., 2015).

Pesquisas realizadas na região Nordeste, indicaram a existência de uma comunidade diversa de bactérias fixadoras de nitrogênio com representantes de gêneros como *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* (LEITE et al., 2009) e *Microvirga* encontrada no solo da bacia do Rio São Francisco, em Sergipe, sendo este último representado pela espécie recém descrita *M. vignae* (RADL et al., 2014).

Duas dessas espécies de leguminosas arbóreas que possuem a capacidade de simbiose com essas bactérias são o mulungu (*Erythrina velutina* Willd*)* (MENEZES et al., 2016) *e a* jurema-preta *(Mimosa teanuiflora* Poir*)* (TEIXEIRA et al., 2010).

O mulungu é uma espécie nativa da Caatinga que apresenta relevante importância econômica e medicinal (CARVALHO, 2008). A jurema-preta, leguminosa que ocorre em quase toda região Nordeste, é uma espécie pioneira e colonizadora

de áreas degradadas ou em estado de degradação, e se destaca por conseguir se estabelecer em solos que estão passando por esse processo (MAIA, 2004).

O extrativismo indiscriminado da Caatinga causa enorme impacto negativo ambiental, o que tem colaborado para aumentar as áreas impactadas e com susceptibilidade à desertificação e outras formas de degradação. Dessa forma, a determinação de práticas de manejo sustentáveis, será importante para a recuperação de áreas degradadas nesse bioma.

Sendo assim, este trabalho apresenta três artigos que contribuem diretamente para esta temática: o primeiro é uma revisão sistemática com o título “O uso de bactérias fixadoras de nitrogênio em leguminosas (Fabaceae) em regiões semiáridas”. Essa revisão teve como objetivo fazer um levantamento de estudos com ênfase no uso de bactérias fixadoras de nitrogênio em leguminosas desde espécies agrícolas a espécies nativas voltadas para diversas finalidades em regiões semiáridas.

O segundo artigo tem como titulo “Eficiência simbiótica de rizóbios para *Erythrina velutina* Willd”, cujo principal objetivo foi avaliar a produção e a qualidade de mudas de mulungu em função do uso de inoculantes com diferentes estirpes de rizóbio.

Finalmente, o terceiro artigo é intitulado como “Eficiência simbiótica de rizóbios para *Mimosa tenuiflora* Poir” e tem como principal avaliar a produção e a qualidade de mudas de jurema-preta em função da aplicação de inoculantes com diferentes estirpes de rizóbio.

2 OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar a eficiência simbiótica de diferentes estirpes de rizóbio para a produção de mudas de mulungu (*Erythrina velutina* Willd.) e de jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* Poir.).

2.2. Específicos

- Elaborar uma revisão sistemática com artigos selecionados em bases de dados sobre o uso de bactérias fixadoras de nitrogênio em leguminosas em regiões semiáridas;
- Avaliar o desenvolvimento de mudas de mulungu e jurema-preta produzidas com diferentes estirpes de rizóbio;
- Determinar a eficiência de bácterias diazotróficas na produção inicial de mudas de mulungu e jurema-preta;
- Selecionar estirpes de rizóbio capazes de promover melhor desenvolvimento e qualidade de mudas de mulungu e jurema-preta;
- Analisar os efeitos de diferentes doses de nitrogênio no desenvolvimento de mudas de mulungu e jurema-preta.

REFERÊNCIAS

AB'SABER, A.N. **Espaços ocupados pela expansão dos climas secos na América do Sul, por ocasião dos períodos glaciais quaternários**. Paleoclimas (Instituto de Geografia, Universidade de São Paulo), v. 3, p. 1-19, 1977.

CANTARELLA, H.; NOVAIS, R.F.; VENEGAS, V.H.A.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B. & NEVES, J.C.L. (eds.). **Fertilidade do solo.** Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p. 375-470, 2007.

CARVALHO, P.E.R. **Mulungu (*Erythrina velutina*)**. Circular Técnica 160, 1º Ed. Embrapa Florestas, Colombo, PR, p. 8, Dez. 2008.

FERNANDES, M. F.; CARDOSO, D.; DE QUEIROZ, L. P. An updated plant checklist of the Brazilian Caatinga seasonally dry forests and woodlands reveals high species richness and endemism. **Journal of Arid Environments**, v. 174, p. 104079, 2020.

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 Ciências do Solo, v. 33, p. 1215-1226, 2009.

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

MAIA, G. N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: D&Z, p. 237-413, 2004.

MENEZES, K.A.S.; NUNES, G.F.O.; SAMPAIO, A.A.; SILVA, A. F. da.; SOUZA, L. S. B. de.; GAVA, C. A. T.; MARTINS, L. M. V.; FERNANDES JUNIOR, P. I. **Diversity of new root nodule bacteria from Erythrina velutina Willd., a native legume from the Caatinga dry forest** (Northeastern Brazil). Rev Cienc Agrárias, v. 39, n. 2, p. 222-233, 2016.

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.

PAIM, G. F. & França-Rocha, W. J. S. **Modelagem de cenários na Caatinga: exploração agrícola x perda de habitat**. In: Anais do XIV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto – SBSR, Natal, 2009.

QUEIROZ, L.P., SAMPAIO, E.V.S.B., A.M. GIULIETTI, J., VIRGÍNIO & C.F.L., GAMARRA-ROJAS, ed. Distribuição das espécies de Leguminoseae na Caatinga. In: **Vegetação e flora das Caatingas**. APNE / CNIP, Recife, PE, p. 141-153, 2002.

RADL, V.; SIMÕES-ARAÚJO, J.L.; LEITE, J.; PASSOS, S.R.; MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G.R.; ZILLI, J. E. **Microvirga vignae sp. nov., a root nodule symbiotic bacterium isolated from cowpea grown in semi-arid Brazil**. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 64, p. 725–730. 2014.

TEIXEIRA, F.C.P.; BORGES, W.L.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G. **Characterization of indigenous rhizobia from Caatinga**. Brazilian Journal of Microbiology, v. 41, p. 201-208, 2010.

VELLOSO AL., Sampaio EVSB., Pareyn FGC. **Ecorregiões: propostas para o Bioma Caatinga**. Recife, PE: Associação de Plantas do Nordeste; Instituto de Conservação Ambiental, 2002.

3 O uso de bactérias fixadoras de nitrogênio em leguminosas (Fabaceae) em regiões semiáridas.

3.1 RESUMO

Um elemento essencial no crescimento e desenvolvimento de espécies vegetais é o nitrogênio (N). Em ecossistemas naturais, a principal fonte de N para as plantas é o processo de fixação biológica do N_2 atmosférico. Dessa forma, o objetivo desta revisão sistemática foi investigar o uso de bactérias fixadoras de nitrogênio em leguminosas em diferentes regiões semiáridas. A revisão sistemática foi baseada nas diretrizes do modelo PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses). A pesquisa foi realizada nas bases de dados: Web of Science; Scopus e Portal de Periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), sendo utilizadas as seguintes palavras-chaves: "Fabaceae" AND "Biological nitrogen fixation" e "Semiarid" AND "Biological nitrogen fixation". Foram considerados artigos científicos publicados entre os anos de 2000 e 2020. A partir do levantamento de trabalhos nas bases de dados, 793 artigos foram encontrados: Periódicos Capes (670), Web of Science (36) e Scopus (87), sendo removidos 5 artigos duplicados, permanecendo 788 artigos. Mediante os critérios previamente estabelecidos com a aplicação dos filtros, 85 artigos foram selecionados pelo título e, após leitura dos resumos, 42 artigos cujos textos condiziam com o objetivo da revisão foram selecionados. A maior parte dos trabalhos concentrou-se no estudo de espécies herbáceas (69%) e arbóreas (26%) e os principais gêneros de microrganismos estudados foram *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Burkholderia.* Observou-se que 71,4% dos artigos não fazem uso de bactéria de referência para comparação do desempenho de novos isolados e em 47,6% dos trabalhos não é empregada uma testemunha nitrogenada, aspectos importantes quando se considera o interesse na recomendação comercial de inoculantes. Apesar disso, o uso de microrganismos fixadores de nitrogênio é uma alternativa viável, capaz de melhorar a produção agrícola e de mudas de espécies nativas em todo o mundo, com ênfase em regiões semiáridas, diminuindo os impactos ao meio ambiente com o uso de fertilizantes.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio; inoculantes; leguminosas; semiárido.

3.2 INTRODUÇÃO

Um elemento essencial no crescimento e desenvolvimento de espécies vegetais é o nitrogênio (N). Para que as plantas possam assimilar o N, é necessário que o gás N_2 presente na atmosfera seja convertido a uma forma nitrogenada absorvível, o que pode ocorrer de forma natural, em processos químicos e/ou físicos que ocorrem na atmosfera, ou em processos biológicos no solo mediados por procariontes diazotróficos, ou ainda por processos antrópicos, como ocorre na produção industrial de fertilizantes nitrogenados (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; BOYD & PETERS, 2013). A fixação biológica do N (FBN) é o principal processo natural para conversão do N_2 atmosférico para formas biologicamente assimiláveis, sendo responsável pelo aporte de 100 a 290 Tg N ha^{-1} ano^{-1} nos ecossistemas naturais (CLEVELAND et al., 1999). A FBN é realizada em grande parte por bactérias, por meio do sistema simbiótico, que consiste na capacidade de redução enzimática do N_2 a amônia (NH_3), composto nitrogenad assimilável pelas plantas (DIXON & KAHN, 2004).

A área com ênfase em estudos de FBN é a simbiose que ocorre entre rizóbios e plantas pertencentes à família Fabaceae (CANTARELLA, 2007). Essa simbiose deve-se à organogênese de estruturas radiculares da planta, chamadas de nódulos. Dentro dessas estruturas o vegetal mantém um suprimento constante de carbono e regula a pressão de oxigênio, permitindo que os rizóbios realizem a FBN e disponibilizem a NH_3 para a planta hospedeira (SCHULTZE & KONDOROSI, 1998).

Inúmeras espécies de rizóbios já foram catalogadas, sendo distribuídas em seis gêneros: *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* e *Mesorhizobium* (MOREIRA, 2008). Os rizóbios que nodulam em leguminosas são abundantes em solos sob vegetação nativa (BALA et al., 2003). Mesmo ocorrendo em um grande número de espécies, a capacidade de FBN varia entre gêneros e espécies de leguminosas (ALLEN & ALLEN, 1981).

Com cerca de 20.000 espécies e mais de 800 gêneros, a família Fabaceae constitui a terceira maior família de angiospermas (LEWIS et al. 2005). Essa família

se destaca pela abundância de espécies no mundo, presentes em ambientes distintos e pelo seu histórico de cultivo para alimentação humana e animal, uso medicinal, entre outros, havendo registros de cultivo desde a antiguidade (MIOTTO et al., 2008). A família Fabaceae é dividida nas subfamílias Papilionoideae (Faboideae), Mimosoideae e Caesalpinioideae e possui como característica distintiva a apresentação de um fruto em forma de vagem (JUDD et al., 2009). Além disso, nas Mimosoideae e Papilionoideae as espécies são predominantemente nodulíferas (SPRENT, 2001), diferente da maioria das espécies que pertencem à subfamília Caesalpinioideae, na qual 76% das espécies já examinadas são incapazes de realizar simbiose com rizóbio (FARIA; LIMA, 1998; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Essa diferença entre as subfamílias pode ter relação com uma maior adaptação evolutiva, sendo mais provável que a simbiose entre bactérias e leguminosas seja resultado de um processo evolutivo que selecionou a característica de fixar nitrogênio com maior eficiência, de modo a suprir a necessidade desta família (MCKEY, 1994).

Sendo assim o objetivo desta revisão sistemática foi investigar o uso de bactérias fixadoras de nitrogênio em leguminosas (Fabaceae) nas regiões semiáridas.

3.3 METODOLOGIA

Foi realizada uma revisão sistemática da literatura científica acerca do uso de bactérias fixadoras de nitrogênio em leguminosas (Fabaceae) abrangendo trabalhos realizados em diversas regiões semiáridas do mundo. A revisão sistemática foi baseada nas diretrizes do modelo PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) e a busca eletrônica sistemática foi executada no periodo de 28 de janeiro de 2020 a 24 de abril de 2020.

A pesquisa foi realizada nas bases de dados: Web of Science; Scopus; e Portal de Periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), sendo utilizadas as seguintes palavras-chaves: "Fabaceae" AND "Biological nitrogen fixation" e "Semiarid" AND "Biological nitrogen fixation”, a seleção de trabalhos com palavras em inglês foi feita para abranger publicações a nível internacional.

Os critérios de inclusão foram: Ano de publicação (contemplando trabalhos publicados entre os anos 2000 e 2020) e Tipo de publicação (sendo selecionados somente artigos).

Foram utilizadas as seguintes variáveis para a sintetização qualitativa: Espécie da planta; Local de estudo; Quantidade de isolados testados; Quantidade de isolados de referência; Dose de N como testemunha nitrogenada; Quantidade de isolados promissores ou eficientes; Gênero(s) do(s) Microrganismo(s); Tempo de plantio; Porte da planta; Principal uso da planta e Principais resultados. Também foram selecionados os dados das publicações: Autores; Local e Ano de publicação; Volume; Páginas e Palavras-chave.

As publicações selecionadas foram lidas e organizadas em planilhas, seguindo as variáveis determinadas, e analisadas na íntegra para a melhor interpretação das informações disponíveis.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do levantamento de trabalhos nas bases de dados, 793 artigos foram encontrados: Periódicos Capes (670), Web of Science (36) e Scopus (87), sendo removidos 5 artigos duplicados, permanecendo 788 artigos. Mediante os critérios previamente estabelecidos com a aplicação dos filtros, 85 artigos foram selecionados pelo título e, após leitura dos resumos, 42 artigos cujos textos condiziam com o objetivo da revisão foram selecionados, conforme apresentado na Figura 3.1.

A maior parte dos 42 estudos, cerca de 14 trabalhos (33,33%), foram desenvolvidos com espécies de feijão: *Phaseolus vulgaris* L., *Vigna unguiculata* (L.) Walp e *Vigna radiata* (L.) Wilczek. Outros 4 estudos (9,52%) trabalharam com o Gênero Mimosa: *Mimosa caesalpiniifolia* Benth e *Mimosa pudica* L., enquanto 3 estudos (7,14%) foram conduzidos com *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit e 3 (7,14%) com *Arachis hypogaea* L. (amendoim). Além disso, destaca-se que 42,87% dos trabalhos selecionados utilizaram mais de uma espécie de leguminosa. Em relação ao porte de planta, 69,04% dos trabalhos avaliados foram conduzidos com espécies herbáceas, 4,76% com arbustos e 26,19% com arbóreas (Tabela 3.1).

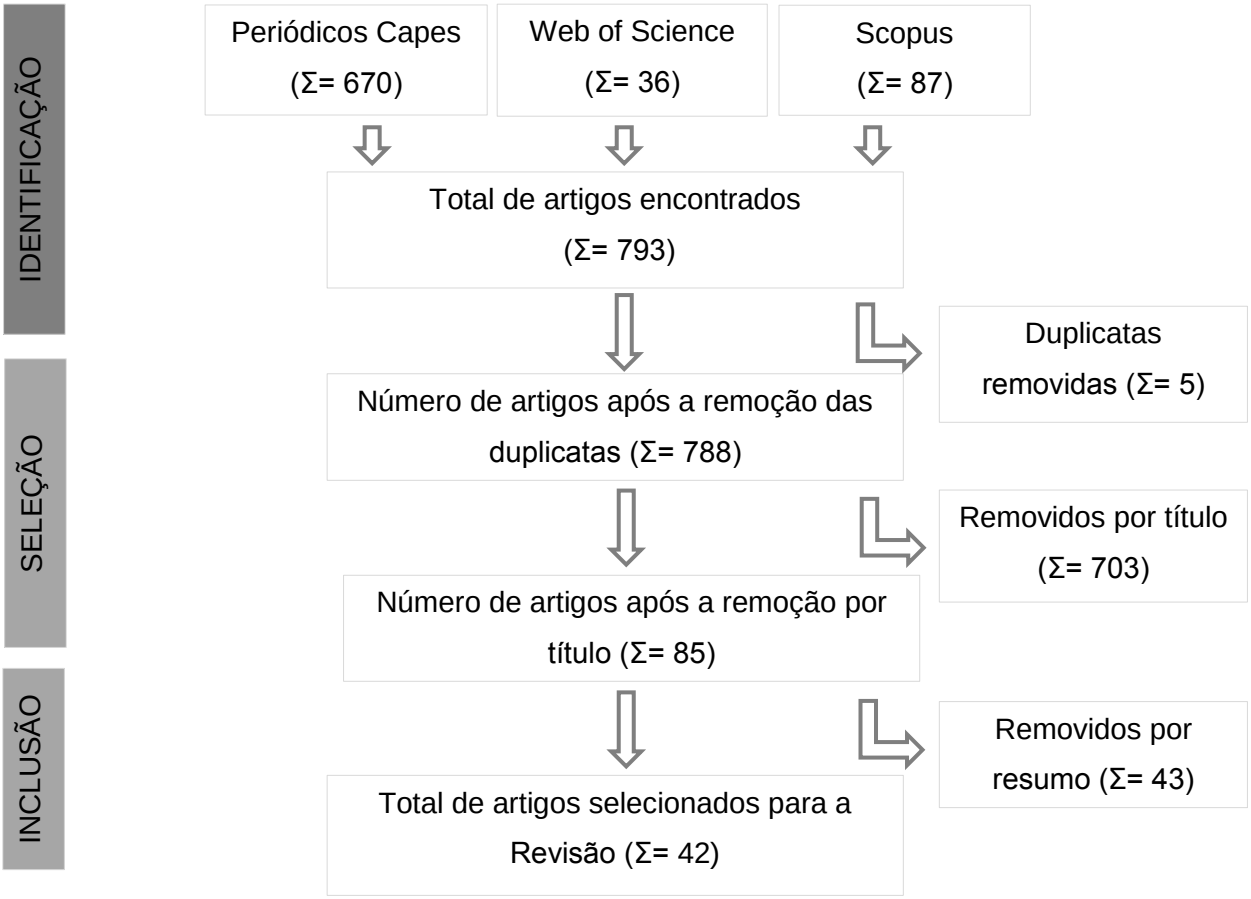

Figura 3.1. Fluxograma da seleção dos artigos. Fonte: O autor, 2021.

Dentre os trabalhos selecionados, há 20 artigos com espécies para a alimentação humana, 11 artigos para a alimentação animal e forragem, 9 artigos se referem ao uso de plantas para reflorestamento, 3 artigos relacionados à fertilização do solo, 1 artigo para uso madeireiro e 1 artigo com espécie destinada a uso medicinal (Tabela 3.1). A maioria das pesquisas apresentou dados de Tempo de plantio nos experimentos, sendo que 8 (19,04%) tiveram tempo de plantio entre 25 a 36 dias, 12 pesquisas (28,57%) entre 40 a 56 dias, 11 pesquisas (26,19%) entre 60 a 98 dias, 4 pesquisas (9,52%) entre 120 e 180 dias e 7 pesquisas (16,66%) não descreveram o tempo de cultivo das plantas (Tabela 3.1).

O uso de plantas herbáceas na maioria dos trabalhos pode ter relação direta com o seu tempo de cultivo mais rápido (25 a 36 dias) em relação às arbustivas e arbóreas, como visto nos trabalhos de Curi, Medina e Jimenez (2020), Ndungu et al. (2018), Talbi et al. (2013), Rufini et al. (2014), Rodrigues et al. (2013), Helene et al. (2020), Singh e Patel (2016) e Arone et al. (2014). Os quatro primeiros utilizaram a

mesma espécie de feijão (*V. unguiculata)*, também utilizada nos trabalhos de Oliveira et al. (2019), Sena et al. (2020), Marinho et al. (2014) e Freitas et al. (2012). Duas outras espécies de feijão foram usadas nos trabalhos de Raji, Tzanakakis e Dörsch (2019): a *P. vulgaris* e a *V. radiata*, sendo a *P. vulgaris* também usada em Florentino et al. (2012), Abou-Shanab et al. (2019), Costa et al. (2018) e Talbi et al. (2013), embora com o tempo de cultivo maior (entre 40 e 98 dias). A grande quantidade de trabalhos com feijão pode ter relação direta com sua importância para alimentação humana e animal em regiões semiáridas. Apenas dois artigos trabalharam com plantas arbustivas.

O tempo de cultivo foi de 150 dias no trabalho de Oliveira Júnior et al. (2017), com a *Piptadenia gonoacantha* Mart. destinada ao uso forrageiro e madeireiro. Também houve 150 dias de cultivo no trabalho desenvolvido por Calanzas et al. (2016) com a espécie *Cratylia argentea* (Desv.) Kuntze, destinada ao uso forrageiro e para reflorestamento.

Para os trabalhos que utilizaram plantas arbóreas, o tempo de cultivo das espécies variou entre 45 e 180 dias. Diferente dos artigos com herbáceas, dos 11 artigos com espécies arbóreas, 7 tinham espécies com uso para reflorestamento (63,6%) (Tabela 3.1).

Em relação ao total de isolados testados, 5 artigos (11,90%) trabalharam com apenas 1 isolado, 14 artigos (33,33%) utilizaram de 2 a 6 isolados, 13 artigos (30,95%) utilizaram de 13 a 47 isolados, 7 artigos (16,66%) de 56 a 95 isolados e 3 artigos (7,14%) de 100 a 420 isolados (Tabela 3.2). A maioria dos trabalhos não utilizaram bactérias de referência em suas pesquisas, correspondendo a 30 artigos (71,42%), enquanto apenas 12 artigos (28,57%) fizeram uso dessa estratégia, nos quais a quantidade de referências variou de 1 até 5 tipos de bactérias (Tabela 3.2).

De um total de 42 pesquisas, 28 (66,66%) encontraram Isolados promissores ou eficientes, sendo que 19 pesquisas (67,85%) relatam terem obtido entre 1 e 8 isolados promissores, 8 pesquisas (28,57%) obtiveram de 11 a 33 isolados e 1 pesquisa (3,57%) apresentou o valor surpreendente de 63 isolados promissores.

Tabela 3.1. Porte de planta, funcionalidades e tempo de plantio de espécies leguminosas utilizadas nos artigos selecionados

Autor	Espécie	Porte de planta	Uso de planta	Tempo de plantio
Oliveira Júnior et al. (2017)	*Piptadenia gonoacantha*	Arbustiva	Forrageiro e uso madeireiro	150 dias
Calanzas et al. (2016)	*Cratylia argentea*	Arbustiva	Forrageiro e Reflorestamento	150 dias
Moreira et al. (2012)	*Enterolobium contortisiliquum*	Arbórea	Reflorestamento	60 dias
Fitouri et al. (2012)	*Hedysarum coronarium L.*	Herbácea	Forrageiro	84 dias
Beukes et al. (2013)	*H. coluteoides*, *H. oxalidifolius*, *H. sophoroides*, *Vigna unguiculata* e *Macroptilium atropurpureum*	Herbácea	Alimentação humana e animal	56 dias
Maia e Scotti (2010)	*Inga vera*	Arbórea	Reflorestamento	90 dias
Martins et al. (2015)	*Mimosa caesalpiniifolia*	Arbórea	Reflorestamento e Forrageiro	60 dias
Lebrazi et al. (2018)	*A. cyanophylla* e *A. hórrida*	Arbórea	Reflorestamento	180 dias
Bournaud et al. (2013)	Grupo *Piptadenia* (Tribo *Mimoseae*)	Arbórea	X	X
Regus et al. (2017)	*Acmispon strigosus*	Herbácea	Fertilização do solo	56 dias
Helene et al. (2020)	*Glycine spp.*	Herbácea	Alimentação humana	25 dias
Hernández et al. (2017)	*Vicia sativa L.* e *Calopogonium mucunoides*	Herbácea	Reflorestamento	60 dias
Helene et al. (2017)	*Deguelia costata*	Arbórea	Reflorestamento	X
Florentino et al. (2012)	*Leucaena leucocephala* e *Phaseolus vulgaris*	Arbórea e Herbácea	Alimentação animal e humana	X
Silva et al. (2018)	*Leucaena leucocephala*	Arbórea	Alimentação animal	90 dias
Ferreira et al. (2013)	*Mimosa caesalpiniaefolia*, *Leucaena leucocephala* e *Mimosa pudica*	Arbórea	Reflorestamento	80 dias
Curi, Medina e Jimenez (2020)	*Vigna unguiculata*	Herbácea	Alimentação humana	30 dias
Ndungu et al. (2018)	*Vigna unguiculata*	Herbácea	Alimentação humana	35 dias
Osei et al. (2018)	*Arachis hypogaea*	Herbácea	Alimentação humana	45 dias
De Oliveira et al. (2019)	*Mimosa caesalpiniifolia*	Arbórea	Reflorestamento e Forrageiro	45 dias
Oliveira et al. (2019)	*Vigna unguiculata*	Herbácea	Alimentação humana	40 dias
Sena et al. (2020)	*Vigna unguiculata*	Herbácea	Alimentação humana	45 dias
Marinho et al. (2014)	*Vigna unguiculata*	Herbácea	Alimentação humana	45 dias
Gericó et al. (2020)	*Arachis hypogaea*	Herbácea	Alimentação humana	X
Abou-Shanab et al. (2019)	*Phaseolus vulgaris*	Herbácea	Alimentação humana	98 dias
Younis et al. (2019)	*Cicer arietinum*	Herbácea	Alimentação humana	X
Solans, Ruiz e Wall (2015)	*Lotus tenuis*	Herbácea	Forrageira	56 dias
Singh e Patel (2016)	*Trigonella foenum graecum*	Herbácea	Medicinal	28 dias
Costa et al. (2018)	*Phaseolus vulgaris*	Herbácea	Alimentação humana	40 dias
Dias et al. (2013)	*Prosopis alba*	Arbórea	Fertilização do solo	120 dias
Arone et al. (2014)	*Medicago hispida*	Herbácea	Forrageira	35 dias
Marek-Kozaczuk et al. (2017)	*T. rubens, T. pratense, T. repens* e *T. resupinatum*	Herbácea	Forrageira	40 dias

Tabela 3.1. Porte de planta, funcionalidades e tempo de plantio de espécies leguminosas utilizadas nos artigos selecionados

Navarro et al. (2014)	*Lupinus mariae-josephae*	Herbácea	Fertilização do solo	42 dias
Raji, Tzanakakis e Dörsch (2019)	*Phaseolus vulgaris* e *Vigna radiata*	Herbácea	Alimentação humana	60 dias
Talbi et al. (2013)	*Phaseolus vulgaris*	Herbácea	Alimentação humana	35 dias
Freitas et al. (2012)	*Vigna unguiculata*	Herbácea	Alimentação humana	80 dias
Rufini et al. (2014)	*Vigna unguiculata*	Herbácea	Alimentação humana	30 dias
Abi-Ghanem, Carpenter-Boggs e Smith (2011)	*Lens culinaris Medik*. e *Pisum sativum L.*	Herbácea	Alimentação humana	42 dias
Rodrigues et al. (2013)	*Vigna unguiculata*	Herbácea	Alimentação humana	36 dias
Melo et al. (2016)	*Arachis hypogaea*	Herbácea	Alimentação humana	90 dias
Michel et al. (2017)	*Centrolobium paraense*	X	X	X
Latif et al. (2013)	*Melilotus alles*, *M. officinalis*, *Trifolium pratense*, *T. repens* e *Medicago sp.*	Herbácea	X	X

(X): não informado. Fonte: O autor, 2021.

No trabalho de Calanzas et al. (2016), 13 cepas associadas a *Cratylia argentea* se destacaram por promover melhorias sobre a produção de biomassa, com ênfase para as cepas CR42 e CR52. No trabalho de Moreira et al. (2012) também se destacaram 13 cepas no crescimento do *Enterolobium contortisiliquum* em relação à testemunha não inoculada, sendo os isolados NFB03, NFB07, NFB08, NFB09, NFB10, NFB11, NFB12, NFB14, NFB15, NFB16, NFB17, NFB18 e NFB19 os mais eficientes. Já no trabalho de Michel et al. (2017), o teste de inoculação cruzada foi capaz de induzir a nodulação eficaz em espécies como *A. hypogaea*, *C. cajan*, *C. mucunoides*, *C. brasiliensis*, *C. paraense*, *C. juncea*, *P. phaseoloides* e *V. unguiculata*. Os resultados apresentados por estes autores mostram que as cepas BR 10245T e BR 10290 e as cepas BR 10245T e BR 10303T formaram nódulos efetivos em feijão (*V. unguiculata*, *V. angularis* e *V. radiata*), enquanto *Stylosanthes guianensis* nodulou com a cepa BR 10245T e *Glycine max* e *Lupinus albus* nodularam com a cepa BR 10290.

A eficiência de isolados na produção de biomassa e matéria seca foi demostrada no trabalho de Fitouri et al. (2012), no qual as estirpes Hc5 e Hc14 promoveram aumento de 170% no rendimento de matéria seca da parte aérea de *Hedysarum coronarium L*. em relação ao controle fertilizado com N. Resultado parecido foi encontrado no peso de matéria seca da parte aérea de *Inga vera* e no aumento do teor de N da parte aérea no experimento de Maia e Scotti (2010), realizado com uso da cepa BHICB-Ig4. Outros destaques são as diferenças

significativas em relação ao peso seco da parte aérea e da raiz, ao número de nódulos e à fixação de N em relação ao controle não inoculado e não fertilizado, como demonstrado por Lebrazi et al. (2018) para a espécie *Acacia sp*. Resultado semelhante foi encontrado por Curi, Medina e Jimenez (2020), no qual o tratamento com inoculante em *V. unguiculata* apresentou um bom crescimento da parte aérea e radicular, sendo a maior matéria fresca obtida em função da inoculação com a cepa Rizo E10, tratamento que superou o desempenho do controle nitrogenado.

O uso de microbiontes eficientes também interfere na produção de grãos, como relatado por Marinho et al. (2014) para as cultivares BRS Pujante e BRS Tapaihum de feijão-caupi, resultado semelhante ao encontrado por Abou-Shanab et al. (2019) que observaram a produção de grãos maiores em plantas inoculadas em comparação a plantas não inoculadas. Na produção de vagens de *Cicer arietinum*, a inoculação aumentou o número de vagens e de sementes, tendo rendimentos superiores ao tratamento não inoculado, como apresentado por Younis et al. (2019).

No trabalho de Osei et al. (2018), foram utilizadas cepas de Rhizobium KNUST1002 e *Bradyrhizobium yuanmingense* e houve aumento da produção da biomassa, aumento da nodulação e acúmulo de N em amendoim. Outro trabalho que utilizou amendoim inoculado com *Bradyrhizobium* foi o de Gericó et al. (2020), que indicou a inoculação a uma taxa de 2 mL kg^{-1} para obter o aumento de FBN e gerar maiores rendimentos para a cultura. Já no trabalho de Melo et al. (2016), constatou-se que a inoculação de *Bradyrhizobium* SEMIA 6144 em amendoim BRS Havana, influencia positivamente a nodulação, a produção de vagens e as trocas gasosas da planta.

Hernández et al. (2017) apresentaram a cepa UFSC-M8 como inoculante eficaz para recuperação de áreas contaminadas com carvão. Segundo os autores, essa bactéria pode contribuir com o aumento do crescimento de plantas leguminosas como a *V. sativa*. Já Talbi et al. (2013) utilizaram a cepa GR01N de *Burkholderia phymatum* em condições de estresse salino no cultivo de *Phaseolus vulgaris* no semiárido do Marrocos. Essa inoculação aumentou a produção de matéria seca e a FBN, quando comparados aos inoculados de referência. Florentino et al. (2012) também identificaram uma cepa eficiente em solos salinos no Brasil. Outro trabalho promissor é o de Ferreira et al. (2013), cujos resultados mostraram que a combinação de cepas rizobiais, leguminosas e silicato de cálcio, tem potencial para favorecer a revegetação de solos contaminados, pois potencializa produção de

matéria seca, número de nódulos e acúmulo de N na parte aérea da planta. Outra combinação importante foi a de fósforo com inoculante, apresentada no trabalho de Raji, Tzanakakis e Dörsch (2019) e que promoveu aumento na produção de grãos e na FBN em feijão.

Tabela 3.1. Identificação dos isolados microbianos utilizados nos artigos selecionados

Autor	Isolados testados	Bactérias de referência	Isolados promissores ou eficientes
Oliveira Júnior et al. (2017)	4	0	1
Calanzas et al. (2016)	25	0	13
Moreira et al. (2012)	19	0	13
Fitouri et al. (2012)	45	0	2
Beukes et al. (2013)	69	0	16
Maia e Scotti (2010)	4	0	4
Martins et al. (2015)	47	0	0
Lebrazi et al. (2018)	38	0	6
Bournaud et al. (2013)	196	0	63
Regus et al. (2017)	2	0	0
Ferraz et al. (2020)	21	0	0
Hernández et al. (2017)	16	1	1
Helene et al. (2017)	2	0	0
Florentino et al. (2012)	25	0	0
Silva et al. (2018)	4	1	2
Ferreira et al. (2013)	2	0	2
Curi, Medina e Jimenez (2020)	2	0	2
Ndungu et al. (2018)	23	2	0
Osei et al. (2018)	65	3	3
De Oliveira et al. (2019)	95	4	0
Oliveira et al. (2019)	73	1	27
Sena et al. (2020)	420	2	27
Marinho et al. (2014)	5	0	0
Gericó et al. (2020)	3	0	1
Abou-Shanab et al. (2019)	1	1	1
Younis et al. (2019)	1	0	1
Solans, Ruiz e Wall (2015)	4	0	3
Singh e Patel (2016)	6	0	1
Costa et al. (2018)	73	0	11
Chávez et al. (2013)	100	5	33
Arone et al. (2014)	25	0	6
Marek-Kozaczuk et al. (2017)	63	0	8
Navarro et al. (2014)	2	0	1
Raji, Tzanakakis e Dörsch (2019)	2	0	0
Talbi et al. (2013)	1	1	1
Freitas et al. (2012)	2	1	0
Rufini et al. (2014)	56	3	21
Abi-Ghanem, Carpenter-Boggs e Smith (2011)	18	0	0
Rodrigues et al. (2013)	1	0	0
Melo et al. (2016)	1	0	0
Michel et al. (2017)	13	0	0
Latif et al. (2013)	20	0	5

Fonte: O autor, 2021

Dentre os 42 artigos selecionados para a revisão, houve uma grande variedade de gêneros de bactérias, sendo que os principais gêneros foram *Rhizobium* (17 trabalhos), *Bradyrhizobium* (17 trabalhos) e *Burkholderia* (8 trabalhos) (Figura 3.2), com diversos resultados como a descoberta de novas espécies de *Burkholderia* spp. relatada por Martins et al. (2015) e por Bournaud et al. (2013). Costa et al. (2018) destacaram uma grande diversidade de bactérias do gênero *Rhizobium* promissoras em leguminosas, algo semelhante ao relatado por Chávez et al. (2013) para *P. alba*.

Helene et al. (2017) descreveram a descoberta de uma nova espécie de *Bradyrhizobium*, o *Bradyrhizobium mercantei* sp., cepa SEMIA 6399T. Já Ferraz et al. (2020) destacaram uma notável divergência dentro do gênero *Bradyrhizobium* em isolados de leguminosas nativas da Austrália. Outra descoberta importante foi feita por Navarro et al. (2014), utilizando *Lupinus mariae-josephae* inoculadas com *Bradyrhizobium* em solos alcalinos. Neste trabalho, observou-se que a espécie utilizada foi totalmente dependente da inoculação para entrar no ciclo reprodutivo. Já Rodrigues et al. (2013), descreveram o sinergismo entre *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) e PGPB (*Bacillus*, *Brevibacillus* e *Paenibacillus*) sobre a promoção de crescimento e desempenho em feijão-caupi.

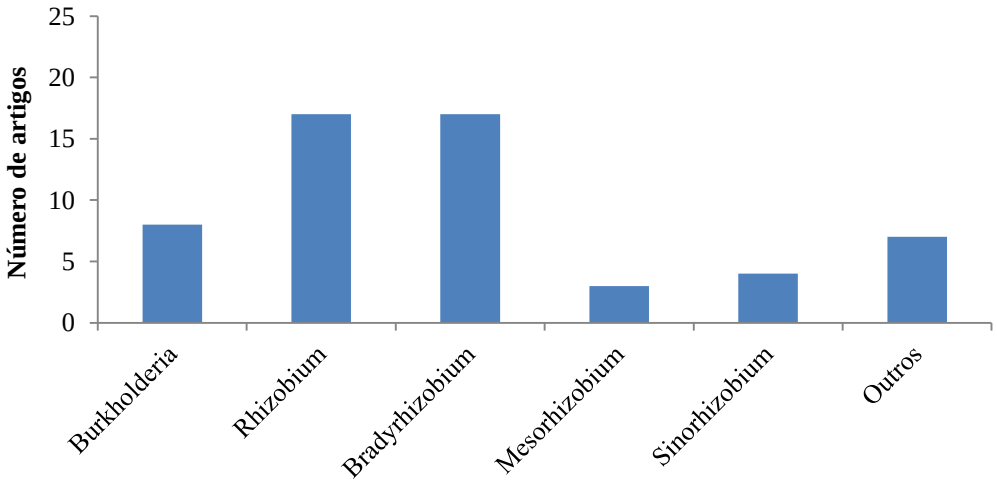

Figura 3.2. Gêneros de bactérias utilizadas nos artigos selecionados. Fonte: O autor, 2021.

O uso de uma testemunha nitrogenada nos experimentos não foi uma regra, dos trabalhos selecionados, 22 artigos (52,38%) fizeram a aplicação de N, enquanto

20 artigos (47,61%) não utilizaram o tratamento testemunha nitrogenada em seus experimentos (Figura 3.3). Apesar disso, ressalta-se a importância do uso de uma testemunha nitrogenada em experimentos dessa natureza, uma vez que o objetivo final da seleção das bactérias fixadoras de nitrogênio é a produção de inoculantes comerciais, que serão empregados em substituição aos fertilizantes nitrogenados. Caso o inoculante não proporcione desempenho pelo menos similar ao uso do fertilizante nitrogenado, dificilmente o insumo será interessante, principalmente sob o aspecto econômico para espécies cultivadas.

Dentre os trabalhos que fizeram uso de testemunha nitrogenada, cada artigo apresentou quantidades e fontes diferentes de N. Essa diversidade na quantidade de N aplicada tem relação com a diversidade de espécies estudadas nos trabalhos, ou seja, uma vez que a demanda de N é diferente para cada espécie, a quantidade de N fornecida na testemunha nitrogenada deve ser suficiente para não limitar o desenvolvimento da planta.

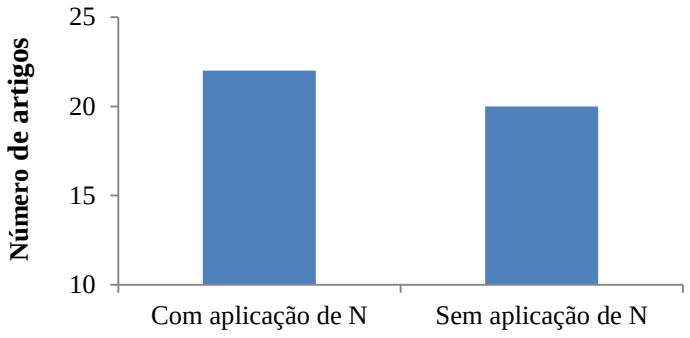

Figura 3.3. Uso de Nitrogênio como testemunha nitrogenada nos artigos selecionados. Fonte: O autor, 2021.

3.5 CONCLUSÃO

O uso de inoculantes em espécies agrícolas e não agrícolas, tem se tornado uma técnica bastante comum em todo o mundo, como mostra os dados do presente estudo. Essa utilização é basicamente proveniente dos diversos mecanismos que esses microrganismos trazem para os vegetais, como a promoção do crescimento e

melhoria vegetal, através da fixação biológica de nitrogênio, além, de atenuarem os efeitos de estresses ambientais, sendo de grande importância em espécies cultivadas em regiões semiáridas. A maior parte dos trabalhos concentrou-se no estudo de espécies herbáceas (69%) e arbóreas (26%) e os principais gêneros de microrganismos estudados foram *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Burkholderia.*

Nesse contexto, o uso de microrganismos fixadores de nitrogênio tem se constituído como uma alternativa viável, capaz de melhorar a produção agrícola e de mudas de espécies nativas em todo o mundo, com ênfase em regiões semiáridas, diminuindo assim os impactos do uso de fertilizantes ao meio ambiente. Apesar disso, 71,4% dos artigos não fazem uso de bactéria de referência para comparação do desempenho de novos isolados e em 47,6% dos trabalhos também não é empregada uma testemunha nitrogenada, aspectos importantes quando se considera o interesse na recomendação comercial de inoculantes.

3.6 REFERÊNCIAS

ABI-GHANEM, R.; CARPENTER-BOGGS, L.; SMITH, J. L. **Cultivar effects on nitrogen fixation in peas and lentils**. Biology and Fertility of Soils, v. 47, n. 1, p. 115-120, 2011.

ABOU-SHANAB, R. A. I.; WONGPHATCHARACHAI, M.; SHEAFFER, C. C.; SADOWSKY, M. J. **Response of dry bean (Phaseolus vulgaris L.) to inoculation with indigenous and commercial Rhizobium strains under organic farming systems in Minnesota**. Symbiosis, v. 78, n. 2, p. 125-134, 2019.

ALLEN, O.N.; ALLEN, E.K. **The Leguminosae: a source book of characteristics use and nodulation**, Wisconsin, University of Wisconsin Press, pp.812, 1981.

ARONE, G.; CALDERÓN, C.; MORENO, S.; BEDMAR, E. J. **Identification of Ensifer strains isolated from root nodules of Medicago hispida grown in association with Zea mays in the Quechua region of the Peruvian Andes**. Biology and fertility of soils, v. 50, n. 1, p. 185-190, 2014.

BALA, A.; MURPHY, P. J.; OSUNDE, A. O. , GILLER, K. E. **Nodulation of tree legumes and the ecology of their native rhizobial populations in tropical soils**, Applied Soil Ecology, v. 22, p. 211-223, 2003.

BEUKES, C. W.; VENTER, S. N.; LAW, I. J.; PHALANE, F. L.; STEENKAMP, E. T. **South African papilionoid legumes are nodulated by diverse Burkholderia with unique nodulation and nitrogen-fixation loci**. PLoS One, v. 8, n. 7, p. e68406, 2013.

BOURNAUD, C.; de FARIA, S. M.; dos SANTOS, J. M. F.; TISSEYRE, P.; SILVA, M.; CHAINTREUIL, C.; MOULIN, L. **Burkholderia species are the most common and preferred nodulating symbionts of the Piptadenia group (tribe Mimoseae)**. PLoS One, v. 8, n. 5, p. e63478, 2013.

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

CALAZANS, G. M.; OLIVEIRA, C. A. D.; CRUZ, J. C.; MATRANGOLO, W. J. R.; MARRIEL, I. E. **Selection of efficient rhizobial symbionts for Cratylia argentea in the cerrado biome**. Ciência Rural, v. 46, n. 9. p. 1594-1600, 2016.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R.F.; VENEGAS, V.H.A.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B. & NEVES, J.C.L. (eds.). **Fertilidade do solo.** Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.375-470, 2007.

CHÁVEZ DÍAZ, L.; GONZÁLEZ, P.; RUBIO, E.; MELCHIORRE, M. **Diversity and stress tolerance in rhizobia from Parque Chaqueño region of Argentina nodulating Prosopis alba**. Biology and fertility of soils, v. 49, n. 8, p. 1153-1165, 2013.

CLEVELAND, C.C., TOWNSEND, A.R., SCHIMEL, D.S., FISHER, H., HOWARTH, R.W., HEDIN, L.O., PERAKIS, S.S., LATTY, E.F., VON FISCHER, J.C., ELSEROAD, A., WASSON, N.F. **Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N2) fixation in natural ecosystems.** Global Biogeochemical Cycles, v. 13, pp.623-645, 1999.

COSTA, M. R.; CHIBEBA, A. M.; MERCANTE, F. M.; HUNGRIA, M. **Polyphasic characterization of rhizobia microsymbionts of common bean [Phaseolus vulgaris (L.)] isolated in Mato Grosso do Sul, a hotspot of Brazilian biodiversity**. Symbiosis, v. 76, n. 2, p. 163-176, 2018.

CURI, M. A.; MEDINA, E. G.; JIMÉNEZ, V. H. (2020). **Azotobacter y Rhizobium como biofertilizantes naturales en semillas y plantas de frijol caupí**. Avances, v. 22, n. 2, p. 239-251, 2020.

de OLIVEIRA, I. S. R.; JESUS, E. D. C.; RIBEIRO, T. G.; SANTOS REIS DE ANDRADE DA SILVA, M.; TENORIO, J. D. O.; MARTINS, L. M. V.; de FARIA, S. M. **Mimosa caesalpiniifolia Benth. adapts to rhizobia populations with differential taxonomy and symbiotic effectiveness outside of its location of origin**. FEMS microbiology ecology, v. 95, n. 8, p. fiz109, 2019.

DIXON, R.; KAHN, D. **Genetic regulation of biological nitrogen fixation**. Nature, v. 2, p. 621-631, 2004.

FARIA, S.M.; LIMA, H.C. Additional studies on the nodulation status of legume species in Brazil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 200, p. 185-192, 1998.

FERRAZ HELENE, L. C.; O'HARA, G.; HUNGRIA, M. **Characterization of Bradyrhizobium strains indigenous to Western Australia and South Africa**

indicates remarkable genetic diversity and reveals putative new species. Systematic and Applied Microbiology, v. 43, n. 2, p. 126053, 2020.

FERREIRA, P. A. A.; LOPES, G.; BOMFETI, C. A.; de OLIVEIRA LONGATTI, S. M.; de SOUSA SOARES, C. R. F.; GUILHERME, L. R. G.; de SOUZA MOREIRA, F. M. **Leguminous plants nodulated by selected strains of Cupriavidus necator grow in heavy metal contaminated soils amended with calcium silicate**. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 29, n. 11, p. 2055-2066, 2013.

FITOURI, S. D.; TRABELSI, D.; SAÏDI, S.; ZRIBI, K.; JEDDI, F. B.; MHAMDI, R. **Diversity of rhizobia nodulating sulla (Hedysarum coronarium L.) and selection of inoculant strains for semi-arid Tunisia**. Annals of microbiology, v. 62, n. 1, p. 77-84, 2012.

FLORENTINO, L. A.; JARAMILLO, P. M. D.; SILVA, K. B.; SILVA, J. S. D.; OLIVEIRA, S. M. D.; MOREIRA, F. M. D. S. **Physiological and symbiotic diversity of Cupriavidus necator strains isolated from nodules of Leguminosae species**. Scientia Agricola, v. 69, n. 4, p. 247-258, 2012.

FREITAS, A. D. S.; SILVA, A. F.; SAMPAIO, E. V. D. S. B. **Yield and biological nitrogen fixation of cowpea varieties in the semi-arid region of Brazil**. Biomass and Bioenergy, v. 45, p. 109-114, 2012.

GERICÓ, T. G.; TAVANTI, R. F. R.; de OLIVEIRA, S. C.; LOURENZANI, A. E. B. S.; de LIMA, J. P.; RIBEIRO, R. P.; Dos REIS, A. R. **Bradyrhizobium sp. enhance ureide metabolism increasing peanuts yield**. Archives of microbiology, v. 202, n. 3, p. 645-656, 2020.

HELENE, L. C. F.; DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; HUNGRIA, M. **Bradyrhizobium mercantei sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from nodules of Deguelia costata (syn. Lonchocarpus costatus)**. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 67, n. 6, p. 1827-1834, 2017.

HERNÁNDEZ, A. G.; de MOURA, G. D.; BINATI, R. L.; NASCIMENTO, F. X. I.; LONDOÑO, D. M.; MAMEDE, A. C. P.; SOARES, C. R. F. S. **Selection and characterization of coal mine autochthonous rhizobia for the inoculation of herbaceous legumes**. Archives of microbiology, v. 199, n. 7, p. 991-1001, 2017.

LATIF, S.; KHAN, S.; NAVEED, M.; MUSTAFA, G.; BASHIR, T.; MUMTAZ, A. S. **The diversity of Rhizobia, Sinorhizobia and novel non-Rhizobial Paenibacillus nodulating wild herbaceous legumes**. Archives of microbiology, v. 195, n. 9, p. 647-653, 2013.

LEBRAZI, S.; CHRAIBI, M.; FADIL, M.; BARKAI, H.; FIKRI-BENBRAHIM, K. **Phenotypic, Genotypic and Symbiotic Characterization of Rhizobial Isolates Nodulating Acacia sp. in Morocco**. Journal of Pure and Applied Microbiology, v. 12, n. 1, p. 249-263, 2018.

LEWIS, G., SCHRIRE, B., MACKINDER, B., LOCK, M. **Legumes of the World**. Royal Botanic Gardens, Kew, UK, 2005.

MAIA, J.; SCOTTI, M. R. **Growth of Inga vera Willd. subsp. affinis under rizobia inoculation**. Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal, v. 10, n. 2, p. 139-149, 2010.

MAREK-KOZACZUK, M.; WDOWIAK-WRÓBEL, S.; KALITA, M.; CHERNETSKYY, M.; DERYŁO, K.; TCHÓRZEWSKI, M.; SKORUPSKA, A. **Host-dependent symbiotic efficiency of Rhizobium leguminosarum bv. trifolii strains isolated from nodules of Trifolium rubens**. Antonie van Leeuwenhoek, v. 110, n. 12, p. 1729-1744, 2017.

MARINHO, R. D. C. N.; NÓBREGA, R. S. A.; ZILLI, J. É.; XAVIER, G. R.; SANTOS, C. A. F.; AIDAR, S. D. T.; FERNANDES JÚNIOR, P. I. **Field performance of new cowpea cultivars inoculated with efficient nitrogen-fixing rhizobial strains in the Brazilian Semiarid**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 49, n. 5, p. 395-402, 2014.

MARTINS, P. G. S.; JUNIOR, M. A. L.; FRACETTO, G. G. M.; da SILVA, M. L. R. B.; VINCENTIN, R. P. **Mimosa caesalpiniifolia rhizobial isolates from different origins of the Brazilian Northeast**. Archives of microbiology, v. 197, n. 3, p. 459-469, 2015.

MCKEY, D. Legume and nitrogen: The evolutionary ecology of a nitrogendemanding lifestyle. In: SPRENT, J. I.; MCKEY, D. (Ed.). **Advances in legume systematic**. 5. The nitrogen factor. Kew: Royal Botanic Gardens, p. 211-228, 1994.

MELO, E. B. S.; de LIMA, L. M.; FERNANDES JUNIOR, P. I.; AIDAR, S. D. T.; FREIRE, M. A. O.; FREIRE, R. M. M.; dos SANTOS, R. C. **Nodulation, gas exchanges and production of peanut cultivated with Bradyrhizobium in soils with different textures**. Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2016.

MICHEL, D. C.; PASSOS, S. R.; SIMÕES-ARAUJO, J. L.; BARAÚNA, A. C.; Da SILVA, K.; PARMA, M. M.; ZILLI, J. E. **Bradyrhizobium centrolobii and Bradyrhizobium macuxiense sp. nov. isolated from Centrolobium paraense grown in soil of Amazonia, Brazil**. Archives of microbiology, v. 199, n. 5, p. 657-664, 2017.

MIOTTO, S.T.S.; LÜDTKE, R. & OLIVEIRA M.L.A.A. A família Leguminosae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências,** v.6, n.3, p. 269-290, 2008.

MOREIRA, F.M.M.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo.** Lavras: Editora da UFLA, p. 726, 2006.

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.

MOREIRA, F. T. A.; SANTOS, D. R.; SILVA, G. H.; ALENCAR, L. S. **OBTENÇÃO DE ESTIRPES DE RIZÓBIO EFICIENTES NA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM TAMBORIL (Enterolobium contortisiliquum (Vell.) Morong).** HOLOS, v. 4, p. 69-79, 2012.

NAVARRO, A.; FOS, S.; LAGUNA, E.; DURÁN, D.; REY, L.; RUBIO-SANZ, L.; RUIZ-ARGÜESO, T. **Conservation of endangered Lupinus mariae-josephae in its natural habitat by inoculation with selected, native Bradyrhizobium strains**. PLoS One, v. 9, n. 7, p. e102205, 2014.

NDUNGU, S. M., MESSMER, M. M., ZIEGLER, D., THUITA, M., VANLAUWE, B., FROSSARD, E., THONAR, C. **Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for the competitiveness analysis of selected indigenous cowpea (Vigna unguiculata L. Walp.) Bradyrhizobium strains from Kenya**. Applied microbiology and biotechnology, v. 102, n. 12, p. 5265-5278, 2018.

OLIVEIRA JÚNIOR, J. Q.; CONCEIÇÃO JESUS, E.; LISBOA, F. J.; BERBARA, R. L. L.; de FARIA, S. M. **Nitrogen-fixing bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi in Piptadenia gonoacantha (Mart.) Macbr**. brazilian journal of microbiology, v. 48, n. 1, p. 95-100, 2017.

OLIVEIRA, G. S.; SENA, P. T. S.; do NASCIMENTO, T. R.; NETO, R. A. F.; PEREIRA, J. R. C.; MARTINS, L. M. V.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I. **Are cowpea-nodulating bradyrhizobial communities influenced by biochar amendments in soils? Genetic diversity and symbiotic effectiveness assessment of two agricultural soils of Brazilian drylands**. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, p. 1-11, 2019.

OSEI, O.; ABAIDOO, R. C.; AHIABOR, B. D.; BODDEY, R. M.; ROUWS, L. F. **Bacteria related to Bradyrhizobium yuanmingense from Ghana are effective groundnut micro-symbionts**. Applied Soil Ecology, v. 127, p. 41-50, 2018.

RAJI, S. G.; TZANAKAKIS, V.; DÖRSCH, P. **Bradyrhizobial inoculation and P application effects on haricot and mung beans in the Ethiopian Rift Valley**. Plant and Soil, v. 442, n. 1-2, p. 271-284, 2019.

REGUS, J. U.; WENDLANDT, C. E.; BANTAY, R. M.; GANO-COHEN, K. A.; GLEASON, N. J.; HOLLOWELL, A. C.; SACHS, J. L. **Nitrogen deposition decreases the benefits of symbiosis in a native legume**. Plant and soil, v. 414, n. 1-2, p. 159-170, 2017.

RODRIGUES, A. C.; ANTUNES, J. E. L.; da COSTA, A. F.; de PAULA OLIVEIRA, J.; FIGUEIREDO, M. D. V. B. **Interrelationship of Bradyrhizobium sp. and plant growth-promoting bacteria in cowpea: survival and symbiotic performance**. Journal of Microbiology, v. 51, n. 1, p. 49-55, 2013.

SCHULTZE, M.; KONDOROSI, A. **Regulation of symbiotic root nodule development**. Annual Review of Genetics, v. 32, p. 33-57, 1998.

SENA, P. T. S.; do NASCIMENTO, T. R.; LINO, J. D. O. S.; OLIVEIRA, G. S.; NETO, R. A. F.; de FREITAS, A. D. S.; MARTINS, L. M. V. **Molecular, Physiological, and Symbiotic Characterization of Cowpea Rhizobia from Soils Under Different Agricultural Systems in the Semiarid Region of Brazil**. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, p. 1-15, 2020.

SILVA, V. S. G.; de ROSALIA E SIVA SANTOS, C. E.; de FREITAS, A. D. S.; STAMFORDM, N. P.; da SILVA, A. F.; de LYRA, M. D. C. C. P.; da SILVA FERREIRA, J. **Symbiotic efficiency of native rhizobia in legume tree'Leucaena leucocephala'derived from several soil classes of Brazilian Northeast region**. Australian Journal of Crop Science, v. 12, n. 3, p. 478, 2018.

SINGH, N. K.; PATEL, D. B. **Performance of fenugreek bioinoculated with Rhizobium meliloti strains under semi-arid condition**. Journal of Environmental Biology, v. 37, n. 1, p. 31, 2016.

SOLANS, M.; RUIZ, O. A.; WALL, L. G. **Effect of actinobacteria on Lotus tenuis–Mesorhizobium loti symbiosis: preliminary study**. Symbiosis, v. 65, n. 1, p. 33-37, 2015.

SPRENT, J.I. **Nodulation in legumes**. Kew: The Cromwell Press, p. 146, 2001.

RUFINI, M.; Da SILVA, M. A. P.; FERREIRA, P. A. A.; de SOUZA CASSETARI, A.; SOARES, B. L.; De ANDRADE, M. J. B.; de SOUZA MOREIRA, F. M. **Symbiotic efficiency and identification of rhizobia that nodulate cowpea in a Rhodic Eutrudox**. Biology and Fertility of Soils, v. 50, n. 1, p. 115-122, 2014.

TALBI, C.; ARGANDOÑA, M.; SALVADOR, M.; ALCHÉ, J. D.; VARGAS, C.; BEDMAR, E. J.; DELGADO, M. J. **Burkholderia phymatum improves salt tolerance of symbiotic nitrogen fixation in Phaseolus vulgaris**. Plant and soil, v. 367, n. 1-2, p. 673-685, 2013.

YOUNIS, M. A.; GUL, R.; ADIL, M.; SABOOR NAEEM, M. S.; RIAZ, A.; ALI, S. 12. **Effect of rhizobium inoculation on morphological and yield contributing traits in chickpea (Cicer arietinum L.)**. Pure and Applied Biology (PAB), v. 8, n. 1, p. 108-116, 2019.

4 Eficiência simbiótica de rizóbios para *Erythrina velutina* Willd.

4.1 RESUMO

A *Erythrina velutina* Willd., uma espécie popularmente conhecida como mulungu, faz parte da subfamília Faboideae (Papilionoideae), sendo nativa do Nordeste do Brasil. É uma espécie com comportamento de tolerância ou mecanismos de adaptações frente a estresses abióticos, além de realizar simbiose com microrganismos capazes de fixar nitrogênio. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a eficiência simbiótica de isolados promissores de rizóbio para a produção de mudas de *E. velutina*, em condições de casa de vegetação, e determinar a quantidade de nitrogênio a ser aplicada como testemunha nitrogenada em experimentos desta natureza. O primeiro experimento consistiu na avaliação do efeito de doses de N - NH_4NO_3 (0, 25, 50, 75, 100, 150, 200 e 300 mg/planta) sobre o crescimento das plantas. No segundo experimento, o crescimento das plantas foi avaliado em função de dez tratamentos: oito estirpes (ESA96, ESA90, ESA70, ESA71, 63, ESA74, ESA75 e BR 5609), mais um tratamento não inoculado e não adubado (testemunha absoluta) e um tratamento não inoculado e adubado com N (testemunha nitrogenada). Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, por 120 dias. No primeiro experimento, a maior produção de matéria fresca das plantas ocorreu quando as plantas receberam 96 mg de N, enquanto a produção de matéria seca foi maximizada na dose 94,44 mg/planta. Portanto, em experimentos futuros, a dose de N a ser empregada como testemunha nitrogenada em experimentos com inoculação de *E. velutina* deve corresponder a 95 mg/planta. No segundo experimento, observou-se que as sete estirpes e a cepa referência inoculadas no mulungu foram capazes de nodular e se destacaram em relação à testemunha nitrogenada e à testemunha absoluta. A estirpe ESA75 apresentou o melhor desempenho para as variáveis altura de planta aos 60 e 120 dias, número de folhas, massa fresca e seca de parte aérea, massa fresca e seca total, massa seca de nódulos, massa fresca e seca de raiz.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio; mulungu; leguminosa; *Rhizobium*; nodulação.

4.2 INTRODUÇÃO

A ocorrência do gênero *Erythrina* pelo mundo é ampla, com cerca de 110 espécies distribuídas em regiões tropicais e sub-tropicais, sendo 70 delas nativas do continente americano (EPAMIG, 1993; VASCONCELOS et al., 2003). A *Erythrina velutina* Willd. é uma espécie arbórea nativa do Nordeste do Brasil, distribuída em todos os estados dessa região, podendo também ser encontrada na região Sudeste, sendo característica de várzeas úmidas e margens de rios temporários. No meio popular ganhou diferentes nomes, como canivete, bucaré, mulungu, mulungu-da-flor-vermelha, bico-de-papagaio, mulungu-da-flor-amarela, muchôco e mulungá (CARVALHO, 2008; APNE/CNIP, 2019).

A *E. velutina* faz parte da subfamília Faboideae (Papilionoideae), cujos indivíduos adultos podem atingir altura superior a 15 metros. Seu caule possui acúleos cônicos, a casca é levemente áspera e suas folhas são do tipo compostas trifoliadas, sua floração é de cor alaranjada ou vermelha intensa, o fruto é um legume, contendo 1 a 3 sementes, de cor vermelha-escura. A época de floração vai do final de agosto até dezembro e, nos dois primeiros meses do ano, os frutos amadurecem (LORENZI, 2002; CARVALHO, 2008).

A principal parte utilizada dessa arbórea é a madeira, destinada para a fabricação de móveis, cercas e outros objetos do dia a dia, sendo importante também para fins ornamentais (LORENZI, 2002). As sementes também são utilizadas para fins medicinais ou artesanato. Esse fato, aliado à dormência do tegumento, característica própria da espécie, limita a sua expansão no ecossistema, diminuindo o número de árvores na natureza (NEVES et al., 2006). Outra parte muito utilizada é a casca, cujo uso é frequente na medicina popular, principalmente no interior da região Nordeste (VIRTUOSO et al., 2005), devido às propriedades calmante e emoliente (LORENZI & MATOS, 2002). O extrato de suas folhas pode ser empregado como sedativo e bloqueador neuromuscular periférico (DANTAS et al., 2004), sendo uma espécie de grande potencial fármaco e de reflorestamento, por sua capacidade adaptativa.

A *E. velutina* é uma planta que cresce em meio às condições de seca e altas temperaturas na maior parte do ano e tem mostrado um comportamento de tolerância ou mecanismos de adaptações frente a estresses abióticos,

especialmente térmico, salino e hídrico, além de realizar simbiose com microrganismos capazes de fixar nitrogênio, tornando-a apta para ser utilizada na recuperação de áreas degradadas (HOLANDA et al., 2010; REIS, 2012). Os principais grupos de microrganismos nodulantes fixadores de N associados a *E. velutina* no Semiárido brasileiro são *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e *Paraburkholderia* (MENEZES et al., 2017; RODRIGUES et al., 2018).

Estudos com bactérias nodulantes nativas e adaptadas às condições de semiaridez são importantes para a produção de mudas saudáveis, vigorosas e com maior capacidade de se estabelecerem no campo (LASTE & FARIA, 2009). No entanto, estudos voltados para a produção de mudas de *E. velutina* são escassos (HOLANDA et., 2010) sendo necessário pesquisas mais amplas para que mudas de espécies adaptadas a regiões semiáridas sejam utilizadas para a recuperação de ambientes degradados e em sistemas agroflorestais.

Este trabalho teve como objetivos avaliar a eficiência simbiótica de isolados promissores de rizóbio para a produção de mudas de *E. velutina*, em condições de casa de vegetação, e determinar a quantidade de nitrogênio a ser aplicada como testemunha nitrogenada em experimentos desta natureza.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Teste de germinação

As sementes de *E. velutina* foram coletadas em 2014, no interior do município de Petrolina-PE, e foram beneficiadas manualmente e acondicionadas em saco plástico transparente (0,15 mm de espessura) e mantidas em câmara fria (10°C ± 3ºC, 40 ± 10% UR) até o início da avaliação. Os testes de germinação (Figura 4.1) foram realizados no Laboratório de Análise de Sementes da Embrapa Semiárido – LASESA, Petrolina, PE.

Antes do início dos testes, as sementes foram submetidas à assepsia, com imersão durante 10 minutos em solução com detergente neutro, seguida por 10 minutos em álcool 70% e 10 minutos em solução de hipoclorito 1%. Em seguida, foram lavadas em água destilada. Depois de secas, todas as sementes tiveram o tegumento externo escarificado com o auxílio de um esmeril de mão (Western R-40). Em seguida, as sementes foram separadas em quatro repetições de 25 sementes

cada e colocadas para germinar em três folhas de papel germitest umedecidas com 2,5 vezes o seu peso seco com água destilada. As folhas de papel foram embrulhadas em forma de rolo e, em seguida, levadas à câmara tipo BOD com temperatura constante de 30ºC, durante 14 dias, sendo fornecidas 24 horas de luz.

Durante o experimento, foram avaliadas a germinação e a formação de plântulas normais. A avaliação da germinação foi feita por 14 dias, sendo considerada semente germinada aquela em que ocorreu a protusão da radícula. Ao final do experimento, foi computado o número de plântulas normais formadas em cada tratamento, com isso obtendo-se o vigor germinativo das sementes.

Figura 4.1. Teste de germinação. A – Sementes de *Erythrina velutina*; B – Processo de assepsia; C – Câmara tipo BOD; D – Sementes com 7 dias na BOD. Fonte: O autor, 2019.

4.3.2 Teste de doses de nitrogênio (testemunha nitrogenada)

Para definir a dose ideal de N que deve ser fornecida à testemunha nitrogenada em experimentos de inoculação com *E. velutina*, nessa etapa do estudo foi realizada a avaliação do crescimento de mudas desta espécie em função do fornecimento de doses crescentes de NH_4NO_3 (0, 25, 50, 75, 100, 150, 200 e 300 mg/planta). O inicio da aplicação do fertilizante ocorreu depois da queda dos cotilédones, com aplicação semanal, durante 2 meses.

As mudas foram produzidas em vasos de poliestireno com capacidade para 500 mL. O substrato utilizado foi areia lavada misturada com vermiculita (Figura 4.2),

na proporção de 2:1 (volume:volume). Depois da mistura, o substrato foi autoclavado sob pressão de 1,0 atm e temperatura de 120ºC, por 1 hora. A autoclavagem foi repetida por duas vezes, com o intervalo mínimo de 48 horas entre os procedimentos. Em seguida, o substrato foi distribuído nos vasos e foi realizada a semeadura com sementes escarificadas.

Figura 4.2. Substrato. A – Areia misturada com vermiculita, na proporção de 2:1; B – Sacos plásticos com o substrato misturado; C – Autoclave; D – Distribuição nos vasos. Fonte: O autor, 2020.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento. Foram semeadas quatro sementes escarificadas por vaso e, aos 20 dias após a germinação, foi realizado o desbaste, deixando-se uma planta por vaso (Figura 4.3). Diariamente as mudas eram irrigadas com água autoclavada, a qual era colocada nos pratos sob os vasos.

Figura 4.3. Visão do experimento de *Erythrina velutina* em casa de vegetação aos três meses após a semeadura. Fonte: O autor, 2020.

Aos 60 dias após a emergência avaliou-se a altura e o diâmetro do caule. Com 120 dias após a emergência, foram avaliadas as seguintes variáveis: altura da planta, diâmetro de caule, produção de massa da parte aérea fresca e seca, número de folhas, teor de N de parte aérea, massa fresca e seca de raízes. A parte aérea das plantas e as raízes foram cortadas e acondicionadas em sacos de papel e colocadas em estufa a 65º C por 72 horas para avaliação da massa seca. O teor de nitrogênio foi determinado pelo método de semi-micro Kjedahl (LIAO, 1981). As raízes foram lavadas e acondicionadas em estufa, para a secagem e posterior pesagem para a determinação de sua massa seca.

4.3.3 Avaliação da eficiência de rizóbios

O segundo experimento consistiu na avaliação da eficiência de oito isolados de rizóbio na produção de mudas de *E. velutina*, além de um tratamento não inoculado e não adubado com nitrogênio (testemunha absoluta) e um tratamento não inoculado e adubado com nitrogênio (testemunha nitrogenada, que recebeu adição de 100 mg de N por planta), conforme as determinações da IN 13/2011 do MAPA. Dos isolados testados, sete são provenientes da Coleção de Microrganismos da Embrapa Semiárido (CMISA), sendo que cinco têm origem em áreas de vegetação da Caatinga no submédio do Vale do São Francisco (ESA 70, ESA 71, ESA 72, ESA 74 e ESA 75), caracterizadas por Menezes et al. (2016). Outros dois

isolados, ESA 90 e ESA 96, foram coletados em solos do município de Serra Talhada-PE, no Sertão de Pernambuco, e de Caruaru-PE, na zona do Agreste, em áreas de Caatinga (RODRIGUES et al., 2018). Além destes isolados promissores, foi incluído no experimento um inoculante de *Bradyrhizobium elkanii* cepa BR 5609 (SEMIA 6100), considerada como estirpe de referência, autorizada para uso como inoculante de *Erytrina verna*e.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições. Os procedimentos de preparo do substrato, semeadura e desbaste foram os mesmos descritos para o experimento de doses de nitrogênio.

Para a produção do inoculante, os isolados foram crescidos no interior de erlenmeyer, em 50 mL de meio YM (Figura 4.4). As bactérias foram cultivadas durante cinco dias em mesa de agitação a 120 rpm. Durante a semeadura dos tratamentos inoculados, 1 mL de caldo de cultivo foi distribuído sobre as sementes, utilizando uma pipeta e ponteiras para a inoculação. No tratamento testemunha nitrogenada a aplicação das doses de N foi semelhante à descrita no experimento anterior.

Aos 60 dias após a emergência foram avaliados altura e diâmetro de plantas. Aos 120 dias após a emergência, foram avaliados as variáveis: altura, diâmetro de caule, massa da parte aérea fresca e seca, massa de raízes fresca e seca, número de folhas, teor de N de parte aérea, número e massa de nódulos secos.

A parte aérea das plantas e as raízes foram cortadas e acondicionadas em sacos de papel e colocadas em estufa a 65º C por 72 horas para avaliação da massa seca. O teor de nitrogênio foi determinado pelo método de semi-micro Kjedahl (LIAO, 1981). As raízes foram lavadas e os nódulos destacados e contados, sendo ambos acondicionados em estufa, para a secagem e posterior pesagem para a determinação de sua massa seca.

Figura 4.4. Caldo de cultivo. A – Reagentes para a solução de YM; B – Béquer com a solução no agitador magnético; C – Mesa agitadora; D – Inoculação das sementes. Fonte: O autor, 2020.

4.3.4 Análises estatísticas

Os dados dos dois experimentos foram submetidos à análise de variância pelo software estatístico SAS (Statistical Analysis Systems).

Os efeitos das doses de N sobre os parâmetros avaliados foram analisados por análise de regressão, com ajuste do modelo matemático que melhor explicou o comportamento dos dados. Com base nesses ajustes, definiu-se a dose de N que seria utilizada como testemunha nitrogenada para comparação com os tratamentos inoculados.

Os tratamentos inoculados e não inoculados foram comparados pelo teste de F (α=0,05). A comparação entre os tratamentos inoculados e as testemunhas foi realizada por teste de comparação de médias de Duncan (α=0,05).

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Teste de germinação

Aos 14 dias após a incubação das sementes, foram avaliadas a porcentagem de germinação. Em todas as repetições houve 100% de germinação. Além disso, foram observadas 95,6% de plântulas normais, não sendo observada ocorrência de plântulas mortas.

4.4.2 Inoculação

As sete estirpes e a cepa referência inoculadas nas plantas de mulungu foram capazes de nodular. Não se constatou ocorrência de nodulação nas testemunhas absolutas e nas testemunhas adubadas (nitrogenadas) (Tabela 4.1), o que indica que não houve contaminação nos experimentos.

Houve diferença significativa entre as plantas inoculadas em relação às não inoculadas para as variáveis de altura de planta aos 60 dias, massa fresca parte aérea, massa seca parte aérea, número de folhas e massa seca total, para as quais foram observados maiores valores nos tratamentos inoculados (Tabela 4.1). O teor de Nitrogênio total na parte aérea das plantas também foi influenciado pela inoculação, com valores maiores nos tratamentos não inoculados, ou seja, naqueles que receberam adição de N mineral.

Os resultados obtidos para as variáveis altura de planta e número de folhas divergem dos encontrados por Silva et al. (2017), que analisaram os efeitos da inoculação de *Azospirillum brasilense* no mulungu e não observaram influência sobre estas variáveis. Diferenças significativas sobre as massas secas de parte aérea em mudas de mulungu em função da inoculação também foram observadas por Rodrigues et al. (2018). Segundo esses autores, os nove tratamentos inoculados apresentaram médias de matéria seca de parte aérea superiores às plantas não inoculadas, sendo a maior média a da cepa de referência (2,22 g/planta), enquanto

as plantas da testemunha absoluta produziram 1,03 g/planta e a testemunha nitrogenada produziu 0,98 g/planta.

Tabela 4.1. Efeitos de isolados microbianos sobre crescimento e desenvolvimento de plantas de *Erythrina velutina*

Variável	Inoculado	Não Inoculado
Altura da planta 60 dias (cm)	19,06±2,32 a	14,41±1,69 b
Altura da planta 120 dias (cm)	22,47±3,06 a	18,65±2,60 a
Diâmetro do colmo 60 dias (mm)	8,42±0,63 a	9,26±0,71 a
Diâmetro do colmo 120 dias (mm)	10,74±0,85 a	10,52±0,95 a
Massa fresca de parte aérea (g/planta)	9,98±1,59 a	7,16±1,34 b
Massa fresca de raízes (g/planta)	4,96±0,81 a	5,45±1,03 a
Massa seca de parte aérea (g/planta)	2,48±0,48 a	1,43±0,30 b
Massa seca de raízes (g/planta)	1,24±0,21 a	1,00±0,22 a
Número de folhas	7,06±0,86 a	4,35±0,98 b
Número de nódulos	14,53±4,96	-
Massa seca dos nódulos (g/planta)	0,08±0,01	-
Teor de N na parte aérea (g/kg)	3,67±0,36 b	10,89±1,74 a
Massa fresca total (g)	15,08±2,09 a	12,71±2,25 a
Massa seca total (g)	3,78±0,63 a	2,45±0,49 b

Valores representam a média±intervalo de confiança. Letras comparam médias na vertical. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste Duncan (α=5%). Fonte: O autor, 2021.

4.4.3 Doses de N mineral

A variável altura de plantas não foi influenciada pelas doses de nitrogênio dentro dos modelos avaliados: linear e quadrático (Figura 4.5 a). Para diâmetro de caule não houve efeito aos 60 dias, mas aos 120 dias houve efeito quadrático das doses de N, sendo o valor máximo obtido quando a dose de N correspondeu a 80,00 mg/planta conforme a equação de regressão ajustada (Figura 4.5 b).

Silva et al. (2018) estudaram, em um experimento de casa de vegetação no Nordeste do Brasil, a altura e diâmetro de *Leucaena leucocephala* aos 30, 60 e 90 dias, em tratamentos inoculados, nitrogenado (100 mg kg^{-1}) e sem adubação. Aos 30 dias não foram observadas diferenças entre os tratamentos, para ambas as variáveis, aos 60 dias, todos os tratamentos também apresentaram comportamentos semelhantes. Porém, aos 90 dias, dois tratamentos inoculados se destacaram para altura: 36F (57,2±9,1) e 45G (52,6±9,2) e quatro para diâmetro, sendo que destes, três eram tratamentos inoculados e um nitrogenado.

A massa fresca de raiz não sofreu influência da disponibilidade de nitrogênio (Figura 4.6 a). Entretanto, as doses de nitrogênio influenciaram o acúmulo de massa fresca de parte aérea e de massa seca total das plantas. Os maiores valores para essas duas variáveis foram obtidos quando as plantas receberam as seguintes doses de N: 101,16 e 96,00 mg/planta, respectivamente. Também não houve efeito das doses de N sobre a massa seca de raiz, diferente da massa seca de parte aérea, que foi influenciada pelas doses de fertilizante nitrogenado e cujo valor máximo foi observado nas plantas que receberam 103,45 mg/planta de N (Figura 4.6 b). Comportamento semelhante foi observado para a massa seca total de plantas, cujo valor máximo foi observado nas plantas que receberam 94,44 mg/planta de N ao longo do período experimental (Figura 4.6 b).

Na pesquisa conduzida por Calanzas et al. (2016), a aplicação de nitrogênio (5 mg N/planta/semana) na forma de nitrato de amônio, por 150 dias, em *Cratylia argentea* produziu a maior quantidade de massa seca de parte aérea (18,82 g/planta) em relação aos tratamentos inoculados e absoluto.

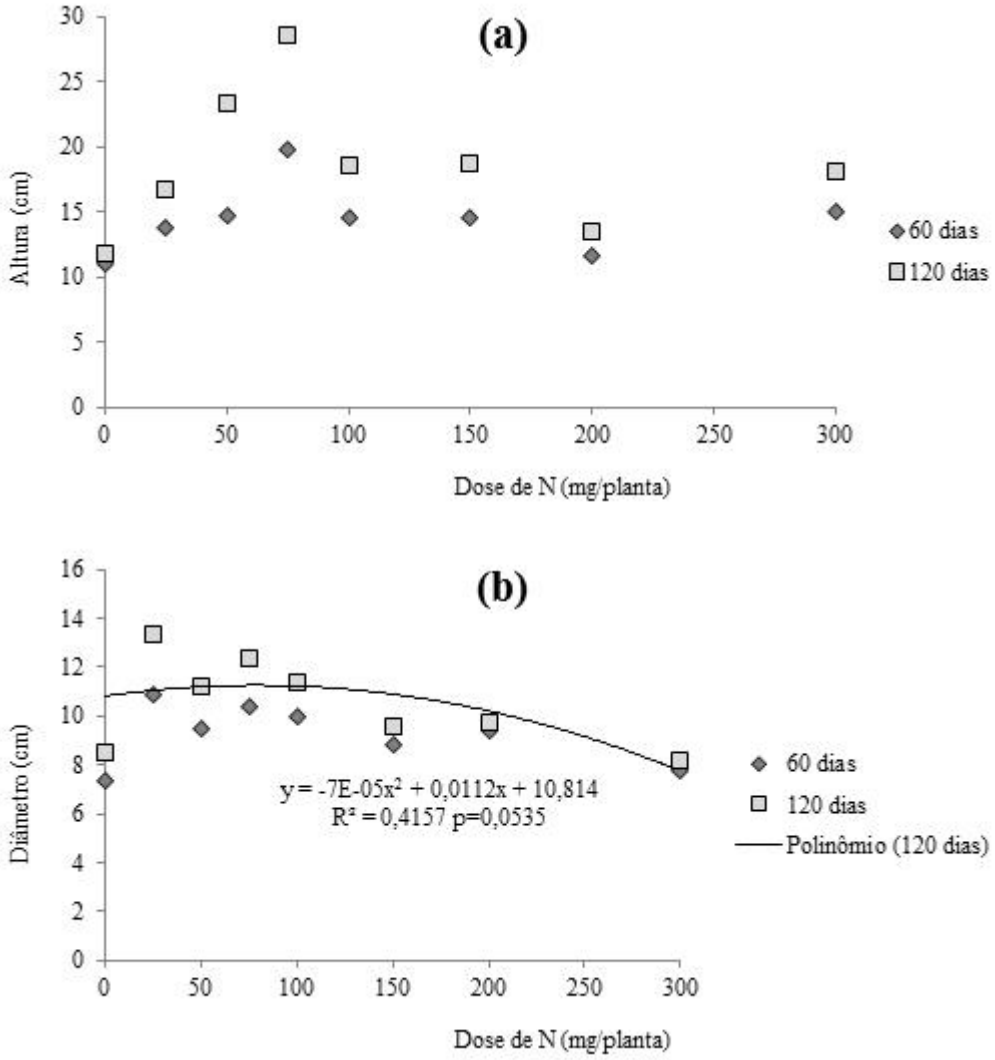

Figura 4.5. Efeitos de doses de N sobre a altura e o diâmetro do colmo de plantas de *Erythrina velutina.* Fonte: O autor, 2021.

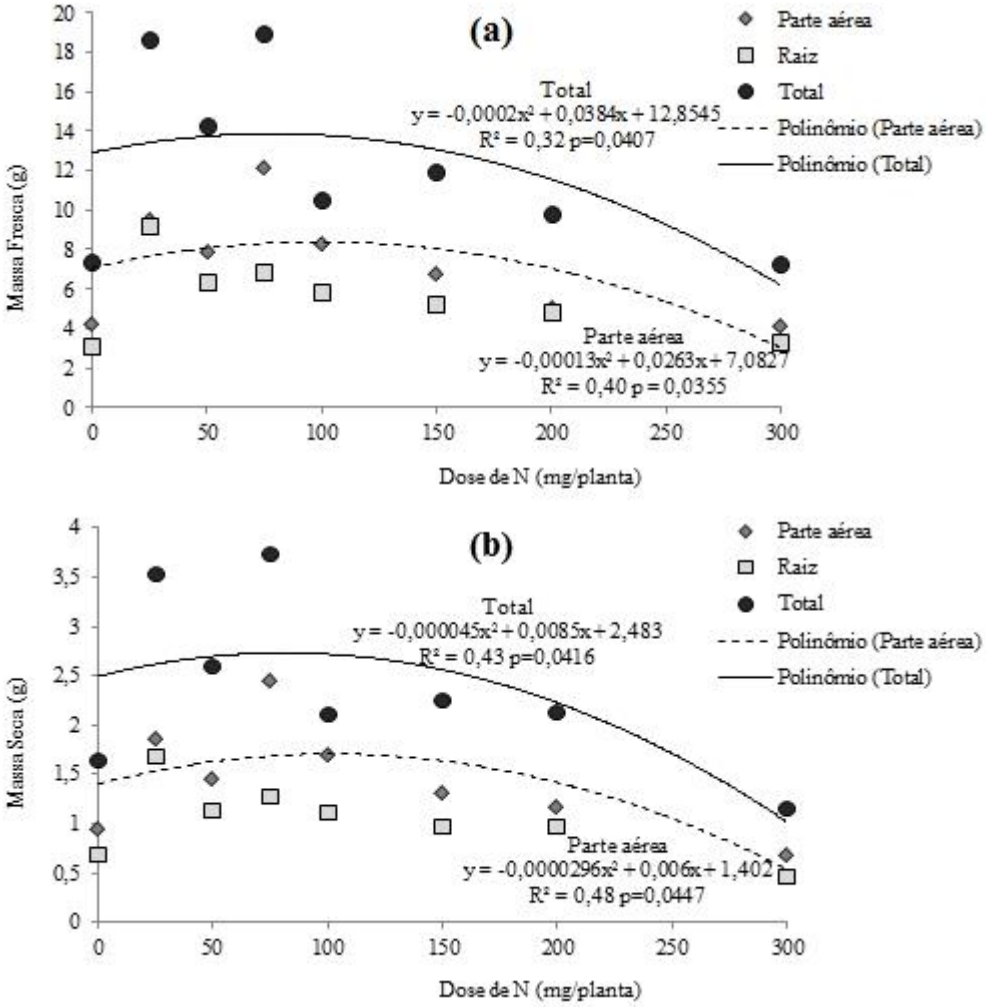

Figura 4.6. Efeitos de doses de N sobre massa fresca e seca de raízes e de parte aérea de plantas de *Erythrina velutina.* Fonte: O autor, 2021.

Para número de folhas e teor de nitrogênio de parte aérea, a influência das doses de N foi significativa (Figuras 4.7 a e 4.7 b). O número de folhas por planta decresceu linearmente com o aumento da dose de N, enquanto o teor de N na parte aérea das plantas aumentou quadraticamente com o aumento da dose de N fornecida às plantas.

Portanto, embora o aumento da dose de N fornecida às plantas não tenha aumentado a altura e tenha reduzido o número de folhas das mudas, houve incremento na produção de matéria fresca e de matéria seca das plantas. Os maiores valores para essas duas variáveis foram obtidos quando a quantidade de N fornecida às plantas ao longo de seu desenvolvimento foi equivalente a 96 e 94,44 mg/planta, respectivamente. Estes resultados permitem inferir que, em experimentos

futuros, a dose de N a ser empregada como testemunha nitrogenada em experimentos com inoculação de *E. velutina* deve corresponder a 95 mg/planta.

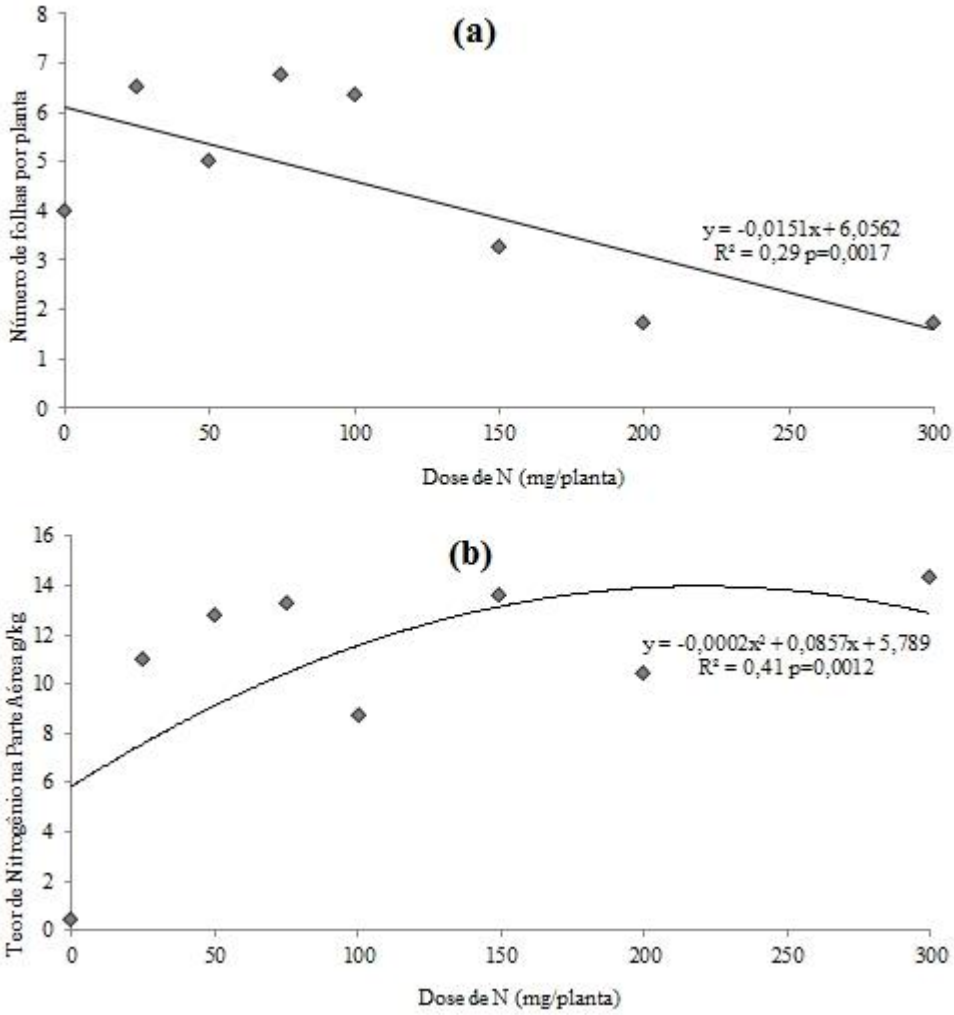

Figura 4.7. Efeitos de doses de N número de folhas e teor de N na parte aérea de plantas de *Erythrina velutina.* Fonte: O autor, 2021.

4.4.4 Avaliação de estirpes

Com base no resultado do ensaio anterior, a testemunha nitrogenada considerada nas comparações de avaliação das estirpes foi o tratamento correspondente à aplicação de 100 mg/planta de N, por ser o tratamento mais próximo à dose ideal para experimentos desta natureza.

A altura das plantas aos 60 dias variou de 11,05±4,84 cm (testemunha absoluta) a 25,55±2,18 cm (estirpe ESA75) (Tabela 4.2). A comparação entre os inoculantes permite verificar que as maiores alturas de plantas aos 60 dias foram

obtidas quando as sementes foram inoculadas com as estirpes ESA75, ESA71, ESA70, ESA74 (Tabela 4.2). Os menores valores de altura de plantas aos 60 dias foram observados para a testemunha absoluta e para a bactéria de referência. Com relação à altura aos 120 dias, a cepa ESA75 apresentou novamente a maior média (31,40±4,31 cm) (Figura 4.8), seguida das cepas ESA70, ESA71 e ESA90, enquanto as cepas ESA96 e ESA72 se igualaram ao tratamento nitrogenado e à testemunha absoluta, tratamento no qual a altura média das mudas foi de 11,85±6,09 cm (Tabela 4.2).

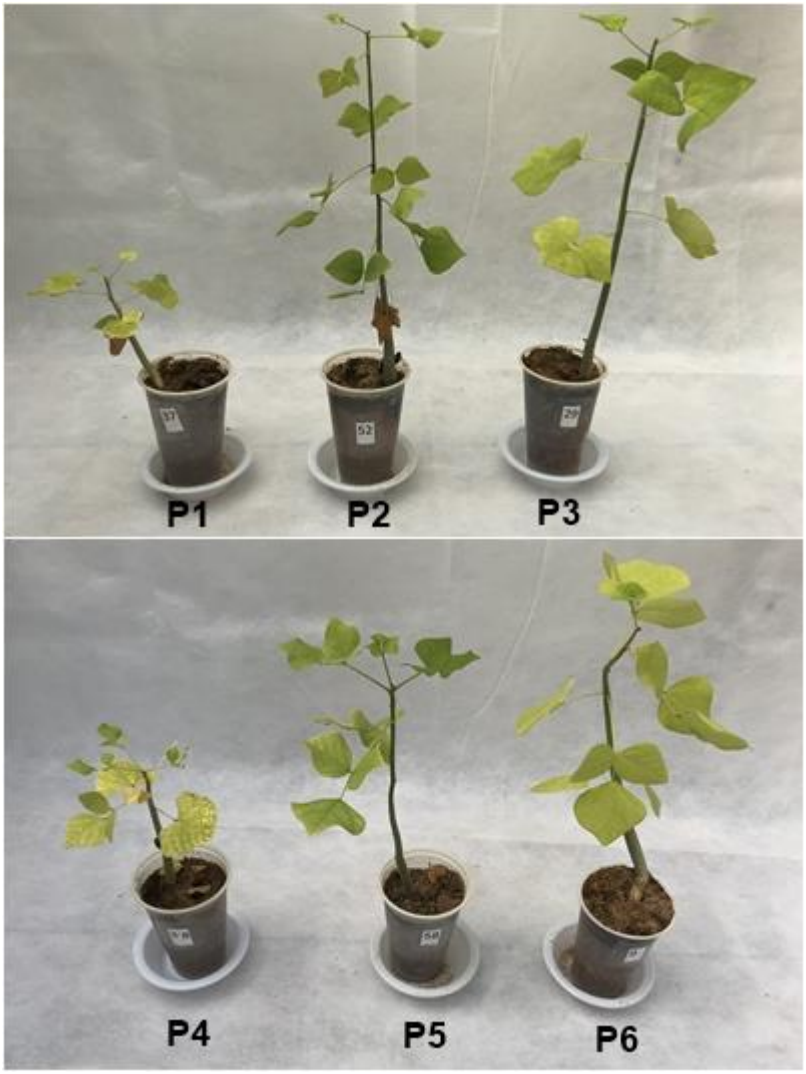

Figura 4.8. Avaliação da eficiência de estirpes de rizóbio na promoção do crescimento de *Erythrina velutina*: P1 e P4: Testemunha absoluta, P2 e P5: testemunha nitrogenada, P3: ESA75 e P6: ESA90. Fonte: O autor, 2021.

Lopes et al. (2019) analisaram a altura aos 60 dias de mudas de *E. velutina* submetidas ao estresse salino e à aplicação de ácido salicílico, apresentando

resultados de 16,49 e 13, 92 cm quando cultivadas em águas com condutividades elétricas de 0,5 e 9,0 dS m^{-1}, respectivamente. Já Singh e Patel (2016), estudando estirpes de *Rhizobium meliloti* na leguminosa *Trigonella foenum graecum* (feno-grego) cultivada na Índia, verificaram que uma das cepas inoculadas promoveu um incremento de 13% na altura das plantas em comparação com a testemunha nitrogenada, enquanto em comparação com a testemunha absoluta esse incremento foi de 87%. No presente estudo, a altura das plantas inoculadas com a estirpe ESA75 foi 59% superior à altura das plantas do tratamento testemunha nitrogenada e 164% superior à altura das plantas da testemunha absoluta, ou seja, resultados mais expressivos que os de Singh e Patel (2016).

O diâmetro de caule é um importante indicador de qualidade de mudas, pois está relacionado à sobrevivência e ao desenvolvimento das plantas em campo (DAVIS & JACOBS, 2005; BALOTA et al. 2011). Contudo, no presente estudo, os tratamentos não apresentaram diferença significativa para esta variável em nenhum dos dois períodos de avaliação (Tabela 4.2).

Com relação aos valores médios para números de folhas aos 120 dias, pode-se verificar que houve diferença estatística entre os isolados estudados, sendo os maiores valores encontrados para o isolado ESA74 (9,50±6,35) (Tabela 4.2). Valor semelhante foi observado por Oliveira et al. (2016), que avaliaram o crescimento inicial de *E. velutina* em diferentes substratos e obtiveram plantas com, em média, sete folhas aos 56 dias e com 10 folhas aos 112 dias de desenvolvimento.

Durante a fixação biológica de nitrogênio, que é a transformação do nitrogênio atmosférico em amônia por microrganismos em simbiose com plantas, ocorrem diversas reações metabólicas, que podem levar ao aumento do crescimento das plantas (FIGUEIREDO et al., 2010; CHIANU et al., 2011).

Tabela 4.2. Efeitos de diferentes isolados microbianos sobre altura (AL), diâmetro de caule (DC) e número de folhas (NF) ao longo do desenvolvimento de mudas de *Erythrina velutina*

	Variáveis				
Tratamentos	AL (cm) 60 dias	AL (cm) 120 dias	DC (mm) 60 dias	DC (mm) 120 dias	NF
ESA96	15,25±8,34 bc	18,28±10,54 bcd	9,00±2,66 a	11,35±3,02 a	6,50±2,06 abcd
ESA90	16,57±10,16 bc	22,57±16,27 abcd	7,51±1,01 a	9,96±3,75 a	7,75±4,18 abcd
ESA70	22,20±8,95 ab	27,47±13,69 ab	7,17±2,82 a	9,74±4,84 a	6,00±2,90 abcd
ESA71	22,30±7,10 ab	25,37±8,94 abc	8,07±1,16 a	10,17±2,08 a	5,00 bcd
ESA72	16,00±13,30 bc	18,00±13,59 bcd	9,88±4,58 a	12,03±6,27 a	6,00±3,44 abcd
ESA74	21,57±11,88 ab	22,25±9,97 bcd	7,71±2,05 a	8,92 a	9,50±6,35 a
ESA75	25,55±2,18 a	31,40±4,31 a	8,04±0,93 a	10,70±1,96 a	8,75±3,53 ab
Ref BR 5069	13,05±2,68 c	15,32±5,76 cd	9,98±3,08 a	12,17±2,11 a	8,25±5,09 abc
Testemunha nitrogenada	14,55±10,07 bc	19,67±16,53 bcd	9,99±2,38 a	11,37±4,52 a	6,33±3,80 cd
Testemunha absoluta	11,05±4,84 c	11,85±6,09 d	7,39±4,04 a	8,54±5,25 a	4,00±3,50 d

Valores representam a média±intervalo de confiança. Letras comparam médias na vertical. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste Duncan (α=5%). Fonte: O autor, 2021.

Em relação à massa fresca da parte aérea, houve diferença estatística entre os tratamentos, sendo os maiores valores encontrados para ESA75 (14,84±4,07 g), seguida pelos tratamentos ESA90, ESA74, ESA72, ESA71, BR 5609 e ESA70, os quais foram superiores aos encontrados nas plantas dos tratamentos testemunhas nitrogenada e absoluta (Tabela 4.3). Com relação à massa seca da parte aérea, o isolado ESA75 manteve a maior média (3,80±1,05 g), seguido por ESA72, ESA90, BR 5609 e as estirpes ESA71, ESA70, ESA74 e ESA96, todas superiores às testemunhas (Tabela 4.3).

Para massa fresca de raiz o tratamento com o inoculante de referência (BR 5609) obteve a maior média (7,77±1,91 g), seguido pelos isolados ESA75, ESA72, ESA96 e a testemunha nitrogenada. Resultado semelhante foi observado para a massa seca de raiz. Para esta variável, o inoculante de referência 5609 e as estirpes ESA96, ESA72, ESA75 e ESA90 apresentaram as maiores médias dos tratamentos inoculados e destacando-se em relação às testemunhas nitrogenada e absoluta. Considerando a massa fresca total, os maiores resultados foram observados com o isolado ESA75 (20,90±6,65 g) e com a cepa de referência BR 5609 (17,00±3,43 g), enquanto os maiores valores de massa seca total foram observados com inoculação pelo isolado ESA75 (5,17±1,55 g) (Tabela 4.3).

No semiárido da Paraíba, aos 60 dias de plantio, a inoculação de isolados em *Enterolobium contortisiliquum* Vell. demonstrou que as plantas inoculadas apresentaram massa seca de parte aérea superior à testemunha sem inoculação. Nesse mesmo trabalho, cinco isolados se destacaram em relação à testemunha na produção de massa seca de raiz (MOREIRA et al., 2012). Fitouri et al. (2012) constataram que a leguminosa *Hedysarum coronarium* L. inoculada com estirpes isoladas no norte da Tunísia promoveram incrementos de rendimento seco de parte aérea da ordem de 170% em relação ao controle nitrogenado e Odee et al. (2002), que inocularam *Calliandra calothyrsus* com a cepa KCC13, observaram um aumento significativo na massa seca de raiz das plantas.

Já Rodrigues et al. (2018), trabalhando com mulungu, não encontraram diferença significativa para as variáveis de massa seca de parte aérea e massa seca de raiz em função da inoculação com estirpes de rizóbios. Em estudos com *Acacia nilotica,* a massa seca de raiz também não demonstrou diferenças significativas entre as plantas inoculadas e não inoculadas (LESUEUR et al., 2005).

Maiores quantidades de nódulos foram observadas nas plantas inoculadas com as estirpes ESA90, ESA75, Referência BR 5609 e ESA96. Dentre os tratamentos avaliados, as plantas inoculadas com a estirpe ESA75 obtiveram a maior média de massa seca de nódulos (0,11±0,05 g) (Tabela 4.4).

Tabela 4.3. Efeitos de diferentes isolados microbianos sobre massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa fresca de raiz (MFR), massa seca de raiz (MSR), massa fresca (MF) total e de massa seca (MS) total de *Erythrina velutina* ao longo do desenvolvimento das mudas

	Variáveis					
Tratamentos	MFPA (g)	MSPA (g)	MFR (g)	MSR (g)	MF total (g)	MS total (g)
ESA96	8,02±5,96 b	2,05±1,76 abc	5,52±0,99 ab	1,54±0,49 ab	13,54±5,42 ab	3,59±1,38 abc
ESA90	9,90±8,66 ab	2,36±1,88 abc	4,12±3,30 ab	1,13±0,87 ab	14,02±13,86 ab	3,49±3,43 abc
ESA70	9,16±4,26 ab	2,11±0,65 abc	3,06±1,73 b	0,76±0,43 b	12,22±3,75 ab	2,87±1,01 abc
ESA71	9,41±3,86 ab	2,21±0,92 abc	3,74±3,25 b	0,97±0,68 ab	13,15±5,12 ab	3,19±1,41 abc
ESA72	9,51±8,77 ab	2,84±1,58 ab	5,55±5,12 ab	1,50±1,13 ab	15,05±14,57 ab	4,35±2,77 ab
ESA74	9,55 ab	2,11 abc	3,88±1,87 b	0,87±0,61 b	14,45 ab	3,30 abc
ESA75	14,84±4,07 a	3,80±1,05 a	6,06±2,73 ab	1,37±0,54 ab	20,90±6,65 a	5,17±1,55 a
Ref BR 5069	9,24±3,65 ab	2,22±0,86 abc	7,77±1,91 a	1,81±0,49 a	17,00±3,43 a	4,03±0,74 abc
Testemunha nitrogenada	8,22±7,41 b	1,69±1,18 bc	4,97±3,56 ab	0,89±0,83 ab	14,02±11,66 ab	2,79±2,14 bc
Testemunha absoluta	4,24±3,93 b	0,95±0,80 c	3,10±2,77 b	0,68±0,17 b	7,34±6,53 b	1,62±1,48 c

Valores representam a média±intervalo de confiança. Letras comparam médias na horizontal. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste F (α=5%). Fonte: O autor, 2021.

Rodrigues et al. (2018) também utilizaram a cepa de referência BR 5609 em um ensaio com mulungu em casa de vegetação e observaram que este inoculante promoveu os maiores valores para número de nódulos (31) e de massa seca de nódulos (105,75 mg). Nesse mesmo trabalho, outros dois isolados também apresentaram bom desempenho com relação à produção de mudas: ESA 97 e ESA 98.

Tabela 4.4. Produção média de número de nódulos e massa seca de nódulos ao longo do desenvolvimento de mudas de *Erythrina velutina*

Tratamentos	Número de Nódulos	Massa seca de nódulos (g)
ESA96	17,75±8,46 ab	0,10±0,06 ab
ESA90	28,25±19,22 a	0,06±0,04 c
ESA70	11,00±2,82 bc	0,07 bc
ESA71	5,00±0,81 c	0,08±0,03 abc
ESA72	5,50±4,78 c	0,06±0,05 c
ESA74	4,75±2,22 c	0,07 bc
ESA75	22,00±19,48 ab	0,11±0,05 a
Ref BR 5069	22,00±19,31 ab	0,08±0,03 abc

Valores representam a média±intervalo de confiança. Letras comparam médias na vertical. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste Duncan (α=5%). Fonte: O autor, 2021.

Já Lebrazi et al. (2018), trabalhando com inoculação de diferentes cepas em *Acacia cyanophylla e A. horrida,* no Marrocos, observaram que o isolado mais infectante apresentou 81±3,53 nódulos por planta, enquanto o isolado menos infeccioso foi capaz de induzir a formação de 31 nódulos.

O processo de nodulação em leguminosas está inteiramente ligado à variedade de espécies nodulantes nativas. Esse processo simbiótico pode ser influenciado por mecanismos químicos lançados ao meio pelas raízes das plantas e também por processos de uso do solo (TEIXEIRA et al., 2010). No Semiárido, as bactérias com capacidade de nodular possuem capacidade de crescimento rápido, permitindo a esses microrganismos mecanismos de sobrevivência nesse ambiente, sendo que a tolerância está relacionada à rápida multiplicação em curto espaço de tempo, explicando a maior frequência dessas bactérias em solos dessa região (MEDEIROS et al. 2009).

Os dados relativos ao teor de N da parte aérea seca das plantas mostram que o tratamento com a testemunha nitrogenada apresentou a maior média em relação aos outros tratamentos: 11,58 g/kg de N de tecido vegetal seco (Tabela 4.5). Rufini et al. (2014) pesquisando a eficiência de cepas bacterianas em *Vigna unguiculata* (L.)

Walp. no estado de Minas Gerais, também constataram que o acúmulo de N na parte aérea das plantas foi superior na testemunha nitrogenada (80 kg de ureia ha^{-1}) com média de 595,4 mg/planta, valor superior em relação às plantas inoculadas (332,57 mg/planta) e a testemunha absoluta (296,8 mg/$planta^{-1}$).

Já Lebrazi et al. (2018), trabalhando com *Acácia cyanophylla* no Marrocos, observaram que três isolados se destacaram em relação à testemunha nitrogenada (0,5% de KNO_3 (p / v) semanalmente por 6 meses): o isolado I1 que acumulou mais nitrogênio na parte aérea (0,75 g/planta) e os isolados I6 e I27 que acumularam 0,34 e 0,38 g de N/planta, respectivamente.

Tabela 4.5. Efeitos de diferentes isolados microbianos sobre o teor de nitrogênio na parte aérea (TNPA) de *Erythrina velutina* ao longo do desenvolvimento das mudas

Tratamentos	TNPA (g/kg)
ESA96	3,41±0,47 bc
ESA90	3,78±0,86 b
ESA70	3,01±1,03 bc
ESA71	2,79±0,94 bc
ESA72	3,93±2,07 b
ESA74	5,24 b
ESA75	4,07±0,69 b
BR 5609	3,93±1,34 b
Testemunha nitrogenada	11,58±7,06 a
Testemunha absoluta	0,43±0,17 c

Valores representam a média±intervalo de confiança. Letras comparam médias na vertical. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste Duncan (α=5%). Fonte: O autor, 2021.

4.5 CONCLUSÕES

O experimento em casa de vegetação com a inoculação de mudas de *E. velutina* mostrou que a maioria das variáveis analisadas: altura de planta aos 60 dias, massa fresca de parte aérea, massa seca de parte aérea, número de folhas e massa seca total, apresentou diferença significativa entre as plantas inoculadas em relação às não inoculadas. A estirpe ESA75 apresentou os melhores resultados para altura aos 60 e 120 dias, número de folhas, massa fresca e seca de parte aérea, massa

fresca e seca total, massa seca de nódulos, também se destacando em relação a massa fresca e seca de raiz. Os isolados ESA90, ESA72, ESA71, ESA70, ESA74 e ESA96 apresentaram resultados superiores em comparação com a testemunha nitrogenada e absoluta em pelo menos 5 variáveis estudadas.

Os resultados encontrados para doses de N, permitem concluir que, em experimentos futuros, a dose de N a ser empregada como testemunha nitrogenada em experimentos com inoculação de *E. velutina* deve corresponder a 95 mg/planta.

4.6 REFERÊNCIAS

APNE/CNIP - Associação Plantas do Nordeste/Centro Nordestino de Informações sobre Plantas. **Banco de dados LPN**. Disponível em: <www.cnip.org.br>. Acesso em: 02 outubro. 2019.

BALOTA, E. L. et al. Physic nut plants present high mycorrhizal dependency under conditions of low phosphate availability. **Brazilian Society of Plant Physiology**. v. 23, n. 1, p. 33–44, 2011.

CALAZANS, G. M.; OLIVEIRA, C. A. D.; CRUZ, J. C.; MATRANGOLO, W. J. R.; MARRIEL, I. E. Selection of efficient rhizobial symbionts for Cratylia argentea in the cerrado biome. **Ciência Rural**, v. 46, n. 9. p. 1594-1600, 2016.

CALIXTO JUNIOR, J.T.; DRUMOND, M.A. Estrutura e distribuição espacial de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret em dois fragmentos de Caatinga em Pernambuco. **Revista Caatinga**, v. 24, p. 95-100, 2015.

CAMPANHA, M.M. **Árvores e arbustos do sistema agrossilvipastoril Caprinos e Ovinos**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, p. 32, 2010.

CARVALHO, O.; EGLER, C. A. G. **Alternativas de desenvolvimento para o Nordeste semiárido**. Fortaleza, CE: Banco do Nordeste do Brasil, 2003.

CARVALHO, P.E.R. Mulungu (*Erythrina velutina*). Circular Técnica 160, 1º Ed. **Embrapa Florestas**, Colombo, PR, Dez. 2008, 8 p.

CASTRO, A.S. & CAVALCANTE, A. Flores da caatinga. Campina Grande: **Instituto Nacional do Semiárido**, p. 116, 2011.

CHIANU, J.N.; NKONYA, E.M.; MAIRURA, F.S.; CHIANU, J.N.; AKINNIFESI, F.K. Biological nitrogen fixation and socioeconomic factors for legume production in sub-Saharan Africa: a review. **Agron. Sust. Dev**. v. 31, p. 139–154, 2011.

DANTAS MC; OLIVEIRA FS; BANDEIRA SM; BATISTA JS; SILVA JUNIOR CD; ALVES PB; ANTONIOLLI AR; MARCHIORO M. Central nervous system effects of

the crude extract of Erythrina velutina on rodents. **J Ethnopharmacol**, v. 94, p. 129-133, 2004.

DAVIS, A. S.; JACOBS, D. F. Quantifying root system quality of nursery seedlings and relationship to outplanting performance. **New Forests**, v. 30, p. 295-311, 2005

DICKSON, A.; LEAF, A.; HOSNER, J.F. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. **Forestry Chronicle**, v. 36, p. 10-13, 1960.

EPAMIG - Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. O Gênero Erythrina L. no PAMG - Herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. **Daphne**, v. 3, p. 20-25, 1993.

FIGUEIREDO, M.V.B.; SOBRAL, J.K.; STAMFORD, T.L.M.; ARAÚJO, J.M; BURITY, H.A.; OLIVEIRA, J.P.O.; SANTOS, C.E.R.S.; STAMFORD, N.P. Bactérias promotoras do crescimento de plantas: estratégia para uma agricultura sustentável. Biotecnologia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais. **Embrapa Agrobiologia**. p. 387–414, 2010.

FITOURI, S. D.; TRABELSI, D.; SAÏDI, S.; ZRIBI, K.; JEDDI, F. B.; MHAMDI, R. Diversity of rhizobia nodulating sulla (Hedysarum coronarium L.) and selection of inoculant strains for semi-arid Tunisia. **Annals of microbiology**, v. 62, n. 1, p. 77-84, 2012.

HOLANDA, F. S. R.; GOMES, L. G. N.; ROCHA, I. P.; SANTOS, T. T.; ARAÚJO FILHO, R. N.; VIEIRA, T. R. S.; MESQUITA, J. B. Crescimento inicial de espécies florestais na recomposição da mata ciliar em taludes submetidos à técnica da bioengenharia de solos. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 20, n.1, p.157-166, 2010.

LASTE, K.C.D.; FARIA, S.M.; Estirpes de bactérias selecionadas para otimização da fixação biológica de nitrogênio em leguminosas florestais. Seropédica, **Embrapa Agrobiologia**, 2009 (Comunicado técnico, 120).

LEBRAZI, S.; CHRAIBI, M.; FADIL, M.; BARKAI, H.; FIKRI-BENBRAHIM, K. Phenotypic, Genotypic and Symbiotic Characterization of Rhizobial Isolates Nodulating Acacia sp. in Morocco. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 249-263, 2018.

LESUEUR, D., SARR, A., DIOP, B., PELTIER, R., NEYRA, M. Effect of rhizobial inoculation methods and host plant provenances on nodulation and growth of Acacia senegal and Acacia nilotica. **New Forests**. v. 29, p. 75-87, 2005.

LIAO, C. F. H. Devarda's Alloy Method for Total Nitrogen Determination 1 CHRISTINA F. H. LiAO 2. n. 3, p. 852–855, 1981.

LIMA, J. L. S. **Plantas forrageiras das Caatingas: uso e potencialidades**. Petrolina: EMBRAPACPTASA/PNE/RBG-KEW, p. 28, 1996.

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

LOPES, M. D. F.Q.; da SILVA, T. I.; NÓBREGA, J. S.; da SILVA, R. T.; FIGUEIREDO, F. R. A.; & BRUNO, R. D. L. A. Crescimento de Erythrina velutina willd. submetida a estresse salino e aplicação de ácido salicílico. **Colloquium Agrariae**. v. 15, n. 4, p. 31-38, 2019.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Nova Odessa Plantarum, p. 384, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda., 2002.

MAGALHÃES, A. R. As mudanças climáticas globais e a desertificação. ANGELOTTI F; SÁ BI; MENEZES EA; PELLEGRINO, GQ.(Editores Técnicos). **Mudanças Climáticas e Desertificação no Semi-Árido Brasileiro**. Petrolina-PE, Embrapa Semi-Árido, Cap, v. 1, p. 19, 2009.

MAIA, G. N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: D&Z, p. 237-413, 2004.

MEDEIROS, E.V.; MARTINS, C.M.; LIMA, J.A.M.; FERNANDES, Y.T.D.; OLIVEIRA, V.R.; BORGES, W.L. Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do Estado do Rio Grande do Norte. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, p. 529-535, 2009.

MENEZES, K.A.S., ESCOBAR, I.E.C., FRAIZ, A.C.R., MARTINS, L.M.V., FERNANDES-JÚNIOR, P.I., Genetic Variability and Symbiotic Efficiency of Erythrina velutina Willd. Root Nodule Bacteria from the Semi-Arid Region in Northeastern Brazil. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**. 41, e01600302, 2017.

MOREIRA, F. T. A.; SANTOS, D. R.; SILVA, G. H.; ALENCAR, L. S. OBTENÇÃO DE ESTIRPES DE RIZÓBIO EFICIENTES NA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM TAMBORIL (Enterolobium contortisiliquum (Vell.) Morong). **HOLOS**, v. 4, p. 69-79, 2012.

MOURA, M. S. B. de, et al. **Potencialidades de água da chuva no Semi-Árido brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2007.

NEVES, T. S.; CARPANEZZI, A. A.; RIBAS, K. C. Z.; MARENCO, R. A. Enraizamento de corticeira-da-serra em função do tipo de estaca e variações sazonais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 41, n. 12, p. 1699-1705, 2006.

NUNES, X.P.; MESQUITA, R.F.; SILVA, D.A.; LIRA, D.P.; COSTA, V.C.O.; SILVA, M.V.B.; XAVIER, A.L.; DINIZ, M.F.F.M.; AGRA, M.F. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de Mimosa paraibana Barneby (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 718-723, 2008.

ODEE, D.W.; INDIEKA, S.A.; LESUEUR, D. Evaluation of inoculation procedures for Calliandra calothyrsus Meisn grown in tree nurseries. **Biology and Fertility Soils**. v. 36, p. 124–128, 2002.

OLIVEIRA, M. K. T., DOMBROSKI, J. L. D., de MEDEIROS, R. D. C. A., TOMCZAK, V. E., & de FARIAS, R. M. Crescimento inicial de Erythrina velutina em diferentes substratos com adubação orgânica. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. V. 11, n. 5, p. 30-38, 2016.

OZAWA, M.; HONDA, K.; NAKAI. I.; KISHIDA, A.; OHSAKI, A. Hypaphorine, an indole alkaloid from Erythrina velutina, induced sleep on normal mice. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**. v. 18, p. 3992-3994, 2009.

QUEIROZ, L.P. **Leguminosas de Caatinga, espécies com potencial forrageiro**. In: Anais Plantas do Nordeste Workshop Geral, 1 Recife, 1996. Royal Botanic Gardens, Kew, p. 63-75, 1999.

REIS, R. C. **Tolerância a estresses abióticos em sementes de Erythrina velutina Willd, (Leguminosae - Papilionoideae) nativa da Caatinga**. 132 f. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2012.

RODRIGUES, D.R., SILVA, A.F. da, CAVALCANTI, M.I.P., ESCOBAR, I.E.C., FRAIZ, A.C.R., RIBEIRO, P.R. de A., FERREIRA-NETO, R.A., FREITAS, A.D.S. de, FERNANDES-JÚNIOR P.I., Phenotypic, genetic and symbiotic characterization of Erythrina velutina rhizobia from Caatinga dry forest. **Brazilian J. Microbiol**. V. 49, p. 503–512, 2018.

RUFINI, M.; Da SILVA, M. A. P.; FERREIRA, P. A. A.; de SOUZA CASSETARI, A.; SOARES, B. L.; De ANDRADE, M. J. B.; de SOUZA MOREIRA, F. M. Symbiotic efficiency and identification of rhizobia that nodulate cowpea in a Rhodic Eutrudox. **Biology and Fertility of Soils**, v. 50, n. 1, p. 115-122, 2014.

SILVA, B.R.F.Da.; COSTA, T.L.n.Da.; FAGUDES, C.M.; VIEIRA, F.A. **Efeito da inoculação de bactérias nitrificantes via semente no desenvolvimento da espécie erythrina velutina wild**.. Anais II CONIDIS... Campina Grande: Realize Editora, 2017. Disponível em: <http://www.editorarealize.com.br/index.php/artigo/visualizar/33443>. Acesso em: 12/05/202

SILVA, V. S. G.; de ROSALIA E SIVA SANTOS, C. E.; de FREITAS, A. D. S.; STAMFORDM, N. P.; da SILVA, A. F.; de LYRA, M. D. C. C. P.; da SILVA FERREIRA, J. Symbiotic efficiency of native rhizobia in legume tree'Leucaena leucocephala'derived from several soil classes of Brazilian Northeast region. **Australian Journal of Crop Science**, v. 12, n. 3, p. 478, 2018.

SINGH, N. K.; PATEL, D. B. Performance of fenugreek bioinoculated with Rhizobium meliloti strains under semi-arid condition. **Journal of Environmental Biology**, v. 37, n. 1, p. 31, 2016.

TEIXEIRA, F.C.P.; BORGES, W.L.; XAVIER G.R.; RUMJANEK N.G.; Characterization of indigenous rhizobia from caatinga. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 201- 208, 2010.

VASCONCELOS SMM, Rebouças Oliveira G, Mohana de Carvalho M, Rodrigues ACP, Rocha Silveira E, Fonteles MFM, Florenço Sousa FC, Barros Viana GS. Antinociceptive activities of the hydroalcoholic extracts from Erytrhrina velutina and Erythrina mulungu in mice. **Biol Pharm Bull**, v. 26, p. 946 -949, 2003.

VIRTUOSO, S.; DAVET, A.; DIAS, J.F.G.; CUNICO, M.M.; MIGUEL, M.D.; OLIVEIRA, A.B.; MIGUEL, O.G. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd, Fabaceae (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 137-142, 2005.

5 Eficiência simbiótica de rizóbios para *Mimosa tenuiflora* Poir.

5.1 RESUMO

A *Mimosa tenuiflora* Poir., popularmente conhecida como jurema-preta, pertence à subfamília Mimosoideae, estando disseminada no Semiárido brasileiro. É uma espécie pioneira e colonizadora de áreas degradadas ou em estado de degradação e possui capacidade de associar-se simbioticamente com microrganismos que realizam fixação biológica de nitrogênio. Este trabalho teve como objetivo determinar a quantidade de nitrogênio para uso como testemunha nitrogenada em experimentos de eficiência simbiótica com jurema-preta, bem como avaliar a eficiência simbiótica de diferentes isolados promissores de rizóbio para a produção de mudas de *M. tenuiflora* em condições de casa de vegetação. No primeiro experimento foram testadas doses crescentes de nitrogênio (0, 25, 50, 75, 100, 150, 200 e 300 mg/planta), aplicadas semanalmente às mudas a partir dos 30 dias após a semeadura. No segundo experimento, avaliou-se a eficiência simbiótica de sete isolados e de uma estirpe de referência (ESA637, ESA630, ESA629, ESA626, ESA673, ESA628, ESA671 e BR 5609), além da testemunha nitrogenada (não inoculada e adubada com NH_4NO_3) e da testemunha absoluta (não inoculado e não adubados). Ambos os experimentos foram conduzidos por 120 dias, em delineamentos inteiramente casualizados. Houve um efeito linear negativo das doses de N sobre a produção matéria seca de parte aérea e total das plantas. A matéria seca de raiz foi máxima quando as plantas receberam adubação com 133 mg/planta de N, sendo esta dose indicada para ser empregada como testemunha nitrogenada em experimentos com inoculação de *M. tenuiflora*. As sete estirpes e a cepa referência inoculadas na jurema-preta foram capazes de nodular. Todas as variáveis analisadas apresentaram maiores valores nas plantas inoculadas em relação às não inoculadas. Destacaram-se a eficiência das estirpes ESA637, ESA673 e ESA671 para altura de plantas, ESA628, ESA629, ESA630 para massa fresca de raiz e massa fresca total e ESA673 e ESA629 para o número de nódulos. Com base no desempenho global, os isolados mais promissores foram ESA673, ESA629, ESA628 e ESA671.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio; jurema-preta; leguminosa; *Rhizobium*; nodulação.

5.2 INTRODUÇÃO

A *Mimosa tenuiflora* Poir., popularmente conhecida como jurema-preta, pertence à família Fabaceae, subfamília Mimosoideae, gênero *Mimosa.* É uma leguminosa predominante do Semiárido brasileiro, ocorrendo desde o estado de Minas Gerais até os estados da região Nordeste, com exceção do Maranhão (ARAÚJO et al., 2010; APNE/CNIP, 2019). Quando adulta, pode chegar a sete metros de altura, tendo como características: muita ramificação, cascas de cor castanho-escura, grossa, rugosa e com fendas longitudinais, possuindo folhas compostas, inflorescência em formato de espigas, flores brancas pequenas e frutos pequenos na forma de vagem, com sementes ovais, achatadas e de cor castanho-clara (CAMPANHA, 2010).

A floração da jurema-preta, que acontece no período seco do ano, entre os meses de novembro e dezembro, é muito expressiva, embora tenha duração de apenas alguns dias (MAIA-SILVA et al., 2012). Assim, uma grande quantidade de pólen fica disponível para as abelhas, sendo de grande importância para a manutenção desses agentes polinizadores durante em uma época de escassez de alimento (ARAÚJO et al., 2000).

Sua madeira é muito utilizada como lenha e na produção de carvão e também para a produção de estacas de cerca e fabricação de móveis (LORENZI, 2002). Além disso, a jurema-preta também possui um grande potencial tanífero, sendo utilizada na curtição de peles (PAES et al., 2006). Na medicina popular, a parte mais utilizada é a casca, que é aplicada no tratamento de queimaduras, de inflamações e de infecções, além do uso como antitérmico e em rituais religiosos indígenas (MAIA, 2004; BEZERRA, 2008).

Essa espécie arbórea é pioneira e colonizadora de áreas degradadas ou em estado de degradação e se destaca por conseguir se estabelecer em solos compactados (CAMPANHA, 2010) e que sofrem com erosão (MAIA, 2004). Por isso, possui papel fundamental no início da regeneração de ambientes naturais ou antropizados. Além disso, possui potencial forrageiro, podendo ser fornecida aos

rebanhos de caprinos e ovinos tanto *in natura* quanto na forma de feno, sendo de importante para a segurança alimentar animal no semiárido brasileiro (PEREIRA FILHO et al., 2003).

A jurema-preta possui capacidade de estabelecer uma relação de simbiose com bactérias diazotróficas que realizam a fixação biológica de nitrogênio. Nos últimos anos, estudos têm avaliado a diversidade de rizóbios dessa leguminosa (FREITAS et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2010). De acordo com Bournaud et al. (2013) a *paraburkholderia*, um microrganismo nodulante, se mostrou eficiente na fixação de nitrogênio, em simbiose com espécies do gênero *Mimosa*. Devido à sua adaptação aos fatores edafoclimáticos limitantes do semiárido brasileiro e à associação com microrganismos fixadores de N, a jurema-preta mostra-se como uma espécie capaz de enriquecer solos empobrecidos em nitrogênio, aumentando sua fertilidade.

Este trabalho teve como objetivo determinar a quantidade de nitrogênio para uso como testemunha nitrogenada em experimentos de eficiência simbiótica com jurema-preta, bem como avaliar a eficiência simbiótica de diferentes isolados promissores de rizóbio para a produção de mudas de *M. tenuiflora* em condições de casa de vegetação.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1 Teste de germinação

As sementes de *M. tenuiflora* foram coletadas em janeiro de 2020, no interior do município de Petrolina-PE. Após a coleta, foram beneficiadas manualmente e acondicionadas em saco plástico transparente (0,15 mm de espessura) e, na sequência, foram armazenadas em câmara fria (10°C ± 3ºC, 40 ± 10% UR) até a realização dos experimentos.

O teste de germinação (Figura 5.1) das sementes de jurema-preta foi realizado no Laboratório de Análise de Sementes da Embrapa Semiárido – LASESA, em Petrolina-PE. Para superar a dormência tegumentar, as sementes foram imersas em ácido sulfúrico (H_2SO_4) por 10 minutos e lavadas com água destilada. O teste foi realizado com 4 repetições de 28 semenstes cada. As sementes foram acondicionadas no interior de quatro caixas gerbox (cada caixa representando uma repetição), sobre dois papéis mata borrão, previamente umedecidos com 12 ml de

água destilada. Em seguida, as caixas gerbox foram mantidas em câmara tipo BOD com temperatura constante de 25ºC, com 24 horas de luz.

A avaliação da germinação foi feita por 14 dias, sendo considerada semente germinada aquela em que ocorreu a protusão da radícula. Ao final do experimento, no décimo quarto dia, foi computado o número de plântulas normais formadas em cada tratamento, obtendo-se o vigor germinativo das sementes.

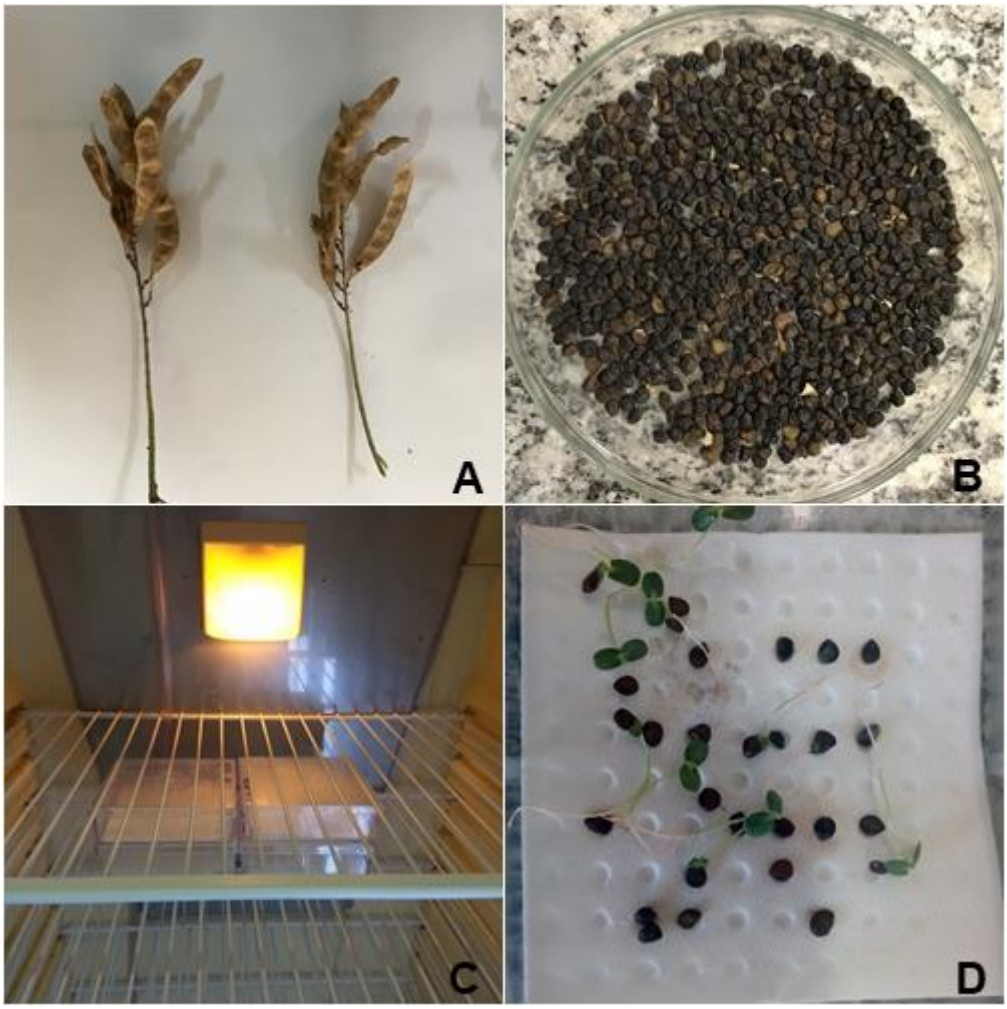

Figura 5.1. Teste de germinação. A – Vagens de *Mimosa tenuiflora*; B – Sementes beneficiadas; C – Câmara tipo BOD; D – Sementes com 5 dias na BOD. Fonte: O autor, 2020.

5.3.2 Teste de doses de nitrogênio (testemunha nitrogenada)

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Solo e em casa de vegetação na Embrapa Semiárido no município de Petrolina-PE.

Avaliou-se o efeito de doses crescentes de nitrogênio (0, 25, 50, 75, 100, 150, 200 e 300 mg/planta), aplicado na forma de NH_4NO_3, sobre o crescimento de mudas de *M. tenuiflora*. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições.

As mudas foram produzidas em vasos de poliestireno com capacidade para 500 mL, utilizando como substrato areia lavada misturada com vermiculita, na proporção de 2:1 (volume:volume). O substrato misturado foi autoclavado sob pressão de 1,0 atm e temperatura de 120ºC, por 1 hora. A autoclavagem foi repetida por duas vezes, com o intervalo mínimo de 48 horas entre os procedimentos. Só então, o substrato foi distribuído nos vasos para posterior semeadura.

Em cada vaso foram semeadas oito sementes e, aos 20 dias após a germinação, foi realizado um desbaste, deixando-se duas plantas por vaso. O fornecimento de água para as plantas foi feito com água estéril, adicionada em pratos individuais localizados sobre cada vaso.

A aplicação dos tratamentos foi iniciada aos 30 dias após a emergência, com aplicações semanais do fertilizante, durante 60 dias. Aos 120 dias após a emergência, o experimento foi coletado, sendo avaliadas as seguintes variáveis: altura da planta, produção de massa da parte aérea fresca e seca, teor de N na parte aérea, massa fresca e seca de raízes.

A parte aérea das plantas e as raízes foram cortadas e pesadas, em seguida o material foi acondicionado em sacos de papel e colocado em estufa a 65º C por 72 horas para avaliação da massa seca. O teor de nitrogênio na parte aérea das plantas foi determinado pelo método de semi-micro Kjedahl (LIAO, 1981).

5.3.3 Avaliação da eficiência de rizóbios

Simultaneamente, ao teste de doses de N, foi conduzido o experimento para avaliação da eficiência de isolados de rizóbio na produção de mudas de *M. tenuiflora* (Figura 5.2).

Figura 5.2. Visão do experimento de *Mimosa tenuiflora* em casa de vegetação aos quatro meses após a semeadura. Fonte: O autor, 2021.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com dez tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos avaliados foram: sete bactérias provenientes da Coleção de Microrganismos da Embrapa Semiárido (CMISA) (ESA637, ESA630, ESA629, ESA626, ESA673, ESA628, ESA671), uma estirpe referência autorizada para uso como inoculante de *Erytrina verna* (*Bradyrhizobium elkanii* BR 5609, SEMIA 6100), uma testemunha nitrogenada (não inoculada e adubada com 150mg/planta de N - NH_4NO_3) e uma testeminha absoluta (sem qualquer fonte de nitrogênio). As bactérias da CMISA foram isoladas por Dias at al. (2021), em solos de Caatinga densa e de Caatinga aberta (em processo de regeneração), nos municípios de Serra Talhada, Garanhuns, Petrolina e Caruaru. As testemunhas nitrogenada e absoluta foram inseridas no experimento conforme as determinações da IN 13/2011 do MAPA.

Os inoculantes com os isolados foram produzidos em 50 mL de meio YM em erlenmeyer. O crescimento das bactérias ocorreu durante cinco dias em mesa de agitação a 120 rpm.

Os procedimentos de preparo do substrato, semeadura e desbaste foram os mesmos descritos para o experimento de doses de nitrogênio. Durante a semeadura, com exceção dos tratamentos testemunhas, os demais receberam 1 mL de caldo de cultivo distribuído sobre as sementes, utilizando uma pipeta e ponteiras para a inoculação. A testemunha nitrogenada recebeu adubação semanal a partir dos 30 dias após a emergência, conforme descrito para o experimento anterior.

Aos 120 dias após a emergência, foram avaliadas as seguintes variáveis: altura da planta, massa da parte aérea fresca e seca, massa de raízes fresca e seca, teor de N na parte aérea e número de nódulos.

A parte aérea das plantas e as raízes foram cortadas e pesadas, as raízes foram lavadas e os nódulos destacados e contados, em seguida o material foi acondicionado em sacos de papel e colocados em estufa a 65º C por 72 horas para avaliação da massa seca. O teor de nitrogênio foi determinado pelo método de semi-micro Kjedahl (LIAO, 1981).

5.3.4 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo software estatístico SAS (Statistical Analysis Systems).

Os efeitos das doses de N sobre os parâmetros avaliados foram analisados por regressão, com ajuste do modelo matemático que melhor explicou o comportamento dos dados. Com base nesses ajustes, definiu-se a dose de N que seria utilizada como testemunha nitrogenada para comparação com os tratamentos inoculados.

Os tratamentos inoculados e não inoculados foram comparados pelo teste de F (α=0,05).

A comparação entre os tratamentos inoculados e as testemunhas foi realizada por teste de comparação de médias de Duncan (α=0,05).

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1 Teste de germinação

Embora as sementes utilizadas tenham ficado armazenadas por curto período de tempo após a coleta, a porcentagem de germinação foi de apenas 58,92%.

5.4.2 Inoculação

As sete estirpes e a cepa referência utilizadas na inoculação de plantas de jurema-preta foram capazes de nodular. Não se constatou ocorrência de nodulação na testemunha absoluta e na testemunha nitrogenada, o que indica que não houve contaminação nos experimentos.

De acordo com Araujo et al. (2010), a *M. tenuiflora* é uma espécie *Fabaceae* de abrangência em todo o Nordeste brasileiro, nativa da Caatinga e que apresenta baixa especificidade simbiótica.

Para todas as variáveis de crescimento, as plantas inoculadas apresentaram melhor desempenho em relação às não inoculadas: altura de planta, massa fresca parte aérea, massa seca parte aérea, massa fresca de raiz, massa seca de raiz, massa fresca total e massa seca total, para as quais foram observados maiores valores nos tratamentos inoculados (Tabela 5.1).

O teor de Nitrogênio total na parte aérea das plantas também foi influenciado pela inoculação, com valores maiores nos tratamentos não inoculados, ou seja, naqueles que recebera adição de N mineral. Comportamento semelhante também foi observado por Fitouri et al. (2012), em estudo de seleção de linhagens de inoculantes de *Hedysarum coronarium* L. no semiárido da Tunísia.

.

Tabela 5.1. Efeitos de isolados microbianos sobre crescimento e desenvolvimento de plantas de *Mimosa tenuiflora*

Variável	Inoculado	Não Inoculado
Altura (cm)*	4,46±1,56 a	3,82±2,07 b
Massa Fresca de parte aérea (g)	0,53±0,49 a	0,25±0,17 b
Massa Fresca de raiz (g)	1,72±1,18 a	1,39±0,98 b
Massa Seca de parte aérea (g)	0,23±0,22 a	0,17±0,16 b
Massa Seca de raiz (g)	0,20±0,15 a	0,11±0,10 b
Massa Fresca total (g)	2,26±1,18 a	1,64±1,09 b
Massa Seca total (g)	0,43±0,31 a	0,29±0,24 b
Teor de N na parte aérea (g/kg)	12,91±4,40 a	5,09±4,13 b

Valores representam a média±intervalo de confiança. Letras comparam médias na vertical. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste Duncan (α=5%). (*) Os valores de altura de plantas representam a média das alturas das duas plantas de cada vaso. Para as demais variáveis, os valores representam a soma das massas das duas plantas de cada vaso. Fonte: O autor, 2021.

5.4.3 Doses de N mineral

A adição de N mineral influenciou a produção de matéria fresca de parte aérea (Figura 5.3 a) e a produção de matéria seca (raízes, parte aérea e total) das plantas (Figura 5.3 b).

A produção de matéria fresca de parte aérea decresceu linearmente em função das doses de N e, embora de pequena magnitude, o ajuste foi significativo (p=0,0028) (Figura 5.3 a).

Houve um efeito linear negativo em função das doses de N para a produção matéria seca de parte aérea e para a produção de matéria seca total, em ambos os casos com nível de significância menor que 1%. As doses de N utilizadas no experimento influenciaram quadraticamente a produção de matéria seca de raiz, com um ponto de máxima produção de matéria seca de raiz ocorrendo quando as plantas receberam adubação com 133 mg/planta de N (Figura 5.3 b).

Calanzas et al. (2016) observaram que a maior produção de massa seca de parte aérea (18,82 g/planta) em *Cratylia argentea* ocorreu no tratamento com aplicação de 5 mg NH_4NO_3/planta/semana em relação aos tratamentos inoculados e ao controle absoluto.

Para teor de nitrogênio de parte aérea por planta, a influência das doses de N, foi significativa, aumentando quadraticamente com o aumento da dose de N fornecida às plantas (Figura 5.4).

A variável altura de plantas não foi influenciada pelas doses de nitrogênio dentro dos modelos avaliados (linear e quadrático) (Figura 5.5).

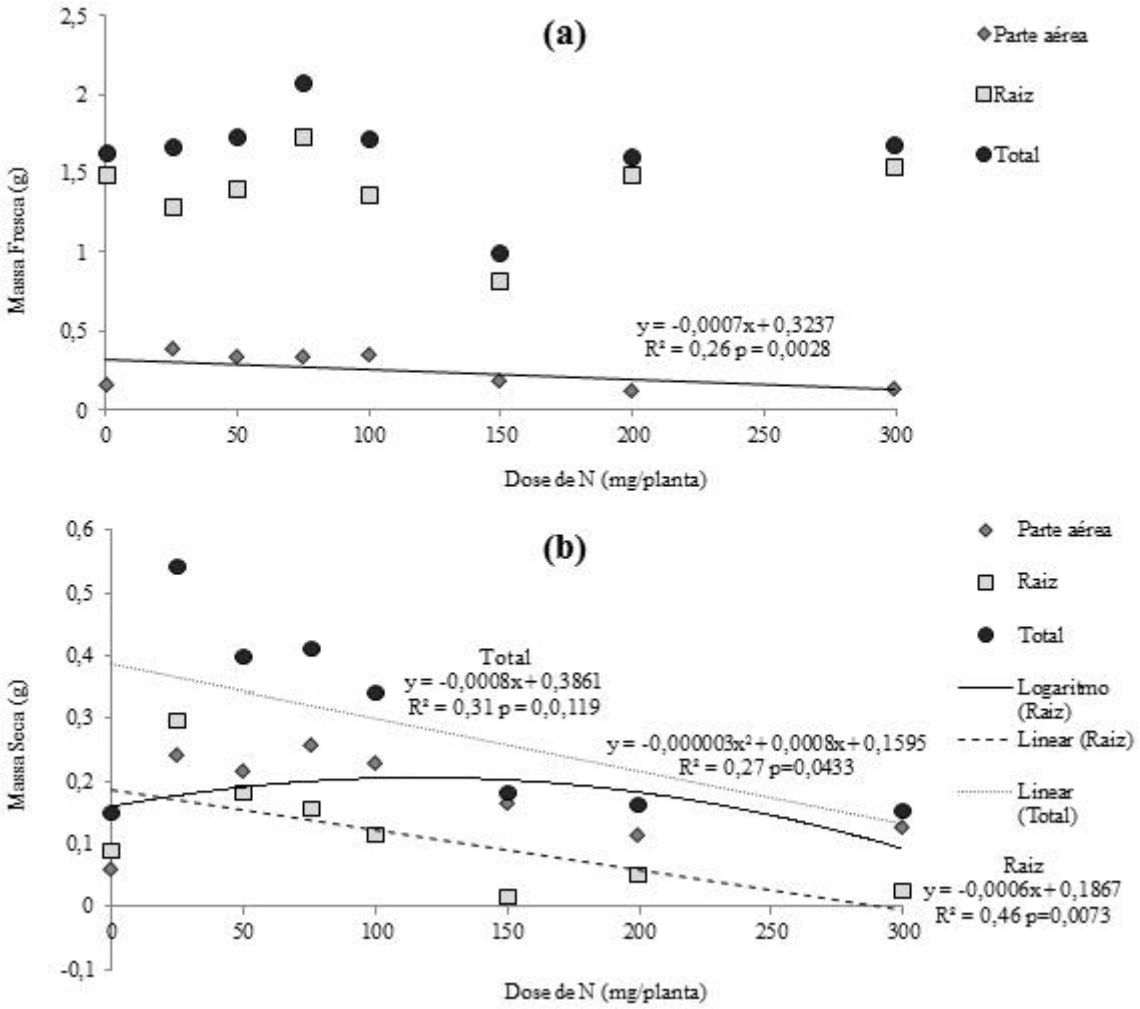

Figura 5.3. Efeitos de doses de N sobre massa fresca e seca de raízes e de parte aérea de plantas de *Mimosa tenuiflora.* Fonte: O autor, 2021.

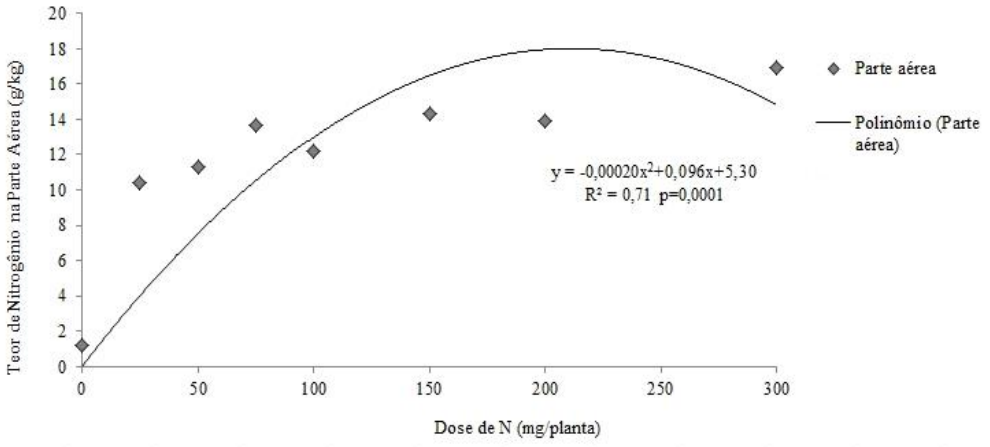

Figura 5.4. Efeitos de doses de N no teor de N na parte aérea de plantas de *Mimosa tenuiflora.* Fonte: O autor, 2021.

Hellen (2010) inoculou diferentes estirpes de rizóbios em *Inga edulis* e verificou que o tratamento nitrogenado com nitrato de amônio apresentou o maior crescimento, com média de 13 cm aos 30 dias, aumentando para cerca de 23 cm aos 110 dias após a emergência. As plantas dos demais tratamentos se mantiveram praticamente com a mesma média de altura (13 a 15 cm) entre os 30 e os 110 dias após emergência.

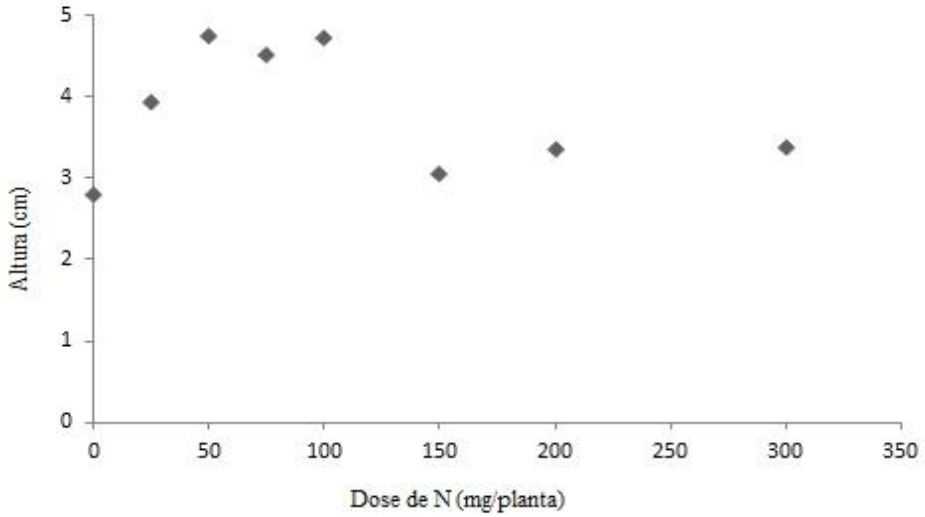

Figura 5.5. Efeitos de doses de N sobre a altura de plantas de *Mimosa tenuiflora.* Fonte: O autor, 2021.

5.4.4 Avaliação de estirpes

A altura média das plantas aos 120 dias variou de 2,81±1,06 cm (testemunha absoluta) a 4,93±0,13 cm (estirpe ESA637) (Tabela 5.2). A comparação entre os tratamentos avaliados permite verificar que as maiores alturas de plantas foram obtidas quando as sementes foram inoculadas com as estirpes ESA637, ESA673, ESA671 e com a cepa de referência BR 5069, enquanto os menores valores foram observados para a testemunha absoluta (2,81±1,06) e testemunha nitrogenada (3,06±1,31) (Tabela 5.2).

Silva et al. (2018) estudaram a eficiência simbiótica em *Leucaena leucocephala*, em tratamentos inoculados, nitrogenado (100 mg kg^{-1}) e sem adubação em casa de vegetação no Nordeste do Brasil. Estes autores observaram que os maiores valores para altura de planta aos 90 dias ocorreram em plantas inoculadas com os isolados 36F (57,2±9,1 cm) e 45G (52,6±9,2 cm). De forma similar ao observado no presente estudo, no trabalho de Silva et al. (2018) os melhores isolados promoveram crescimento superior ao controle absoluto e ao controle nitrogenado.

Com relação à massa fresca da parte aérea, houve diferença estatística entre os tratamentos, sendo os maiores valores encontrados para referência BR 5069 e para os isolados ESA637, ESA629, ESA628, ESA630, ESA671 e ESA626, os quais apresentaram valores superiores aos encontrados nas plantas dos tratamentos testemunhas (Tabela 5.2). Com relação à massa seca da parte aérea, a cepa de referência BR 5069 manteve a maior média (0,31±0,16 g), seguida por ESA637, ESA629 e ESA628, as quais também foram superiores às testemunhas. Para massa fresca de raiz o tratamento com a estirpe ESA628 obteve a maior média (2,05±0,28 g), seguido pelos isolados ESA629, ESA630, ESA671, ESA626 e ESA673. Os tratamentos inoculados apresentaram desempenho estatisticamente entre si para a massa seca de raiz, embora todos tenham sido superiores à testemunha nitrogenada (Tabela 5.2).

Singh & Patel (2016), avaliando o desempenho de *Trigonella foenum graecum* inoculada com seis estirpes de *Rhizobium meliloti* (FRS-2, FRS-6, FRS-7, FRS-8, FRS-9 e FRS-12), em condições semiáridas na Índia, observaram que o tratamento com a cepa FRS-7 aumentou em 83% e em 80% o peso seco de parte aérea e o peso seco da raiz, respectivamente, em comparação com a testemunha nitrogenada (20 kg N ha^{-1} de uréia aos 30 dias).

No presente estudo, os maiores valores de matéria seca de parte foram obtidos pela bactéria referência BR 5069, que proporcionou aumentos de 37,5% e de 266% na matéria seca de parte aérea em relação às testemunhas nitrogenada e absoluta, respectivamente. Essa mesma bactéria também promoveu a maior produção de matéria seca de raízes de *M. tenuiflora*, com um desepenho 122% superior ao da testemunha absoluta.

A seleção de linhagens de inoculantes de *Hedysarum coronarium* L. no semiárido da Tunísia por Fitouri et al. (2012) demonstrou a eficiência de duas estirpes (Hc5 e Hc14) para massa seca de parte aérea, com rendimento 170% superior ao controle fertilizado com nitrogênio.

Já Oliveira et al. (2019) não encontraram diferença significativa em biomassa de *Mimosa caesalpiniifolia* Benth. coletada aos 3 meses, em relação aos tratamentos inoculados com diferentes estirpes (14P1, 3-RN, JUA3-1, 6-RN, JUA-7A, 7-RN, 5-RN, 1-RN, 4- RN e JUA3-4) e o tratamento de testemunha nitrogenada (65 mg NH_4NO_3). No experimento destes autores, o acúmulo de biomassa variou entre 24,37 a 39,86 mg entre os inoculados.

Rufini et al. (2014) testaram três cepas recomendadas para feijão-caupi e observaram que a testemunha adubada com 80 kg ha^{-1} de ureia, apresentou resultado superior ou igual estatisticamente a 14 isolados de um total de 24 testados, para acúmulo de N na parte aérea.

Para massa fresca total, os maiores resultados foram observados com o isolado ESA628 (2,64±0,34 g), seguido pelos tratamentos ESA629, ESA630, ESA673, ESA671, a cepa de referência BR 5609 e o isolado ESA626, todos superiores às testemunhas nitrogenada e absoluta (Tabela 5.3). Os maiores valores de massa seca total foram observados com inoculação da cepa de referência BR 5069 (0,54±10,25 g) e com os isolados ESA637, ESA629, ESA628 e ESA671, superiores as testemunhas (Tabela 5.3).

Maia & Scotti (2010) trabalhando com *Inga vera* Willd. em estufa não encontraram diferença significativa para massa seca total das plantas em comparação com a testemunha nitrogenada, obtendo média de 1,18±0,36 g. Neste trabalho, Maia & Scotti (2010) também não observaram diferenças entre os tratamentos para massa seca de raiz.

Tabela 5.2. Efeitos de diferentes isolados microbianos sobre altura (AL), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa fresca de raiz (MFR), massa seca de raiz (MSR), ao longo do desenvolvimento de mudas de *Mimosa tenuiflora*

Tratamentos	AL (cm)*	MFPA (g)	MSPA (g)	MFR (g)	MSR (g)
ESA637	4,93±0,13 a	0,61±012 ab	0,27±0,06 ab	1,32±0,61 ab	0,21±0,09 ab
ESA630	4,05±0,70 abcd	0,46±0,28 abc	0,18±0,11 bcd	1,88±0,28 a	0,20±0,09 abc
ESA629	4,21±0,61 abc	0,59±0,27 abc	0,25±0,07 ab	1,93±1,07 a	0,21±0,14 ab
ESA626	4,13±0,68 abcd	0,39±0,28 abcd	0,15±0,10 bcde	1,71±0,71 a	0,11±0,06 bcd
ESA673	4,60±0,30 ab	0,52±0,16 abc	0,18±0,13 bcd	1,66±0,44 a	0,19±0,14 abc
ESA628	4,45±1,30 abc	0,59±0,10 abc	0,24±0,08 abc	2,05±0,28 a	0,22±0,10 ab
ESA671	4,57±1,07 ab	0,45±0,41 abc	0,22±0,21 abcd	1,73±0,42 a	0,20±0,10 abc
Ref BR 5069	4,79±1,90 ab	0,64±0,40 a	0,31±0,16 a	1,50±0,96 ab	0,23±0,09 ab
Testemunha nitrogenada	3,06±1,31 cd	0,18±0,07 de	0,16±0,05 bcde	0,82±0,38 b	0,01±0,00 d
Testemunha absoluta	2,81±1,06 d	0,15±0,04 de	0,06±0,05 e	1,48±0,41 ab	0,09±0,05 bcd

Valores representam a média±intervalo de confiança. Letras comparam médias na vertical. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste Duncan (α=5%). (*) Os valores de altura de plantas representam a média das alturas das duas plantas de cada vaso. Para as demais variáveis, os valores representam a soma das massas das duas plantas de cada vaso. Fonte: O autor, 2021.

Tabela 5.3. Efeitos de diferentes isolados microbianos sobre massa fresca (MF) total, massa seca (MS) total e teor de nitrogênio na parte aérea (TNPA) e número de nódulos (NN) ao longo do desenvolvimento de mudas de *Mimosa tenuiflora*

	Variáveis			
Tratamentos	MF total (g)*	MS total (g)	TNPA (g/kg)	NN
ESA637	1,94±0,74 abc	0,49±0,15 ab	5,54±1,55 cd	3,20±1,20 ab
ESA630	2,35±0,57 ab	0,38±0,14 abc	5,91±2,36 cd	3,20±1,20 ab
ESA629	2,52±1,34 ab	0,47±0,21 ab	4,47±1,95 d	4,00±2,00 a
ESA626	2,10±0,58 ab	0,27±0,13 bcde	5,63±2,09 cd	2,00 b
ESA673	2,18±0,42 ab	0,37±0,16 abcd	8,07±0,81 b	4,20±1,20 a
ESA628	2,64±0,34 a	0,46±0,18 ab	6,71±0,36 bc	3,80±0,80 a
ESA671	2,18±0,83 ab	0,42±0,30 ab	5,85±0,28 cd	3,60±1,60 ab
Ref BR 5069	2,14±1,06 ab	0,54±0,25 a	2,50±1,50 e	4,00±2,00 a
Testemunha nitrogenada	1,00±0,45 c	0,18±0,06 cde	14,32±0,73 a	-
Testemunha absoluta	1,64±0,46 abc	0,15±0,10 e	1,17±0,21 e	-

Valores representam a média±intervalo de confiança. Letras comparam médias na vertical. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste Duncan (α=5%). (*) Os valores representam a soma das massas das duas plantas de cada vaso. Fonte: O autor, 2021.

Osei et al. (2018) pesquisando a eficácia da inoculação de estirpes de diferentes solos de Gana em amendoim (*Arachis hypogaea* L.), constataram que a cepa de referência (32H1) foi a mais eficaz para a variável peso seco da parte aérea, enquanto o isolado KNUST 1002 produziu o maior peso seco da parte aérea dentre os isolados testados.

O maior teor de N da parte aérea seca das plantas foi obtido no tratamento com a testemunha nitrogenada (14,32±0,73 g/kg) (Tabela 5.3). Dentre os isolados testados, o que promoveu maior acúmulo de N na parte aérea das plantas foi ESA673 (8,07±0,81 g/kg), embora esse valor corresponda a apenas 56% do teor de N nas plantas da testemunha nitrogenada. O teor de N na parte aérea das plantas da testemunha absoluta foi cerca de 12 vezes menor que nas plantas da testemunha nitrogenada. Apesar disso, a produção de matéria fresca e seca dos dois

tratamentos testemunhas foi semelhante (Tabela 5.3), o que demonstra que o nitrogênio não foi o fator limitante para o desenvolvimento das mudas de *M. tenuiflora* neste experimento.

Fitouri et al. (2012), trabalhando com a seleção de linhagens de inoculantes de *Hedysarum coronarium* L. verificaram que duas estirpes promoveram maior rendimento de massa seca de parte aérea em relação ao controle nitrogenado, o que também esteve associado ao significativo aumento do teor de nitrogênio nas plantas. Esse comportamento diferente em relação ao observado no presente estudo pode ser explicado por diferenças fisiológicas entre as duas espécies.

Maiores quantidades de nódulos foram observadas nas plantas inoculadas com as estirpes ESA673 com média de 4,20±1,20, seguida por ESA629, pela cepa de referência BR 5609 e por ESA628 (Tabela 5.3). A estirpe ESA673 também foi a que apresentou o maior teor de N na parte aérea das plantas, comprovando a efetividade destes nódulos para fornecimento de N às plantas deste tratamento.

No trabalho realizado por Maia & Scotti (2010) com *I. vera*, a quantidade de nódulos nas plantas variou de 47,0 a 13,4. Já para teor de nitrogênio de parte aérea, esse mesmo trabalho relatou que o tratamento adubado com diferentes fertilizantes químicos apresentou média inferior (38,0±0,53 g/kg) aos tratamentos inoculados e com adubação orgânica.

De acordo com Costa et al. (2013) a produção de massa seca de parte aérea, teor de nitrogênio na parte aérea e a nodulação são variáveis fundamentais no processo de seleção de estirpes e importantes na recomendação de inoculantes. Assim, com base nos resultados da Tabela 5.3, é possível indicar que os isolados mais promissores foram ESA673 e ESA629, seguidos pelos isolados ESA628 e ESA671 (Figura 5.6). Contudo, vale destacar que a estirpe de referência (BR 5069) apresentou o melhor desempenho para a produção de matéria seca total e número de nódulos.

Figura 5.6. Avaliação da eficiência de estirpes de rizóbio na promoção do crescimento de *Mimosa tenuiflora*: P1 e P4: Testemunha absoluta, P2 e P5: testemunha nitrogenada, P3: ESA628 e P6: ESA671. Fonte: O autor, 2021.

5.5 CONCLUSÕES

O ensaio com mudas de *M. tenuiflora* inoculadas em casa de vegetação permitiu constatar melhor desempenho de plantas inoculadas em relação às não inoculadas para as seguintes variáveis: altura de plantas, massa fresca e seca de parte aérea, massa fresca e seca de raiz, massa fresca e seca total. Destacaram-se

como eficientes as estirpes que apresentaram os melhores resultados para altura de plantas (ESA637, ESA673 e ESA671), massa fresca de raiz e massa fresca total (ESA628, ESA629, ESA630) e número de nódulos (ESA673 e ESA629). Com base no desempenho global, os resultados sugerem que, dentre os isolados avaliados, os mais promissores foram ESA673, ESA629, ESA628 e ESA671.

Os resultados encontrados para doses de N, permitem concluir que, em experimentos futuros, a dose de N a ser empregada como testemunha nitrogenada em experimentos com inoculação de *M. tenuiflora* deve corresponder a 133 mg/planta.

5.6 REFERÊNCIAS

APNE/CNIP - Associação Plantas do Nordeste/Centro Nordestino de Informações sobre Plantas. **Banco de dados LPN**. Disponível em: <www.cnip.org.br>. Acesso em: 02 outubro. 2019.

ARAÚJO, L. V. C.; LEITE, J. A. N.; ARRIEL, E. F.; BAKKE, O. A. **Aspectos fenológicos de uma população de jurema preta (*Mimosa hostilis* POIR.).** In: CONGRESSO E EXPOSIÇÃO INTERNACIONAL SOBRE FLORESTA VI. Porto Seguro, Anais. Porto Seguro, p. 18-19, 2000.

ARAUJO, K.D.; DANTAS, R.T.; ANDRADE, A.P. et al. Uso de espécies da Caatinga na alimentação de rebanhos no município de São João do Cariri – PB. **Revistas Técnico-Científicas da UFPR**, editora UFPR. N, 20, p. 157-171, 2010.

BEZERRA, D. A. C. **Estudo Fitoquímico, Bromatológico e Microbiológico de Mimosa tenuiflora (Wild) Poiret e Piptadenia stipulacea (Benth) Ducke**, Dissertação de Mestrado em Sistemas Agrosilvopastoris no Semi-Arido. Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, f. 63, 2008.

BOURNAUD, C. et al. Burkholderia species are the most common and preferred nodulating symbionts of the Piptadenia group (tribe mimoseae), **Plos One**, v. 8, n. 5, 2013.

CALAZANS, G. M.; OLIVEIRA, C. A. D.; CRUZ, J. C.; MATRANGOLO, W. J. R.; MARRIEL, I. E. Selection of efficient rhizobial symbionts for Cratylia argentea in the cerrado biome. **Ciência Rural**, v. 46, n. 9. p. 1594-1600, 2016.

CAMPANHA, M.M. **Árvores e arbustos do sistema agrossilvipastoril Caprinos e Ovinos**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, p. 32, 2010.

COSTA, E.M.; NÓBREGA, R.S.A.; de CARVALHO, F.; TROCHMANN, A.;FERREIRA, L.V.M.; MOREIRA, F.M.S. Promoção de crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 9, p. 1275-1284, set. 2013.

DIAS, M. A. M.; BOMFIM, C. S. G.; RODRIGUES, D. R.; da SILVA, A. F.; SANTOS, J. C. S.; do NASCIMENTO, T. R.; ... & FERNANDES-JÚNIOR, P. I. Paraburkholderia spp. are the main rhizobial microsymbionts of Mimosa tenuiflora (Willd.) Poir. in soils of the Brazilian tropical dry forests (Caatinga biome). **Systematic and Applied Microbiology**. p. 126-208, 2021.

FITOURI, S. D.; TRABELSI, D.; SAÏDI, S.; ZRIBI, K.; JEDDI, F. B.; MHAMDI, R. Diversity of rhizobia nodulating sulla (Hedysarum coronarium L.) and selection of inoculant strains for semi-arid Tunisia. **Annals of microbiology**, v. 62, n. 1, p. 77-84, 2012.

FREITAS, A.D.S.; SAMPAIO, E.V.S.B.; SANTOS, C.E.R.S. et al. Biological nitrogen fixation in tree legumes of the Brazilian semi-arid caatinga. **Journal of Arid Environments**, v.74, p. 344–349, 2010.

LIAO, C. F. H. **Devarda's Alloy Method for Total Nitrogen Determination** 1 CHRISTINA F. H. LiAO 2. n. 3, p. 852–855, 1981.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Nova Odessa Plantarum, p. 384, 2002.

MAIA, G. N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: D&Z, p. 237-413, 2004.

MAIA, J.; SCOTTI, M. R. Growth of Inga vera Willd. subsp. affinis under rizobia inoculation. **Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal**, v. 10, n. 2, p. 139-149, 2010.

MAIA-SILVA, C. et al. **Guia de Plantas Visitadas por Abelhas na Caatinga**. Fortaleza: Editora Fundação Brasil Cidadão, p. 99, 2012.

OLIVEIRA, I. S. R.; JESUS, E. D. C.; RIBEIRO, T. G.; SANTOS REIS DE ANDRADE DA SILVA, M.; TENORIO, J. D. O.; MARTINS, L. M. V.; de FARIA, S. M. Mimosa caesalpiniifolia Benth. adapts to rhizobia populations with differential taxonomy and symbiotic effectiveness outside of its location of origin. **FEMS microbiology ecology**, v. 95, n. 8, p. fiz109, 2019.

OSEI, O.; ABAIDOO, R. C.; AHIABOR, B. D.; BODDEY, R. M.; ROUWS, L. F. Bacteria related to Bradyrhizobium yuanmingense from Ghana are effective groundnut micro-symbionts. **Applied Soil Ecology**, v. 127, p. 41-50, 2018.

PAES, J.B.; MARINHO, I.V.; LIMA, R.A. et al. Viabilidade técnica dos taninos de quatro espécies florestais de ocorrência no semiárido brasileiro no curtimento de peles. **Ciência Florestal**, v.16, n.4, p. 453-462, 2006.

PEREIRA FILHO, J.M.; VIEIRA, E.L.; SILVA, A.M.A. et al. Efeito do tratamento com hidróxido de sódio sobre a fração fibrosa, digestibilidade e tanino do feno de jurema preta (Mimosa tenuiflora Wild). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 70-76, 2003.

SILVA, V. S. G.; de ROSALIA E SIVA SANTOS, C. E.; de FREITAS, A. D. S.; STAMFORDM, N. P.; da SILVA, A. F.; de LYRA, M. D. C. C. P.; da SILVA FERREIRA, J. Symbiotic efficiency of native rhizobia in legume tree'Leucaena leucocephala'derived from several soil classes of Brazilian Northeast region. Australian **Journal of Crop Science**, v. 12, n. 3, p. 478, 2018.

SINGH, N. K.; PATEL, D. B. Performance of fenugreek bioinoculated with Rhizobium meliloti strains under semi-arid condition. **Journal of Environmental Biology**, v. 37, n. 1, p. 31, 2016.

TEIXEIRA, F.C.P.; BORGES, W.L.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G. Characterization of indigenous rhizobia from Caatinga. Brazilian **Journal of Microbiology**, v. 41, p. 201-208, 2010.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar do uso de microrganismos fixadores de nitrogênio ser uma alternativa viável, capaz de melhorar a produção agrícola principalmente em regiões semiáridas, diminuindo os impactos ao meio ambiente com o uso de fertilizantes, o primeiro artigo elaborado neste trabalho mostrou que ainda há necessidade de melhorias metodológicas em artigos desta natureza. Na revisão sistemática realizada, observou-se que 71,4% dos artigos não fazem uso de bactéria de referência para comparação do desempenho de novos isolados e em 47,6% dos trabalhos também não é empregada uma testemunha nitrogenada. Estas são questões relevantes quando se considera o interesse na recomendação de isolados para a produção inoculantes comerciais.

No segundo artigo, observou-se que a inoculação de mudas de *E. velutina* com a estirpe ESA75 apresentou os melhores desempenhos para altura, número de folhas, massa fresca e seca de parte aérea, massa fresca e seca total, massa seca de nódulos. Além disso, recomenda-se que em experimentos desta natureza com *E. velutina*, a dose de N a ser empregada como testemunha nitrogenada deve ser equivalente a 95 mg/planta.

No terceiro artigo, observou-se que a jurema-preta foi menos responsiva ao fornecimento de N e apresentou crescimento inicial nos vasos mais lento em comparação ao mulungu. A avaliação da resposta das mudas às doses de N permitiu concluir que, em experimentos futuros, a dose a ser empregada como testemunha nitrogenada em experimentos com *M. tenuiflora* deve corresponder a 133 mg/planta. Dentre os isolados avaliados, os mais promissores e que devem seguir em estudos posteriores para recomendação de inoculantes foram ESA673, ESA629, ESA628 e ESA671.