



Fixação biológica de azoto por bactérias diazotróficas em plantas do género *Trifolium*

Roberto Sadao Sinabucro Saburo

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Agroecologia

Orientado por:

Professora Doutora Felícia Maria da Silva Fonseca (ESA-IPB)

Professora Doutora Paula Cristina dos Santos Baptista (ESA-IPB)

Professor Doutor Sérgio Miguel Mazaró (UTFPR-DV)

Bragança

2024

**Fixação biológica de azoto por bactérias
diazotróficas em plantas do género *Trifolium***

**Roberto Sadao Sinabucro Saburo
Felícia Maria da Silva Fonseca
Paula Cristina dos Santos Baptista
Sérgio Miguel Mazaro**

Bragança
2024

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Universidade Tecnológica Federal do Paraná pela formação de profissionais capacitados e de qualidade. Sou grato também pela oportunidade de intercâmbio, algo que sonhava há anos e que a universidade tornou possível. Esta experiência não só ampliou os meus horizontes acadêmicos e profissionais, mas também proporcionou um crescimento pessoal inestimável.

Agradeço profundamente pelos desafios enfrentados em Portugal, que colocaram à prova quem eu sou, os meus valores e os meus objetivos. Essas experiências não só fortaleceram o meu caráter, como também enriqueceram o meu conhecimento e ampliaram a minha visão do mundo. Sou grato por cada obstáculo superado e pelas lições aprendidas ao longo deste percurso.

À minha orientadora Professora Doutora Felícia Fonseca por ter aceitado orientar-me, assim como toda a paciência e tempo compartilhados desde a instalação, condução e encerramento do experimento, bem como suas orientações.

À minha coorientadora, Professora Doutora Paula Cristina dos Santos Baptista, agradeço pelo apoio incansável e pela paciência dedicada à elaboração deste trabalho.

Ao meu coorientador, Professor Doutor Sérgio Miguel Mazaro. Sob a sua orientação, cresci de forma inestimável, não apenas academicamente, mas também a nível profissional e pessoal. Muitas portas se abriram ao longo da minha jornada, e em cada uma delas recordo-me dos seus conselhos, sempre incentivando-me a dar o meu melhor, independentemente dos recursos disponíveis e dos resultados obtidos.

Aos meus pais e minha irmã, pelos conselhos e sempre apoiar-me em minha jornada.

À minha noiva, Renata Voitena por trilhar firmemente ao meu lado diante das turbulências da vida.

Ao Israel, Matheus Piran, Matheus Toloto, Renata e Welida pela enorme ajuda para a realização deste trabalho.

Mar calmo não faz bom marinheiro.

RESUMO

A proteção dos solos na agricultura tem um papel crucial na mitigação das alterações climáticas. Na prática da agricultura, sempre que possível, é essencial manter uma cobertura permanente sobre o solo, utilizando plantas de cobertura. Portugal possui um clima mediterrânico, com verões quentes e secos e invernos frios e chuvosos, tornando a implementação de plantas de cobertura de inverno a mais adequada para proteger os solos durante a estação chuvosa. Plantas do género *Trifolium* são ideais devido à sua elevada capacidade de cobertura, resistência a invernos rigorosos e potencial para adubação verde, realizando associações simbióticas com bactérias diazotróficas que fixam azoto atmosférico. Este trabalho teve como objetivo avaliar a fixação biológica de azoto de diferentes estirpes de bactérias fixadoras de azoto em três misturas de espécies de trevos, visando promover o crescimento das plantas e melhorar a fertilidade do solo. O ensaio foi conduzido durante 52 dias, em vaso, numa estufa da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança. Bactérias do género *Rhizobium* e *Agrobacterium* foram bioprospectadas de nódulos de trevos do distrito de Bragança e inoculadas em misturas de sementes de trevos, incluindo uma mistura de duas cultivares de trevo subterrâneo (*Trifolium subterraneum* cv. Campeda e *Trifolium subterraneum* cv. Woogenellup) e trevos de porte ereto (*Trifolium vesiculosum* e *Trifolium incarnatum*). Foram avaliados o comprimento da parte aérea das plantas, massa seca, teores de clorofilas e teor de N do solo. Os resultados não mostraram diferença estatística para massa seca, comprimento da parte aérea e teor de N do solo. No entanto, houve uma melhoria no teor de clorofila total nos tratamentos com misturas de trevos de porte ereto inoculados, em comparação com a testemunha. Estes resultados podem ter sido influenciados pela elevada infestação da planta daninha *Chenopodium alba*, que não foi controlada para simular um ambiente de campo. Além disso, a eficiência das estirpes de bactérias fixadoras de azoto pode variar dependendo das condições específicas do solo e do clima, sugerindo a necessidade de mais estudos para otimizar a aplicação destas práticas. É importante continuar a investigar a interação entre diferentes estirpes de *Rhizobium* spp. e *Agrobacterium* spp. com várias espécies de trevos para maximizar a fixação de azoto e, conseqüentemente, a saúde e produtividade do solo.

Palavras-chave: *Rhizobium*, *Agrobacterium*, trevo, crescimento.

ABSTRACT

Soil protection is crucial for mitigating climate change in agriculture. For this practice, it is essential to maintain permanent soil cover using cover crops. Portugal has a mediterranean climate, with hot, dry summers and cold, rainy winters, making the implementation of winter cover crops the most suitable for soil protection during the rainy season. Plants of the genus *Trifolium* are ideal due to their high soil coverage capacity, resistance to harsh winters, and potential for green manuring, forming symbiotic associations with diazotrophic bacteria that fix atmospheric nitrogen. This study aimed to evaluate the nitrogen fixation of different strains of indigenous nitrogen-fixing bacteria in two mixtures of species of clover, aiming to promote plant growth and improve soil fertility. The experiment was conducted for 52 days in pots placed in a greenhouse at the Escola Superior Agrária of the Institute Polytechnic of Bragança. Bacteria of the genera *Rhizobium* and *Agrobacterium* were bioprospected from clover nodules in the Bragança district and inoculated into mixtures of clover seeds, including subterranean clover (*Trifolium subterraneum* cv. Campeda e *Trifolium subterraneum* cv. Woogenellup) and erect-growing clovers (*Trifolium vesiculosum* e *Trifolium incarnatum*). The length of the plant aerial parts, dry mass, chlorophyll content, and soil N content were evaluated. The results showed no statistical difference for dry mass, aerial part length, and soil N content. However, there was an improvement in total chlorophyll content in the surface clover mix treatments when inoculated compared to the control. These results may have been influenced by the high infestation of the weed *Chenopodium alba*, which was not controlled to simulate a field environment. Furthermore, the efficiency of nitrogen-fixing bacterial strains can vary depending on specific soil and climate conditions, suggesting the need for further studies to optimize the application of these practices. It is important to continue investigating the interaction between different strains of *Rhizobium* spp. and *Agrobacterium* spp. with various clover species to maximize nitrogen fixation and, consequently, soil health and productivity.

Keywords: *Rhizobium*, *Agrobacterium*, clover, plant growth.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
SUMÁRIO	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIACÕES	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVO GERAL	3
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 CONSERVAÇÃO DO SOLO	4
2.2 MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO	5
2.3 CICLO DO AZOTO	7
2.3.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE AZOTO	8
2.3.2 SIMBIOSE EM LEGUMINOSAS	8
2.4 PLANTAS DE COBERTURA	9
2.4.1 TREVOS DE COBERTURA	11
3. MATERIAL E METODOS	14
3.1 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE AZOTO	14
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	16
3.3 PREPARO DO INÓCULO E SEMENTEIRA	19
3.4 DETERMINAÇÕES DE CAMPO	21
3.4.1 COLHEITA DE AMOSTRAS DA PARTE AÉREA DA VEGETAÇÃO E DE NÓDULOS DAS RAÍZES	21
3.4.2 COLHEITA DE AMOSTRAS DE SOLO	23
3.5 DETERMINAÇÕES LABORATORIAIS	24

3.5.1 DETERMINAÇÃO DE CLOROFILA A E B	24
3.5.2 DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA SECA	25
3.5.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AZOTO DO SOLO	25
3.5.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS FIXADORAS DE AZOTO	26
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 COMPRIMENTO DAS PLANTAS DE TREVOS	28
4.2 PRODUÇÃO DE BIOMASSA DAS PLANTAS INFESTANTES E DE TREVOS	30
4.3 TEOR DE CLOROFILA NAS FOLHAS DOS TREVOS	34
4.4 TEOR DE N DO SOLO.....	40
4.5 IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS FIXADORAS DE AZOTO.....	40
5. CONCLUSÃO.....	45
6. REFERÊNCIAS	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Coleta de nódulos de raízes de <i>Trifolium incarnatum</i> (a), <i>Trifolium vesiculosum</i> (b) e raízes com nódulos (c). Fonte: Saburo (2023).	14
Figura 2 – Desinfestação de nódulos de <i>Trifolium</i> spp. para o isolamento de bactérias fixadoras de azoto, em câmara de fluxo. Fonte: Saburo (2023).	15
Figura 3 - Placa contendo colónias puras de bactérias em meio Yeast Manitol Agar isoladas a partir de nódulos de raízes de trevos. Fonte: Saburo (2023).	16
Figura 4 - Coleta de solo na camada 0-20 cm de um olival localizado em Vilarino dos Galegos, Mogadouro. Fonte: Saburo (2023).	17
Figura 5- Esquema dos tratamentos dispostos de forma aleatória na bancada da estufa. Os números representam as repetições de cada tratamento. Fonte: Saburo (2023).	19
Figura 6 - Sementes dos diversos tratamentos para inoculação. Fonte: Saburo (2023). 20	
Figura 7 - Inoculação das sementes de cada tratamento (a), sementeira (b) e um mês após a sementeira (c). Fonte: Saburo (2023).	20
Figura 8 - Vaso com infestantes e trevo (esquerda), vaso apenas com trevo (direita). Fonte: Saburo (2023).	22
Figura 9 - Medição do comprimento da parte aérea das plantas. Fonte: Saburo (2023). 23	
Figura 10 - Colheita de amostras de solo. Fonte: Saburo (2023).	23
Figura 11 - Amostras para leitura de clorofilas. Fonte: Saburo (2023).	24
Figura 12 - Envelopes para secagem das amostras de trevos. Fonte: Saburo (2023).	25
Figura 13 - Comprimento da parte aérea das plantas dos tratamentos das misturas de trevo subterrâneo. Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos ($p < 0,05$).	28
Figura 14 - Comprimento da parte aérea das plantas dos tratamentos das misturas de trevos de porte ereto. Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos ($p < 0,05$).	29
Figura 15 - Comprimento da parte aérea das plantas dos tratamentos das misturas de trevo subterrâneo + trevos de porte ereto. Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos ($p < 0,05$).	29
Figura 16 – Biomassa (g vaso^{-1}) das plantas infestantes de todos os tratamentos do ensaio experimental (A a V). Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos ($p < 0,05$).	30

Figura 17 - Biomassa (g vaso ⁻¹) dos tratamentos da mistura de trevo subterrâneo. Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos (p < 0,05).	31
Figura 18 - Biomassa (g vaso ⁻¹) dos tratamentos da mistura de trevos de porte ereto. Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos (p < 0,05).	31
Figura 19 - Biomassa (g vaso ⁻¹) dos tratamentos da mistura de trevo subterrâneo + trevos de porte ereto. Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos (p < 0,05).	32
Figura 20 - Biomassa (g vaso ⁻¹) dos trevos em todos os tratamentos do ensaio experimental (B a V). Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos (p < 0,05).	33
Figura 21 - Teor de clorofila “a” nos tratamentos da mistura de trevo subterrâneo. Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos (p < 0,05).	35
Figura 22 - Teor de clorofila “a” nos tratamentos da mistura de trevos de porte ereto. Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos (p < 0,05).	35
Figura 23 - Teor de clorofila “a” nos tratamentos da mistura de trevo subterrâneo + trevos de porte ereto. Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos (p < 0,05).	36
Figura 24 - Teor de clorofila “b” nos tratamentos da mistura de trevo subterrâneo. Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos (p < 0,05).	37
Figura 25 - Teor de clorofila “b” nos tratamentos da mistura de trevos de porte ereto. Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos (p < 0,05).	37
Figura 26 - Teor de clorofila “b” nos tratamentos da mistura de trevo subterrâneo + trevos de porte ereto. Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos (p < 0,05).	38
Figura 27 - Teor de clorofila total nos tratamentos da mistura de trevo subterrâneo. Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos (p < 0,05).	38

Figura 28 - Teor de clorofila total nos tratamentos da mistura de trevos de porte ereto. Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos ($p < 0,05$).	39
Figura 29 - Teor de clorofila total nos tratamentos da mistura de trevo subterrâneo + trevos de porte ereto. Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos ($p < 0,05$).	39
Figura 30 - Teor de N no solo de todos os tratamentos do ensaio experimental (A a V). Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos ($p < 0,05$).	40
Figura 31 - Árvore de Máxima Verossimilhança de sequências do gene 16S rRNA das bactérias isoladas a partir de plantas do género <i>Trifolium</i> no distrito de Bragança. Os isolados bacterianos de referência são identificados através do seu número de acesso. 44	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies de <i>Trifolium</i> e sua origem geográfica, utilizadas para o isolamento de bactérias fixadoras de azoto.....	14
Tabela 2 - Descrição dos tratamentos do ensaio instalado com espécies do género <i>Trifolium</i> (trevos) e bactérias fixadoras de azoto atmosférico (ver isolados na Tabela 1).	18
Tabela 3 - Resultados do BLAST mostrando a classificação taxonómica final das bactérias isoladas de plantas do género <i>Trifolium</i>	43

LISTA DE ABREVIACOES

ABS	Absorbância
ADN	cido desoxirribonucleico
CH ₄	Metano
CO ₂	Dióxido de carbono
CTC	Capacidade de Troca de Cátions
FBA	Fixao biológica de azoto
MOS	Matéria orgânica do solo
MS	Massa Seca
N ₂	Azoto molecular
N ₂ O	xido nitroso
NH ₃	Amnia
NH ₄ ⁺	Amnio
NO	xido nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
YMA	Yeast Manitol gar

1. INTRODUÇÃO

Preservar os recursos naturais solo e água em sistemas de produção agrícola é indispensável para garantir a continuidade das altas produtividades e, conseqüentemente diminuir os gastos envolvidos na produção. O solo é um ecossistema crucial, que possui uma grande importância ambiental e socioeconômica, sendo multifuncional e vivo. É responsável por diversas funções vitais e presta serviços cruciais para a sobrevivência humana e sustentabilidade dos ecossistemas, incluindo a manutenção da biodiversidade, fornecimento de alimentos e matérias-primas, regulação do clima através da fixação de carbono, purificação da água, controle de nutrientes, doenças e pragas (Alexandre, 2015). Todo este potencial pode, no entanto, ser reduzido através da perda de matéria orgânica do solo (MOS) e erosão, podendo afetar a resistência e resiliência da vegetação, tanto natural quanto cultivada, a secas prolongadas e eventos extremos, criando assim um ciclo que pode evoluir para a desertificação.

A erosão do solo é um dos principais problemas enfrentados pela agricultura na União Europeia (UE). Segundo a Resolução do Parlamento Europeu sobre a proteção dos Solos (28 de abril de 2021), cerca de 25% das terras agrícolas da UE estão afetadas pela erosão do solo, o que representa um aumento de aproximadamente 20% entre 2000 e 2010. A perda anual de produção devido à erosão do solo é estimada em 0,3% da produção mundial. Se esse problema persistir no mesmo ritmo, estima-se que uma redução total de mais de 10% na produção agrícola pode ocorrer até 2050 (Montanarella *et al.*, 2016).

Investir na prevenção da degradação do solo e na recuperação dos solos degradados é uma medida economicamente viável e necessária. A degradação do solo custa à União Europeia várias dezenas de milhares de milhões de euros por ano (Resolução do Parlamento Europeu sobre a proteção dos Solos, 2021). Estima-se, que a erosão do solo representa uma perda anual global de US\$ 150 mil milhões em fertilizantes para substituir os nutrientes perdidos (Montanarella *et al.*, 2016). A conservação do solo pode gerar até 1,2 trilhão de euros anualmente em benefícios econômicos globais (Resolução do Parlamento Europeu sobre a proteção dos Solos, 2021).

Um dos macronutrientes mais afetados pela erosão é o azoto (N), que é perdido principalmente na forma de amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-), contaminando rios e aquíferos subterrâneos (Pugliesi *et al.*, 2011). Além disso, há a perda de N devido à transformação da MOS em metano (CH_4), processo que ocorre em práticas agrícolas

convencionais e que contribui para o aquecimento global, já que o CH_4 é um gás de efeito estufa 150 vezes mais prejudicial do que o dióxido de carbono (CO_2).

No ano de 2020, a UE consumiu aproximadamente 13,1 milhões de toneladas de fertilizantes azotados, de acordo com dados do EUROSTAT (2021). Desse total, cerca de 30% dos fertilizantes azotados utilizados pela UE foram importados da Rússia, enquanto o restante foi produzido internamente (FAO, 2022). É importante destacar, que a UE é altamente dependente do gás natural de origem russa para suprir a procura energética (Forbes, 2022).

A guerra entre a Rússia e a Ucrânia tem impactado diversas áreas das Relações Internacionais. Na esfera da economia global, o conflito iniciado em fevereiro de 2022 e as sanções impostas à Rússia pela comunidade europeia têm gerado prejuízos na comercialização de diversos produtos e serviços, incluindo gás, alimentos e fertilizantes (FAO, 2022).

O aumento do preço do gás natural, que representa cerca de 70% do custo de produção de fertilizantes azotados, tem resultado numa redução de 25% na produção desse fertilizante na UE (Forbes, 2022). Além disso, o preço da tonelada de NH_4 , um dos principais fertilizantes azotados, aumentou drasticamente de cerca de US\$ 250 em 2021 para US\$ 1 250 em setembro de 2022. Esta situação tem gerado impactos negativos para os agricultores europeus, refletindo no preço dos alimentos (Exame Agro, 2022).

Uma alternativa para contornar estes problemas pode incluir o uso de bactérias com potencial de realizar a fixação biológica de azoto (FBA). Esta prática tem vindo a crescer cada vez mais em agroecossistemas que visam uma agricultura sustentável, devido à ótima resposta que estas proporcionam às plantas cultivadas, a redução de custos com fertilizantes azotados para os agricultores, além de não contaminar a água potável com nitratos. A FBA é realizada por microrganismos procarióticos que possuem a enzima nitrogenase. Estes microrganismos, chamados diazotróficos, são capazes de transformar o azoto atmosférico (N_2) numa forma utilizável pelas plantas. Este processo consiste na redução do N_2 em NH_3 que é então convertida em formas orgânicas, como aminoácidos (Somasegaran & Hoben, 1994).

A FBA pode ser utilizada como uma estratégia para aumentar a estabilidade ecológica do solo, já que promove o aumento da MOS (Somasegaran & Hoben, 1994). Consequentemente aumenta a formação de agregados, melhora a aeração, infiltração e

retenção de água no sistema. Além disso, contribui para reduzir a erosão e manter ou melhorar a estabilidade da agregação do solo (Kay & Vandenbygaart, 2002).

O objetivo deste estudo é avaliar o crescimento e o potencial de adubação azotada de diferentes espécies de trevos, usados como coberturas verdes, quando inoculadas por diferentes espécies de bactérias promotoras de fixação biológica de azoto.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a fixação biológica de azoto no solo de diferentes espécies de bactérias diazotróficas inoculadas em espécies do género *Trifolium*.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a fixação biológica de azoto no solo por diferentes espécies de bactérias diazotróficas inoculadas em três misturas de trevos (Mistura 1: duas cultivares de trevo subterrâneo, Mistura 2: duas espécies de trevos de porte ereto, Mistura 3: Mistura 1 + Mistura 2.
- Analisar os efeitos produzidos no crescimento, na produção de biomassa e nos teores de clorofila nas plantas, bem como no teor de N do solo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONSERVAÇÃO DO SOLO

A erosão hídrica é um fenômeno natural que ocorre quando a água da chuva provoca o transporte de partículas do solo, resultando na perda de camadas superficiais do solo. Constitui o principal mecanismo de remoção de sedimentos, elementos minerais e produtos fitossanitários, levando à degradação dos solos e à contaminação dos recursos hídricos. Segundo Castro *et al.* (2006) a erosão hídrica é influenciada por fatores como a erodibilidade dos solos, mas principalmente pelo impacto das gotas da chuva associado a más práticas de manejo adotadas em áreas agrícolas.

Além da perda de solo fértil, a erosão hídrica também resulta na degradação dos recursos hídricos, como rios, lagos e aquíferos. Segundo Waltrick *et al.* (2015), a erosividade das chuvas pode causar a escassez de água em determinadas regiões, afetando tanto a quantidade como a qualidade desse recurso vital. Também a erosão hídrica contribui para a contaminação dos mananciais de água por produtos fitossanitários e fertilizantes utilizados nas atividades agrícolas (Oromar *et al.*, 2016). Portanto, é fundamental adotar medidas de manejo e conservação do solo e da água para controlar a erosão hídrica e garantir a sustentabilidade dos recursos naturais solo e água.

A erosão do solo não apenas causa danos ao ambiente, mas também impacta negativamente a produção agrícola em escala global. Diversos estudos têm quantificado esses custos em diferentes regiões do mundo. Por exemplo, no Brasil, estima-se que os custos anuais da erosão do solo alcancem US\$ 242 milhões (Marques, 1998). Na UE, os custos associados à erosão do solo estão estimados em US\$ 45,5 bilhões por ano, enquanto nos Estados Unidos, estima-se que alcancem US\$ 44 bilhões anualmente (Pimentel *et al.*, 1995). Esses números ilustram a magnitude dos prejuízos econômicos causados pela erosão do solo em âmbito global.

A perda de produtividade das culturas, devido à erosão do solo, é um problema agrícola de grande relevância (Pimentel *et al.*, 1995). Estudos têm demonstrado que a perda de camadas superficiais do solo por erosão hídrica pode resultar em reduções significativas na produtividade das culturas, como observado por Montgomery & Matson (2007). Além disso, a diminuição do teor de carbono orgânico do solo na forma de MOS também tem sido associada a uma menor produtividade das culturas (West & Post, 2002). A MOS desempenha um papel fundamental na fertilidade do solo, influenciando sua

capacidade de retenção de água, disponibilidade de nutrientes e estrutura física (Lal, 2003).

Estes números destacam a importância de implementar medidas de conservação do solo para reduzir estes custos e garantir a sustentabilidade da produção agrícola.

2.2 MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO

A matéria orgânica do solo (MOS) desempenha um papel crucial na sustentabilidade dos sistemas agrícolas, pois influencia as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, afetando diretamente a estabilidade e produtividade dos agroecossistemas (Costa *et al.*, 2013). A MOS é considerada o principal indicador da qualidade do solo, sendo a base da sustentabilidade dos ecossistemas a curto, médio e longo prazo.

Em ambientes com vegetação natural, as reservas de MOS geralmente mantêm um equilíbrio, sem grandes variações. Apesar dessa tendência, os ecossistemas naturais ainda apresentam variabilidade nas médias mensais do fluxo de CO₂ do solo devido à influência de fatores edafoclimáticos, como destacado por D'Andrea *et al.* (2010).

Os efeitos mais notáveis da MOS nas propriedades físicas do solo englobam a estabilização da temperatura, proporcionando benefícios ao crescimento das plantas; o aumento na capacidade de retenção de água, estimulando o desenvolvimento das raízes, especialmente em regiões propensas a períodos secos; a aprimoração da estabilidade dos agregados, contribuindo para a redução do escoamento superficial e, conseqüentemente, minimizando os riscos de erosão (Conceição *et al.*, 2005). À medida que a quantidade de resíduos orgânicos devolvidos ao solo aumenta, a cobertura da superfície do solo se intensifica, proporcionando uma proteção mais robusta à estrutura do solo contra perturbações naturais e humanas (Blanco & Lal, 2009).

No contexto do papel desempenhado pela MOS como agente condicionador químico do solo, é notável a sua influência na capacidade de troca catiónica (CTC), no pH, na condutividade elétrica, na ciclagem de nutrientes e na complexação de elementos tóxicos no solo. Além disso, a decomposição do material orgânico funciona como uma fonte de nutrientes para o solo, uma vez que resulta na mineralização dos nutrientes presentes nos resíduos orgânicos (Conceição *et al.*, 2005; Pavinato & Rosolem, 2008).

A quantidade de MOS é identificada como um fator determinante para a fertilidade do solo. O incremento nos estoques de MOS forma a base principal para todas as intervenções agronômicas voltadas à melhoria da fertilidade do solo. A MOS desempenha um papel crucial ao fornecer uma quantidade significativa de locais de ligação para nutrientes presentes no solo (redução das perdas por lixiviação), contribuindo para o aumento da CTC do solo e, conseqüentemente aprimorando a eficiência na utilização de nutrientes na nutrição vegetal (Costa & Sangakkara, 2006).

No âmbito da biologia do solo, a MOS desempenha um papel fundamental. Destaca-se o impacto significativo na estimulação da biota do solo, fornecendo nutrientes e energia para impulsionar a atividade desses organismos. Os resíduos orgânicos presentes na superfície do solo exercem uma influência direta na dinâmica dos microrganismos do solo. Além da função primordial dos microrganismos edáficos na execução de tarefas essenciais para o equilíbrio dos ecossistemas, a biomassa microbiana é também reconhecida como um reservatório de nutrientes de ciclagem rápida, associando-se à fertilidade do solo (Moreira & Malavolta, 2004).

O incremento nos teores de MOS decorre do sequestro de carbono atmosférico durante a fotossíntese realizada pelas plantas ao longo do seu ciclo, desempenhando um papel ambiental crucial na redução das emissões de gases de efeito estufa (Lal, 2004). A formação da MOS é influenciada pela atividade biológica no solo, envolvendo a ação de macro e microrganismos que realizam a ciclagem de nutrientes a partir dos processos de mineralização/humificação de resíduos orgânicos de origem vegetal e animal. A importância da matéria orgânica na qualidade do solo é amplamente reconhecida na literatura, conforme enfatizado por Bayer & Mielniczuk (2008), Silva & Mendonça (2007), Guerra *et al.* (2008), Fonseca *et al.* (2019).

Esses benefícios e outros atribuem à MOS uma função central, sendo frequentemente considerada o principal indicador da qualidade do solo. Portanto, estudos que investiguem os efeitos da implementação de novos métodos de manejo do solo e práticas agrícolas na MOS, assim como nas propriedades químicas, físicas e biológicas do solo, desempenham um papel crucial na avaliação da sustentabilidade de diversos agroecossistemas em uma região específica (Conceição *et al.*, 2005).

2.3 CICLO DO AZOTO

O azoto é essencial na formação de proteínas, ácidos nucleicos, peptidoglicanos, aminoácidos e outras moléculas essenciais, sendo um elemento fundamental para a manutenção da vida. Sua contribuição para a biomassa total dos seres vivos é superada apenas pelo carbono, hidrogénio e oxigénio (Young, 1992).

Levando em conta que cerca de 78% da atmosfera terrestre é composta por azoto no estado gasoso (N_2), o principal desafio reside na presença da ligação tripla $N\equiv N$, o que confere a este gás uma alta estabilidade à temperatura ambiente (Sprent & Sprent, 1990; Evans & Burris, 1992). Embora o N_2 seja abundante na atmosfera terrestre, organismos eucarióticos como plantas e animais, não conseguem utilizar diretamente essa forma de azoto. Apenas uma minoria de organismos procarióticos é capaz de converter ou reduzir enzimaticamente o N_2 que pode ser assimilado e utilizado no crescimento e manutenção celular. Este facto está relacionado a atividade do complexo enzimático conhecido como nitrogenase, que realiza a conversão de moléculas de N_2 em NH_3 (Raymond *et al.*, 2004).

Na primeira etapa do ciclo do azoto, ocorre a redução do azoto atmosférico (N_2) para amónia (NH_3), realizada por bactérias fixadoras de azoto, principalmente do género *Rhizobium*. A NH_3 , quando se combina com a água do solo, produz o ião amónio (NH_4^+), sendo este processo designado de amonificação (Guerrero *et al.*, 1981; Moreira & Siqueira, 2006). Por sua vez, o processo de nitrificação inclui duas etapas: a nitrosação que envolve a oxidação da amónia (NH_3) em nitrito (NO_2^-), por microrganismos que oxidam NH_3 , seguida da nitração que envolve a oxidação do NO_2^- em nitrato (NO_3^-), realizada por bactérias que oxidam NO_2^- (Prosser, 1989; Cardoso *et al.*, 1992; Teske *et al.*, 1994; Treusch *et al.*, 2005). Tanto o ião amónio quanto o ião nitrato podem ser absorvidos pela grande maioria dos organismos que vivem no solo e na água (Esteves & Amado, 2011).

A desnitrificação é um processo respiratório em que o NO_3^- , NO_2^- , óxido nítrico (NO) e óxido nitroso (N_2O) são sequencialmente utilizados por microrganismos como aceitadores finais de elétrons durante a respiração. Esse processo resulta na produção de gás N_2 . Essa via é reconhecida como a principal causa de perda de azoto na agricultura, ocorrendo uma parte significativa dessa perda na forma de N_2O , um gás de elevado potencial de efeito estufa (Tiedje, 1982). A desnitrificação garante a devolução do azoto para a atmosfera.

2.3.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE AZOTO

A fixação biológica de azoto (FBA) constitui uma significativa fonte de azoto assimilável nos ecossistemas, contribuindo aproximadamente com 92 a 97% do total de azoto que entra nos ambientes naturais terrestres, representando cerca de 150 milhões de toneladas de azoto por ano (Zehr *et al.*, 2003; Galloway *et al.*, 2004; Moreira & Siqueira, 2006). É considerado um dos processos biológicos mais importante da biosfera, logo a seguir à fotossíntese.

Em decorrência disso, os demais seres vivos dependem dos organismos que contribuem para a fixação do azoto no ambiente. Esse procedimento é especialmente crucial na prática da agricultura biológica, onde não há a aplicação de fertilizantes químicos (Ledgard & Giller, 1995; Menino *et al.*, 2003). Os organismos capazes de realizar a FBA, são conhecidos como diazotróficos e possuem a habilidade de converter o N_2 em NH_3 em condições normais de temperatura e pressão, através de uma enzima denominada de nitrogenase (Neves & Rumjaneck, 1992).

Segundo Postgate, (1982), as bactérias diazotróficas podem ser divididas em três grupos com base na sua relação com a planta hospedeira. As bactérias diazotróficas de vida livre apresentam a capacidade de fixar o N_2 sem depender de um hospedeiro superior, as endofíticas possuem uma relação mais estreita com o hospedeiro, e as simbióticas dependem de uma interação íntima com as plantas hospedeiras.

2.3.2 SIMBIOSE EM LEGUMINOSAS

A FBA tem sua maior contribuição na associação entre bactérias diazotróficas simbióticas em plantas da família *Leguminosae*, também conhecida como *Fabaceae*. Com cerca de 19 325 espécies e 727 géneros, esta família representa aproximadamente 8% das plantas com flores e está presente em quase todos os ecossistemas terrestres (Polhill & Raven, 1981; Herendeen *et al.*, 1992; Souza & Aguiar, 2009).

Uma das características notáveis desta família é a capacidade de estabelecer simbiose com bactérias fixadoras de azoto, resultando na formação de nódulos nas raízes. A morfologia dos nódulos é uma característica específica de cada planta hospedeira (Corby, 1981). É importante observar que as leguminosas podem variar de altamente específicas a generalistas em sua simbiose, podendo estabelecer parceria com apenas uma

espécie de bactéria ou com uma ampla gama delas (Moreira & Siqueira, 2006), o que é outra característica distintiva de cada espécie.

A formação dos nódulos resulta de um processo complexo que envolve várias etapas. De acordo com Debellé *et al.* (2001), inicialmente, há uma intensa troca de sinais entre as bactérias e as plantas hospedeiras, começando com a libertação de compostos fenólicos, incluindo flavonóides e isoflavonóides pelas raízes. Em resposta a estes sinais, as bactérias reagem desencadeando a expressão coordenada de uma série de genes da nodulação – nod/nol/noe, que são essenciais para a síntese e secreção de lipoquitooligossacarídeos, conhecidos como fatores Nod (Debellé *et al.* 2001). Quando ativados, estes genes estimulam a bactéria a sintetizar outras moléculas que, por sua vez, ativam os genes da planta hospedeira, desempenhando um papel crucial na continuidade do processo de infecção até à formação dos nódulos. Os flavonóides são constantemente libertados na rizosfera, porém a sua concentração e diversidade aumentam na presença da bactéria simbiótica compatível. Estes compostos podem agir como indutores para uma espécie de rizóbio e ao mesmo tempo suprimir outras espécies (Begum *et al.*, 2001).

Devido às suas associações com bactérias fixadoras de N, as leguminosas desempenham um papel crucial na aprimoração da qualidade do solo e no estímulo ao crescimento das plantas. Conforme evidenciado por Hungria *et al.* (2007), em certos cenários, a FBA é tão eficiente que é capaz de suprir totalmente a demanda de azoto de suas plantas hospedeiras. Em outros casos, parte do azoto fixado pelas leguminosas é aproveitado pela cultura sucessora, onde nem sempre é necessário realizar adubação azotada complementar (Baldissera & Scherer, 1991; Calegari, 1991; Andreola, 2001). Este fenómeno resulta num acréscimo substancial de nutrientes e MOS, conforme apontado por Franco *et al.* (1995). Por tais razões, as leguminosas são consideradas uma escolha destacada, especialmente em boas práticas de manejo do solo.

2.4 PLANTAS DE COBERTURA

Com o objetivo de encontrar opções mais sustentáveis na produção agrícola, muitos agricultores têm optado por utilizar plantas de cobertura para a cobertura permanente do solo, principalmente em sistemas de agricultura biológica (Darolt, 1998). Além disso, Redin *et al.* (2016) mostram que o uso de plantas de cobertura auxiliam no incremento de diversos benefícios em culturas perenes de forma direta e indireta.

As plantas de cobertura desempenham um papel importante na proteção do solo, reduzindo a energia cinética do impacto das gotas da chuva na superfície e, assim, diminuem o potencial de erosão e aumentam a taxa de infiltração da água no perfil do solo (Bertoni *et al.*, 2005; Figueiredo *et al.*, 2012). Além disso, a técnica de cobertura morta com resíduos orgânicos de origem vegetal (*mulching*) é uma estratégia eficaz para minimizar as perdas de água por evaporação, pois esta camada desempenha um papel de barreira, evitando o contato direto da radiação solar sobre a superfície do solo, reduzindo as oscilações de temperatura, mantendo o solo mais estável. O aquecimento da camada superficial do solo pela radiação solar pode acelerar a evaporação da água, deixando as plantas mais susceptíveis ao déficit hídrico, prejudicando também a absorção de nutrientes pelas raízes das plantas (Pes & Giacomini, 2017).

Os espaços deixados pelas raízes das plantas, produzem poros contínuos chamados de bioporos, que facilitam o fluxo de água e as trocas gasosas (Reichert *et al.*, 2016). Diferentemente dos poros produzidos pela mobilização mecânica do solo, os bioporos são mais eficientes na difusão de água e ar, por serem mais longos e contínuos (Oades, 1993; Dorner *et al.*, 2010). A presença de bioporos é fundamental para melhorar a infiltração da água no solo, diminuir o escoamento superficial e promover um melhor armazenamento de água no solo.

De acordo com Oliveira & Brighenti (2018), as plantas de cobertura proporcionam outro benefício importante que é o controle de infestantes, através de dois mecanismos: alelopatia e supressão. A alelopatia é caracterizada pela liberação de compostos químicos pelas plantas vivas ou mortas que afetam o desenvolvimento ou germinação das infestantes. Já a supressão é uma forma de controle físico proporcionada pela camada de palha das plantas de cobertura que cobre o solo, a qual impede ou prejudica a germinação das plantas infestantes, uma vez que a passagem da luz é dificultada (Almeida, 1991). Assim, também contribuem para a redução dos custos com herbicidas.

Através do seu sistema radicular, as plantas de cobertura conseguem reciclar nutrientes de camadas mais profundas do solo que podem ficar posteriormente disponíveis para outras plantas (Redin *et al.*, 2016). Segundo o mesmo autor, as plantas de cobertura promovem a atividade biológica do solo, pois com o manejo destas plantas, ocorre a decomposição e a mineralização dos nutrientes contidos na sua biomassa por ação de macro e microrganismos, deixando-os disponíveis para as culturas sucessoras e mais próximo da superfície, podendo resultar num contributo para a redução da adição de

fertilizantes. Ainda contribuem para melhorar a estrutura do solo, através da formação de agregados do solo pela incrementação do teor de carbono orgânico (Castro *et al.*, 1998; Calegari *et al.*, 2006)

Um exemplo, é o uso de plantas de cobertura que possuem a habilidade de formar simbiose com bactérias fixadoras de azoto atmosférico, principalmente plantas pertencentes à família das *Fabaceae* (Redin *et al.*, 2016). Segundo este autor, algumas espécies podem acumular na biomassa mais de 300 kg ha⁻¹ de N, e após o manejo, parte desse N é incorporado na matéria orgânica do solo.

2.4.1 TREVOS DE COBERTURA

O género *Trifolium* representa plantas leguminosas que podem perenizar por ressemeadura natural, caracterizando-se por apresentarem crescimento prostrado com ou sem caules estoloníferos, ou por possuírem crescimento ascendente ou erecto. Apresentam raízes pivotantes que podem atingir até 0,30 m de profundidade e se originam em grande número a partir de cada nó do estolão. O caule pode atingir uma altura aproximada de 0,20 m. Essas plantas podem ser classificadas de acordo com o seu ciclo de vida em trevos anuais, bianuais e vivazes. Os trevos anuais completam o seu ciclo de vida num único ano. Os trevos bianuais têm um ciclo de vida de dois a três anos. Já os trevos vivazes, uma vez estabelecidos, permanecem na área por vários anos, dependendo das condições ambientais (Paim & Riboldi, 1994; Ball *et al.*, 2007; Fontaneli *et al.*, 2012).

O género *Trifolium* é típico de climas temperados, não tolerando temperaturas elevadas. Desenvolve-se bem em solos neutros e ricos em matéria orgânica (Fontaneli *et al.*, 2012). Este género é tolerante à geada e vegeta bem à sombra, produzindo uma folhagem abundante e densa. No inverno, as folhas são menores do que na primavera e no verão. Além disso, é excelente na restauração de solos, possuindo uma grande capacidade de fixação de azoto atmosférico (Cassol *et al.*, 1999; Medeiros, 2016).

Em Portugal, várias espécies de *Trifolium* têm sido utilizadas para diferentes finalidades, incluindo para a proteção do solo (Medeiros, 2016). Estas plantas têm vindo a ganhar popularidade entre os produtores na região de Trás-os-Montes devido à sua persistência durante o inverno rigoroso, oferecendo cobertura vegetal durante a estação mais chuvosa (Aguiar & Rodrigues, 2010). Segundo Muñoz (1992), os trevos estão amplamente distribuídos na zona mediterrânica, na qual apresentam boa adaptação a diversos tipos de solos e ambientes.

Espécies do género *Trifolium* estabelecem relações simbióticas com a bactéria *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* em condições de azoto limitado (Cieśła *et al.*, 2016). Embora a inter-relação entre rizóbios e leguminosas seja bastante específica, o grau de especificidade varia conforme a espécie de rizóbio. No caso do *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, este fixa azoto exclusivamente com espécies do género *Trifolium*. Em contraste, o *Rhizobium* sp. NGR234 é capaz de induzir a nodulação em 112 géneros, incluindo uma planta não leguminosa do género *Parasponia* (Wang *et al.*, 2001).

A competição entre estirpes autóctones e introduzidas é um desafio no uso de rizóbios como inoculantes na agricultura (Ferguson *et al.*, 2020). Na simbiose entre trevo e *Rhizobium*, dois problemas principais são destacados: a barreira geográfica, devido aos grandes centros de diversidade dos trevos, e a barreira fenológica, resultante dos diferentes ciclos de crescimento das espécies anuais e perenes (Howieson *et al.*, 2005). Essas barreiras podem afetar a eficácia da inoculação e a formação de nódulos eficazes para a fixação de azoto, o que pode prejudicar a melhoria da fertilidade do solo e a produtividade das culturas. Portanto, a compreensão dessas interações simbióticas e das variáveis que influenciam a competição entre estirpes autóctones e introduzidas é fundamental para otimizar o uso de rizóbios como inoculantes em sistemas agrícolas.

Segundo Hoglund *et al.* (1979), Caradus (1990) e Ledgard *et al.* (1990), a fixação de azoto pelo trevo-branco em consórcios com gramíneas geralmente varia de 85 a 350 kg ha⁻¹ ano⁻¹. Esta prática pode ser uma solução viável para os agricultores europeus atenderem à demanda de azoto pelas culturas. Uma das principais dificuldades em pesquisas com trevos é garantir uma percentagem suficiente de plantas, especialmente quando cultivados em consórcio, de modo que contribuam de forma significativa para o fornecimento de azoto nas culturas associadas ou subsequentes. De acordo com Boller & Nösberger (1987), para alcançar uma fixação de azoto superior a 200 kg ha⁻¹ ano⁻¹ pelo trevo em consórcio, as condições climáticas e do solo devem ser favoráveis à produção de massa seca superior a 10 000 kg ha⁻¹ ano⁻¹. Segundo o mesmo autor, a proporção de trevo presente no consórcio deve ser de pelo menos 50%, e no mínimo 70% do N total no trevo deve ser proveniente da fixação biológica. Estas condições são essenciais para maximizar a contribuição do trevo na FBA e, conseqüentemente, na melhoria da fertilidade do solo e na sustentabilidade dos sistemas agrícolas. A otimização dessas

práticas pode proporcionar uma alternativa eficiente e ecológica para a gestão de nutrientes nas explorações agrícolas.

3. MATERIAL E METODOS

3.1 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE AZOTO

A primeira etapa deste trabalho consistiu na obtenção de bactérias fixadoras de azoto, onde foram isolados a partir de nódulos de plantas do género *Trifolium* coletadas em alguns pontos do distrito de Bragança (Tabela 1 e Figura 1).

Tabela 1 - Espécies de *Trifolium* e sua origem geográfica, utilizadas para o isolamento de bactérias fixadoras de azoto.

Localidade	Cultura	Espécie de planta	Código do isolado
Macedo de cavaleiros	Castanheiro	<i>Trifolium incarnatum</i>	RRA
Bragança	Pastagem	<i>Trifolium pratense</i>	RQ
Macedo de cavaleiros	Pastagem	<i>Trifolium repens</i>	RMB
Bragança	Olival	<i>Trifolium subterraneum</i>	RNA
Bragança	Pastagem	<i>Trifolium subterraneum</i>	RHA
Macedo de cavaleiros	Amendoal	<i>Trifolium vesiculosum</i>	RSB



Figura 1 - Coleta de nódulos de raízes de *Trifolium incarnatum* (a), *Trifolium vesiculosum* (b) e raízes com nódulos (c). Fonte: Saburo (2023).

As raízes das plantas coletadas foram meticulosamente lavadas em água corrente para remover quaisquer impurezas. Em seguida, foram retirados entre 8 a 16 nódulos de cada planta avaliada. Estes nódulos foram então sujeitos a uma desinfestação seguindo o protocolo descrito por Calazans *et al.* (2010). De forma breve, este método consistiu na imersão sequencial dos nódulos em álcool 90% por 10 segundos e hipoclorito de sódio

3% por 3 minutos, seguida pela sua lavagem, pelo menos cinco vezes, com água destilada esterilizada, numa câmara de fluxo laminar (Figura 2).

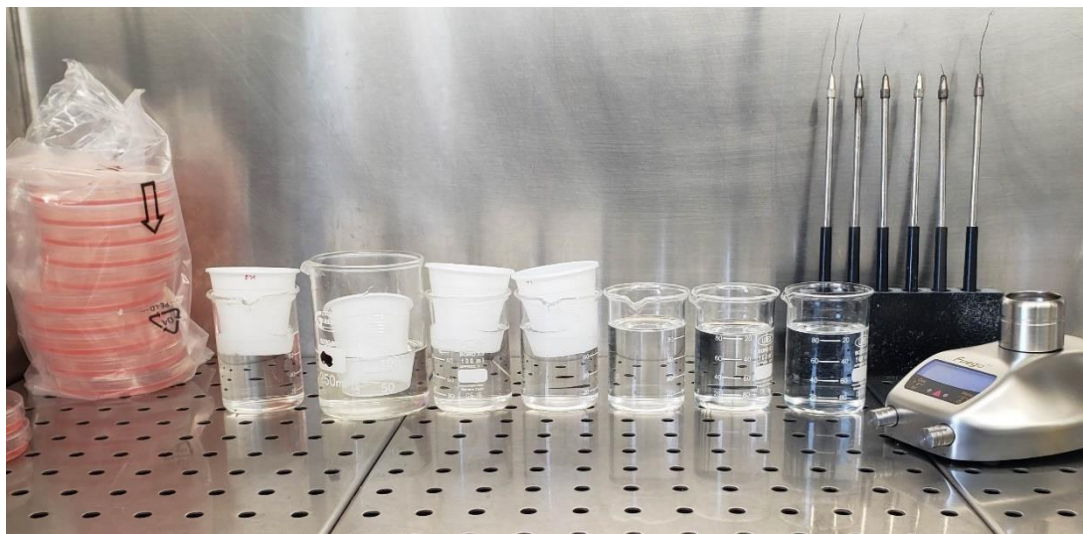


Figura 2 – Desinfestação de nódulos de *Trifolium* spp. para o isolamento de bactérias fixadoras de azoto, em câmara de fluxo. Fonte: Saburo (2023).

Para o isolamento, os nódulos foram macerados cuidadosamente num almofariz estéril, em seguida, 100 μ L deste macerado foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura Yeast Manitol Agar (YMA) com corante vermelho congo e pH ajustado entre 6,8 e 7,0 (Vincent, 1970). As placas foram incubadas a 28 °C, no escuro. Após sete dias de incubação, foram selecionadas colónias de bactérias que exibiam características típicas de rizóbios, conforme descrito por Hungria & Araújo (1994). Essas características incluem a forma da colónia (achatada, cónica e arredondada), a textura (branca opaca, leitosa, translúcida, brilhosa ou fosca), com a possibilidade de escurecer no centro com o envelhecimento da cultura, para além de as colónias poderem apresentar um aspeto bastante gomoso. Outro fator a ser considerado é a capacidade das colónias absorverem ou não o corante vermelho congo presente no meio. Geralmente, as colónias de rizóbios não absorvem ou absorvem muito pouco esse corante. As colónias com estas características foram repicadas para novo meio de cultura YMA, de forma sequencial, até obter culturas puras (Figura 3).

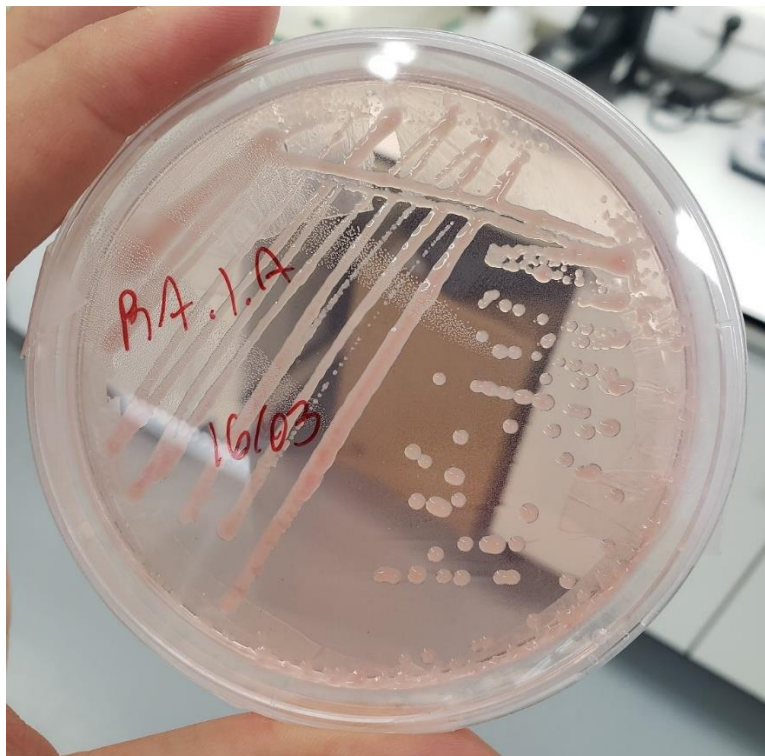


Figura 3 - Placa contendo colónias puras de bactérias em meio Yeast Manitol Agar isoladas a partir de nódulos de raízes de trevos. Fonte: Saburo (2023).

Após isolar e purificar as colónias, os isolados foram repicados para placas de Petri® contendo meio YMA com o corante azul de bromotimol (Hungria & Araújo, 1994). O pH do meio foi ajustado para 6,8, resultando em um meio de cultura verde. Isso permitiu observar que o tempo de crescimento dos isolados foi rápido, de 4 a 5 dias, e a sua capacidade de acidificar o pH do meio, alterou a coloração inicial de verde para amarelo. As colónias puras foram em seguida identificadas molecularmente e depositadas na coleção de culturas do Centro de Investigação de Montanha (CIMO-CC), do Instituto Politécnico de Bragança.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi conduzido no município de Bragança, situado na região de Trás-os-Montes, NE Portugal. Os testes foram realizados em vasos dispostos em uma estufa localizada nas coordenadas 41°47'48.8" N e 6°45'43.2" W, a uma altitude de 674 metros, nas instalações da Escola Superior Agrária (ESA) do Instituto Politécnico de Bragança (IPB).

O solo utilizado no experimento foi coletado na camada arável (0-20 cm) de um olival situado em Vilarinho dos Galegos, uma aldeia pertencente ao município de

Mogadouro, na região de Trás-os-Montes (Figura 4). Este solo é classificado como Leptossolo, o tipo predominante na área (ocupando cerca de 72% da região). Os Leptossolos são caracterizados por serem solos rasos (espessura < 30 cm), com baixo teor de matéria orgânica (inferior a 2%) e elevada pedregosidade (superior a 25%), frequentemente degradados pela erosão ou pela aplicação de tecnologias de baixo desenvolvimento. Após a coleta, o solo foi crivado (com malha de 4,25 mm) e homogeneizado.



Figura 4 - Coleta de solo na camada 0-20 cm de um olival localizado em Vilarino dos Galegos, Mogadouro. Fonte: Saburo (2023).

O ensaio ficou constituído por 110 vasos de polietileno, com 21,5 cm de altura, 15,5 cm de diâmetro e uma área de 0,045216 m². Cada vaso foi preenchido com 5,7 kg de solo (o solo ficou 5 cm abaixo do limite superior do vaso, totalizando 16,5 cm de altura). Após a pesagem do solo (5,7 kg por vaso), os vasos foram identificados com o respetivo tratamento e distribuídos aleatoriamente numa bancada da estufa, de forma a adoptar um delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) (Figura 5). Foi necessário aguardar alguns dias até as cepas estarem prontas para serem inoculadas nas sementes das três misturas.

Foram realizadas inoculações isoladas de 6 espécies de bactérias fixadoras de N em três combinações de trevos (misturas). A primeira mistura incluiu duas espécies de trevos de porte ereto, composta por sementes de *Trifolium vesiculosum* e *Trifolium incarnatum*. A segunda mistura ficou formada por duas cultivares de trevo subterrâneo,

sementes de *Trifolium subterraneum* cv. Campeda e *Trifolium subterraneum* cv. Woogenellup. A terceira mistura, ficou formada pelas três espécies (trevo subterrâneo + trevos de porte ereto). O ensaio incluiu 22 tratamentos (identificados com as letras de A a V, Tabela 2) com 5 repetições cada (110 vasos). Os tratamentos A, B, C, D representam os tratamentos testemunha, sendo um apenas constituído por solo sem sementeira (A, usado para comparar os efeitos nas propriedades do solo, não fazendo parte deste trabalho) e os outros três contendo as misturas de trevos sem inoculações (B, C, D) (Tabela 2).

Tabela 2 - Descrição dos tratamentos do ensaio instalado com espécies do género *Trifolium* (trevos) e bactérias fixadoras de azoto atmosférico (ver isolados na Tabela 1).

Tratamento	Descrição
A	Testemunha (solo original sem sementeira)
B	Mistura de trevo subterrâneo (sem inoculação)
C	Mistura de trevos de porte ereto (sem inoculação)
D	Mistura de trevo subterrâneo + de porte ereto (sem inoculação)
E	Mistura de trevo subterrâneo + cepa RHA
F	Mistura de trevos de porte ereto + cepa RHA
G	Mistura de trevo subterrâneo + de porte ereto + cepa RHA
H	Mistura de trevos subterrâneo + cepa RMB
I	Mistura de trevos de porte ereto + cepa RMB
J	Mistura de trevo subterrâneo + de porte ereto + cepa RMB
K	Mistura de trevo subterrâneo + cepa RNA
L	Mistura de trevos de porte ereto + cepa RNA
M	Mistura de trevo subterrâneo + de porte ereto + cepa RNA
N	Mistura de trevo subterrâneo + cepa RQ
O	Mistura de trevos de porte ereto + cepa RQ
P	Mistura de trevo subterrâneo + de porte ereto + cepa RQ
Q	Mistura de trevo subterrâneo + cepa RRA
R	Mistura de trevos de porte ereto + cepa RRA
S	Mistura de trevo subterrâneo + de porte ereto + cepa RRA
T	Mistura de trevo subterrâneo + cepa RSB
U	Mistura de trevos de porte ereto + cepa RSB
V	Mistura de trevo subterrâneo + de porte ereto + cepa RSB

R2	D1	T4	J1	J3	K4	T2	M5	C2	P4	U2	C4	V1	I3	E5	R4	J2	B5	F3
A1	T1	P1	H4	O1	C1	L4	I1	U5	S1	E1	G5	O4	E2	H1	V2	B2	F4	L2
	B4	S2	L3	E3	R3	J5	F1	H5	M3	A4	Q4	V4	Q5	P5	G2	O2	K1	B3
	S5	G3	R5	L5	V3	Q3	N5	A5	F2	C3	N2	R1	K5	F5	L1	U3	H2	N4
	O3	U4	C5	D5	I4	G1	A3	E4	D3	O5	I2	N1	D2	T3	A2	H3	P2	V5
	I5	B1	U1	M2	S3	J4	M1	Q1	G4	K2	K3	D4	P3	Q2	N3	M4	T5	S4

Figura 5- Esquema dos tratamentos dispostos de forma aleatória na bancada da estufa. Os números representam as repetições de cada tratamento. Fonte: Saburo (2023).

3.3 PREPARO DO INÓCULO E SEMENTEIRA

Os seis isolados bacterianos obtidos foram cultivados em meio YM líquido em agitação constante por cinco dias a 28°C, no escuro, de forma a obter o inóculo. Após este período, a concentração de células foi determinada através da contagem das mesmas em câmara de Neubauer (Moura *et al.*, 1987). O número de células foi então correlacionado com a absorbância medida num espectrofotômetro a 540 nm. Em seguida foi ajustada a concentração do inóculo para 10⁸ células por mL.

Após a preparação dos inóculos, utilizando uma balança analítica do laboratório de solos do IPB, procedeu-se à pesagem das sementes das espécies de trevos para formar as três misturas e os 22 tratamentos referidos na Tabela 2. As pesagens foram realizadas de acordo com a área dos vasos, seguindo uma taxa de sementeira de 40 kg ha⁻¹ e admitindo uma taxa de germinação de 80%. As sementes correspondentes a cada tratamento foram colocadas em copinhos de plástico descartáveis devidamente identificados (Figura 6).



Figura 6 - Sementes dos diversos tratamentos para inoculação. Fonte: Saburo (2023).

Os vasos foram regados na manhã do dia da sementeira, a qual ocorreu no final da tarde do dia 23 de maio de 2023. Ao fim do dia, quando a temperatura havia amenizado, todo o material foi transferido para a estufa da ESA para a instalação do experimento. A inoculação das sementes de cada tratamentos foi realizada utilizando uma micropipeta, na dose de 10 mL kg^{-1} de sementes (Figura 7). Para os tratamentos testemunhas, as sementes foram inoculadas com meio de cultura YM líquido esterilizado.

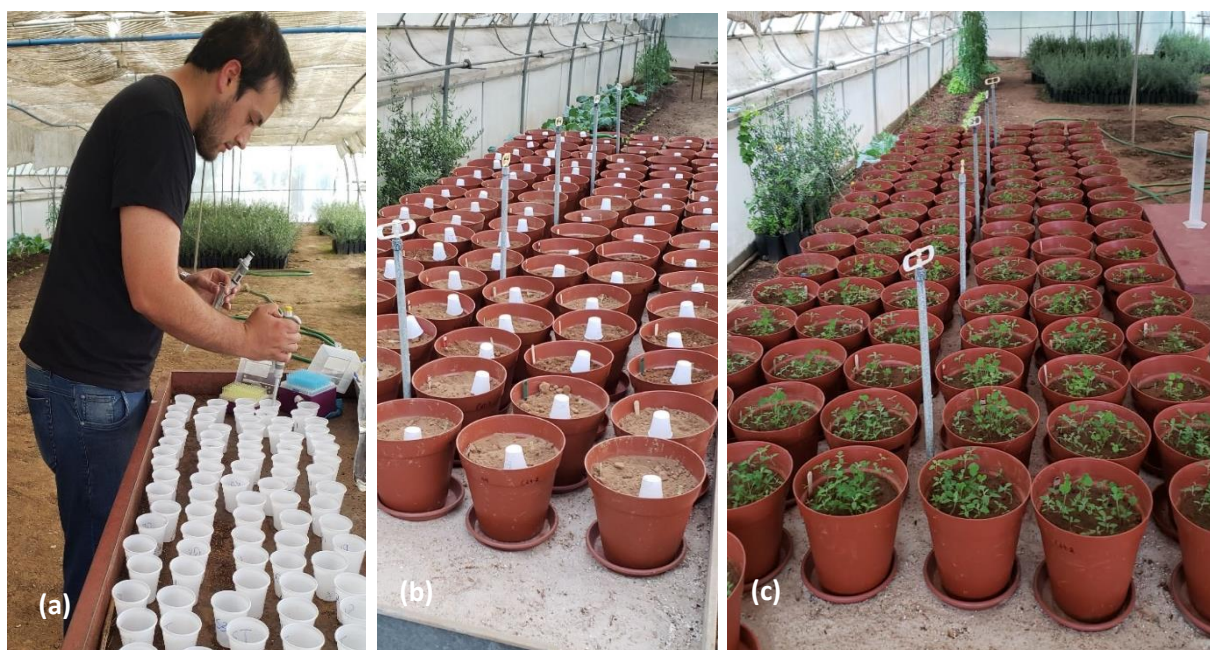


Figura 7 - Inoculação das sementes de cada tratamento (a), sementeira (b) e um mês após a sementeira (c). Fonte: Saburo (2023).

Após a sementeira, os vasos foram acompanhados por um período de 52 dias (de 23 de maio a 14 de julho de 2023), abrangendo o período de início da floração das plantas infestantes, o que correspondeu ao pico de produção de biomassa vegetal. Os vasos foram irrigados três vezes por semana para garantir que o solo permanecesse com um teor de humidade entre 60% e 80% da capacidade de campo. A temperatura no interior da estufa foi monitorizada utilizando um datalogger da marca Elitheclog®, modelo RC-5+. As medições foram realizadas a cada 5 minutos ao longo de todo o período do ensaio. Durante este período, a temperatura variou entre um máximo de 44,3°C e um mínimo de 12,2°C, com uma média de 24,6°C.

No intuito de simular condições de campo, no que respeita à invasão de ervas daninhas, não foi feito qualquer controlo dessas plantas durante o período do ensaio, o que influenciou os resultados.

3.4 DETERMINAÇÕES DE CAMPO

3.4.1 COLHEITA DE AMOSTRAS DA PARTE AÉREA DA VEGETAÇÃO E DE NÓDULOS DAS RAÍZES

No final do período experimental, em 14 de julho de 2023, procedeu-se ao corte da parte aérea das plantas daninhas para avaliação da massa seca e facilitar a manipulação dos vasos com as plantas de *Trifolium* sp. (trevos) (Figura 8).



Figura 8 - Vaso com infestantes e trevo (esquerda), vaso apenas com trevo (direita). Fonte: Saburo (2023).

As plantas de *Trifolium* spp. foram cuidadosamente removidas do solo e lavadas em água, visando preservar ao máximo os nódulos presentes nas raízes. Em seguida, as raízes com nodulações foram separadas, identificadas e armazenadas em caixas de esferovite com material refrigerante para preservação. Nestas plantas foram avaliados alguns parâmetros de crescimento, nomeadamente a altura total da parte aérea, o teor de clorofilas e a matéria seca. Salienta-se que a altura total das plantas de trevo foi medida com uma régua depois das plantas terem sido extraídas dos vasos (Figura 9). Foi ainda colhido um trifólio (folha) do terço superior de cada planta para análise de clorofilas, sendo armazenado em sacos identificados e colocados em caixas de esferovite. Todo o material restante da parte aérea foi devidamente identificado e armazenado em caixas de esferovite para determinação da massa seca (MS) em laboratório.



Figura 9 - Medição do comprimento da parte aérea das plantas. Fonte: Saburo (2023).

3.4.2 COLHEITA DE AMOSTRAS DE SOLO

Em cada tratamento colheram-se amostras perturbadas de solo para avaliação da dos teores de azoto no solo (Figura 10).



Figura 10 - Colheita de amostras de solo. Fonte: Saburo (2023).

3.5 DETERMINAÇÕES LABORATORIAIS

3.5.1 DETERMINAÇÃO DE CLOROFILA A E B

Para a determinação de clorofilas colheu-se uma folha do terço superior em cada planta, sendo armazenada em saco identificado e colocado em caixa de esferovite refrigerado. A determinação de clorofilas a, b, e total, foi efetuada logo após a colheita das folhas utilizando a técnica espectrofotométrica após extração metanólica, conforme descrito por Ozerol & Titus (1965). A análise dos pigmentos foi realizada em triplicado para cada tratamento. Em resumo, 0,1 g de folhas de trevo de cada tratamento colhidas no terço superior das plantas e previamente cortada em pequenos fragmentos, foram imersos em 10 mL de metanol 99,8% durante 24 horas, a 4 °C e no escuro (Figura 11). Após esse período, a absorbância do extrato foi medida a 651 e 664 nm. As concentrações de clorofila a, clorofila b e clorofila total foram calculadas utilizando as seguintes fórmulas:

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g/mL}) = 16,5 \text{ Abs}_{664} - 8,34 \text{ Abs}_{651}$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g/mL}) = 33,8 \text{ Abs}_{651} - 12,5 \text{ Abs}_{664}$$

$$\text{Clorofila total } (\mu\text{g/mL}) = 25,5 \text{ Abs}_{651} + \text{Abs}_{664}$$



Figura 11 - Amostras para leitura de clorofilas. Fonte: Saburo (2023).

3.5.2 DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA SECA

Todo o material restante da parte aérea foi utilizado para determinar a matéria seca (MS). Esta determinação de matéria seca foi igualmente efetuada para as plantas infestantes. Para tal, a parte aérea das plantas infestantes e os trevos, foram secas numa estufa de ventilação forçada por 72 horas a uma temperatura de 65°C. Após o processo de secagem, as amostras foram pesadas numa balança semi-analítica para determinar a matéria seca produzida (Figura 12).



Figura 12 - Envelopes para secagem das amostras de trevos. Fonte: Saburo (2023).

3.5.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AZOTO DO SOLO

Em cada tratamento, colheram-se amostras perturbadas de solo para avaliação do teor de azoto no solo (Figura 10). Após colheita, as amostras de solo foram secas a 45°C e crivadas num crivo de malha de 2 mm, de modo a separar os elementos grosseiros da terra fina (partículas com dimensões inferiores a 2 mm). Nas amostras de terra fina de cada tratamento, foi avaliado o teor de azoto do solo por combustão a 1000 °C e determinação em analisador elementar.

3.5.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS FIXADORAS DE AZOTO

Os isolados puros foram identificados por meio do sequenciamento da região V5-V9 do gene 16S rRNA. A extração do ADN genómico foi realizada utilizando o kit REDEExtract-N-Amp™ Plant PCR da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, foi retirado cerca de 0,1 a 0,2 g de massa microbiana de colónias em crescimento ativo para um microtubo de 1,5 mL contendo 25µL de tampão de extração. Após a mistura, as amostras foram incubadas a 95°C durante 10 minutos, adicionando, em seguida, 50µL de tampão de diluição. Após homogeneização, as amostras foram utilizadas para amplificar a região V5-V9 do gene 16S rRNA. Para a amplificação, 2 µL de ADN extraído foram adicionados a uma mistura de PCR de 20 µL, que continha: tampão de reação 1x (BIORON GmbH, Römerberg, Alemanha), 0,4 µL de dNTPs (10mM), 0,4 µL do primer 895F à concentração 10µM (5'-CRCCTGGGGAGTRCRG-3') (Hodkinson & Lutzoni, 2009), 0,4 µL do primer 1492R à concentração 10µM (3'-GGTTACCTTGTTACGACTT-5') (WEISBURG *et al.*, 1991) e 0,1 µL de Taq DNA Polymerase (BIORON GmbH, Römerberg, Alemanha). Durante as amplificações foram efetuados controlos negativos que continham 2 µL de água ultrapura estéril, em substituição de DNA bacteriano.

A amplificação foi executada num termociclador MyCycler™ (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) com o seguinte programa: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida de 34 ciclos de desnaturação a 95 °C por 40 segundos, emparelhamento a 54 °C por 40 segundos e extensão a 72 °C por 45 segundos, com uma extensão final a 72 °C por 7 minutos.

A qualidade do DNA amplificado foi avaliada por eletroforese, em tinas horizontais da BioRad, através de géis de agarose a 1% (p/v) em tampão TAE 1X (Tris pH7,6 89mM, ácido bórico 89mM e EDTA 2mM). As amostras de DNA amplificadas e o marcador molecular 1Kb (DNA Ladder, Promega) foram aplicados nos poços dos géis. A separação eletroforética foi efetuada a uma diferença de potencial de 100 V e, após a separação terminar, mergulhou-se o gel numa solução de RedGel™ (BIOTIUM, 3X) durante cerca de 30 minutos. O DNA foi visualizado por fluorescência sob radiação ultravioleta utilizando um transiluminador ChemiDoc™XRS (BioRad). Os produtos amplificados foram purificados e sequenciados usando os serviços da Macrogen Inc. (Madri, Espanha).

Os isolados bacterianos foram identificados utilizando a ferramenta BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool for nucleotides), com a opção “Sequences from type material” selecionada no banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este procedimento determinou o grau de similaridade entre as sequências inseridas e as depositadas no banco de dados, através de alinhamentos. Os resultados desses alinhamentos foram classificados com base na maior percentagem de identidade e no menor valor E-value (*Expected value*).

A análise filogenética dos isolados bacterianos foi realizada usando o software MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). Para isso, as sequências brutas dos isolados de referência com melhor % de similaridade (obtida no BLAST) e as 14 sequências obtidas no presente estudo foram montadas e alinhadas. Todos os alinhamentos de sequências múltiplas foram feitos usando o ClustalW. A árvore filogenética foi construída pelo método de máxima verossimilhança, com base no modelo Hasegawa-Kishino-Yano (Hasegawa *et al.*, 1985; Kumar *et al.*, 2018). De acordo com o critério de informação de Akaike corrigido, o modelo de substituição selecionado foi o HKY + I. Informações detalhadas sobre as sequências das bactérias caracterizadas neste estudo estão resumidas na Figura 31 (Secção Resultados e Discussão).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na condução das análises estatísticas, empregou-se o software RStudio para processamento dos dados. Os dados foram submetidos a uma análise de normalidade e posteriormente a análise de variância (ANOVA) e, quando constatada significância estatística, procedeu-se à aplicação do teste de comparação de médias de Tukey ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o intuito de facilitar a análise dos dados, cada mistura foi comparada de maneira isolada (efeito da bactéria fixadora de azoto) e com o respetivo tratamento controlo (mistura sem inoculação). Também todos os tratamentos foram comparados entre si.

De uma forma global, os resultados não mostraram diferenças estatisticamente significativas, sugerindo que as bactérias bioprospectadas não foram eficientes na fixação de azoto atmosférico. Consequentemente, os custos fisiológicos associados à formação das nodulações não se refletiram em um aumento de rendimento das plantas.

4.1 COMPRIMENTO DAS PLANTAS DE TREVOS

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos quando comparadas as misturas de forma isolada de trevo subterrâneo (Figura 13), de trevos de porte ereto (Figura 14) e mistura de trevos de porte ereto + subterrâneo (Figura 15).

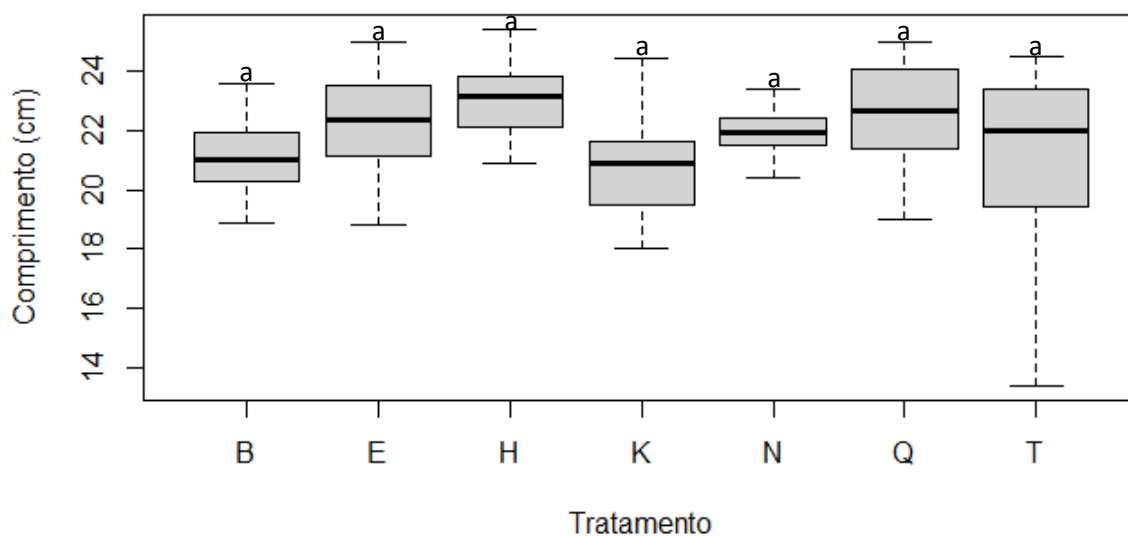


Figura 13 - Comprimento da parte aérea das plantas dos tratamentos das misturas de trevo subterrâneo. Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos ($p < 0,05$).

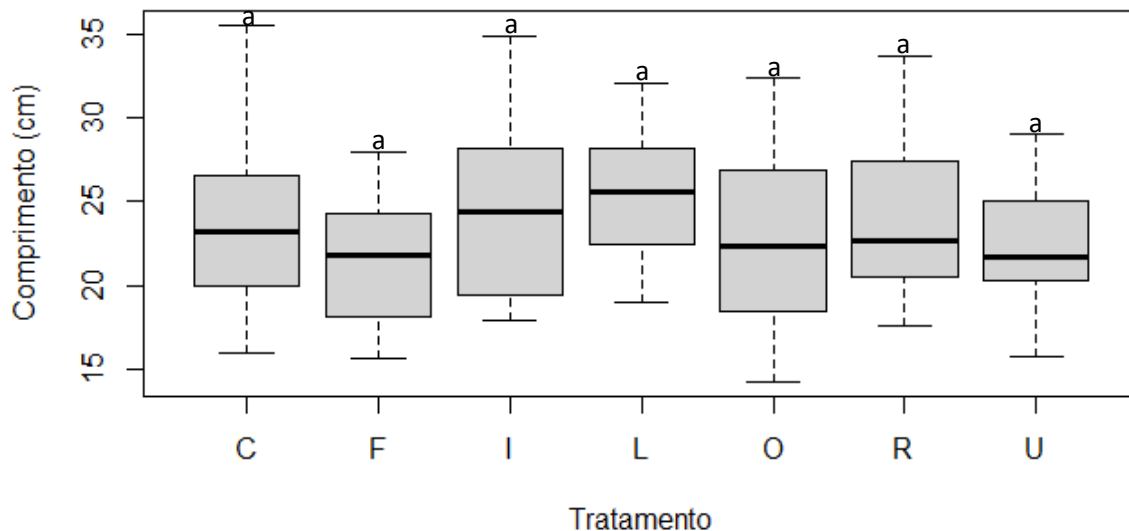


Figura 14 - Comprimento da parte aérea das plantas dos tratamentos das misturas de trevos de porte ereto. Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos ($p < 0,05$).

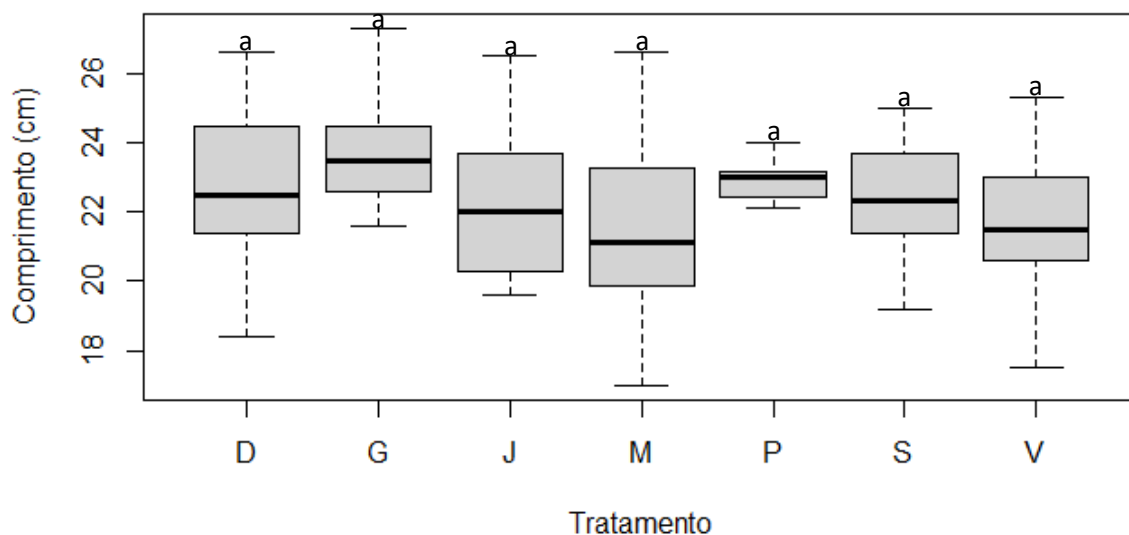


Figura 15 - Comprimento da parte aérea das plantas dos tratamentos das misturas de trevo subterrâneo + trevos de porte ereto. Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos ($p < 0,05$).

Estudos realizados por Bonfada *et al.* (2018) concluíram que a inoculação de sementes de trevo vermelho promoveu o desenvolvimento das plantas, resultando em maior altura em comparação com as plantas não inoculadas. No entanto, os resultados indicaram que a inoculação foi mais eficaz quando realizada em substrato orgânico em comparação com solo mineral. Isso sugere que há uma interação negativa entre as

bactérias inoculadas e os microrganismos já presentes no solo, afetando a eficácia da inoculação.

Segundo as pesquisas realizadas por Machado (2015), de um total de 70 isolados analisados, 61 demonstraram a capacidade de formar nódulos em serradelas, com 38 destes mostrando eficiência em promover o crescimento das plantas.

4.2 PRODUÇÃO DE BIOMASSA DAS PLANTAS INFESTANTES E DE TREVOS

Apesar da elevada infestação da planta invasora *Chenopodium album* no ensaio experimental (Figura 8), não se registaram diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos tratamentos, mostrando os tratamentos B (mistura de trevo subterrâneo sem inoculação) e T (mistura de trevo subterrâneo com a cepa RSB) os maiores valores médios de biomassa das plantas infestantes (Figura 16).

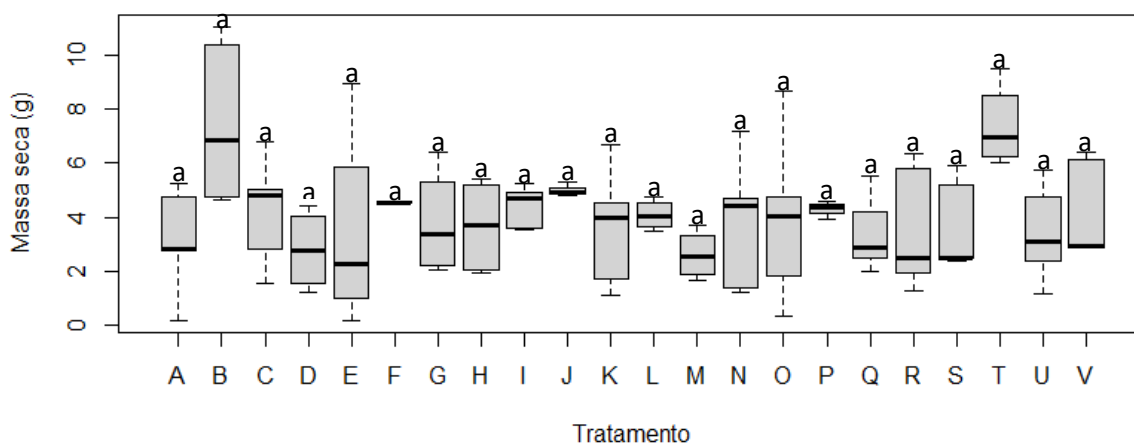


Figura 16 – Biomassa (g vaso^{-1}) das plantas infestantes de todos os tratamentos do ensaio experimental (A a V). Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos ($p < 0,05$).

Um dos principais fatores que contribuíram para o desempenho abaixo do esperado dos trevos, foi a significativa supressão causada pela espécie *Chenopodium album*. Esta supressão foi particularmente notável devido à rápida emergência dessa erva daninha, que ocorreu em apenas cinco dias após a instalação do experimento. Além disso, a arquitetura da planta de *Chenopodium album* também teve um impacto negativo no desenvolvimento dos trevos. Com um caule ereto e ramificado, a planta daninha criou um efeito de "guarda-chuva", reduzindo a quantidade de luz solar disponível para os trevos, que possuem uma estrutura mais rasteira. Esse fenômeno resultou em condições adversas

para o crescimento e desenvolvimento dos trevos, comprometendo assim o seu desempenho. Neste sentido, a biomassa produzida pelos trevos, também não registou diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos quando comparadas as misturas de forma isolada de trevo subterrâneo (Figura 17) e de trevos de porte ereto (Figura 18).

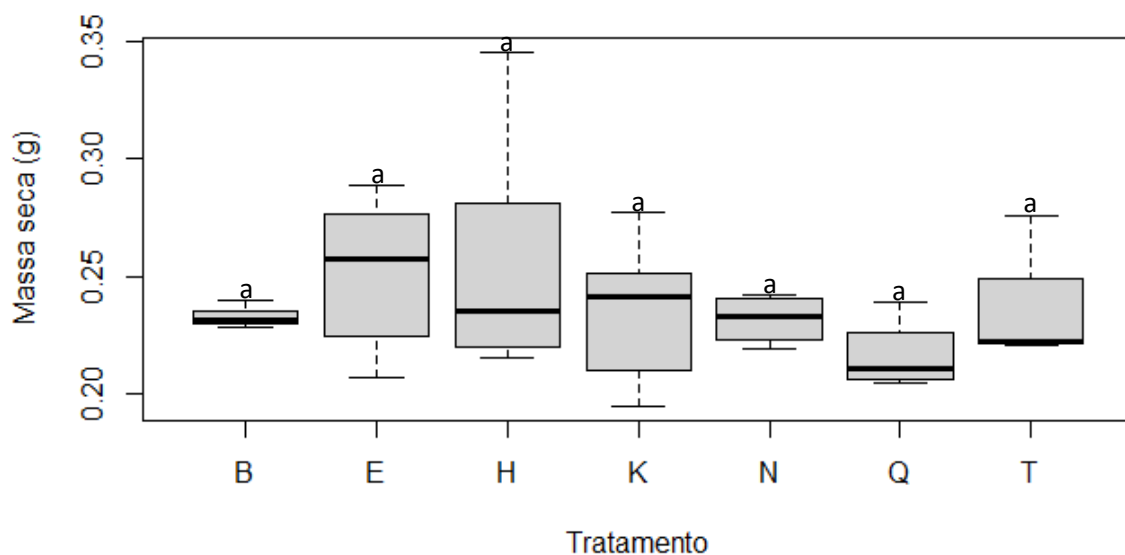


Figura 17 - Biomassa (g vaso^{-1}) dos tratamentos da mistura de trevo subterrâneo. Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos ($p < 0,05$).

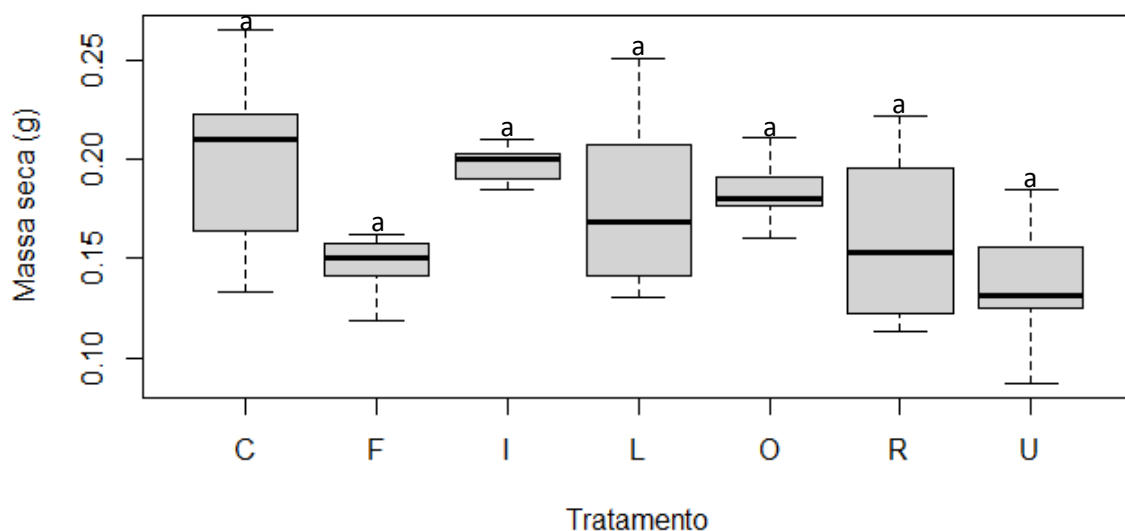


Figura 18 - Biomassa (g vaso^{-1}) dos tratamentos da mistura de trevos de porte ereto. Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos ($p < 0,05$).

Apenas foram registadas diferenças significativas para a mistura de trevo subterrâneo + trevos de porte ereto (Figura 19). Os tratamentos M (mistura de trevo subterrâneo + trevos de porte ereto com o isolado RNA), S (mistura de trevo subterrâneo + trevos de porte ereto com o isolado RRA) e V (mistura de trevo subterrâneo + trevos de porte ereto com o isolado RNA), mostraram valores significativamente inferiores quando comparados com os restantes tratamentos da respetiva mistura (Figura 19).

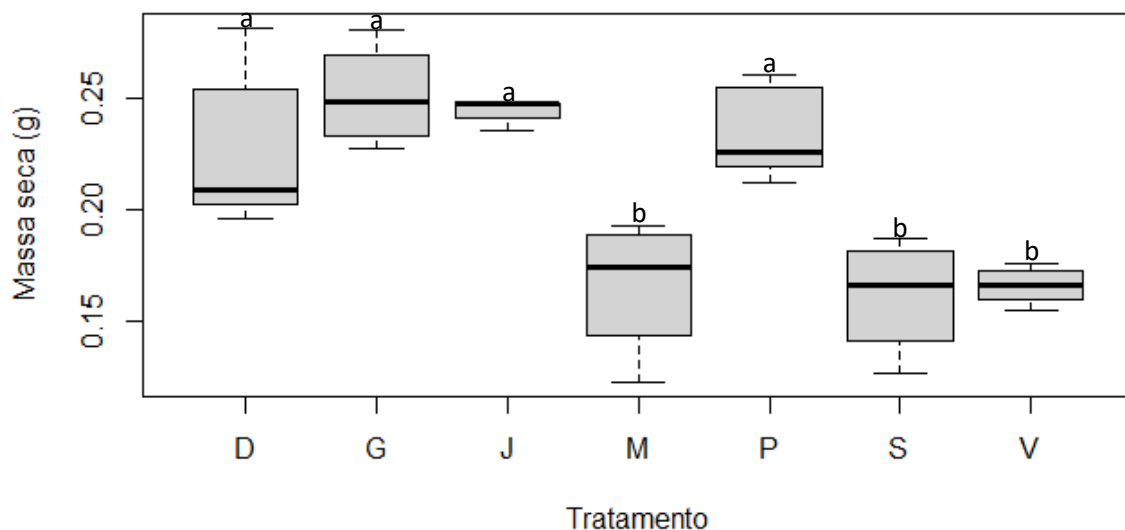


Figura 19 - Biomassa (g vaso^{-1}) dos tratamentos da mistura de trevo subterrâneo + trevos de porte ereto. Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos ($p < 0,05$).

Quando comparados todos os tratamentos entre si (B a V), observou-se que os tratamentos F (mistura de trevos de porte ereto com o isolado RHA) e U (mistura de trevos de porte ereto com o isolado RSB) apresentaram valores de biomassa significativamente inferiores comparativamente às testemunhas (B, C, D, as três misturas de trevos sem inoculação). Também é de salientar que nenhum dos tratamentos testados, produziu quantidades de biomassa significativamente superiores às testemunhas (Figura 20).

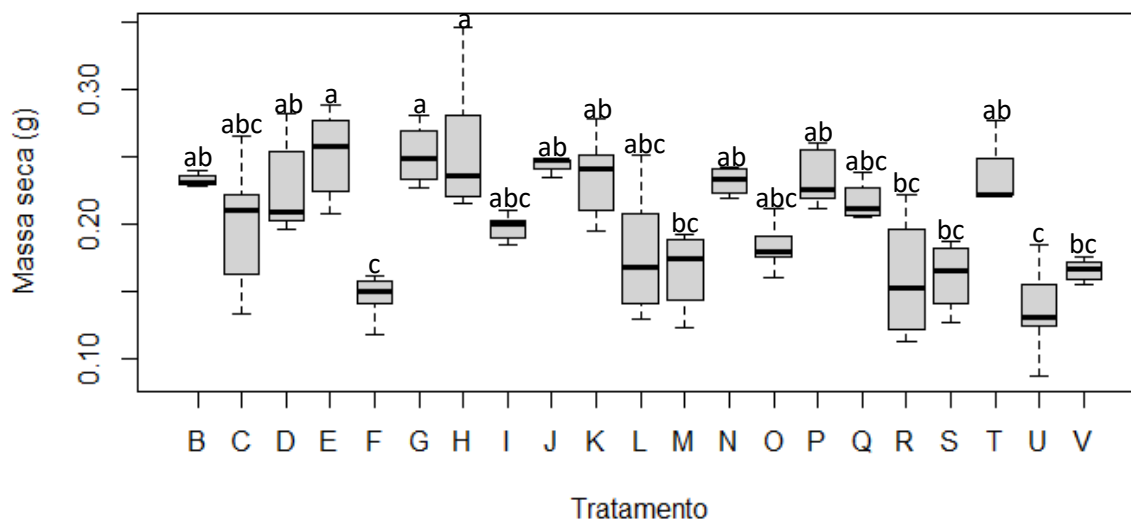


Figura 20 - Biomassa (g vaso^{-1}) dos trevos em todos os tratamentos do ensaio experimental (B a V). Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos ($p < 0,05$).

A produção de biomassa pelas plantas de trevos sugerem que não basta implementar plantas de cobertura sem antes realizar o controlo de ervas daninhas no campo. No trabalho de Schuster et al. (2013), foi constatada uma redução significativa de 96% na biomassa produzida por trevos brancos em um experimento de 119 dias, quando não houve controlo de plantas daninhas, mesmo com o uso de inoculante específico contendo *Rhizobium trifolii*.

De acordo com Den et al. (2007), o trevo emerge aproximadamente 20 dias após a sementeira. Devido ao tamanho reduzido de suas sementes, as plântulas são pequenas e seu crescimento inicial é lento (Lustosa et al., 2011). Esse fenómeno, combinado com o revolvimento do solo no sistema de preparo convencional, resulta numa elevada expressão do banco de sementes presente no solo logo após a sementeira, o que desencadeia um grande fluxo de emergência de plantas daninhas (Meschede et al., 2004).

Um fator que também influenciou os resultados foi a época de instalação do experimento. A temperatura média da estufa, durante o experimento, não era favorável para o desenvolvimento dos trevos, que são espécies de estações frias. A temperatura ideal para a germinação dos trevos varia de 15°C a 20°C (Brasil, 2009). Embora os trevos

resistam ao inverno, completam seu ciclo durante a primavera, as temperaturas dentro da estufa durante o experimento não estavam favoráveis para a espécie.

Em contraste, a erva daninha *Chenopodium album* tem uma faixa de temperatura favorável para a germinação de suas sementes similar à dos trevos, variando de 15°C a 25°C (Tanveer *et al.*, 2009). No entanto, diferentemente dos trevos, a *Chenopodium album* encerra seu ciclo no verão. Essa diferença no ciclo de vida e nas condições ideais de germinação entre as espécies (infestantes e trevos) pode ter contribuído para os resultados observados no experimento.

4.3 TEOR DE CLOROFILA NAS FOLHAS DOS TREVOS

Capelesso *et al.* (2016) observou que, mesmo com a inoculação de bactérias diazotróficas fixadoras de N em cana-de-açúcar, não ocorreu contribuição significativa na habilidade competitiva da cultura contra plantas daninhas, nem redução dos teores de clorofilas das folhas. No presente trabalho é possível observar que os tratamentos da mistura de trevo subterrâneo não interferiram com a produção de clorofila “a” (Figura 21). Já na mistura de trevos de porte ereto, todos os tratamentos inoculados com bactérias fixadoras de N (F, I, L, O, R, U) contribuíram para teores significativamente superiores em relação à testemunha (C) (Figura 22). Quando as quatro espécies de trevo são misturadas (trevo subterrâneo + trevos de porte ereto), os tratamentos G, M e V produziram quantidades de clorofila “a” significativamente superiores à testemunha (D) (Figura 23).

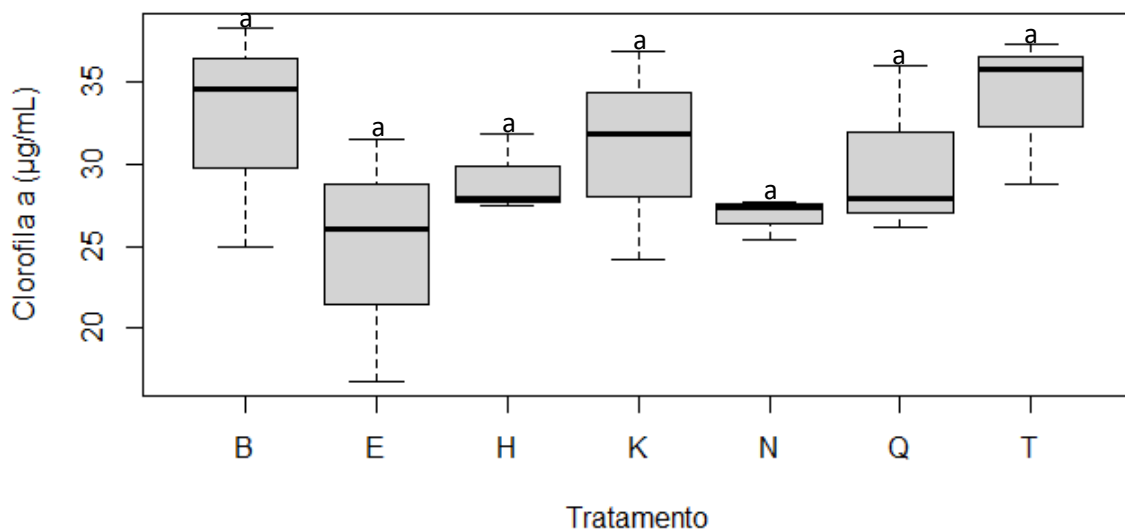


Figura 21 - Teor de clorofila “a” nos tratamentos da mistura de trevo subterrâneo. Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos ($p < 0,05$).

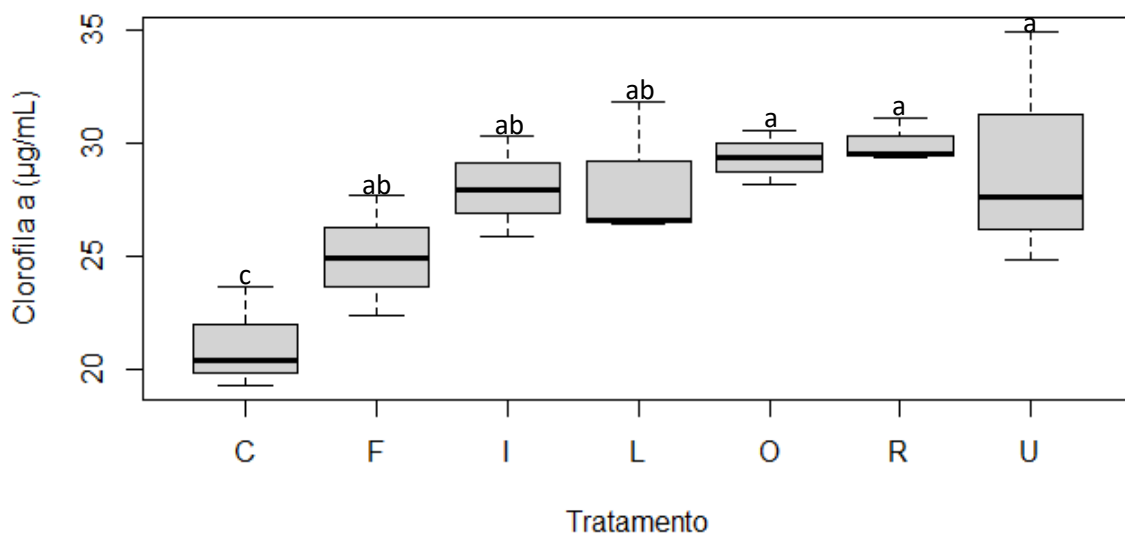


Figura 22 - Teor de clorofila “a” nos tratamentos da mistura de trevos de porte ereto. Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos ($p < 0,05$).

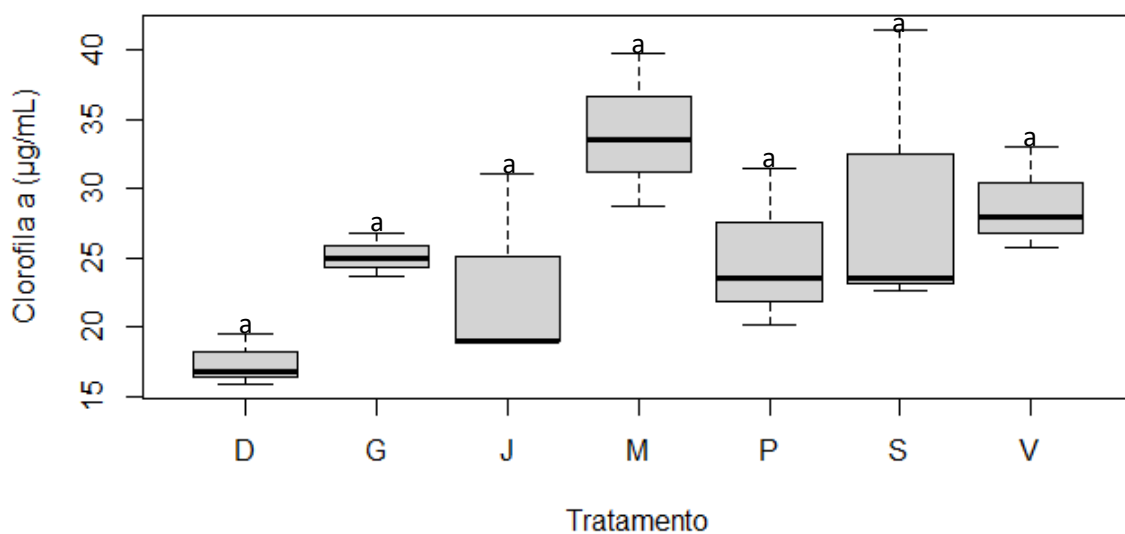


Figura 23 - Teor de clorofila “a” nos tratamentos da mistura de trevo subterrâneo + trevos de porte ereto. Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos ($p < 0,05$).

O padrão de variação da clorofila “b” difere do da clorofila “a”. Os tratamentos K (mistura de trevo subterrâneo com o isolado RNA) e N (mistura de trevo subterrâneo com o isolado RQ), registaram teores de clorofila “b” significativamente mais baixos que o tratamento testemunha (B) (Figura 24). Relativamente à mistura de trevos de porte ereto, os tratamentos F (mistura de trevos de porte ereto com o isolado RHA) e I (mistura de trevos de porte ereto com o isolado RMB) destacaram-se dos restantes ao produzirem quantidades superiores de clorofila “b” (Figura 25). A mistura de trevo subterrâneo + trevos de porte ereto não interferiu na produção de clorofila “b” (Figura 26).

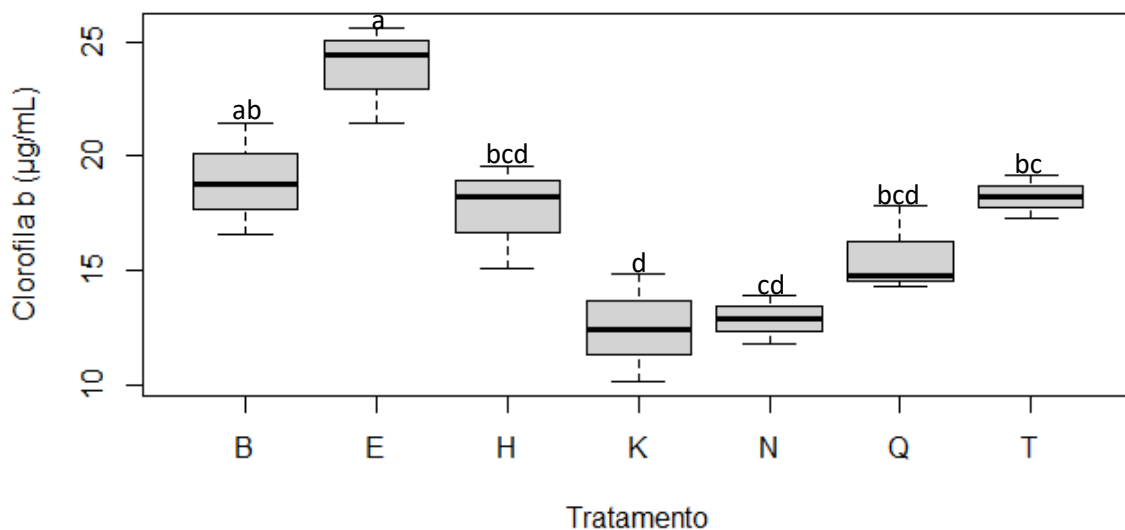


Figura 24 - Teor de clorofila “b” nos tratamentos da mistura de trevo subterrâneo. Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos ($p < 0,05$).

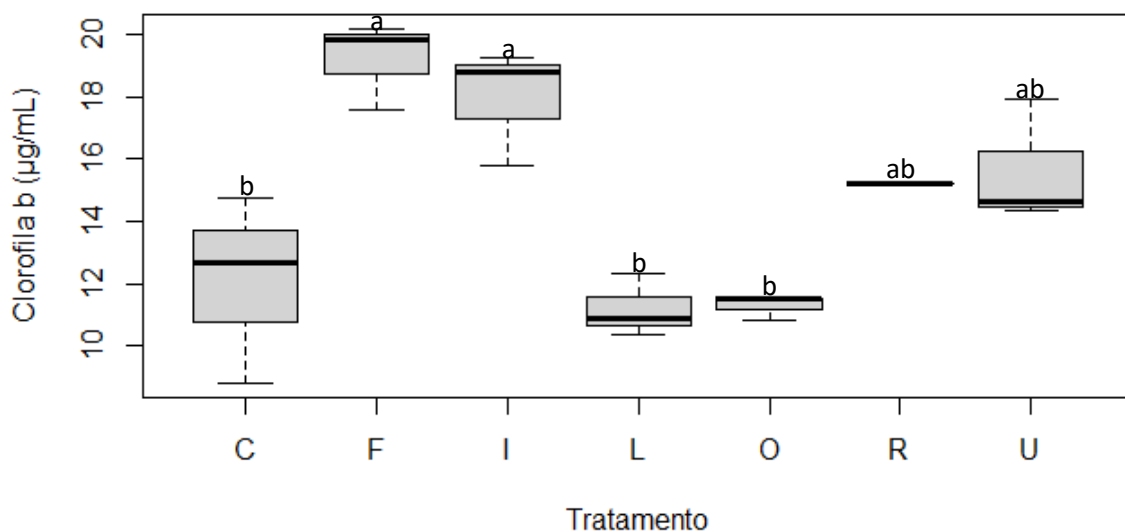


Figura 25 - Teor de clorofila “b” nos tratamentos da mistura de trevos de porte ereto. Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos ($p < 0,05$).

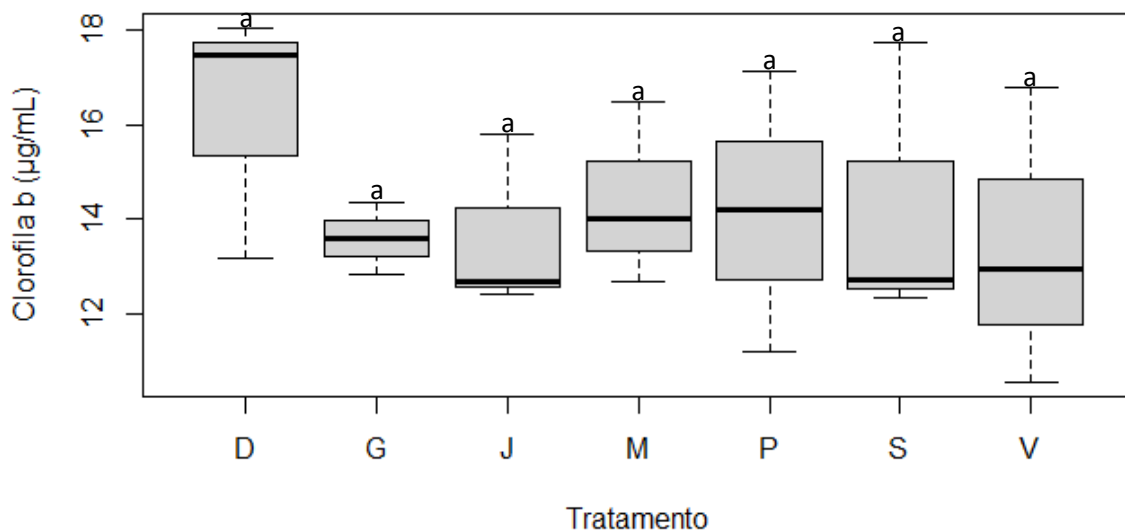


Figura 26 - Teor de clorofila “b” nos tratamentos da mistura de trevo subterrâneo + trevos de porte ereto. Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos ($p < 0,05$).

No que respeita aos teores de clorofila total, esta não foi afetada na mistura de trevo subterrâneo (Figura 27), bem como na mistura de trevo subterrâneo + trevos de porte ereto (Figura 29). Na mistura de trevos de porte ereto, os tratamentos F, I, R e U destacaram-se ao registarem valores significados mais elevados que o tratamento testemunha (C) (Figura 28).

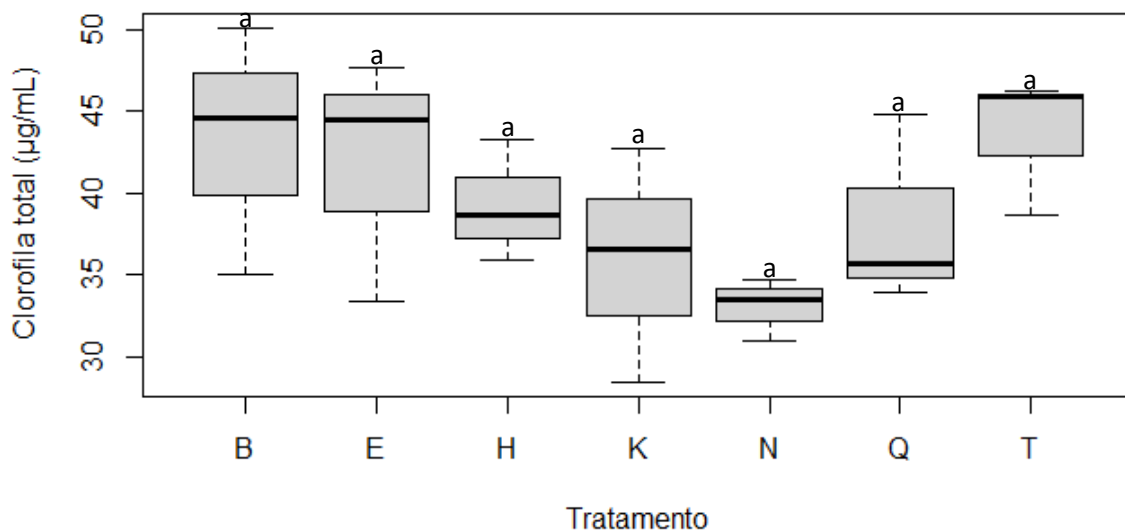


Figura 27 - Teor de clorofila total nos tratamentos da mistura de trevo subterrâneo. Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos ($p < 0,05$).

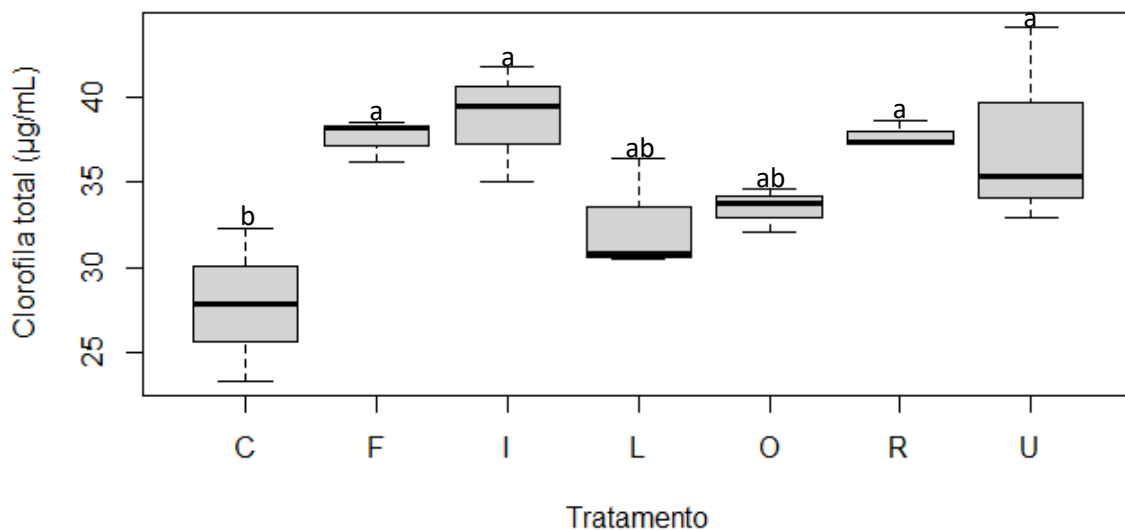


Figura 28 - Teor de clorofila total nos tratamentos da mistura de trevos de porte ereto. Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos ($p < 0,05$).

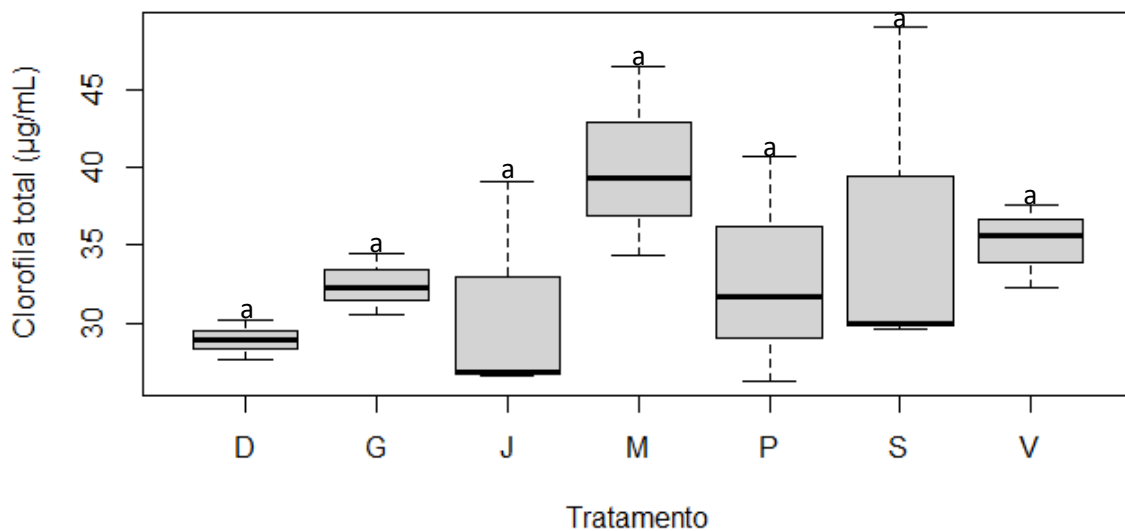


Figura 29 - Teor de clorofila total nos tratamentos da mistura de trevo subterrâneo + trevos de porte ereto. Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos ($p < 0,05$).

Apesar da variabilidade dos resultados, não foi observada uma correlação significativa entre os valores de clorofila “a”, “b” e total com o incremento de biomassa nos tratamentos.

4.4 TEOR DE N DO SOLO

De acordo com a Figura 30 não ocorreram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos para o teores de azoto do solo. A ausência de incremento de N no solo pode ser atribuída ao facto de que a biomassa do ensaio foi removida para determinação da matéria seca produzida em cada tratamento. Em condições normais, quando o restolho é mantido no campo, ocorre sua decomposição, promovendo a ciclagem de nutrientes. É importante ressaltar que, em circunstâncias típicas, aproximadamente 20% da biomassa é convertida em MOS. Contudo, essa taxa pode variar significativamente dependendo das condições ambientais específicas e das práticas de manejo do solo (Oliveira *et al.*, 2004).

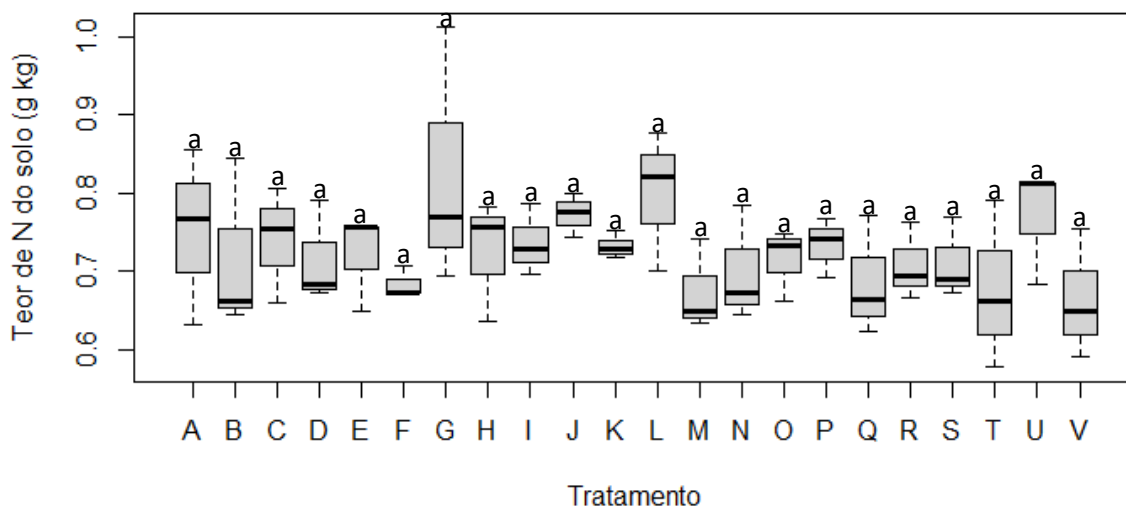


Figura 30 - Teor de N no solo de todos os tratamentos do ensaio experimental (A a V). Ver significado dos tratamentos na Tabela 2. Letras diferentes nas colunas diferem significativamente os tratamentos ($p < 0,05$).

4.5 IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS FIXADORAS DE AZOTO

No total, foram identificadas seis unidades taxonómicas operacionais (UTO) de bactérias a partir de plantas do género *Trifolium* colhidas no distrito de Bragança. Quatro das seis UTO de bactérias pertencem ao género *Rhizobium* e duas ao género *Agrobacterium* (Tabela 3). A análise filogenética destas seis UTOs com sequências V5-V9 do gene 16S rRNA para *Rhizobium* e *Agrobacterium* já existentes na base de dados GenBank, mostra dois clados diferentes: um para o *Rhizobium* e outro para o *Agrobacterium* (Figura 31). No primeiro clado, as UTOs *Rhizobium* sp.1, *Rhizobium* sp.2

e *Rhizobium* sp.4 são distintas entre si mas filogeneticamente próximas de *Rhizobium viscosum*. Por sua vez, a UTO *Rhizobium* sp.3 mostrou ser filogeneticamente próxima das espécies *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium phaseoli* e *Rhizobium pisi*. No segundo clado, as UTOs *Agrobacterium* sp. 1 e *Agrobacterium* sp. 2 são diferentes entre si, mas filogeneticamente próximas de *Agrobacterium radiobacter* e *Agrobacterium tumefaciens*. Estas últimas, apesar de serem associados a patogenicidade, os tratamentos não demonstraram qualquer sintomatologia de doenças.

Estudos conduzidos por Flores *et al.* (2017), indicam que a espécie *Arthrobacter viscosus* foi reclassificada como *Rhizobium viscosum*. Posteriormente, Kumar *et al.* (2023) documentaram a nodulação em feijão-caupi (*Cajanus cajan*) por espécies de *Rhizobium* spp. geneticamente semelhantes a *R. viscosum*. Na literatura não foram encontrados registros de nodulação causados por essa espécie (*R. viscosum*).

O *Rhizobium leguminosarum* possui a habilidade de formar associações simbióticas com uma ampla variedade de hospedeiros, abrangendo diversas espécies dos géneros *Lathyrus*, *Lens*, *Phaseolus*, *Pisum*, *Trifolium* e *Vavilovia* (Araújo *et al.*, 2000; Onischuk *et al.*, 2023). Por outro lado, o *Rhizobium phaseoli* apresenta uma especificidade maior, sendo predominante na nodulação das raízes do *Phaseolus vulgaris* (de Fátima *et al.*, 2022).

Ramírez-Bahena *et al.* (2008) reclassificaram a espécie *R. leguminosarum* DSM 30132, para *Rhizobium pisi* sp. NCIMB 11478. Esta nova espécie demonstrou capacidade de nodulação em plantas de ervilha, ervilhaca e feijão (Marek-Kozaczuk *et al.*, 2013). Adicionalmente, Zaheer *et al.* (2019) observaram que a co-inoculação de *Azospirillum brasilense* e *Rhizobium pisi* promoveu o crescimento de plantas de trigo (*Triticum aestivum*) e melhorou a qualidade dos cereais.

Apesar de terem sido utilizadas duas espécies de bactérias do género *Agrobacterium*, nenhuma planta manifestou sintomatologia patogénica. Estas espécies acabaram por ser escolhidas para a inoculação devido às características morfológicas das suas colónias, que são semelhantes às de *Rhizobium* quando cultivadas no mesmo meio (Scherer, 2019). Esta similaridade é explicada pelo facto de ambos os géneros pertencerem à família *Rhizobiaceae* (Ramírez *et al.*, 2014).

Na literatura, há relatos consistentes de isolamento de *Agrobacterium* spp. a partir de nódulos de raízes de leguminosas em diversas regiões do mundo. No Brasil, estudos

como os de Hungria *et al.* (2006), Grange & Hungria (2004), Costa *et al.* (2018), Menna *et al.* (2006), Binde *et al.* (2009) e Roma *et al.* (2010) documentaram essa ocorrência. Além disso, pesquisas realizadas na China (Yan *et al.*, 2017), no Equador (Ribeiro *et al.*, 2013), em Moçambique (Chibeba *et al.*, 2017) e no Paraguai (Chen *et al.*, 2000) também confirmam a presença de agrobactérias nesses ecossistemas, apesar de não terem comprovado o potencial de fixação biológica de azoto. Estas descobertas indicam que o fenómeno é global, abrangendo diversos ambientes e condições climáticas.

Na literatura, identifiquei apenas dois relatos sobre a fixação de N₂ por bactérias do género *Agrobacterium* realizados por Kanvide *et al.* (1987) e por Kanvide & Sastry (1990). Estes estudos documentaram que duas estirpes de *Agrobacterium tumefaciens* (C58 e B6) são capazes de fixar N₂ em meio de cultivo sem a presença de azoto combinado. Contudo mais estudos são necessários para concluir estas capacidades.

Segundo Drew *et al.* (2012), em ensaios de campo envolvendo cultivos de leguminosas, a formação de nódulos está sujeita a uma competição entre os rizóbios presentes no solo. Os nódulos podem ser desenvolvidos por bactérias endêmicas, que frequentemente apresentam baixa eficiência, ou por bactérias eficientes introduzidas através de inoculantes. Dessa forma, a estirpe recomendada e fornecida pelo inoculante nem sempre se torna a principal colonizadora dos nódulos. Diante desse cenário, é crucial investir no isolamento e seleção de cepas bacterianas noduladoras que sejam competitivas e eficazes na fixação do azoto atmosférico.

Tabela 3 - Resultados do BLAST mostrando a classificação taxonômica final das bactérias isoladas de plantas do gênero *Trifolium*.

Classificação final (código isolado)	Valor E	Identidade (%)	BLAST classificação (número de acesso)
<i>Rhizobium</i> sp1 (RHA)	0.0	98.54	<i>Rhizobium viscosum</i> LMG 16473 (NR_042253.1)
<i>Rhizobium</i> sp2 (RQ)	0.0	100	<i>Rhizobium sophorae</i> LMG 27901 (MH345083.1) <i>Rhizobium</i> sp. CC275e (OQ226180.1) <i>Rhizobium anhuiense</i> CCBAU 23252 (KF111868.2) <i>Rhizobium indicum</i> JKLM 12A2 (NR_180571.1) <i>Rhizobium ruizarguesonis</i> UPM1133 (NR_179958.1) <i>Rhizobium phaseoli</i> NBRC 14785 (NR_113671.1) <i>Rhizobium indigoferae</i> NBRC 100398 (NR_113895.1) <i>Rhizobium laguerreae</i> FB206 (NR_118274.1) <i>Rhizobium pisi</i> DSM 30132 (NR_115253.1) <i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA 2370 (NR_044774.1)
<i>Rhizobium</i> sp3 (RNA)	0.0	99.6	<i>Rhizobium beringeri</i> SM51(OQ226177.1)
<i>Rhizobium</i> sp4 (RRA)	0.0	99.82	<i>Rhizobium sophorae</i> LMG 27901 (MH345083.1) <i>Rhizobium</i> sp. CC275e (OQ226180.1) <i>Rhizobium anhuiense</i> CCBAU 23252 (KF111868.2) <i>Rhizobium indicum</i> JKLM 12A2 (NR_180571.1) <i>Rhizobium ruizarguesonis</i> UPM1133 (NR_179958.1) <i>Rhizobium phaseoli</i> NBRC 14785 (NR_113671.1) <i>Rhizobium indigoferae</i> NBRC 100398 (NR_113895.1) <i>Rhizobium laguerreae</i> FB206 (NR_118274.1) <i>Rhizobium pisi</i> DSM 30132 (NR_115253.1) <i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA 2370 (NR_044774.1)
<i>Agrobacterium</i> sp1 (RMB)	0.0	100	<i>Agrobacterium radiobacter</i> ATCC 19358 (MK424303.1) <i>Agrobacterium tumefaciens</i> NBRC 13532 (AB680423.1)
<i>Agrobacterium</i> sp2 (RSB)	0.0	99.82	<i>Agrobacterium radiobacter</i> ATCC 19358 (MK424303.1) <i>Agrobacterium tumefaciens</i> NBRC 13532 (AB680423.1)

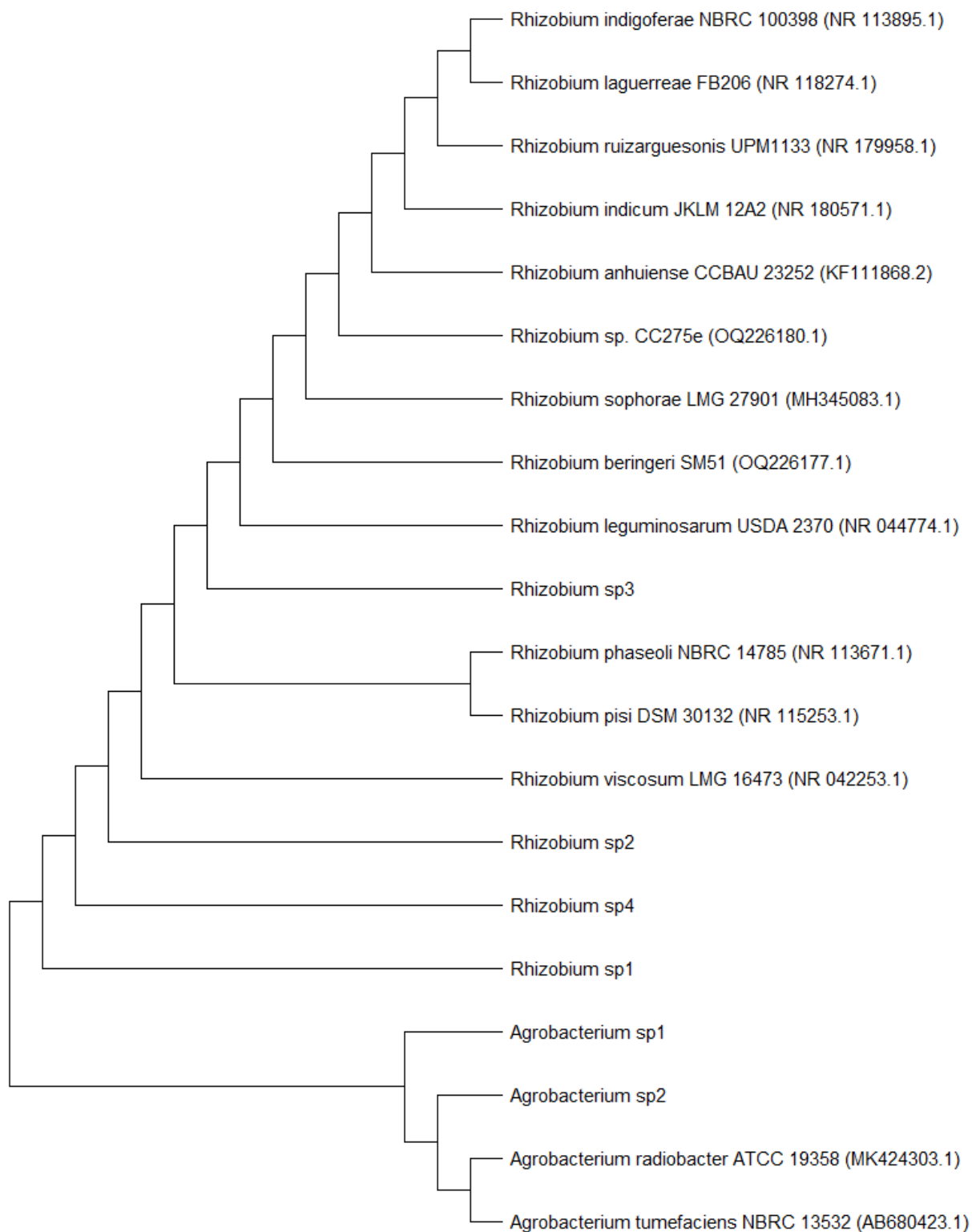


Figura 31 - Árvore de Máxima Verossimilhança de seqüências do gene 16S rRNA das bactérias isoladas a partir de plantas do gênero *Trifolium* no distrito de Bragança. Os isolados bacterianos de referência são identificados através do seu número de acesso.

5. CONCLUSÃO

Os benefícios obtidos pelas diferentes inoculações de bactérias fixadoras de azoto atmosférico em plantas do género *Trifolium* foram pouco expressivos. De um modo geral, o crescimento das plantas, a produção de biomassa e o incremento de azoto no solo não sofreram efeitos significativos. Todos os tratamentos produziram quantidades de biomassa semelhantes ou significativamente inferiores (F e U) às testemunhas. Alguns tratamentos contribuíram para o aumento do teor de clorofila nas folhas (principalmente os tratamentos da mistura de trevos de porte ereto), o que não se traduziu de forma significativa na produção de biomassa. Estes resultados podem ser atribuídos à implementação do experimento numa época desfavorável para o crescimento dos trevos, à falta de controlo das ervas infestantes e ao uso de bactérias ineficientes para a fixação biológica de azoto, como foi o caso de agrobactérias (isolados RMB e RSB).

Este trabalho realça a necessidade da realização de mais estudos sobre a diversidade e compatibilidade de bactérias fixadoras de azoto com diferentes espécies de trevos, e também a sua eficiência mediante diferentes graus de controlo das plantas infestantes. Investigações adicionais podem fornecer informações valiosas para otimizar o uso dessas bactérias na melhoria da produtividade e saúde do solo.

6. REFERÊNCIAS

- Aguiar, C., Rodrigues, F. M. (2010) Trevo-balansa (*Trifolium michelianum* Savi). Fichas Técnicas 1, 5-6.
- Alexandre, C. (2015). Funções, usos e degradação do solo. In: Figueiredo, T., Fonseca, F., Nunes, L. (eds). Proteção do Solo e combate à desertificação: oportunidade para as regiões transfronteiriças. Instituto Politécnico de Bragança, Bragança. p. 1-14.
- Almeida, F. S. de. (1991). Controle de plantas daninhas em plantio direto. IAPAR, Circular 67.
- Andreola, F. (2001). Efeito do consórcio de espécies de inverno para cobertura do solo sobre o rendimento de milho e de feijão. In: Livro de Resumos da Reunião técnica catarinense de milho e feijão, 313-317. Chapecó: EPAGRI-CPPP.
- Araújo, A. P., Teixeira, M. G., & de Almeida, D. L. (2000). Crescimento e produção de cultivares de feijoeiro em dois níveis de fósforo no solo sob fixação biológica de nitrogênio. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 35(4), 809-817.
- Baldissera, I. T. Scherer, E. H. (1991). Efeito da mucuna e da adubação nitrogenada na cultura do milho em Latossolo Roxo distrófico (LRd). In: Livro de Resumos da Reunião sul-brasileira de adubação verde e rotação de culturas, p. 129. Cascavel, PR, Brasil.
- Ball, D. M., Hoveland, C. S., Lacefield, G. D. (2007). Southern forages. 4. ed. Lawrenceville, Georgia: International Plant Nutrition Institute (IPNI), 322 p.
- Bayer, C., Mielniczuk, J., Martin, L. N. (2000). Efeito de sistemas de preparo e de cultura na dinâmica da matéria orgânica e na mitigação das emissões de CO₂. Revista Brasileira de Ciência do Solo 24, 599-607.
- Begum, A. A., Leibovitch, S., Migner, P., Zhang, F. (2001). Inoculation of pea (*Pisum sativum* L.) by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* preincubated with naringenin and hesperetin or application of naringenin and hesperetin directly into soil increased pea nodulation under short season conditions. Plant and Soil 237 (1), 71-80.
- Bertoni, J., Lombardi, F. L. N. (2005). Conservação do solo. 5. ed. São Paulo: Ícone, 355 p.
- Binde, D. R., Menna, P., Bangel, E. V., Barcellos, F. G., Hungria, M. (2009). rep-PCR fingerprinting and taxonomy based on the sequencing of the 16S rRNA gene of fifty-four elite commercial rhizobial strains. Appl Microbiol Biotechnol 83, 897-908.
- Blanco, H. C., Lal, R. (2009). Crop residue removal impacts on soil productivity and environmental quality. Critical Reviews in Plant Science 28, 39-163.
- Boller, B. C., Nösberger, J. (1987). Symbiotically fixed nitrogen from field-grown white and red clover mixed with ryegrasses at low levels of N15 fertilization. Plant and Soil 104, 219-226.
- Bonfada, M. L., Rita, G. R., Leites, L., Souza, J., Maia, M., da Silva, G. M. (2018). Efeito da inoculação em sementes de trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.). In: congresso de iniciação científica. Semana integrada de ensino, pesquisa e extensão. Anais eletrônicos 4. Pelotas.
- Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2009). Regras para análise de sementes. Brasília: Mapa/ACS. 399 p.

- Calazans, G. M., Miranda, G. A., Teixeira, J. N., Matrangolo, W. J. R., Moreira, J. A. A., Cruz, J. C., Marriel, I. E. (2010). Isolamento e seleção de estirpes de rizóbios eficientes na fixação biológica de nitrogênio da *Cratylia argentea*. Sete Lagoas - Mg: Associação Brasileira de Milho e Sorgo. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/866255/1/0436.pdf>.
- Calegari, A. (1991). Efeito dos resíduos de mucuna preta (*Stizolobium aterrimum* L.) no rendimento do milho. In: Livro de Resumos da Reunião sul-brasileira de adubação verde e rotação de culturas, p. 127. Cascavel, PR, Brasil.
- Calegari, A., de Castro, F., C., Tavares, F., J., Ralisch, R., Guimarães, M. de F. (2006). Melhoria da agregação do solo através do sistema plantio direto. *Semina: Ciências Agrárias* 27, 147-157.
- Capelesso, F. J., Dedonatti, E., Munaretto, D., Cezarotto, L. A., Tironi, S. P. (2016). Competitividade de cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas com plantas daninhas. *VI Jornada de Iniciação Científica e Tecnológica* 1 (6).
- Caradus, J. R. (1990). The structure and function of white clover roots systems. *Advances in Agronomy* 43, 1-46.
- Cardoso, E. J., Tsai, S. M., Neves, M. C. P. *Microbiologia do solo*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 360 p.
- Cassol, E. A., Levien, R., Jong van Lier, Q. D., Badelucci, M. P. (1999). Infiltração de água e perdas de água e solo por erosão influenciadas por diferentes métodos de melhoramento da pastagem nativa gaúcha. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 23, 923-931.
- Castro, F. C., Muzilli, O., Podanoschi, A. L. (1998). Estabilidade de agregados e sua relação com o teor de carbono orgânico num Latossolo Roxo distrófico, em função de sistemas de plantio, rotações de culturas e métodos de preparo das amostras. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 22, 527-538.
- Castro, L. G., Cogo, N. P., Volk, L, B. S. (2006). Alterações na rugosidade superficial do solo pelo preparo e pela chuva e sua relação com a erosão hídrica. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 30, 339-352.
- Castro, L. G., Cogo, N. P., Volk, L, B. S. (2006). Alterações na rugosidade superficial do solo pelo preparo e pela chuva e sua relação com a erosão hídrica. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 30, 339-352.
- Chen, L. S., Figueredo, A., Pedrosa, F. O., Hungria, M. (2000). Genetic characterization of soybean rhizobia in Paraguay. *Appl Environ Microbiol* 66, 5099-5103.
- Chibeba, A. M., Kyei-Boahen, S., Guimarães, M. F., Nogueira, M. A., Hungria, M. (2017). Isolation, characterization and selection of indigenous *Bradyrhizobium* strains with outstanding symbiotic performance to increase soybean yields in Mozambique. *Agric Ecosyst Environ* 246, 291-305.
- Cieśla, J., Kopycińska, M., Łukowska, M., Bieganowski, A., Janczarek, M. (2016). Surface properties of wild-type *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* strain 24.2 and its derivatives with different extracellular polysaccharide content. *PLoS ONE* 11 (10), e0165080.
- Conceição, P. C., Amado, T. J. C., Mielniczuk, J., Spagnollo, E. (2005). Qualidade do solo em sistemas de manejo avaliada pela dinâmica da matéria orgânica e atributos relacionados. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 29, 777-788.

- Corby, H. D. L. (1981). The systematic value of leguminous root nodules. In: International legume conference, London. Advances in legume systematics proceedings: Royal Botanical Gardens 2, 657-670.
- Costa, M. R., Chibeba, A. M., Mercante, F. M., Hungria M. (2018). Polyphasic characterization of rhizobia microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) isolated in Mato Grosso do Sul, a hotspot of Brazilian biodiversity. *Symbiosis* 76, 163-176.
- Costa, W. A. J. M. D., Sangakkara, U. R. (2006). Agronomic regeneration of soil fertility in tropical Asian smallholder uplands for sustainable food production. *Journal of Agricultural Science* 144, 111-133.
- D'andrea, A. F., Silva, M. L. N., Freitas, D. A. F., Curi, N., Silva, C. A. (2010). Variações de curto prazo no fluxo e variabilidade espacial do CO₂ do solo em floresta nativa. *Pesquisa Florestal Brasileira* 30, 85-92.
- Darolt, M. R. (1998). Considerações gerais e perspectivas de expansão. In “Plantio Direto. Pequena propriedade sustentável”, p1-15. Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) Circular 101, Londrina, PR, Brasil.
- de Fátima Milcheski, V., Senff, S. E., Orsi, N., Botelho, G. R., & Fioreze, A. C. D. C. L. (2022). Influence of common bean genotypes and rhizobia interaction for nodulation and nitrogen fixation. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 21(1), 8-15.
- Debellé, F., Moulin, L., Mangin, B., Dénarié, J., Boivin, C. (2001). Nod genes and Nod signals and the evolution of the *Rhizobium* legume symbiosis. *Acta Biochimica Polonica* 48 (2) 359-365.
- Den, N. H., Bastiaans, L., Kropff, M. J. (2007). Clover as a cover crop for weed suppression in an intercropping design I. Characteristics of several clover species. *European Journal of Agronomy* 26 (2), 92-103.
- Dorner, J., Sandoval, P., Dec, D. (2010). The role of soil structure on the pore functionality of an ultisol. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 10 (4), 495-508.
- Drew, E., Herridge, D., Ballard, R., O'Hara, G., Deaker, R., Denton, M., *et al.* (2012). Inoculating legumes: a practical guide. 1st. ed. Kingston: Grains Research and Development Corporation (GRDC), 71 p.
- Esteves, F. A., Amado, A. M. (2011). Nitrogênio. In: Esteves, F. A. (ed.) *Fundamentos de Limnologia* 1, 239-258.
- Europeia, União (2011). Regulamento (CE) nº 889/2008. *Jornal Oficial da União Europeia* 250.
- Eurostat <https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/aei_fm_usefert/default/table?lang=en>.
- Evans, H. J., Burris, R. H. (1992). Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years. In: Stacey, G.; Burris, R.H.; Evans, H.J eds. *Biological Nitrogen Fixation*. New York. p.1-42.
- EXAME <<https://exame.com/agro/crise-de-energia-na-europa-atinge-uso-de-fertilizantes/>>.
- FAO <<https://www.fao.org/3/cb9013en/cb9013en.pdf>>.

- Ferguson, S., Major, A. S., Sullivan, J. T., Bourke, S. D., Kelly, S. J., Perry, B. J., Ronson, C. W. (2020). *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* NodD2 Enhances Competitive Nodule Colonization in the Clover-Rhizobium Symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology* 86 (18), e01268-20.
- Figueiredo, T., Fonseca, F., Martins, A., 2012. Soil loss and runoff in young forest stands as affected by site preparation technique: a study in NE Portugal. *European Journal of Forest Research* 131, 1747-1760.
- Flores, F. J. D., Ramírez, B. M. H., Salazar, S., Peix, A., Velázquez, E. (2017). Reclassification of *Arthrobacter viscosus* as *Rhizobium viscosum* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(6), 1789-1792.
- Fonseca, F., Figueiredo, F., Vilela, A., Santos, R., Carvalho, A.L., Eliane, A., Nunes, L., 2019. Impact of tree species replacement on carbon stocks in a Mediterranean mountain area, NE Portugal. *Forest Ecology and Management* 439, 181-188.
- Fontaneli, R. S., Fontaneli, R. S., Santos, H. P. (2012). Leguminosas forrageiras perenes de inverno. Forrageiras para integração lavoura-pecuária-floresta na região sul-brasileira. Brasília, Embrapa, p. 321-334.
- Forbes <<https://forbes.com.br/forbesagro/2022/09/crise-dos-fertilizantes-na-ue-esta-se-tornando-uma-crise-alimentar>>.
- Franco, A. A., Dias, L. E., Faria, S. M., Campello, E. F. C., Silva, E. M. R. (1995). Uso de leguminosas florestais noduladas e micorrizadas como agentes de recuperação e manutenção da vida no solo: um modelo tecnológico. *Oecologia brasilienses* 1, 459-467.
- Galloway, J. N., Dentener, F. J., Capone, D. G., Boyer, E. W., Howarth, R. W., Seitzinger, S. P., Asner, G. P., Cleveland, C. C., Green, P. A., Holland, E. A., Karl, D. M. (2004) Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry* 70,153-226.
- Grange, L., Hungria, M. 2004. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. *Soil Biol Biochem.* 36, 1389-1398.
- Guerra, J. G. M. Santos, G. A., Silva, L. S., Camargo, F. A. O. (2008). Macromoléculas e substâncias húmicas. In: Santos, G. A., Silva, L. S., Canellas, L. P., Camargo, F. A. O. *Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais.* p. 19-26. 2ª ed., Porto Alegre, Brasil.
- Guerrero, M. G., Vega, J. M., Losada, M. (1981). The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Annual Review of Plant Physiology* 32, 169-204.
- Hasegawa, M., Kishino, H., Yano, T. (1985). Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22, 160-174.
- Herendeen, P. S., Crepet, W. L., Dilcher, D. L. (1992). The fossil records. *Advances in legume systematics* 3, 303-316.
- Hodkinson, B. P., Lutzoni, F. A. (2009). Microbiotic survey of lichen-associated bacteria reveals a new lineage from the Rhizobiales. *Symbiosis* 49, 163-180.
- Hoglund, J. H., Crush, J. R., Brock, J. L. (1979). Nitrogen fixation in pasture. 12. General discussion. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture* 7 (1), 45-51.
- Howieson, J. G., Yates, R. J., O'Hara, G. W., Ryder M., Real, D. (2005). The interactions of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* nodulation of annual and perennial *Trifolium*

- spp. from diverse centres of origin. *Australian Journal Experimental Agriculture* 45, 199-207.
- Hungria, M., Chueire, L. M. O., Megías, M., Lamrabet, Y., Probanza, A., Gutierrez-Manero F. J., Campo, R. J. (2006). Genetic diversity of indigenous tropical fast-growing rhizobia isolated from soybean nodules. *Plant Soil* 288, 343-356.
- Hungria, M. (1994). Coleta de Nódulos e Isolamento de Rizóbios. In: Hungria, M., Araújo, R. S.(Ed.). *Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola*. EMBRAPA, Brasília, p.157-170.
- Hungria, M., Campo, R. J., Mendes, I. C. (2007). A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. *Documentos/Embrapa Soja*, 283, 80p.
- IPMA (2023). Instituto Português do Mar e da Atmosfera. *Normal Climatológica (1971-2000)*, Mirandela.
- Kanvide, L., Sastry, G. R. K. (1990). *Agrobacterium tumefaciens* is a diazotrophic bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 2087-2092.
- Kanvide, L., Soliman, M. H., Wardhan, H., Nowell, L., Fox, D., Sastry, G. R. K. (1987). Studies on the diazotrophic nature of *Agrobacterium*. *Current Plant Science Biotechnology Agriculture* 3, 309-312.
- Kay, B. D., Vandenbygaart, A. J. (2002). Conservation tillage and depth stratification of porosity and soil organic matter. *Soil & Tillage Research* 66 (2), 107-118.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35, 1547-1549.
- Kumar, S. C., Singh, P., Kumar, M., Singh Rajawat, M. V., Ansari, W. A., Rao, D. L. N., & Saxena, A. K. (2023). Population and diversity of pigeonpea rhizobia from the Indo-Gangetic plains of India. *Symbiosis*, 90(2), 213-230.
- Lal, R. (2004). Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. *Science* 304, 1623-1627.
- Lal, R. (2003). Soil erosion and the global carbon budget. *Environment International* 29 (4), 437-450.
- Ledgard, S. F., Brier, G. J., Upsdell, M. P. (1990). Effect of clover cultivar on production and nitrogen fixation in clover-ryegrass swards under dairy cow grazing. *New Zealand Journal of Agriculture Research* 33, 243-249.
- Ledgard, S. F., Giller, K. E. (1995). Atmospheric N₂ fixation as an alternative N source. In Dekker, M (ed) *Nitrogen fertilization in the environment*. p. 443-486. New York.
- Lustosa, S. B. C., Machado, D., Baldissera, T., Moraes, A., Sandini, I. (2011). Experiências de integração lavoura pecuária na região central do Paraná. *Synergismus scyentifi* 6 (2), 48-57.
- Machado R. G. (2015). Seleção de Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas Forrageiras. Tese de Doutorado. Universidade Federal do rio Grande do Sul. Porto Alegre 123 p.
- Marek-Kozaczuk, M., Leszcz, A., Wielbo, J., Wdowiak-Wróbel, S., & Skorupska, A. (2013). *Rhizobium pisi* sv. *trifolii* K3. 22 harboring nod genes of the *Rhizobium*

leguminosarum sv. *trifolii* cluster. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(4), 252-258.

Marques, J. F. (1998). Custos da erosão do solo em razão dos seus efeitos internos e externos à área de produção agrícola. *Revista de Economia e Sociologia Rural* 36 (1), 61-80.

Medeiros, M. A. A. (2016). Estudo do efeito de dois intervalos de crescimento e seis níveis de azoto na produção de matéria seca e na qualidade de uma pastagem de *Lolium perenne*, em consociação com *Trifolium repens* e *Trifolium pratense* (Doctoral dissertation).

Menino, M. R., Carranca, C., de Varennes, A., d'Almeida, V. V., Baeta, J. (2003) Tree size and flowering intensity as affected by nitrogen fertilization in non-bearing orange trees grown under Mediterranean conditions. *J. Plant Physiol.* 160, 1435-1440.

Menna P., Hungria M., Barcellos F. G., Bangel, E. V., Hess, P. N., Martínez, R. E. (2006). Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Syst Appl Microbiol* 29, 315-32.

Meschede, D. K., Oliveira Jr, R. S., Constantim, J., Scapim, C. A. (2004). Período anterior à interferência em soja: estudo de caso com baixa densidade de estande e testemunhas duplas. *Planta Daninha* 22 (2), 239- 246.

Montanarella, L. Pennock, D.J., McKenzie, N., Badraoui, M., Chude, V., Baptista, I., *et al.* (2016). World's soils are under threat. *Soil* 2 (1), 79-82.

Montgomery, D. R. (2007). Soil erosion and agricultural sustainability. *Proc Natl Acad Sci USA (PNAS)* 104 (33), 13268-13272.

Moreira, A., Malavolta, E. (2004). Dinâmica da matéria orgânica e da biomassa microbiana em solo submetido a diferentes sistemas de manejo na Amazônia Ocidental. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39, 1103-1110.

Moreira, F. M. M., Siqueira, J. O. (2006). *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. 2ª ed., Lavras: Editora UFLA, p. 449-542.

Moura, R. A., Wada, C. S., Purchio, A., Almeida, T.V. (1987). *Técnicas de laboratório*. Atheneu, Rio de Janeiro.

Muñoz, A. F. R. (1992). Revisión del género *Trifolium* sect. *Trifolium* en la Península Ibérica e Islas Baleares. *Acta Botánica Malacitana* 17, 79-118.

Neves, M. C. P., Rumjaneck, N. G. (1992). Bioquímica e fisiologia da fixação de nitrogênio. In: Cardoso, E.J.B.N.; Tsai, S.M.; Neves, M.C.P. *Microbiologia do Solo*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo. p.141-156.

Oades, J. M. (1993). The role of biology in the formation, stabilization and degradation of soil structure. *Geoderma* 56, 377-400.

Oliveira, M. F., & Brighenti, A. M. (2018). Controle de Plantas Daninhas: Métodos físico, mecânico, cultural, biológico e alelopatia. In *Controle de Plantas Daninhas* (1st ed.). Embrapa.

Oliveira, O. L. P., Juergen, J. P., Bellé, V., Rigo, J. C. (2004). Manejo do solo e da cobertura verde em videiras visando sustentabilidade. *Embrapa Uva e Vinho, CNPUV. Comunicado Técnico*, 55.

- Onischuk, O. P., Kurchak, O. N., Kimeklis, A. K., Aksenova, T. S., Andronov, E. E., Provorov, N. A. (2023). Biodiversity of the symbiotic systems formed by nodule bacteria *Rhizobium leguminosarum* with the leguminous plants of galegoid complex. *Agric. Biol*, 58, 87-99.
- Oromar, E. A., Bertol, J., Azevedo, M. L. D., E. A., Enio, E. A., Bragagnolo, A., Bodnar, E. A. (2016). Manejo e Conservação do Solo e da Água. Série de Cadernos Técnicos da Agenda Parlamentar.
- Ozerol, N. H., Titus, J. F. (1965). The determination of total chlorophyll in methanol extracts. *Trans. III. State Acad. Sci.* 58, 15-19.
- Paim, N. R., & Riboldi, J. (1994). Duas novas cultivares de trevo-branco comparadas com outras disponíveis no Rio Grande do Sul, em associação com gramíneas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 29(1), 01-91.
- Pavinato, P.S., Rosolem, C. A. (2008). Disponibilidade de nutrientes no solo - decomposição e liberação de compostos orgânicos de resíduos vegetais. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 32, 911-920.
- Pes, L. Z., Giacomini, D. A. (2017). Conservação do solo. Colégio Politécnico da UFSM. 70 p.
- Pimentel, D., Harvey, C., Resosudarmo, P., Sinclair, K., Kurz, D., McNair, M., Crist, S., Shpritz, L., Fitton, L., Saffouri, R., Blair, R. (1995). Environmental and Economic Costs of Soil Erosion and Conservation Benefits.
- Polhill, R. M., Raven, P. H. (1981). *Advances in legume systematics*. Kew: Royal Botanic Gardens. 446 p.
- Postgate, J. R. (1982). *The fundamentals of nitrogen fixation*. Cambridge University Press. 252 p.
- Prosser, J. I. (1989). Autotrophic nitrification in bacteria. *Advances in Microbial Physiology* 30, 125-181.
- Pugliesi, A. C. V., Marinho, M. D. A., Marques, J. F., Lucarelli, J. R. F. (2011). Valoração econômica do efeito da erosão em sistemas de manejo do solo empregando o método custo de reposição. *Bragantia* 70, 113-121.
- Ramírez, M. H. B., Frasco, L., Lassalle, F., Diel, B., Chapulliot, D., Daubin, V., Nesme X., Muller, D. (2014). Single acquisition of protelomerase gave rise to speciation of a large and diverse clade within the *Agrobacterium/Rhizobium* supercluster characterized by the presence of a linear chromid. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 73, 202-207.
- Ramírez-Bahena, M. H., García-Fraile, P., Peix, A., Valverde, A., Rivas, R., Igual, J. M., Velázquez, E. (2008). Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (= NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(11), 2484-2490.
- Raymond, J., Siefert, J. L., Staples, C. R., Blankenship, R. E. (2004). The natural history of nitrogen fixation. *Molecular Biology and Evolution* 21, 541-554.
- Redin, M., Giacomini, S. J., Ferreira, P. A. A., Eckhardt, D. P. (2016). Plantas de cobertura de solo e agricultura sustentável: espécies, matéria seca e ciclagem de carbono

e nitrogênio. In Manejo e conservação do solo e da água em pequenas propriedades rurais no sul do Brasil: práticas alternativas de manejo visando a conservação do solo e da água. Vol. 1, 7-22.

Reichert, J. M., da Rosa, V. T., Vogelmann, E. S., da Rosa, D. P., Horn, R., Reinert, D. J., Sattler, A., Denardin, J. E. (2016). Conceptual framework for capacity and intensity physical soil properties affected by short and long-term (14 years) continuous no-tillage and controlled traffic. *Soil and Tillage Research* 158, 123-136.

Resolução do Parlamento Europeu sobre a proteção dos Solos. (2021). Estratégia de Proteção do Solo da UE para 2030 Colher os benefícios dos solos saudáveis para as pessoas, a alimentação, a natureza e o clima [Comissão Europeia]. <https://environment.ec.europa.eu/publications/eu-soil-strategy-2030_pt>.

Ribeiro, R. A., Ormeño-Orrillo, E., Dall'Agnol, R. F., Graham, P. H., Martinez-Romero, E., Hungria, M. (2013). Novel Rhizobium lineages isolated from root nodules of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Andean and Mesoamerican areas. *Research in microbiology* 164 (7), 740-748.

Roma Neto I, Ribeiro RA, Hungria M. (2010). Genetic diversity of elite rhizobial strains of subtropical and tropical legumes based on the 16S rRNA and gln II genes. *World J Microbiol Biotechnol* 22, 1291-1302.

Scherer, A. J. (2019). Taxonomia polifásica de bactérias do gênero *Agrobacterium* isoladas de nódulos radiculares de *Phaseolus vulgaris* e *Glycine max*. Universidade Estadual de Londrina.

Schneyder, A. I., Matchado, M. S., Reitmeier, S., Sommer, A., Sewald, Z., Baumbach, J., List, M., Neuhaus, K. (2021). Primer, Pipelines, Parameters: Issues in 16S rRNA Gene Sequencing. *mSphere* 6 (1), 10.1128/msphere.01202-20.

Schuster, M. Z., Szymczak, L. S., Lustosa, S. B. C., Pelissari, A., Moraes, A., Francisco, R. (2013). Interferência de plantas daninhas no estabelecimento do trevo branco como cultura forrageira. *Ciência Rural* 43 (12) 2148-2153.

Silva, I.R.; Sá Mendonça, E. (2007). Matéria orgânica do solo = Soil organic matter. In: Novais, R. F., Alvarez, V. H., Barros, N. F., Fontes, R. L. F.; Cantarutti, R. B.; Neves, J. C., eds. Fertilidade do solo = Soil fertility. p. 275-374. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, MG, Brasil.

Somasegaran, P., Hoben, H. J., (1994). Handbook for Rhizobia: Methods in Legumes *Rhizobium* Technology. In Handbook for Rhizobia (1st ed.). Springer, New York.

Souza, L. A. G., Aguiar, A. M. C. S. P. (2009). Contribuição para a check-list das *Fabaceae* de Pernambuco. Natal: Opção Gráfica. 172 p.

Sprent, J. I., Sprent, P. (1990). Nitrogen fixing organisms. London: Chapman and Hall, 2ed. 256p.

Tanveer, A., Nadeem, M. A., Ali, A., Tahir, M., Zamir, M. S. I. (2009). Germination behaviour of seeds from herbicide treated plants of *Chenopodium album* L. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 81 (4), 873-879.

Teske, A. Alm, E., Regan, J. M., Toze, S., Rittmann, B. E., Stahl, D. A. (1994). Evolutionary relationships among ammonia- and nitriteoxidizing bacteria. *Journal of Bacteriology* 176 (6), 6623-6630.

- Tiedje, J. M., Sexstone, A. J., Myrold, D. D., Robinson, J. A. (1982). Denitrification: ecological niches, competition and survival. *Journal of Microbiology* 48, 569-583.
- Treusch, A. H., Leininger, S., Kletzin, A., Schuster, S. C., Klenk, H. P., Schleper, C. (2005). Novel genes for nitrite reductase and Amo related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environmental Microbiology* 7, 1985- 1995.
- Vincent, J. M. (1970). *Manual for the practical study of root nodule bacteria* Oxford. Blackwell Scientific Publications. 164 p.
- Waltrick, P. C., Mello M., M. A. De., Dieckow, J., de Oliveira, D. (2015). Estimativa Da Erosividade De Chuvas No Estado Do Paraná Pelo Método Da Pluviometria: Atualização Com Dados de 1986 a 2008. *Revista Brasileira de Ciencia Do Solo*, 39 (1), 256-267.
- Wang, E. T.; Martínez J.; López, I. 2001. *Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas. In: Martínez-Romero, E., Martínez-Romero, J. C. *Microbios*. Centro de Investigaciones sobre Fijación de Nitrógeno. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Weisburg, W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane D. J. (1991). 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697-703.
- West, T. O., Post, W. M. (2002). Soil Organic Carbon Sequestration Rates by Tillage and Crop Rotation: A Global Data Analysis. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 66, 1930-1946.
- Yan J, Li. Y., Han. X. Z., Chen, W. F., Zou, W. X., XIE Z, Li. M. (2017). *Agrobacterium deltaense* sp. nov., an endophytic bacteria isolated from nodule of *Sesbania cannabina*. *Arch Microbiol* 199, 1003-1009.
- Young, J. P. W. (1992). Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: Stacey, G., Evans, H. J. Burris, R. H. *Biological nitrogen fixation*. p. 43-86. London.
- Zaheer, M. S., Raza, M. A. S., Saleem, M. F., Khan, I. H., Ahmad, S., Iqbal, R., & Manevski, K. (2019). Investigating the effect of *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium pisi* on agronomic traits of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Archives of Agronomy and Soil Science*.
- Zehr, J. P., Jenkins, B. D., Short, S. M., Steward, G. F. (2003). Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: A cross-system comparison. *Environmental Microbiology* 5, 539-554.