

FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO E CRESCIMENTO DE PLANTAS DE LEUCENA (*Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit.) SOB SALINIDADE¹

ANTONIO LUCINEUDO DE OLIVEIRA FREIRE^{2*}, TERESINHA DE JESUS DELÉO RODRIGUES³, JOSÉ ROMILSON PAES DE MIRANDA⁴

RESUMO - Este trabalho teve como objetivo verificar os efeitos da salinidade no crescimento e na fixação biológica do nitrogênio de plantas de leucena. As plantas cresceram em vasos de Leonard, contendo areia lavada e esterilizada, e os tratamentos foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, num esquema fatorial 3x3, com 5 repetições. O primeiro fator correspondeu a não inoculação e inoculação com as estirpes de *Bradyrhizobium* sp SEMIA 6070 e SEMIA 6153 e o segundo fator, às doses de NaCl (0, 25 e 50 mol m⁻³). Analisaram-se a altura e o acúmulo de massa seca, o número de nódulos e o teor de nitrogênio nas plantas. A inoculação das plantas com a estirpe SEMIA 6070 proporcionou maior crescimento e maior acúmulo de nitrogênio nas plantas que não foram submetidas à salinidade. A nodulação não foi afetada pela salinidade. A inoculação com a estirpe SEMIA 6153 proporcionou maior tolerância à salinidade.

Palavras-chave: Tolerância à salinidade. *Bradyrhizobium*. NaCl.

NITROGEN FIXATION AND PLANT GROWTH OF LEUCENA (*Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit) UNDER SALINITY

ABSTRACT – This study aimed to evaluate the effects of salinity in the growth and nitrogen fixation in leucaena. Plants were cultivated in Leonard pots containing clean and sterilized sand. The treatments were distributed in a completely randomized design, in a 3x3 factorial, with five replicates. The first factor corresponded to no inoculation and inoculation with *Bradyrhizobium* sp SEMIA 6070 and SEMIA 6153 strains. The second factor corresponded to NaCl concentrations: 0, 25 and 50 mol m⁻³. Were analyzed the height and dry matter accumulation, the number of nodules and nitrogen in plants. The inoculation of plants with the strain SEMIA 6070 provided higher growth and greater nitrogen accumulation in plants that were not subject to salinity. Nodulation was not affected by salinity. Inoculation with SEMIA 6153 strain provided greater tolerance to salinity.

Keywords: Salt tolerance. *Bradyrhizobium*. NaCl.

*Autor para correspondência.

¹Recebido para publicação em 10/07/2009; aceito para publicação em 04/05/2010.

Parte da Tese do primeiro autor para obtenção do título de Doutor pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, FCAV/UNESP, Jaboticabal - SP.

²Unidade Acadêmica de Engenharia Florestal, UFCG, Caixa Postal 64, 58700-970, Patos - PB; lofreire@cstr.ufcg.edu.br

³Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, UNESP/FCAV, Via de Acesso Paulo Donato Castellane, s/n, 14884-900, Jaboticabal - SP; tedelro@fcav.unesp.br

⁴Unidade Acadêmica de Agronomia e Tecnologia de Alimentos, UFCG, 58840-000, Pombal - PB; romilson@ccta.ufcg.edu.br

INTRODUÇÃO

A produtividade agrícola em várias partes do globo é muito afetada pela alta concentração de sais no solo, que são prejudiciais ao crescimento das plantas (DARDANELLI et al., 2009). A grande concentração de sais no ambiente desencadeia vários tipos de estresses físicos e químicos nas plantas, promovendo respostas complexas que envolvem mudanças na morfologia, fisiologia e no metabolismo (HASEGAWA et al., 2000; MUSYIMI et al., 2007). Da mesma forma que a maioria das culturas agrícolas, as respostas das leguminosas forrageiras à salinidade variam muito e dependem de fatores como condições climáticas, propriedades do solo e estágio de crescimento (MITTLER, 2006; MNASRI et al., 2006).

A salinidade traz vários problemas para o crescimento e o desenvolvimento das plantas, especialmente nas glicófitas, por promover distúrbios fisiológicos. Na fixação biológica do nitrogênio (FBN), a salinidade afeta a simbiose leguminosa-*Rhizobium* através da inibição dos passos iniciais da infecção pela bactéria no pelo radicular (BOUHMOUCH et al., 2005), impedindo o início do processo de nodulação (ZAHARAN, 1999), além da redução no crescimento das plantas e na disponibilidade de fotossintatos para dar suporte à fixação do nitrogênio (AZAM et al., 2006). Além disso, afeta diretamente a infecção e o desenvolvimento do nódulo, induzindo sua senescência (KUMAR et al., 2008) e reduzindo a capacidade de fixação do nitrogênio (SASSI AYDI et al., 2008). No entanto, a influência da salinidade no processo de fixação simbiótica do nitrogênio varia com a espécie, o nível de salinidade e a estirpe de rizóbio utilizada.

Dessa forma, é necessário que se utilizem espécies que tolerem essa condição e, se possível, que sejam capazes de melhorar as características físicas e químicas deste solo, o que pode ser conseguido através do plantio de leguminosas arbóreas de crescimento rápido, tolerantes à salinidade. No entanto, para que se obtenha sucesso, é necessário que se conheçam os efeitos da salinidade na espécie a ser empregada.

A leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit.) é uma importante leguminosa arbórea tropical, perene, com sistema radicular profundo, que lhe confere grande resistência à seca, ocasião em que, não perdendo suas folhas, proporciona forragem verde de alta qualidade. O seu emprego pode ser diverso, visando desde a produção de madeira para lenha, carvão, celulose, até a sua utilização como quebra-vento, conservação e fertilidade do solo, além de se constituir em forragem de excelente valor nutritivo. No entanto, poucos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de avaliar sua tolerância à salinidade.

Diante o exposto, o presente trabalho teve como objetivo verificar os efeitos da salinidade da

solução nutritiva no crescimento e na fixação biológica do nitrogênio em plantas jovens de leucena.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação no Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), Jaboticabal, SP (21°15'19" S e 48°19'20" W), utilizando-se vasos de Leonard, com volume de 800 mL, de acordo com metodologia descrita por Vincent (1970), contendo areia lavada e esterilizada, como suporte para as plantas nos vasos.

As sementes de leucena foram submetidas ao processo de quebra de dormência utilizando-se água quente (80 °C), em banho-maria, durante 4 minutos. Em seguida, foram esterilizadas através da imersão em etanol 95% durante 3 minutos e depois com solução de bicloreto de mercúrio por 1 minuto.

Para a obtenção do inoculante, as estirpes cresceram em meio YMB (Yeast Mannitol Broth), à temperatura de 28 °C e sob agitação (120 rpm), até que fosse atingida a fase exponencial, que ocorreu após 72 horas. Após a quebra da dormência e esterilização das sementes, foi realizada a primeira inoculação, em que estas ficaram incubadas no meio YMB durante 1 hora, semeando-as em seguida. A segunda inoculação foi realizada após a emergência das plântulas, utilizando-se 1 mL de cultura por plântula. A terceira inoculação, procedida da mesma forma, 5 dias após a segunda e a quarta inoculação, 5 dias após a terceira. Nesse dia foi realizado o desbaste, deixando-se apenas 3 plantas por vaso.

Os tratamentos foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, em fatorial 3 x 3, com 5 repetições. O primeiro fator correspondeu à inoculação ou não com as estirpes SEMIA 6070 e SEMIA 6153, provenientes do MIRCEN (Microbiological Resources Center, Porto Alegre, RS). As plantas não inoculadas receberam nitrogênio na solução nutritiva, na forma de sulfato de amônio (23 mg L⁻¹ de N). O segundo fator correspondeu às concentrações de cloreto de sódio (0, 25 e 50 mol m⁻³). A solução nutritiva utilizada foi a indicada por Gibson (1987) para cultivo em vaso, que era trocada a cada cinco dias.

Após a quebra de dormência e a primeira inoculação, as sementes foram semeadas nos vasos de Leonard, contendo a solução nutritiva, com as concentrações de cloreto de sódio a serem testadas. Aos 60 dias após a emergência, foi medida a altura das plantas. Em seguida, a parte aérea das plantas foi cortada e acondicionada em sacos de papel, colocada para secar em estufa de circulação forçada de ar a 70 °C, até atingir massa constante. O sistema radicular foi cuidadosamente lavado em água corrente, sobre peneira, para coleta dos nódulos e, após a separação e contagem destes, foi colocado junto com as raízes

para secagem em estufa. Posteriormente, a parte aérea e as raízes foram submetidas à pesagem para determinação das massas secas.

Para a quantificação do teor de N, a parte aérea foi moída e submetida à digestão sulfúrica. O material obtido após a digestão foi destilado e o nitrogênio analisado pelo método semi-microKjedahl (LIAO, 1981).

Os dados foram submetidos à análise de variação e as médias comparadas pelo teste de Tukey utilizando-se o programa estatístico ASSISTAT (SILVA; AZEVEDO, 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Altura e matéria seca das plantas

Foi verificado efeito significativo das concentrações de NaCl na altura, na matéria seca das raízes e total das plantas, e efeito significativo da inoculação na matéria seca da parte aérea e das raízes. A interação foi significativa apenas para a massa seca da parte aérea (Tabela 1).

Tabela 1. Análise de variância e coeficiente de variação de altura de plantas (H), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca de raízes (MSR), matéria seca total (MST), número de nódulos (NNOD) e acúmulo de nitrogênio (N) em função dos tratamentos de inoculação com *Bradyrhizobium* sp e das doses de NaCl.

Fonte de variação	Graus de liberdade	H	MSPA	MSR	MST	NNOD	N
Inoculação (I)	2	0,98 ^{ns}	7,97**	4,04*	1,11 ^{ns}	7,29**	7,33**
Doses de NaCl (D)	2	59,97**	23,76 ^{ns}	7,85**	30,53**	2,54 ^{ns}	43,83**
I X D	4	1,28 ^{ns}	2,99*	0,97 ^{ns}	1,46 ^{ns}	0,66 ^{ns}	17,02**
C.V. (%)		10,95	18,48	29,91	19,78	34,03	24,89

^{ns} Não significativo; * Significativo a 5%; ** Significativo a 1%.

As plantas que não foram inoculadas, nem receberam nitrogênio (testemunha), apresentaram menor crescimento em altura e menor acúmulo de massa seca nas raízes e total em relação à média das plantas que foram submetidas à salinidade, independente do tratamento de inoculação (Tabela 2). À proporção que se aumentou a concentração de NaCl para 25 e 50 mol m⁻³ na solução nutritiva houve redução de 28% e 34%, respectivamente, em relação às plantas que não receberam NaCl. Em relação às raízes,

a salinidade reduziu o acúmulo de massa seca em 27%, enquanto que na massa seca total as reduções foram de 30% e 40% quando se adicionou 25 e 50 mol m⁻³ NaCl, respectivamente, quando comparadas com as plantas que não foram submetidas à salinidade.

As plantas inoculadas com a estirpe SEMIA 6153 apresentaram maior acúmulo de massa seca das raízes, sendo superior até às plantas que receberam nitrogênio na solução nutritiva (Tabela 3).

Tabela 2. Altura e matéria seca das raízes e total das plantas em função das doses de NaCl.

NaCl (mol m ⁻³)	Altura (cm)	Matéria seca (mg planta ⁻¹)	
		Raízes	Total
0	7,29 a	221,61 a	414,68 a
25	5,24 b	161,95 b	288,71 b
50	4,83 b	161,64 b	246,49 b

Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Tabela 3. Matéria seca de raízes de plantas em relação aos tratamentos de inoculação com *Bradyrhizobium* sp.

Tratamento	Massa seca de raízes (mg planta ⁻¹)
Nitrogênio	162,39 b
SEMIA 6070	172,49 ab
SEMIA 6153	209,75 a

Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Quanto à massa seca da parte aérea, foi verificada interação significativa entre os tratamentos. Os valores mais altos de massa seca da parte aérea foram observados nas plantas que não foram submetidas ao estresse salino (Tabela 4).

Porém, com o aumento da salinidade foi verificada redução na massa seca. As menores reduções

foram verificadas nas plantas que receberam N na solução nutritiva, não sendo verificada diferença estatística entre os tratamentos de salinidade nestas plantas. As plantas inoculadas com a estirpe 6070 apresentaram maior massa seca da parte aérea, mas foram as mais prejudicadas com o aumento da salinidade, principalmente no tratamento 50 mol m⁻³, com redução de 72% na massa seca.

Tabela 4. Matéria seca da parte aérea (g planta⁻¹) de plantas em função dos tratamentos de inoculação com *Bradyrhizobium* sp e das doses de NaCl.

Inoculação	NaCl (mol m ⁻³)		
	0	25	50
N	194,72 Aa	151,42 ABa	123,52 Ba
SEMIA 6070	199,58 Aa	121,78 Bab	55,60 Cb
SEMIA 6153	184,14 Aa	105,60 Bb	82,90 Bab

Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (P < 0,05).

O efeito da salinidade sobre o crescimento das plantas tem revelado a resposta varia com a espécie e a concentração de sal utilizada. Reduções na matéria seca de raízes e da parte aérea em função da salinidade têm sido observadas em plantas como *Sesbania* (RAO et al., 2005; AZAM et al., 2006) e *Vigna* (MEDEIROS et al., 2008).

Vários fatores podem contribuir para a redução no crescimento sob estresse salino, como redução na absorção de água, redução na taxa fotossintética e toxicidade específica de íons (ASHRAF et al., 2002; NETONDO et al., 2004a; NETONDO et al., 2004b). Em plantas de *Atriplex prostrata*, Wang et al. (1997) verificaram que aumento da salinidade causou reduções no acúmulo de massa seca e no crescimento. A redução na taxa de fotossíntese observada por esses pesquisadores foi atribuída à redução na condutância estomática e, devido à alta respiração em plantas mantidas sob 2% NaCl, a fotossíntese líquida foi nula, o que explica a drástica redução no crescimento destas plantas. A falta de capacidade de se ajustar osmoticamente também pode ser um

fator de redução no crescimento. Isto foi notado por Kurban et al. (1998) em plantas de *Vigna radiata*, em comparação com uma halófita, a *Alhagi pseudoalhagi*. Estes autores observaram que a altura e a massa seca das plantas de *Vigna* diminuíram, enquanto que na halófita, estas características foram beneficiadas pelo aumento na salinidade de 9,1 para 16,2 dS m⁻¹, em relação ao controle, e esta diferença no comportamento entre as duas espécies foi atribuída ao baixo ajustamento osmótico apresentado pelas plantas de *Vigna*.

Número de nódulos e acúmulo de nitrogênio

Não foi verificada influência significativa dos níveis de salinidade estudados sobre o número de nódulos e a interação concentração de NaCl x tratamento de inoculação foi significativa para o acúmulo de nitrogênio (Tabela 1). As plantas inoculadas com a estirpe SEMIA 6070 apresentaram maior número de nódulos por planta do que as inoculadas com a estirpe SEMIA 6153 (Tabela 5), independente da salinidade empregada.

Tabela 5. Número de nódulos em plantas de leucena inoculadas com *Bradyrhizobium* sp.

Estirpe	Número de nódulos/planta
SEMIA 6070	18,4 a
SEMIA 6153	13,1 b

Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Com o aumento da salinidade, o acúmulo de nitrogênio nas plantas que receberam nitrogênio na solução nutritiva não sofreu variação significativa, mas aquelas que foram inoculadas com as estirpes

testadas apresentaram redução no acúmulo nitrogênio (Tabela 6).

Considerando-se apenas as plantas que não foram submetidas à salinidade, aquelas inoculadas com a estirpe SEMIA 6070 tiveram maior acúmulo

Tabela 6. Acúmulo de nitrogênio (mg planta⁻¹) na parte aérea de plantas de leucena em função da inoculação com *Bradyrhizobium* sp e da salinidade.

Tratamento	NaCl (mol m ⁻³)		
	0	25	50
Nitrogênio	3,61 Ab	3,85 Aa	3,88 Aa
SEMIA 6070	5,88 Aa	2,92 Bab	0,95 Cb
SEMIA 6153	4,24 Ab	2,46 Bb	1,66 Bb

Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (P < 0,05).

de nitrogênio, o que indica que esta estirpe de bradirizóbio foi bastante eficiente na fixação do nitrogênio sob condições não salinas. A 25 mol m⁻³ NaCl, não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas, mas com a adição de 50 mol m⁻³ NaCl na solução nutritiva, houve redução acentuada na capacidade da estirpe SEMIA 6070 fixar nitrogênio quando comparada com as plantas que receberam nitrogênio. As plantas inoculadas com essa estirpe, e que foram submetidas a 50 mol m⁻³ NaCl apresentaram valores de quantidade acumulada de nitrogênio cerca de quatro vezes inferior à das plantas que receberam nitrogênio, no mesmo nível de salinidade, e mais de seis vezes inferior àquela apresentada pelas plantas inoculadas com a mesma, mas que não foram submetidas à salinidade. Isto mostra a sensibilidade da mesma à condição salina do substrato. Quanto à estirpe SEMIA 6153, a fixação do nitrogênio da mesma diminuiu com o aumento da salinidade, mas com redução menos acentuada na fixação do nitrogênio do que a estirpe SEMIA 6070, o que pode indicar tolerância à salinidade, apesar do acúmulo de nitrogênio terem sido inferiores aos das plantas que receberam nitrogênio, no nível mais alto de salinidade (Tabela 5). Isto indica que a salinidade pode não ter afetado o desenvolvimento do nódulo, ao contrário do que foi observado por Anthraper e DuBois (2003) e Kumar et al. (2008), mas afetou a capacidade de fixação do nitrogênio, conforme verificado por Azam et al. (2006).

Têm sido identificados vários sistemas simbióticos de leguminosas arbóreas tolerantes a condições extremas de temperatura, salinidade, seca, alagamento e de baixa fertilidade do solo (KULKARNI et al., 2000; SAUR et al., 2000; ZAHARAN, 2001), havendo variabilidade genética na tolerância de estirpes a estresses hídrico e salino, conforme foi constatada por Mohammad et al. (1991).

Ao contrário do observado neste experimento, vários estudos têm mostrado redução na nodulação em função da salinidade. Em plantas de leucena houve redução de 25% e 16% no número de nódulos e atividade da nitrogenase, respectivamente, com o aumento da condutividade elétrica (Ec) de 0 para 9 dS m⁻¹, enquanto que em plantas de algaroba, o aumento da Ec de 0 para 12 dS m⁻¹ causou redução de 50% e 26% no nódulo e atividade da nitrogenase,

respectivamente (BALA et al., 1990).

A redução no acúmulo de nitrogênio nas plantas inoculadas, em função da salinidade, indica que a fixação no nitrogênio pela bactéria foi afetada, concordando com o que foi verificado em plantas de amendoim por Dardanelli et al. (2009).

O fato das plantas que receberam nitrogênio não apresentarem redução no teor deste elemento concorda com a informação de Wilson (1970), que afirmou que geralmente plantas dependentes do nitrogênio proveniente da fixação simbiótica são mais sensíveis à salinidade do que plantas supridas com nitrogênio mineral. A manutenção do acúmulo de nitrogênio nas plantas com o aumento da salinidade pode ter sido devido ao ajustamento osmótico das plantas, como forma de promover redução no potencial osmótico das células e garantir absorção de água para a manutenção de funções fisiológicas essenciais. Apesar de ter havido redução no acúmulo de massa seca na parte aérea das plantas com o aumento da salinidade (Tabela 4), aquelas que receberam nitrogênio apresentaram valores de massa seca da parte aérea sempre superiores aos das plantas inoculadas, nos dois níveis de salinidade testados, e a 50 mol m⁻³ NaCl, estas plantas apresentaram redução apenas de 36% na massa seca da parte aérea, contra 72% e 55% de redução na massa seca das plantas inoculadas com as estirpes SEMIA 6070 e SEMIA 6153, respectivamente. Como recebiam nitrogênio na solução nutritiva, e não dependiam de nitrogênio fixado, estas plantas podiam aproveitar melhor o nitrogênio disponível, mesmo que sua absorção pelas raízes e transporte para a parte aérea estivesse comprometida devido à redução do potencial osmótico da solução nutritiva em função do aumento da salinidade. Enquanto isso, as plantas não inoculadas dependiam do nitrogênio do solo e daquele armazenado nos seus tecidos, e podem ter desenvolvido estratégias que as tornassem capazes de manter o teor de nitrogênio em seus tecidos em níveis satisfatórios para o seu crescimento ou manutenção dos processos metabólicos vitais. Outro fator que deve ser levado em consideração é o efeito da salinidade sobre a capacidade fotossintética das plantas. Azam et al. (2006) atribuíram a redução na fixação do nitrogênio aos efeitos da salinidade reduzindo o crescimento e a quantidade de fotossintatos distribuída para as raízes.

CONCLUSÕES

A inoculação com a estirpe SEMIA 6070 proporciona maior crescimento e acúmulo de nitrogênio nas plantas que não foram submetidas à salinidade;

A salinidade não afeta a nodulação das plantas de leucena;

A inoculação com a estirpe SEMIA 6153 proporciona maior tolerância à salinidade.

REFERÊNCIAS

- ANTHRAPER, A.; DuBOIS, J. D. The effect of NaCl on growth, N₂ fixation (acetylene reduction), and percentage total nitrogen in *Leucaena leucocephala* (Leguminosae) var. K-8. **American Journal of Botany**, v. 90, n. 5, p. 683-692, 2003.
- ASHARF, M. F.; KARIM, F.; RASUL, E. Interactive effects of Gibberellic Acid (GA₃) and salt stress on growth, ion accumulation and photosynthetic capacity of two-spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars differing in salt tolerance. **Plant Growth Regulation**, v. 36, n. 1, p. 49-49, 2002.
- AZAM, F. et al. Chamber effect on growth and N₂ fixation of *Sesbania aculeate* (L.) at two salinity and moisture regimes. **Pakistan Journal Biological Sciences**, v. 9, n. 7, p. 1381-1388, 2006.
- BALA, N.; SHARMA, P. K.; LAKSHMINARAYANA, K. Nodulation and nitrogen fixation by salinity-tolerant rhizobia in symbiosis with tree legumes. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 33, n. 1, p. 33-46, 1990.
- BOUHMOUCH, I.; SOUAD-MOUHSINE, B.; BRHADA, F.; AURAG, J. Influence of host cultivars and Rhizobium species on the growth and symbiotic performance of *Phaseolus vulgaris* under salt stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, n. 10, p. 1103-1113, 2005.
- DARDANELLI, M. S. et al. Effects of peanut rhizobia on the growth and symbiotic performance of *Arachis hypogaea* under abiotic stress. **Symbiosis**, v. 47, n. 3, p. 175-180, 2009.
- GIBSON, A. H. Evaluation of nitrogen fixation by legumes in the greenhouse and growth chamber. In: ELKAN, G.H. **Symbiotic nitrogen fixation technology**. New York: Marcel Dekker Inc., 1987. p. 321-369.
- HASEGAWA, P.M. et al. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, v. 51, p. 463-499, 2000.
- KULKARNI, S.; SURANGE, K.; NANTIYAL, C. S. Crossing the limits of *Rhizobium* existence in extreme conditions. **Current Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 402-409, 2000.
- KUMAR, D. et al. Nodulation and leghemoglobin content as influenced by salinity in berseem. **Progressive Research**, v. 3, n. 2, p. 199-200, 2008.
- KURBAN, H. et al. Effect of salinity on growth and accumulation of organic and inorganic solutes in the leguminous plants *Alhagi pseudoalhagi* and *Vigna radiata*. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 44, n. 4, p. 589-597, 1998.
- LIAO, C. F. H. Devarda's alloy method for total nitrogen determination. **Soil Science Society of American Journal**, v. 45, p. 852-855, 1981.
- MEDEIROS, R. et al. Estresse salino sobre a nodulação em feijão-caupi. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 21, n. 5, p. 202-206, 2008.
- MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 1, p. 15-19, 2006.
- MNASRI, B. et al. Salt-tolerant rhizobia isolated from a Tunisian oasis that are highly effective for symbiotic N₂-fixation with *Phaseolus vulgaris* constitute a novel biovar (bv. *mediterranense*) of *Sinorhizobium meliloti*. **Archives of Microbiology**, v. 187, n. 1, p. 79-85, 2006.
- MOHAMMAD, R. M. et al. Identification of salt- and drought-tolerant *Rhizobium meliloti* strains. **Plant and Soil**, v. 134, n. 2, p. 271-276, 1991.
- MUSYIMI, D. M.; NETONDO, G. W.; OUMA, G. Effects of salinity on gas exchange and nutrients uptake in avocados. **Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 3, p. 496-505, 2007.
- NETONDO, G. W.; ONYANGO, J. C.; BECK, E. Sorghum and salinity: I. Response of growth, water relations and ion accumulation to NaCl salinity. **Crop Science**, v. 44, n. 3, p. 797-805, 2004a.
- NETONDO, G. W.; ONYANGO, J. C.; BECK, E. Sorghum and salinity: II. Gas exchange and chlorophyll fluorescence of sorghum under salt stress. **Crop Science**, v. 44, n. 3, p. 806-811, 2004b.
- RAO, V. M. et al. Role of arbuscular mycorrhiza on tolerance to salinity of the tree legume *Dalbergia sissoo* Roxb. Inoculated by *Rhizobium*. **Journal of**

Phytologist Research, v. 18, n. 2, p. 223-226, 2005.

SASSI AYDI, S. et al. Osmotic stress affects water relations, growth, and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 4, p. 441-449, 2008.

SAUR, E. et al. Nodulation of legume species in wetlands of Guadeloupe (lesser Antilles). **Wetlands**, v. 20, n. 4, p. 730-734, 2000.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2002.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. IBP Hand book Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. n. 15, 200 p.

WANG, L.; SHOWALTER, A. M.; UNGAR, I. A. Effect of salinity on growth, ion content, and cell wall chemistry in *Atriplex prostrata* (Cheonopodiaceae). **American Journal of Botany**, v. 84, n. 9, p. 1247-1255, 1997.

WILSON, J. R. Response to salinity in Glycine. VI. Some effects of a range of short term salt stresses on the growth, nodulation and nitrogen fixation of *Glycine wightii*. **Australian Journal of Agriculture Research**, v. 21, p. 571-582, 1970.

ZAHARAN, H. H. Conditions for successful *Rhizobium*-legume symbiosis in saline environments. **Biology and Fertility of Soils**, v. 12, n. 1, p. 73-80, 1992.

ZAHARAN, H. H. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 91, n. 2-3, p. 143-153, 2001.