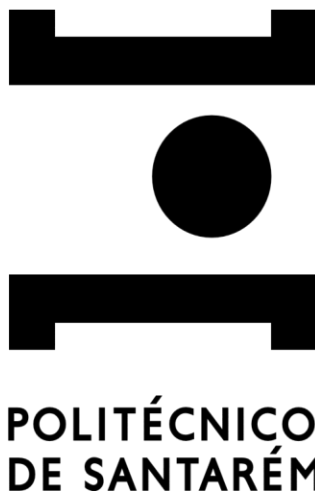


INSTITUTO POLITÉCNICO DE SANTARÉM
Escola Superior Agraria de Santarém



Efeito da bactéria *Methylobacterium symbioticum* na
adubação azotada em laranjeiras

Dissertação
Mestrado em Engenharia Agrónoma
Nuno José Alves Quaresma Rodrigues Primo

Orientação:

Doutora Ana Mafalda Dúlio Ribeiro Pacheco Ferreira (orientadora)
Berto Filipe Lopes Correia (co-orientador)

Dezembro, 2023

Agradecimentos

Quero expressar a minha profunda gratidão a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho, pois sem o seu apoio e orientação, este feito não seria possível.

À Doutora Mafalda Ferreira, da Escola Superior Agrária de Santarém, e ao Engenheiro Berto Correia da empresa Hubel Verde, agradeço pela orientação perspicaz, paciência e encorajamento ao longo deste percurso académico. Estas contribuições foram fundamentais para o desenvolvimento desta tese e para o meu crescimento como profissional.

À equipa da empresa Zona Imperial, onde tive a oportunidade de realizar o estágio, expresso o meu agradecimento por me terem aceite na empresa e terem enriquecido o meu conhecimento a nível profissional.

Gostaria, também, de agradecer à minha família por todo o apoio dado, especialmente nestes últimos anos e por todos os esforços que fazem diariamente por mim.

A execução desta dissertação foi, também, facilitada com o apoio diário dos meus amigos mais chegados e a todos eles agradeço o apoio recebido. Quero agradecer sobretudo aos meus colegas da ESAS que me permitiram concluir com sucesso este projeto, apesar de todas as adversidades.

Abreviaturas/Símbolos

ATP – Adenosina Trifosfato

FMA – Fungos Micorrízicos Arbusculares

GS – Glutamina Sintese

GOGAT – Glutamato Sintese

IAF – Índice de Área Foliar

MDH – Metanol por meio da Desidrogenase do Metanol

N - Azoto

N₂ – Azoto Molecular Diatómico

Na⁺ - Sódio

NADH - Nicotinamida-adenina Dinucleótido

NADPH – Nicotinamida-adenina Dinucleótido Fosfato

NH₄⁺- Ião de Amónio

NH₃ – Amoníaco

NO₃⁻ -Nitrato

NO₂⁻ - Nitrito

NPK – Azoto, Fosforo, Potássio

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

SPAD – Soil-Plant Analyses Development

Resumo

A necessidade de estratégias sustentáveis na agricultura tem despertado o interesse em explorar o potencial das bactérias fixadoras de azoto como uma alternativa promissora na redução da dependência de fertilizantes químicos e no aumento da produtividade das culturas. A *Methylobacterium symbioticum* sp. nov é uma bactéria isolada dos esporos de um fungo micorrízico arbuscular, *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum*, que induz uma biomassa vegetal elevada, levando a rendimentos mais elevados não apenas em culturas anuais, mas também em culturas perenes. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito dessa bactéria na capacidade de fixação do azoto e o efeito no crescimento de árvores de laranjeira.

O ensaio foi realizado em estufa de viveiros de árvores de fruto, localizada na Lousã. O delineamento experimental utilizado foi totalmente casualizado com cinco repetições. Foram ensaiados dois fatores: fertilização azotada com 5 níveis de fator (100 %, 90 %, 80 %, 60 % e 50 % da dose de azoto recomendada para a cultura) e uma aplicação com *Methylobacterium symbioticum*, com 1 nível de fator (100 %). O ensaio teve início em julho e terminou em setembro de 2023. Durante esse período, foram realizadas observações semanais, da altura das plantas, diâmetro basal e área foliar. No final do ensaio realizou-se uma análise à seiva.

Embora não tenham sido observadas diferenças significativas entre tratamentos no que respeita aos parâmetros analisados, os resultados sugerem uma influência positiva no crescimento das plantas com a aplicação da *Methylobacterium* sp., especialmente no tratamento com redução de 40 % de azoto. Contudo, esses resultados não se mostraram com expressão suficiente para concluir um efeito positivo da utilização da bactéria quanto aos parâmetros avaliados. Assim, recomenda-se a realização de novos estudos para avaliar a eficácia da bactéria *Methylobacterium* sp., para esta e outras culturas.

Palavras-chave: Laranjeira, azoto, fixação biológica, *Methylobacterium symbioticum* sp.nov

Abstract

The need for sustainable strategies in agriculture has sparked interest in exploring the potential of nitrogen-fixing bacteria as a promising alternative for reducing dependence on chemical fertilizers and increasing crop productivity. *Methylobacterium symbioticum* sp. nov is a bacterium isolated from the spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum*, which induces high plant biomass, leading to higher yields not only in annual crops but also in perennial crops. The objective of this work was to study the effect of this bacteria on the nitrogen fixation capacity and the effect on the growth of orange trees.

The test was carried out in a fruit tree nursery greenhouse, located in Lousã. The experimental design used was completely randomized with five replications. Two factors were tested: nitrogen fertilization with 5 factor levels (100 %, 90 %, 80 %, 60 % and 50 % of the recommended nitrogen dose for the crop) and an application with *Methylobacterium symbioticum*, with 1 factor level (100 %). The trial began in July and ended in September 2023. During this period, weekly observations of plant height, basal diameter and leaf area were carried out. At the end of the test, a sap analysis was carried out.

Although no significant differences were observed between treatments with regard to the analyzed parameters, the results suggest a positive influence on plant growth with the application of *Methylobacterium* sp., especially in the treatment with a 40 % nitrogen reduction. However, these results were not sufficiently expressive to conclude a positive effect of using the bacteria in terms of the parameters evaluated. Therefore, it is recommended that new studies be carried out to evaluate the effectiveness of the bacteria *Methylobacterium* sp., for this and other cultures.

Key-words: Orange tree, nitrogen, biological fixation, *Methylobacterium symbioticum* sp.nov

Índice

| | |
|--|-----------|
| Agradecimentos | III |
| Abreviaturas/Símbolos | V |
| Resumo | VII |
| Abstract..... | IX |
| Índice de quadros..... | XIII |
| Índice de figuras | XV |
| 1. Introdução | 1 |
| 2. Pesquisa Bibliográfica | 3 |
| 2.1. Cultura da laranjeira | 3 |
| 2.2. Caracterização botânica da planta | 4 |
| 2.2.1. Variedade <i>Lane Late</i> | 4 |
| 2.2.2. Nutrição da laranjeira | 6 |
| 2.3. O Azoto..... | 7 |
| 2.4. Ciclo do azoto..... | 8 |
| 2.5. Fixação biológica do azoto | 10 |
| 2.6. <i>Methylobacterium Simbioticum</i> | 12 |
| 3. Materiais e Métodos | 15 |
| 3.1. Caracterização do Local de Ensaio..... | 15 |
| 3.1.1. Estufa de Propagação de Citrinos | 15 |
| 3.1.2. Sistema de Rega e Fertilização | 16 |
| 3.2. Protocolo Experimental | 17 |
| 4. Resultados e discussão..... | 23 |
| 4.1. Altura das plantas..... | 23 |
| 4.2. Diâmetro basal..... | 27 |
| 4.3. Área foliar..... | 29 |

| | |
|--|-----------|
| 4.4. Análise à seiva | 30 |
| 5. Considerações finais | 32 |
| 6. Referências bibliográficas | 34 |
| Anexos | 38 |

Índice de Quadros

| | |
|--|----|
| Quadro 1 - Organismos que intervêm na fixação biológica do azoto | 10 |
| Quadro 2 - Tratamentos realizados..... | 17 |
| Quadro 3 - Quantidade de adubo NPK utilizado em cada um dos tratamentos | 21 |
| Quadro 4 - Altura Média Semanal(cm) e Respetivo Desvio Padrão nos tratamentos T1 (100 % adubação), T2 (100 % adubação+bactéria), T3(90 %adubação+bactéria), T4(80 %adubação+bactéria), T5(60 %adubação+bactéria), T6(50 %adubação+bactéria), T7(100 %bacteria)..... | 24 |
| Quadro 5 - Diâmetro Basal médio (mm) e respetivo desvio padrão nos tratamentos T1 (100 % adubação), T2 (100 % adubação + bactéria), T3(90 %adubação+bactéria), T4(80 %adubação+bactéria), T5(60 %adubação+bactéria), T6(50 %adubação+bactéria), T7(100 %bacteria)..... | 27 |
| Quadro 6 – Valores médios da área foliar total (cm ²) nos tratamentos T1 (100 %adubação),T2(100 %adubação+bactéria),T3(90 %adubação+bactéria),T4(80 %adubação+bactéria),T5(60 %adubação+bactéria), T6(50 %adubação+bactéria), T7(100%bacteria) | 29 |
| Quadro 7 - Análise à seiva para visualização da quantidade de NO ³⁻ , presente na planta em (ppm) nos tratamentos T1 (100 % adubação), T2 (100 % adubação+bactéria), T3(90 %adubação+bactéria), T4(80 %adubação+bactéria), T5(60 %adubação+bactéria), T6(50 %adubação+bactéria), T7(100 %bacteria) | 30 |
| Quadro 8 - Ensaios de campo onde foi aplicado <i>Methylobacterium symbioticum sp</i> | 31 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Laranjeira da variedade <i>Lane Late</i> | 5 |
| Figura 2 - Morfologia da laranja da variedade <i>Lane Late</i> | 5 |
| Figura 3 - Planta com sintomas visíveis de carência em Azoto | 8 |
| Figura 4 - Processo de fixação de azoto atmosférico | 12 |
| Figura 5 - <i>Methylobacterium</i> isolada da filosfera de folhas de mostarda..... | 13 |
| Figura 6 - Ensaio in vitro onde foi aplicado <i>Methylobacterium symbioticum</i> sp.nov..... | 14 |
| Figura 7 - Localização da empresa e da estufa onde foi realizado o ensaio..... | 15 |
| Figura 8 - Plantas selecionadas para o ensaio..... | 18 |
| Figura 9 - Local onde foram colocadas as plantas do ensaio | 18 |
| Figura 10 - Análise da área foliar através do programa imagemJ | 19 |
| Figura 11 - Análise à seiva e ao grau Brix nos tratamentos do ensaio. | 19 |
| Figura 12 - Primeiro, segundo e terceiro teste de adubação respetivamente..... | 21 |
| Figura 13 - Aplicação do adubo misturado no substrato | 22 |
| Figura 14 - Altura média (cm), a 16 de março, das plantas selecionadas para o ensaio, nos tratamentos T1 (100 % adubo), T2 (100% adubo + bactéria), T3 (90 % adubo + bactéria), T4 (80 % adubo + bactéria), T5 (60 % adubo + bactéria), T6 (50 % adubo + bactéria) e T7 (100 % bactéria)..... | 23 |
| Figura 15 - Altura média semanal (cm) nos tratamentos T1 (100 % adubo), T2 (100 % adubo + bactéria), T3 (90 % adubo + bactéria), T4 (80 % adubo + bactéria), T5 (60 % adubo + bactéria), T6 (50 % adubo + bactéria) e T7 (100 % bactéria). As setas indicam as semanas nas quais se aplicou o adubo e a bactéria..... | 25 |
| Figura 16 - Diâmetro basal médio nos tratamentos T1 (100 % adubo), T2 (100 % adubo + bactéria), T3 (90 % adubo + bactéria), T4 (80 % adubo + bactéria), T5 (60 % adubo + bactéria), T6 (50 % adubo + bactéria) e T7 (100 % bactéria). | 28 |

1. Introdução

O aumento exponencial da população mundial tem levado a uma enorme pressão sobre os recursos da Terra. De acordo com dados estatísticos das Nações Unidas, a população mundial estará perto de 11 bilhões de pessoas e haverá mais 2 a 3 bilhões de pessoas para alimentar (Nações Unidas, 2022).

Este crescimento tem levado à expansão da produção agrícola, à exigência de maiores rendimentos das colheitas e ao cultivo de terras agrícolas adicionais. Um efeito direto dessa tendência é o aumento do uso de fertilizantes azotados (Fernandes et al., 2021; Liang et al., 2019) e o aumento constante da prevalência da agricultura em terras marginais, áridas e semiáridas, especialmente no mundo em desenvolvimento (Lantican et al., 2003; Köberl et al., 2011).

Na agricultura, a disponibilidade de azoto é geralmente considerada um dos fatores mais importantes para a nutrição vegetal uma vez que, exceção feita às leguminosas, o azoto é o elemento que mais limita as produções. Por um lado, as plantas absorvem grandes quantidades deste nutriente. Por outro, como não é possível constituir reservatórios de azoto inorgânico nos solos devido à sua elevada mobilidade, é aquele que mais frequentemente aparece em deficiência, sendo sistematicamente necessário suplementar as disponibilidades naturais do solo recorrendo à aplicação de fertilizantes. Por estas razões, o azoto é o nutriente que usualmente é fornecido em maior quantidade às culturas, sendo a sua aplicação inadequada a principal responsável por situações de sobrefertilização e frequente poluição das águas superficiais e subterrâneas (Despacho n.º 1230/2018; Decreto Lei n.º 25 de 5 de fevereiro de 2018 do Ministério do Ambiente e Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural).

No âmbito da Estratégia do Prado ao Prato, uma das principais ações do Pacto Ecológico Europeu, a Comissão Europeia visa reduzir as perdas de nutrientes em, pelo menos, 50 % até 2030, sem deterioração da fertilidade do solo. Tal deverá resultar numa redução da utilização de fertilizantes de, pelo menos, 20 % (Comissão Europeia, 2023). Neste contexto, é cada vez mais importante adotar estratégias mais sustentáveis para aumentar a eficiência do uso do azoto e reduzir o impacto negativo da sobredosagem deste nutriente sobre o ambiente. A utilização de biofertilizantes, poderá constituir uma estratégia viável para esse efeito.

Os biofertilizantes são produtos cujo princípio ativo são microrganismos vivos, não patogénicos, que favorecem a nutrição e, ou, o desenvolvimento das plantas, sem afetar a diversidade biológica do solo e o ambiente, com exclusão dos denominados agentes de controlo biológico, biofungicidas, bionematicidas e bioinsecticidas (portaria 185/2022 de 21 de julho de 2022). Estes produtos atuam na fertilidade e nutrição das plantas trazem melhorias nos processos físico-químicos e biológicos do solo, aumentam sua capacidade produtiva e ainda regeneram os sistemas de produção (Jen-Hshuan Chen, 2006).

Nesse cenário emerge uma abordagem agrícola mais sensível, que visa não apenas a produção de alimentos, mas também a proteção do meio ambiente. A pesquisa de alternativas para fornecer azoto às plantas de forma sustentável tem vindo a aumentar e a bactéria *Methylobacterium Symbioticum spp.* apresenta-se como uma forma promissora para a obtenção de azoto, graças à sua capacidade de fixação de azoto atmosférico.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito desta bactéria na nutrição azotada da laranjeira através da altura, diâmetro basal, índice de área foliar e análise à seiva das plantas, como indicadores de crescimento.

2. Pesquisa Bibliográfica

2.1. Cultura da Laranjeira

A laranjeiras (*Citrus sinensis L.*) são usadas predominantemente para a produção de frutos, mas também encerram grande interesse como plantas ornamentais. Enquanto grupo de culturas frutícolas, é um dos mais importantes a nível mundial. Oriundos do continente asiático (China e Índia) os citrinos adaptaram-se bem em muitas zonas do mundo, com especial destaque para a bacia do Mediterrâneo. Em Portugal, podemos encontrar a cultura da laranjeira em todo o país, sendo predominante no Algarve, no litoral alentejano e noutras zonas microclimáticas espalhadas pelo país (Duarte, 2014).

Os citrinos ocupam um lugar de destaque na fruticultura nacional, tendo o recenseamento geral agrícola de 2009 apurado uma área de citrinos no território nacional de 16.389 ha, com predomínio das laranjeiras, com 13631 ha de área plantada (Tomás, 2016).

No Algarve, a área de laranjeiras corresponde a 68 % do total nacional, a de laranjeiras a 80 % do total nacional e a área de limoeiros a 31 % do total nacional (Tomás, 2016).

A produção mundial de laranja em 2022 foi de cerca de 110 milhões de toneladas. O Brasil foi o maior produtor mundial, com uma produção de cerca de 45 milhões de toneladas, seguido da China, com uma produção de cerca de 25 milhões de toneladas. A produtividade média mundial de laranja é de cerca de 40 toneladas por hectare. O Brasil e a China apresentam as maiores produtividades mundiais, com valores de cerca de 60 e 50 toneladas por hectare, respetivamente (Santos e Silva, 2023).

Em Portugal a produção de laranja em 2022 foi de cerca de 355 mil de toneladas. A região do Algarve é a principal produtora de laranja em Portugal, sendo responsável por cerca de 80 % da produção nacional. A área plantada com laranjeiras é cerca de 17 221 mil ha. A região do Algarve é também a região com a maior área plantada com laranjeiras em Portugal, com cerca de 80 mil hectares (Instituto Nacional de Estatística (INE), 2022).

2.2. Caracterização botânica da planta

A laranjeira (*Citrus sinensis*) é uma árvore de fruto da família *Rutaceae*, nativa da Ásia. É uma espécie híbrida, resultante do cruzamento de duas espécies de citrinos: a tangerina (*Citrus reticulata*) e a citrina (*Citrus medica*). Pertence ao Reino: *Plantae*, Divisão: *Magnoliophyta*, Classe: *Magnoliopsida*, Ordem: *Sapindales*, Família: *Rutaceae*, Subfamília: *Aurantioideae*, Tribo: *Citreae*, Gênero: *Citrus*, Espécie: *Citrus sinensis* (Silva, 2022).

Em relação à sua morfologia pode-se caracterizar por uma árvore de porte médio, com uma altura média entre 5 a 10 metros. A copa é arredondada, com folhas verde-escuras e brilhantes. As flores são brancas, com cinco pétalas. Os frutos da laranjeira são hesperídios, com casca lisa e brilhante. O interior do fruto é dividido em gomos, que contém a polpa e as sementes (Silva, 2022).

2.2.1. Variedade *Lane Late*

Descoberta na propriedade de Lindsay Lane, em Curlwaa, New South Wales, Austrália, em 1954. Presume-se que será uma mutação da Washington Navel. Adquiriu grande importância no Algarve a partir de meados da década de noventa por ser mais tardia que as variedades do grupo Navel até então cultivadas na região. É bastante produtiva. O fruto pode manter-se na árvore até abril ou maio, sem perda de qualidade (Tomás, 2016).

A estrutura da árvore é composta por uma copa de forma esférica, por vezes elipsoide. Vigor médio, com ramos principais medianamente densos e de crescimento vertical, mas com tendência para apresentar ramos pendentes na zona inferior da copa. Apresenta alguns espinhos retos. Na maturação, o fruto mantém uma boa aderência ao pedúnculo (Figura 1) Tomás (2016).

O fruto é caracterizado por ter tamanho médio a grande, embora ligeiramente inferior ao da Newhall, com forma tendencialmente redonda. Tem umbigo pequeno. Pode apresentar caneladuras mais ou menos longas desde o cálice até à zona estilar. Não tem sementes (Figura 2) Tomás (2016).



Figura 1 – Laranjeira da variedade *Lane Late*. Fonte: Tomás (2016).

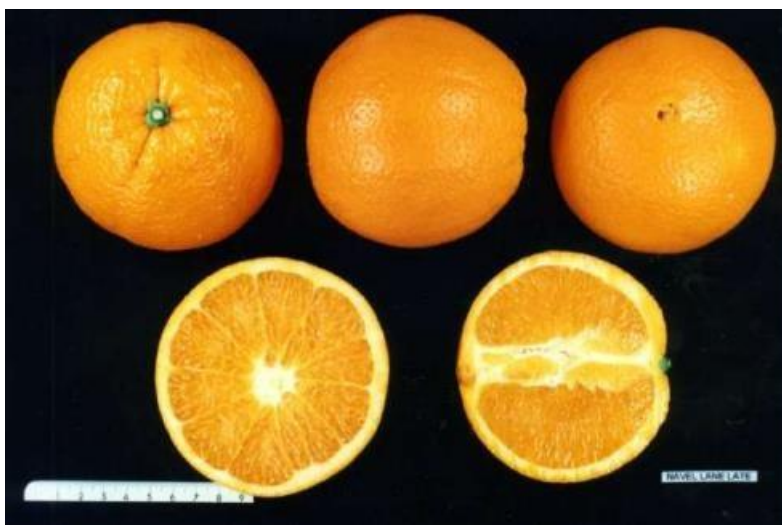


Figura 2 – Morfologia da laranja da variedade *Lane Late* Fonte: Tomás (2016).

2.2.2 Nutrição da Laranjeira

Para obter uma boa produtividade e uma elevada qualidade da produção, é necessário não descurar a fertilização do pomar. O diagnóstico do estado nutritivo do pomar deve ser feito anualmente, através de uma análise de folhas, colhidas no período compreendido entre setembro e novembro, quando as folhas da rebentação de primavera têm 7-9 meses de idade. Não é conveniente realizar a amostragem antes de 15-20 dias depois da última adubação. O período mais crítico em termos da nutrição do pomar é a primavera, quando ocorre a floração e o vingamento do fruto e numa época em que a temperatura não favorece a absorção de nutrientes. Assim, é conveniente dar muita atenção à adubação de outono, para que as árvores entrem no Inverno em bom estado e estejam preparadas para dar uma boa floração, sem atingir um estado crítico em termos de teores de nutrientes. Todos ou quase todos os fertilizantes são aplicados por fertirrega, sendo por vezes conveniente complementar com uma aplicação de micronutrientes por via foliar (Duarte, 2014).

Os requisitos nutricionais das plantas inclusive da laranjeira, são fundamentais para o seu desenvolvimento estrutural e para a captação da energia luminosa para a fotossíntese. Estudos como o de Paredes & Primo-Millo (1988), identificaram os principais nutrientes necessários, destacando a importância do azoto, fósforo, potássio e micronutrientes como ferro, zinco e manganês.

As deficiências nutricionais são identificadas por sintomas visuais nas plantas, e Alva et al. (2018) analisaram esses sintomas, auxiliando na deteção precoce de problemas nutricionais. Por outro lado, o excesso de nutrientes, como azoto e potássio, pode ter impactos negativos na cultura, incluindo a poluição do solo e da água, conforme discutido por Smith e Jones (2016).

Para contrariar os impactos negativos do uso de fertilizantes químicos, Xavier et al. (2020) investigaram estratégias como o uso de biofertilizantes e coberturas mortas na nutrição da laranjeira. Os resultados desse estudo sugerem que as estratégias de nutrição sustentável podem ser uma alternativa viável aos fertilizantes químicos tradicionais. Essas estratégias podem ajudar a melhorar a produtividade, a qualidade dos frutos e a saúde das plantas, além de reduzir o impacto ambiental da agricultura.

Os microrganismos do solo também desempenham um papel importante na nutrição da laranjeira, conforme identificado por Santos et al. (2017), que ao investigar o papel dos

microrganismos do solo na nutrição da laranjeira-clementina, concluíram que estes podem melhorar a absorção de nutrientes pelas plantas, levando a um aumento da produtividade e da qualidade dos frutos.

2.3. O Azoto

O azoto é o nutriente mais importante exigido por plantas cultivadas, e a sua escassez no solo afeta significativamente o rendimento das culturas. Por sua vez, as quantidades excessivas no solo podem resultar em efeitos ambientais indesejáveis. O esgotamento do azoto em solos agrícolas ocorre, principalmente, por meio da remoção de plantas. Muitas vezes, é restabelecido através de adição de fertilizantes azotados ou em parte, através de processos naturais, nomeadamente a fixação biológica. Estima-se que, à escala global, a fixação biológica de azoto possa contribuir com cerca de 90 milhões de toneladas de N ha⁻¹ ano⁻¹ em sistemas agrícolas dos quais a simbiose *Rhizobium*-leguminosa é estimada em cerca de 40 milhões de toneladas (Ahmad, 1996 citado por Ladeira, 2017)

O azoto é o macronutriente mais abundante nas plantas, sendo também o mais exigido em relação aos demais. A sua função mais importante está relacionada com sua participação na constituição das proteínas. Além disso, participa também na formação de compostos indispensáveis às plantas, como purinas, pirimidinas e coenzimas (Varenes, 2003).

De todos os nutrientes minerais, o azoto é o mais importante para o crescimento das plantas, influenciando o crescimento das folhas e, conseqüentemente, a disponibilidade de hidratos de carbono disponíveis para o crescimento, a taxa fotossintética por unidade de área da folha, bem como o número e tamanho de órgãos de armazenamento (Varenes, 2003).

No entanto a carência de azoto é uma das principais deficiências nutricionais que afeta as laranjeiras. Os efeitos da deficiência de azoto nas laranjeiras incluem: crescimento reduzido, redução da produção e redução na qualidade do fruto (Silva et. al 2022). Sendo o azoto um componente essencial de todas as proteínas, promove a formação da clorofila, e por esse motivo, um dos principais sintomas visuais da sua deficiência é a coloração amarelada das folhas jovens (Figura 3) (Barros, 2020).



Figura 3 – Planta com sintomas visíveis de carência em Azoto. Fonte: Gasparotto & Bueno(1999).

2.4. Ciclo do Azoto

As principais formas de azoto absorvidas pelas plantas são os iões amónio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-). O ião nitrito (NO_2^-) e certos compostos orgânicos simples (aminoácidos, ureia, ácido úrico, etc.) podem também ser absorvidos pelas raízes, mas em quantidades reduzidas (Campbell, 1978 citado por Coutinho, 2000)

Estas duas formas de azoto, que as plantas absorvem com mais ou menos facilidade, resultam, essencialmente, da degradação de compostos azotados mais complexos que existem, quer na matéria orgânica, quer na população microbiana do solo. A maior parte de amónio absorvido é incorporado em formas orgânicas nas raízes, enquanto o nitrato possui grande mobilidade na planta, sendo translocado no xilema ou podendo ser armazenado nos vacúolos das células da raiz, parte aérea e órgãos de reserva, sem ser incorporado em compostos orgânicos (Marschner, 1995).

A assimilação do nitrato implica a sua redução a amoníaco (NH_3). Esta reação dá-se em dois passos: em primeiro lugar, o nitrato é reduzido a nitrito (NH_2^-) no citoplasma, pela enzima nitrato redutase, atuando a nicotinamida-adenina dinucleótido (NADH) ou a nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (NADPH) como dadores de eletrões; o nitrito é, de seguida, reduzido a amónio (NH_4^+) nos cloroplastos das folhas ou proplastídeos das raízes pela redutase, normalmente, com a ferredoxina reduzida como dador de eletrões. A energia para

a redução dos nitratos é retirada da respiração ou de produtos das reações luminosas da fotossíntese (Carvalho, 1997).

A localização da redução de nitrato nas plantas é muito importante porque envolve custos energéticos ligados ao transporte e metabolismos dos ácidos carboxílicos envolvidos na síntese de aminoácidos. Quando a redução ocorre nas raízes, implica que uma quantidade apreciável de esqueletos de carbono seja transportada das folhas para as raízes, uma vez que o amoníaco praticamente não é translocado, quer no xilema quer no floema (Carvalho, 1997).

Enquanto o nitrato pode ser armazenado nos vacúolos sem provocar efeitos tóxicos, o amónio e, sobretudo, o amoníaco, são tóxicos. O amoníaco produzido na redução do nitrato, ou na fotorrespiração nas plantas C₃, e o amónio absorvido diretamente pelas raízes combinam-se com ácidos orgânicos para formar aminoácidos, amidas e compostos afins, evitando a toxicidade que poderia ocorrer por acumulação das formas reduzidas de azoto (Marschner, 1995).

A incorporação de amoníaco em aminoácidos envolve uma via metabólica cíclica envolvendo duas enzimas: a glutamina sintetase (GS) e a glutamato sintetase (GOGAT). Nas plantas, estas enzimas foram identificadas em raízes e cloroplastos. A primeira envolve a combinação de amónio, ácido glutâmico e consumo de ATP, produzindo glutamina. A GS tem uma forte afinidade com o amoníaco, sendo capaz de incorporá-lo se este se encontrar em baixas concentrações (Carvalho, 1997).

Para que a assimilação de amoníaco prossiga, verifica-se a reposição de ácido glutâmico a partir da glutamina e do ácido oxaloglutárico, numa reação que envolve a GOGAT, que produz duas moléculas de ácido glutâmico por cada molécula de glutamina. Uma destas moléculas é utilizada na assimilação de amoníaco, sendo a outra utilizada na síntese de compostos azotados (Carvalho, 1997).

2.5. Fixação Biológica do Azoto

A fixação biológica de azoto é comum a um conjunto de microrganismos procariotas que possuem o complexo enzimático nitrogenase a partir do qual conseguem transformar o azoto atmosférico em azoto utilizável pelas plantas. Estes organismos são conjuntamente designados diazotrofos (Santos, 2015).

A fixação biológica do azoto atmosférico consiste na redução de azoto molecular (N_2) a amoníaco (NH_3), o qual é convertido numa forma orgânica. Este processo é realizado tanto por bactérias que vivem livremente nos seus habitats, como por bactérias que estabelecem relações de simbiose com diversas plantas (Militão, 2004).

Quadro 1 - Organismos que intervêm na fixação biológica do azoto. Fonte: Intagri (2018)

| Formas de vida | Tipos de Organismos | Exemplos |
|----------------------------------|----------------------|--|
| Livre | Bactérias | <i>Azotobacter</i> spp., <i>Clostridium pasteurianum</i> , <i>Beijerinckia</i> sp. |
| | Cianobactérias | <i>Nostoc</i> spp., <i>Anabaena</i> sp.,... |
| | Actinobactérias | <i>Frankia alni</i> |
| Em Simbiose | <i>Rhizobium</i> | <i>Parasponia</i> spp., <i>Rizhobium</i> spp., <i>Ensifer</i> spp., <i>Bradyrhizobium</i> spp., <i>Azorhizobium</i> spp., <i>Mesorhizobium</i> sp. |
| | Cianobactérias | <i>Nostoc</i> spp. <i>parmotremma stuppeum</i> , <i>caloplaca saxícola</i> , <i>Notothylas</i> spp., <i>Anthoceros</i> spp., <i>Ababaena azollae.</i> , <i>Nostoc punctiforme.</i> , <i>calothrix</i> sp., <i>Oscillatoria</i> sp., <i>Rivularia</i> sp. |
| Associação não simbiótica | Bactérias/ Filosfera | <i>Methylobacterium mesophilicum.</i> , <i>Methylobacterium simbioticum.</i> , <i>Azobacter</i> sp., <i>Beijerinckia</i> sp., <i>Pseudomonas syringae.</i> |
| | Bactérias/ Rizosfera | <i>Azospirillum</i> sp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp., <i>Pseudomonas Spp.</i> , <i>Burkholderia</i> spp. |

A nitrogenase é uma enzima produzida por determinadas bactérias, essencial para o processo de fixação biológica de azoto. Requer grande quantidade de energia (adenosina trifosfato o ATP), para romper a ligação tripla que existe entre os átomos de N, conforme a seguinte equação:



As plantas geram energia necessária para este processo, mediante a fotossíntese. Por sua vez, os microrganismos utilizam essa energia para a fixação de azoto (Unkovich et al., 2008).

A enzima nitrogenase, proteína-chave na fixação do azoto, consiste em duas proteínas componentes. O componente I (proteína que contém molibdénio e ferro) é constituído por quatro subunidades, cada uma delas com uma hélice simples de aminoácidos contendo vinte e quatro átomos de ferro, dois átomos de molibdénio e cerca de 28 átomos de enxofre ácido lábil. O componente II (proteína que contém ferro) é constituído por duas subunidades e inclui quatro átomos de ferro e quatro átomos de enxofre ácido lábil. Na composição em aminoácidos da proteína de ferro-molibdénio, predominam ácidos acíclicos, possuindo todos os aminoácidos comuns. A proteína do componente II não contém triptofano (Hoffmann, et al. 2014 & Militão, 2004).

A fixação do azoto implica a transferência de átomos de hidrogénio dos glícidos para o azoto, que se opera através da nitrogenase, existente apenas em procariontes. Os eletrões provenientes dos glícidos são transferidos para o componente II e, depois, para o componente I, onde ocorre a redução de azoto a amónia, sendo os prótons removidos do meio aquoso da célula. O funcionamento dos dois componentes necessita de ATP (Hoffmann, et al. 2014 & Militão, 2004).

Os eletrões provêm da ferredoxina, que pode ser reduzida de diversas formas, de acordo com o organismo de proveniência: através da fotossíntese nas bactérias, processos respiratórios em fixadores de azoto aeróbios ou fermentações em organismos anaeróbios, como é exibido na Figura 4.

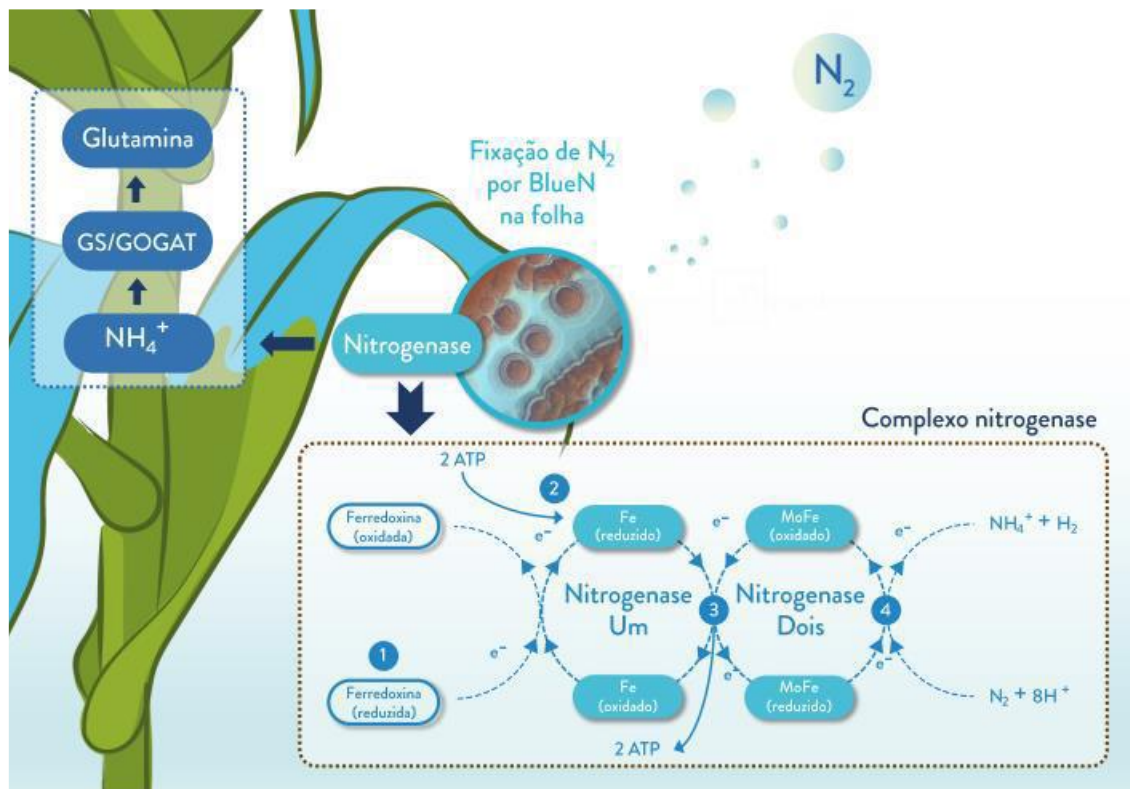


Figura 4 - Processo de fixação de azoto atmosférico. Fonte: Hubel Verde, (2021).

2.6. *A Methylobacterium Simbioticum*

O género *Methylobacterium* pertence à ordem *Rhizobiales*, subclasse α -Proteobacteria e à família *Methylobacteriaceae*. É composto por bactérias de coloração rosa, metilotróficas facultativas (PPFM - pink-pigmented facultative methylotrophic), que podem fixar azoto, nodular a planta hospedeira, produzir citocinina e as enzimas pectinase e celulase, podendo dessa forma promover o crescimento vegetal devido à disponibilidade de azoto e à indução de resistência sistêmica. As bactérias *Methylobacterium spp.* têm sido descritas como endófitas ou epífitas em diferentes plantas hospedeiras, onde a sua colonização e distribuição no hospedeiro podem ser influenciadas pelo genótipo da planta ou por interações com outros microrganismos associados ao hospedeiro (Dourado, 2010).

A principal característica desse grupo está na habilidade de oxidar metanol por meio da desidrogenase do metanol (MDH), codificada pelo gene *mxaF*. Estas bactérias apresentam como características taxonómicas a forma de bastonete reto e metabolismo estritamente aeróbio (Figura 5). Crescem ativamente em tecidos meristemáticos, formando populações entre 10^4 e 10^6 unidades formadoras de colónias (UFC) por grama de tecido da planta. onde podem formar biofilmes e utilizar o metabolismo metilotrófico como vantagem durante a

colonização da planta hospedeira. Ocupam os mais diferentes habitats, incluindo solo, água, superfícies de folha, nódulos, grãos, ar entre outros (Dourado, 2010).

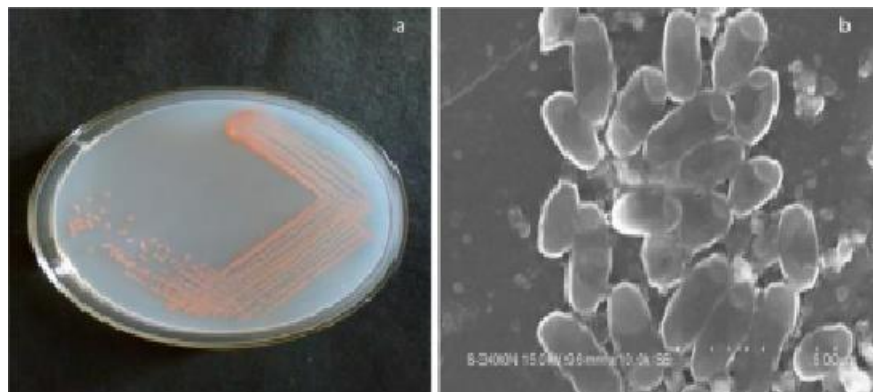


Figura 5 – *Methylobacterium* isolada da filosfera de folhas de mostarda. Fonte: Subhaswaraj, (2017)

Espécies do género *Methylobacterium* podem ser encontradas em associação com mais de 70 espécies de plantas colonizando ativamente a superfície de folhas de diferentes hospedeiros, como por exemplo, soja, amendoim, citrinos, eucalipto, milho, arroz (Dourado, 2010).

A *Methylobacterium symbioticum* é uma bactéria isolada de esporos do fungo micorrízico arbuscular *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum*. Foi estudada quanto à sua utilidade no campo da agricultura para reduzir o aporte de fertilizantes nitrogenados. Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são simbioses vegetais obrigatórios que são capazes de colonizar as raízes de aproximadamente dois terços de todas as espécies de plantas terrestres. A *Methylobacterium Symbioticum* apresenta capacidade de penetrar no tecido vegetal e, ainda, se deslocar pelo xilema, não sendo afetada pela parte inoculada (raiz ou parte aérea). Esta induz a uma elevada biomassa vegetal, levando a maiores rendimentos, não apenas em culturas folhosas, mas também em culturas frutíferas (Pascual et al.2020).

A bactéria é Gram-negativa, estritamente aeróbia, em forma de bastonete (0,8–1 µm de largura e 1,2–1,6 µm de comprimento) com flagelo lateral, pode aparecer em suspensão, de forma individual ou aos pares, sem formação de esporos. Cresce entre 10 e 30 °C (temperatura ótima 28 °C); pH 5,5-8,0 (pH ótimo 7). É sensível ao cloreto de sódio (NaCl), crescendo bem entre 0-1,5 %, reduzindo o crescimento a 2,0-2,5 %, e não mostram crescimento a 3,0 % (Pascual et al. 2020).

Segundo Pascual et al. (2020), a *Methylobacterium* spp. desempenha um papel em várias aplicações biotecnológicas. As plantas tratadas mostram melhorias significativas no rendimento, possivelmente devido a múltiplos mecanismos, incluindo fixação de azoto atmosférico (através de um sistema Fe_3^+/Mo_2^+ dependente da nitrogenase), a modulação da fotossíntese, o prolongamento da senescência das folhas e a precocidade na diferenciação sexual das flores. Os mesmos autores testaram esta estirpe em ensaios *in vitro* (milho) e em ensaios de campo (milho, arroz e uva de mesa) e demonstraram que em todos os casos, foi possível diminuir a fertilização azotada. Nos ensaios *in vitro*, em plantas de milho com 2 a 3 folhas, inoculadas com *Methylobacterium* spp. e com redução da fertilização azotada em 50 %, o valor de SPAD (Soil-Plant Analyses Development) foi significativamente maior do que em plantas com 100% de adubação azotada, mas não inoculadas com a bactéria em questão, (Figura 6). Nos ensaios de campo, demonstraram que, de modo geral, houve um aumento rendimento, permitindo uma redução do nível médio de azoto mineral. Nos tratamentos do milho e do arroz, o nível de azoto mineral foi reduzido entre 30-42 %, levando à manutenção ou aumento rendimento de 28 %. Os resultados mostram-se assim promissores e realçam o potencial destas bactérias para reduzir a dependência de fertilizantes azotados.

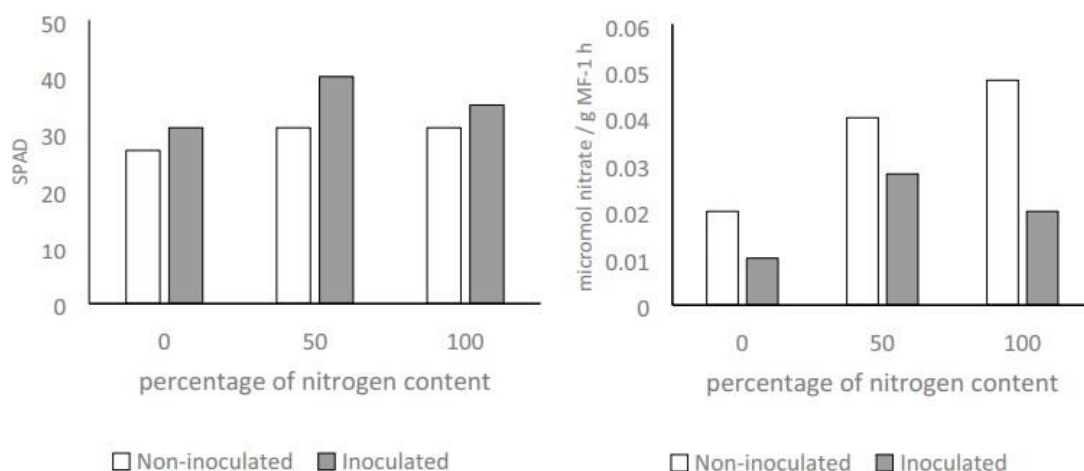


Figura 6 - Ensaios *in vitro* onde foi aplicado *Methylobacterium symbioticum* sp.nov. Fonte: Pascual et al. (2020)

3. Materiais e métodos

3.1. Caracterização do local de ensaio

O ensaio experimental foi realizado na empresa Zona Ímpar, Lda., dedicada à produção de materiais de propagação vegetativa, localizada na Lousã. A empresa é detentora de oito estufas de polietileno fixado em estruturas de ferro, orientadas Este – Oeste. A estufa onde se realizou o ensaio destina-se à propagação de citrinos e tem uma área de 400 m² (40 m x 10 m) (Figura 7).



Figura 7 – Localização da empresa e da estufa onde foi realizado o ensaio.

3.1.1. Estufa de propagação de citrinos

A estufa escolhida para o ensaio foi a estufa nº5, localizada no centro das oito estufas. A escolha foi feita para evitar variações de temperatura, proporcionando um ambiente mais controlado. A estufa tem uma área de 400 m², com 40 m de comprimento e 10 m de largura. A cobertura é de polietileno e as laterais são revestidas rede, o que ajuda a proteger da *Xylella fastidiosa* e da *Trioza erytreae*. A área é completamente vedada, sem aberturas e com uma antecâmara na entrada, com uma cortina de vento, para evitar a entrada de pragas e doenças.

Nesta estufa são plantados os porta enxertos em vasos de 3,5 L e 6 L. Após um ano de crescimento, são enxertados pelo método de borbulha com as variedades desejadas, permanecendo na estufa até atingirem o porte necessário para a transplantação para outros vasos e, posteriormente, para outra estufa.

3.1.2. Sistema de rega e de fertilização

O sistema de irrigação adotado compreende o uso de fertirrigação com um sistema de gota a gota, com débito de 1L/hora, movido por uma bomba de água de 6,35 cm, e um computador para a automatização do tempo de rega e para aplicação de vários componentes de fertilização. A empresa contém 7 tanques de fertilizantes diferentes:

1º Tanque – Macronutrientes (NPK)

2º Tanque – Enraizante

3º Tanque – Especial Citros (Fe, Mn, Zn)

5º Tanque – Cálcio

6º Tanque – Tratamentos pontuais

7º Tanque – Matéria Orgânica (M.O)

Durante a Primavera e o Verão, a fertirrega ocorre diariamente, com duas aplicações por dia. A primeira é realizada às 7 horas da manhã e inclui a adição de nutrientes, enquanto que a segunda, à tarde, é exclusivamente para irrigação, sem a incorporação de qualquer tipo de nutrientes. A matéria orgânica é adicionada uma vez por mês.

3.2. Protocolo experimental

O ensaio foi realizado em laranjeiras (variedade *Lane Late*) dentro de estufas de viveiro, em vasos de 3,5 L, com substrato de origem vegetal (carrasca de pinho + perlita), isento de metais pesados. O substrato foi misturado com fertilizante de libertação controlada. Para satisfazer as necessidades hídricas da planta, foi instalada uma fita de rega gota a gota, também utilizada para a fertilização.

O delineamento experimental utilizado foi totalmente casualizado com cinco repetições. Foram ensaiados dois fatores: fertilização azotada com 5 níveis de fator (100 %, 90 %, 80 %, 60 % e 50 % da dose de azoto recomendada para a cultura) e uma aplicação com *Methylobacterium symbioticum*, com 1 nível de fator (100 %), totalizando 7 tratamentos e 35 unidades experimentais (Quadro 2).

Quadro 2 - Tratamentos realizados

| Tratamentos | |
|-------------|--|
| T1 | Total de Azoto |
| T2 | Total de Azoto e <i>Methylobacterium sp.</i> |
| T3 | Redução em 10 % de Azoto + <i>Methylobacterium sp.</i> |
| T4 | Redução em 20 % de Azoto + <i>Methylobacterium sp.</i> |
| T5 | Redução em 40 % de Azoto + <i>Methylobacterium sp.</i> |
| T6 | Redução em 50 % de Azoto + <i>Methylobacterium sp.</i> |
| T7 | Total de <i>Methylobacterium sp.</i> |

As 35 plantas foram escolhidas do mesmo lote, de forma a que o porte fosse o mais homogéneo possível (Figura 8), com uma idade de, aproximadamente, 2 anos. As plantas selecionadas foram colocadas no centro da estufa, para não haver interferência ao nível da temperatura e da humidade. Assim, o ambiente em redor era mais estável e homogéneo (Figura 9).



Figura 8 – Plantas selecionadas para o ensaio.



Figura 9 - Local onde foram colocadas as plantas do ensaio.

O ensaio foi montado no dia 16 de março de 2023. Para quantificar o crescimento das plantas, fizeram-se duas medições semanais (segunda-feira e quinta-feira) da altura e do diâmetro basal. As medições tiveram início no mês de julho e terminaram no mês de setembro, que coincide com o término do ensaio.

O diâmetro basal foi medido através de um *packlist* e a altura foi medida com o auxílio de uma fita métrica. O índice de área foliar (IAF) foi estimado a partir de imagens digitais processadas pelo software ImageJ, disponível, gratuitamente, via internet, no site <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>. Foram retiradas fotos com um telemóvel, munido com uma câmara de 48MP. As fotos foram realizadas para todas as folhas de cada planta de forma individual, colocando uma folha de papel branca por baixo da folha desejada da planta.

Posteriormente, fotografou-se a copa da planta, de forma vertical. Com o auxílio do programa referido anteriormente, conseguiu-se apurar o IAF sem destruir ou retirar as folhas da planta (Figura 10). Esta manobra foi fundamental, já que, a planta tinha um tamanho reduzido, e poderia comprometer o seguimento do ensaio, caso se optasse pelo método destrutivo. Esta análise foi feita mensalmente, e iniciou-se no mês de julho, e, depois, todos os meses.

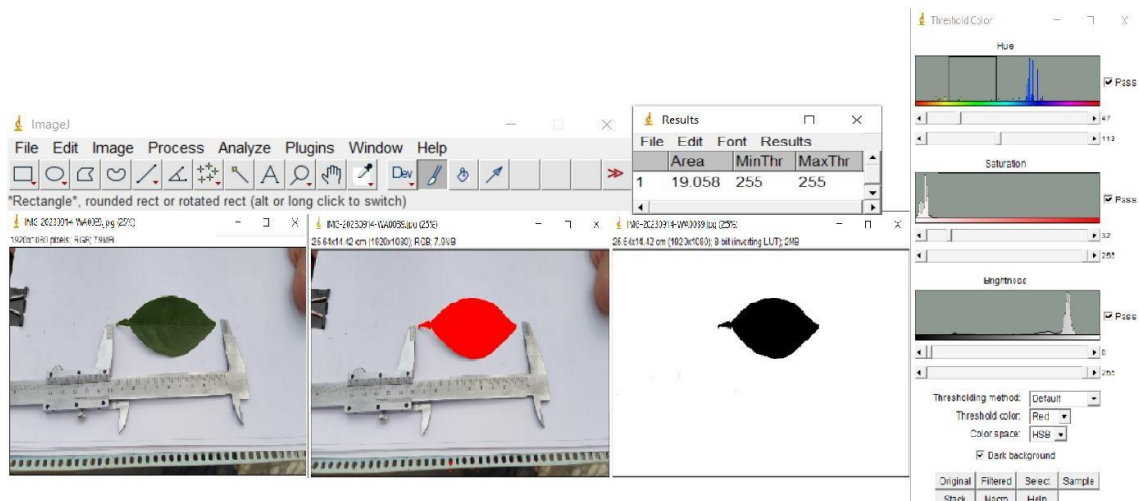


Figura 10 – Análise da área foliar através do programa imagemJ.

Para analisar a síntese metabólica das plantas em estudo, realizou-se uma análise à seiva, no final do ensaio. Esta análise foi realizada com a ajuda da Hubel Verde, foram retiradas entre 35 a 40 folhas por tratamento, retirou-se o pecíolo e cortou-se em fragmentos mais pequenos que posteriormente foram colocados numa prensa para extrair a seiva com a finalidade de a colocar nos medidores de pH, NO_3^- , Na^+ e açúcares presentes na seiva (Grau Brix).

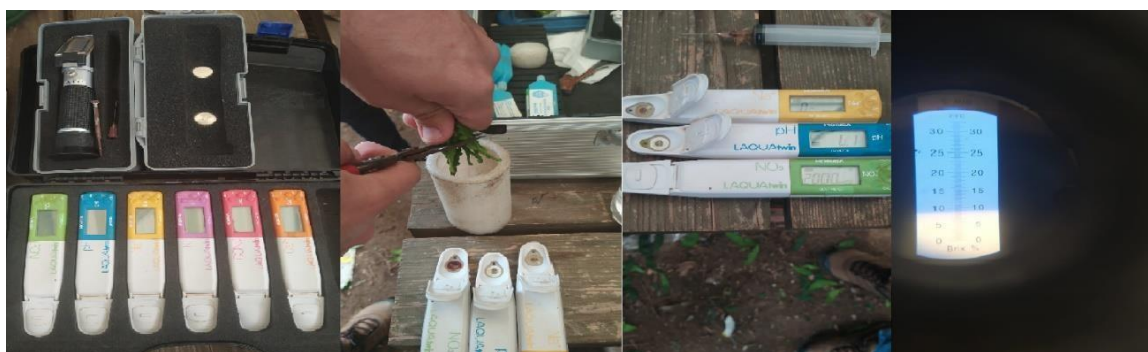


Figura 11 – Análise à seiva e ao grau Brix nos tratamentos do ensaio.

Os primeiros testes de fertilização foram realizados no início de maio, pois, aquando da instalação do ensaio, as plantas encontravam-se a sair do estado de dormência do inverno. O

adubo utilizado foi um adubo NPK sólido granulado, de libertação controlada e com inibidor de urease, com 24 unidades de azoto, 5 unidades de fósforo e 10 unidades de potássio (24-5-10). A quantidade de adubo foi definida com base nas recomendações de fertilização para a cultura em análise (INIAV, 2022). Tendo em conta que a quantidade recomendada pelo manual de fertilização de cultura é de 20 g de azoto por planta, a quantidade de adubo aplicada foi de 83 g por planta, uma vez que o adubo utilizado continha 24 unidades de azoto a cada 100kg.

Antes de fazer a fertilização nas plantas do ensaio, foram realizados testes de fertilização noutras plantas da mesma variedade e do mesmo lote para não comprometer as plantas do ensaio e a viabilidade do mesmo.

No primeiro teste de fertilização, realizado no dia 3 de maio de 2023, aplicou-se 83 g de adubo. As plantas foram retiradas dos vasos e o substrato foi sacudido para outro recipiente. Nesse recipiente, misturou-se o adubo com o substrato e replantou-se a planta no mesmo vaso. Após o transplante, fez-se uma rega imediata. Durante uma semana, observou-se atentamente o comportamento da planta. Verificou-se que a quantidade de 83 g de adubo (aplicada de uma só vez) causou a morte da planta. Assim, optou-se por realizar duas fertilizações, no lugar de uma só, usando-se 41,5 g de adubo por fertilização.

No dia 10 de maio de 2023, foram realizados mais dois testes de adubação. Para evitar constrangimentos nas plantas de ensaio, colocou-se, neste segundo teste, 41,5 g de adubo sobre a superfície do vaso. No terceiro teste, misturou-se 41,5 g de adubo no substrato sem sacudir a raiz. Em suma, em ambos os testes, a resposta das plantas foi positiva (Figura 12).



Figura 12 – Primeiro, segundo e terceiro teste de adubação respetivamente.

A fertilização dos diferentes tratamentos do ensaio foi realizada no dia 17 de julho de 2023, utilizando-se o método do terceiro ensaio de fertilização para a primeira adubação, ou seja, misturando 41,5 g de adubo no substrato sem sacudir a raiz. As quantidades de adubo aplicadas apresentam-se no Quadro 3.

Quadro 3 - Quantidade de adubo NPK utilizado em cada um dos tratamentos.

TRATAMENTOS

| | |
|-----------------------|------------------|
| T1-100 % ADUBO | 41 g de adubo |
| T2-100 % ADUBO | 41 g de adubo |
| T3-90 % ADUBO | 37,35 g de adubo |
| T4-80 % ADUBO | 33,2 g de adubo |
| T5-60 % ADUBO | 24,9 g de adubo |
| T6-50 % ADUBO | 20,75 g de adubo |
| T7-0 % ADUBO | 0 g de adubo |

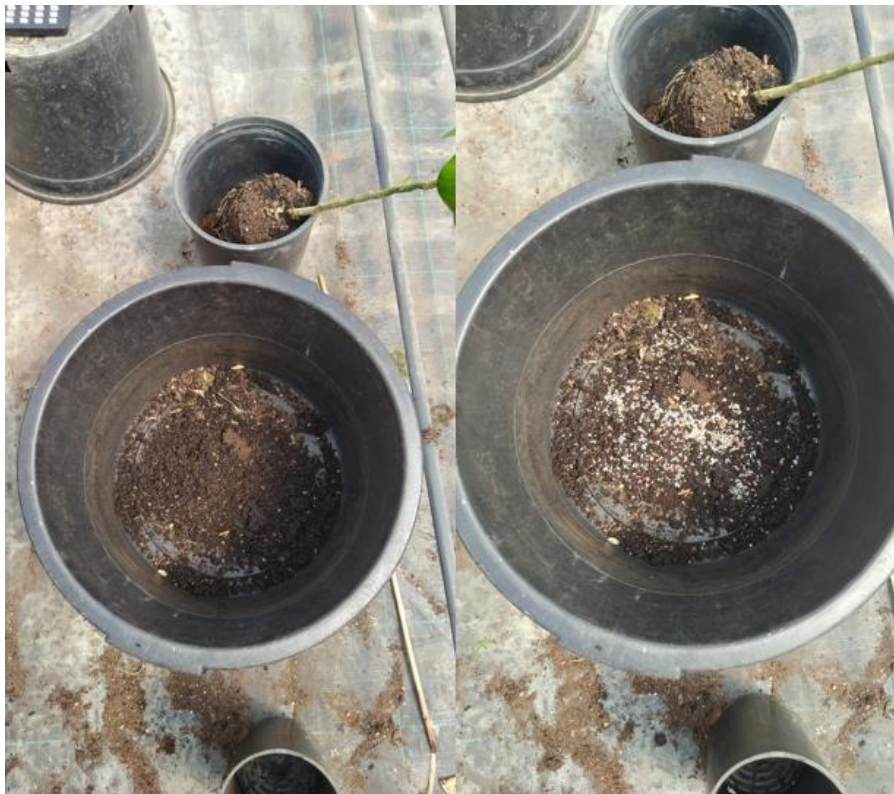


Figura 13 – Aplicação do adubo misturado no substrato.

Após a fertilização sólida, aguardou-se até ao dia 22 de julho de 2023. Neste dia, foi aplicada a bactéria *Methylobacterium symbioticum*: 300g diluídos numa calda de 250l (cálculo realizado através da ficha técnica do produto). Aplicou-se manualmente o preparado, com uma mangueira ligada a um pulverizador (acoplado a um trator), em todas as plantas de todas as estufas. Para evitar contaminação das plantas do ensaio, estas foram retiradas para a antecâmara da estufa e foi feita uma aplicação individual.

No dia 17 de agosto de 2023 foi realizada a segunda fertilização. Devido ao tamanho e para evitar *stress* nas plantas (para que estas não cessassem temporariamente o crescimento), foi aplicado o adubo adequado sobre a superfície de cada vaso. As quantidades aplicadas foram as registadas no Quadro 3.

4. Resultados e discussão

Ao longo deste estudo, foram realizadas várias medições com o intuito de analisar algumas características das plantas no decorrer de três meses, tais como a medição da altura e do diâmetro basal das plantas, como também o índice de área foliar e análise à seiva. Neste ponto apresentam-se e discutem-se os resultados obtidos no que respeita às medições da altura das plantas, diâmetro basal, área foliar e análise à seiva.

4.1. Altura das plantas

No início do ensaio, as plantas foram selecionadas de forma a possuírem alturas semelhantes. Essa seleção possibilitou um grupo inicial uniforme, permitindo avaliar com maior rigor o efeito dos tratamentos no crescimento das plantas. Na Figura 14, pode-se observar a semelhança das plantas em relação à altura média, em todos os tratamentos considerados.

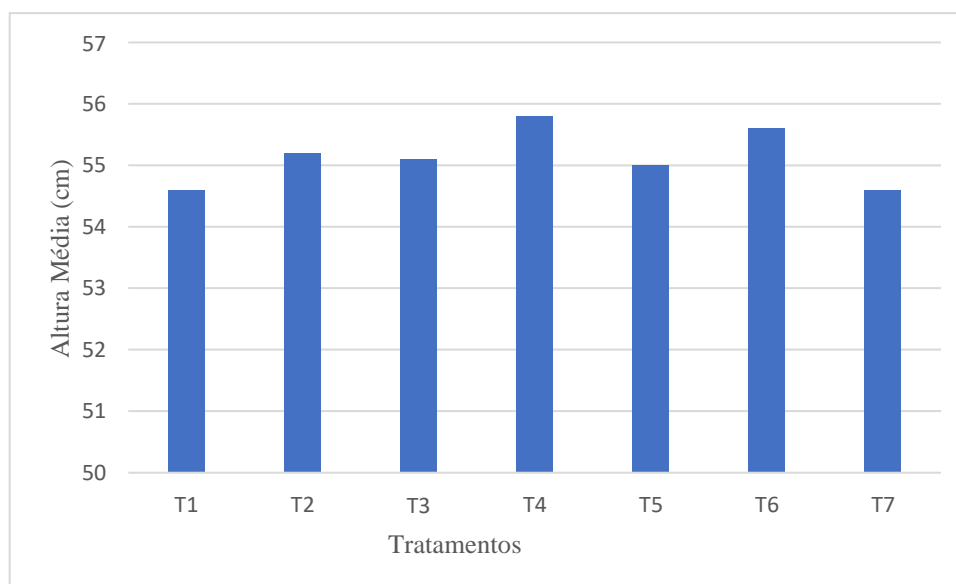


Figura 14 - Altura média (cm), a 16 de março, das plantas selecionadas para o ensaio, nos tratamentos T1 (100 % adubo), T2 (100 % adubo + bactéria), T3 (90 % adubo + bactéria), T4 (80 % adubo + bactéria), T5 (60 % adubo + bactéria), T6 (50 % adubo + bactéria) e T7 (100 % bactéria).

Podemos assim considerar que a organização dos tratamentos, realizada no dia 16 de março de 2023, foi bem-sucedida, visto que se obteve uma homogeneidade aceitável de alturas de árvores entre tratamentos, variando aproximadamente entre 54 a 56 cm.

No Quadro 4 e Figura 15 apresenta-se a evolução semanal da altura média das plantas ao longo do ensaio. Recorde-se que em cada semana foram realizadas duas medições (uma à

segunda-feira e outra à quinta-feira). Os resultados apresentados em cada semana dizem respeito ao valor médio obtido dessas duas observações.

Quadro 4 – Altura média semanal (cm) e respetivo desvio padrão nos tratamentos T1 (100 % adubo), T2 (100 % adubo + bactéria), T3 (90 % adubo + bactéria), T4 (80 % adubo + bactéria), T5 (60 % adubo + bactéria), T6 (50 % adubo + bactéria) e T7 (100 % bactéria).

| Semana | Altura Média Semanal (cm) e Desvio Padrão | | | | | | |
|-------------------------|---|----------|----------|----------|-----------|----------|----------|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 |
| 1 (3/Jul a 6/Jul) | 62,2±2,7 | 61,8±5,7 | 60,8±2,2 | 65,4±2,8 | 63,8±5,7 | 63,9±4,4 | 59±3,8 |
| 2 (10/Jul a 13/Jul) | 64,3±2 | 62,9±6,9 | 62,7±2,6 | 67,6±2,6 | 65,9±5,4 | 66,5±5 | 59,7±2,8 |
| 3 (17/Jul a 20/Jul) | 64,8±2 | 64,4±7,2 | 63,3±3,1 | 68,3±2,4 | 66,7±5,2 | 67,3±5,3 | 60,4±2,9 |
| 4 (24/Jul a 27/Jul) | 65,6±2,5 | 67±6,2 | 63,4±3,2 | 69,1±2,6 | 67±5,2 | 67,5±5,3 | 61,4±3,8 |
| 5 (31/Jul a 3/Ago) | 66,2±2,8 | 71,3±3,3 | 65,6±4,9 | 70,9±4,5 | 69,3±7,3 | 69,5±4,2 | 64±3,6 |
| 6 (7/Ago a 10/Ago) | 71,2±5,4 | 73,7±3,4 | 69,4±6,6 | 75,9±9,2 | 75,6±11,1 | 73,1±4,9 | 69,5±4,8 |
| 7 (14/Ago a 18/Ago) | 77,1±9,4 | 77,2±4,1 | 77,4±3,5 | 80,8±7,3 | 80,2±8,4 | 74,8±5,9 | 71,7±5,9 |
| 8 (21/Ago a 24/Ago) | 78,8±9,1 | 79,1±5,8 | 80,3±3,2 | 83,8±4,8 | 83,5±6,3 | 76±6,0 | 72,7±5,5 |
| 9 (28/Ago a 31/Ago) | 79,3±9 | 79,3±5,8 | 81,2±2,5 | 85±4,6 | 85,2±5,3 | 76,2±5,9 | 73,1±5,4 |
| 10 (4/Set a 7/Set) | 79,4±8,9 | 80±5,6 | 81,2±2,7 | 85,1±4,7 | 87,4±4,8 | 77,8±6,6 | 74,5±4,7 |
| 11 (11/Set a 14/Set) | 80,1±9,4 | 81,1±5,5 | 81,6±2,8 | 85,8±4,4 | 89,5±7,6 | 79,5±8,4 | 76±4,5 |
| 12 (18/Set a 21/Set) | 80,9±10 | 81,5±5,4 | 82,3±2,9 | 86,9±4,1 | 90,3±7,7 | 80,3±8,2 | 77±5,1 |

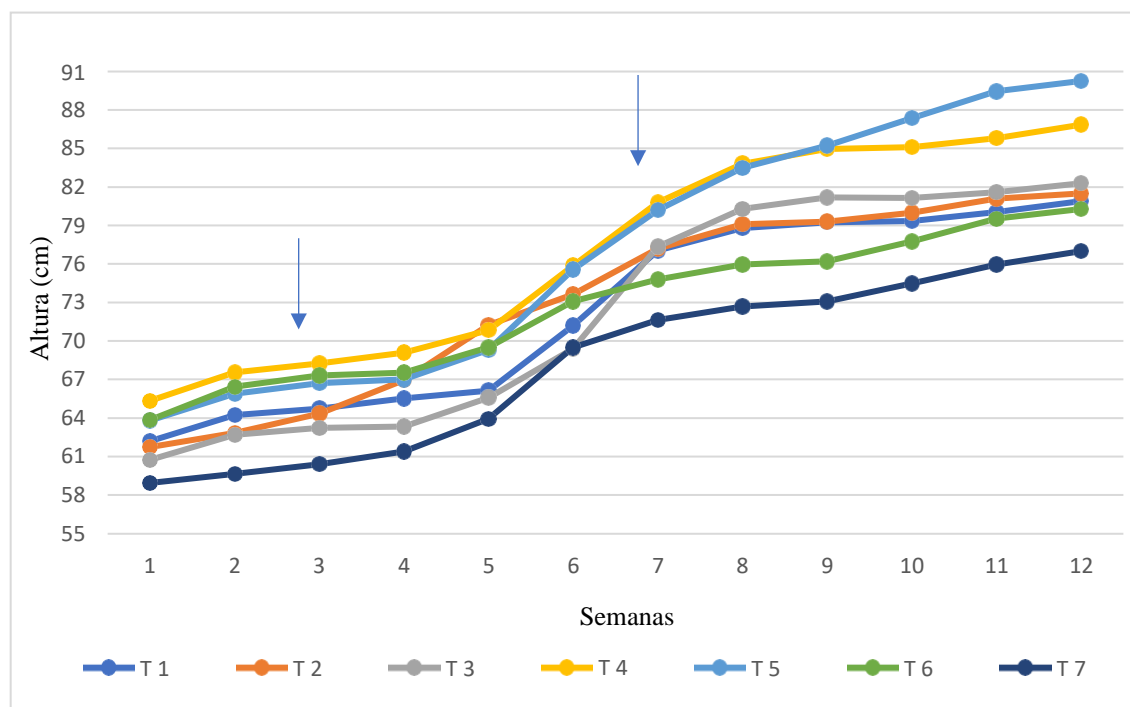


Figura 15 – Altura média semanal (cm) nos tratamentos T1 (100 % adubo), T2 (100 % adubo + bactéria), T3 (90 % adubo + bactéria), T4 (80% adubo + bactéria), T5 (60 % adubo + bactéria), T6 (50 % adubo + bactéria) e T7 (100 % bactéria). As setas indicam as semanas nas quais se aplicou o adubo e a bactéria.

A altura média das plantas aumentou ao longo do ensaio, mas a análise estatística realizada (ANOVA) mostrou não ter havido diferenças significativas entre tratamentos.

Em todos os tratamentos, verificou-se um aumento da altura média das plantas entre a semana 1 e a semana 12. Esse aumento pareceu mais evidente a partir da semana 4, altura em que se aplicou o adubo e a bactéria *Methylobacterium sp.*. Recorde-se que a primeira fertilização com o adubo e com a bactéria, foi realizada na semana 3 e a que segunda fertilização foi realizada na semana 7.

Os tratamentos onde se verificou maior crescimento da altura das plantas (desde o início até ao fim do ensaio) foram os tratamentos T3, T4 e T5, com aumentos de 21, 20 e 22 cm respetivamente. Sente-se necessidade de evidenciar o tratamento T5 (com aplicação da bactéria *Methylobacterium sp.* e 60 % de adubo), que foi aquele onde o aumento de altura das plantas foi mais expressivo. Este resultado sugere que a aplicação da *Methylobacterium sp.* teve uma influência positiva no crescimento das plantas, permitindo reduzir a fertilização em 40 %.

O tratamento em que se registou o menor crescimento das plantas (18 cm) foi o tratamento T7, que correspondeu ao tratamento onde apenas se aplicou a *Methylobacterium sp.*. Este resultado mostra que a substituição da fertilização total pela bactéria não permitiu o melhor crescimento das plantas.

Embora existam estudos que evidenciem o efeito positivo da aplicação de determinadas bactérias no crescimento das plantas, como demonstrado por Bogas (2010), que analisou o efeito da aplicação da bactéria *Methylobacterium spp.* em porta enxertos de plantas de limão e tangerina, identificando aumentos de crescimento entre 1 a 3 cm nas plantas de tangerina, em comparação com os grupos de controle, em diferentes ensaios realizados, outros estudos contradizem esse resultado. Por exemplo, trabalhos realizados em plantas de eucalipto, como o de Araújo (2021), que ao analisar os efeitos da mesma bactéria, não observou os resultados esperados. Nas plantas tratadas com a bactéria, não se observou diferenças significativas em relação à altura e à biomassa vegetal em comparação com as plantas não tratadas.

No presente trabalho, à semelhança dos resultados de Araújo (2021), não foram encontradas diferenças significativas que comprovassem o efeito positivo da bactéria no crescimento em altura das plantas de laranjeira, o que não permite a formulação de conclusões mais definitivas.

4.2. Diâmetro Basal

O Quadro 5 e a Figura 16 apresentam os resultados semanais referentes ao diâmetro basal médio em cada tratamento do início até ao final do ensaio.

Quadro 5 – Diâmetro Basal médio (cm) e respetivo desvio padrão nos tratamentos T1 (100 % adubo), T2 (100 % adubo + bactéria), T3 (90 % adubo + bactéria), T4 (80 % adubo + bactéria), T5 (60 % adubo + bactéria), T6 (50 % adubo + bactéria) e T7 (100 % bactéria).

| Semana | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 |
|-------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 1 (3/Jul a 6/Jul) | 0,8±0,05 | 0,8±0,08 | 0,8±0,09 | 0,8±0,04 | 0,8±0,04 | 0,7±0,08 | 0,7±0,04 |
| 2 (10/Jul a 13/Jul) | 0,8±0,05 | 0,8±0,08 | 0,8±0,09 | 0,8±0,04 | 0,8±0,04 | 0,7±0,08 | 0,7±0,04 |
| 3 (17/Jul a 20/Jul) | 0,8±0,05 | 0,8±0,08 | 0,8±0,09 | 0,8±0,04 | 0,8±0,04 | 0,7±0,08 | 0,7±0,04 |
| 4 (24/Jul a 27/Jul) | 0,8±0,04 | 0,8±0,06 | 0,8±0,1 | 0,8±0,04 | 0,8±0,05 | 0,8±0,06 | 0,8±0,06 |
| 5 (31/Jul a 3/Ago) | 0,8±0,04 | 0,8±0,02 | 0,8±0,09 | 0,8±0,04 | 0,8±0,08 | 0,8±0,1 | 0,8±0,04 |
| 6 (7/Ago a 10/Ago) | 0,8±0,04 | 0,8±0,04 | 0,7±0,08 | 0,8±0,04 | 0,8±0,05 | 0,8±0,1 | 0,8±0,04 |
| 7 (14/Ago a 18/Ago) | 0,8±0,04 | 0,8±0,06 | 0,8±0,08 | 0,8±0,06 | 0,8±0,06 | 0,8±0,1 | 0,8±0,06 |
| 8 (21/Ago a 24/Ago) | 0,8±0,09 | 0,8±0,08 | 0,8±0,08 | 0,9±0,08 | 0,8±0,08 | 0,8±0,1 | 0,8±0,08 |
| 9 (28/Ago a 31/Ago) | 0,8±0,08 | 0,9±0,08 | 0,8±0,08 | 0,9±0,06 | 0,9±0,00 | 0,8±0,1 | 0,8±0,08 |
| 10 (4/Set a 7/Set) | 0,8±0,09 | 0,9±0,08 | 0,8±0,09 | 0,9±0,06 | 0,9±0,06 | 0,8±0,1 | 0,9±0,08 |
| 11 (11/Set a 14/Set) | 0,9±0,08 | 0,9±0,1 | 0,8±0,1 | 0,9±0,08 | 0,9±0,1 | 0,9±0,1 | 0,9±0,08 |
| 12 (18/Set a 21/Set) | 0,9±0,08 | 0,9±0,1 | 0,8±0,1 | 0,9±0,08 | 0,9±0,1 | 0,9±0,1 | 0,9±0,08 |

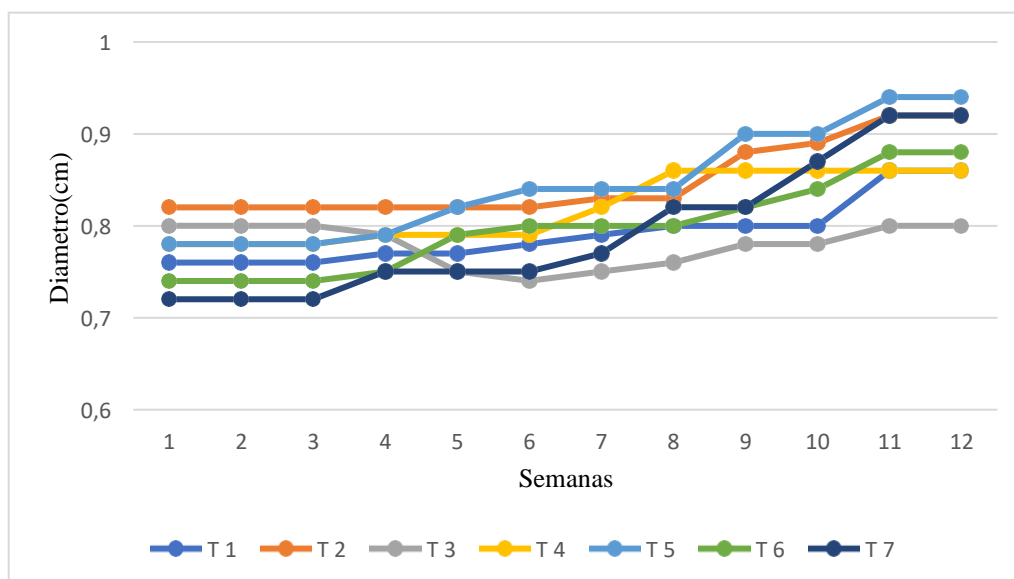


Figura 16 – Diâmetro basal médio nos tratamentos T1 (100 % adubo), T2 (100 % adubo + bactéria), T3 (90 % adubo + bactéria), T4 (80 % adubo + bactéria), T5 (60 % adubo + bactéria), T6 (50 % adubo + bactéria) e T7 (100 % bactéria).

Os tratamentos estudados não exerceram efeitos significativos ($p > 0,05$) no diâmetro basal das plantas. No entanto, pela observação do Quadro 5 e da Figura 16 podemos observar que, apesar das diferenças terem sido muito pouco expressivas e não terem sido significativas, os tratamentos T7 e T5 foram aqueles onde parece ter-se registado maior desenvolvimento do diâmetro basal. Tal como observado no crescimento em altura. Estes resultados estão de acordo com os de Bogas (2010), que analisou o efeito da aplicação da bactéria *Methylobacterium* spp. em porta enxertos de plantas de limão e tangerina, e também não encontrou diferenças significativas no diâmetro basal entre as plantas inoculadas nenhum com *Methylobacterium* spp. e as plantas não inoculadas.

4.3. Área Foliar

A área foliar total foi um dos parâmetros analisados, pois o aumento da área foliar é de grande importância, quanto maior a área de captação de energia solar maior será a síntese metabólica da planta. O desenvolvimento da área foliar total por planta, nos meses de julho, agosto e setembro, nos sete tratamentos realizados pode ser observado no Quadro 6.

Quadro 6 – Valores médios da área foliar total (cm²), nos tratamentos T1 (100 % adubo), T2 (100 % adubo + bactéria), T3 (90 % adubo + bactéria), T4 (80 % adubo + bactéria), T5 (60 % adubo + bactéria), T6 (50 % adubo + bactéria) e T7 (100 % bactéria).

| Tratamentos | Área Foliar de Julho | | Área Foliar de Agosto | | Área Foliar de Setembro | |
|-------------|----------------------|---------------|-----------------------|---------------|-------------------------|---------------|
| | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão | Média | Desvio Padrão |
| T1 | 1265 | 109 | 1577 | 205 | 2021 | 490 |
| T2 | 1088 | 312 | 1312 | 370 | 1613 | 445 |
| T3 | 1304 | 118 | 1414 | 122 | 1538 | 125 |
| T4 | 1255 | 101 | 1460 | 141 | 1718 | 209 |
| T5 | 1265 | 235 | 1482 | 244 | 1761 | 253 |
| T6 | 1201 | 439 | 1348 | 503 | 1524 | 581 |
| T7 | 1324 | 359 | 1460 | 289 | 1619 | 238 |

Os tratamentos estudados não exerceram efeitos significativos ($p > 0,05$) na área foliar das plantas. No entanto, pela observação do Quadro 6 podemos observar que, em todos os tratamentos, a área foliar aumentou de julho a setembro. Este aumento foi mais marcado no tratamento T1 (aumento de 756 cm²) e menos expressivo nos tratamentos T3 (aumento de 234 cm²) e T7 (aumento de 295 cm²). De uma maneira geral, verificou-se que a redução de 50 % na quantidade de adubo aplicada influenciou de forma negativa o desenvolvimento da área foliar das plantas de laranjeira.

4.4. Análise à seiva

No Quadro 7 apresentam-se os resultados das concentrações médias de azoto nítrico (NO_3^-), sódio (Na^+), pH e grau Brix obtidos na seiva das plantas nas diferentes modalidades experimentais: T1 (100 % adubação), T2 (100 %adubação+bactéria), T3 (90 %adubação+bactéria), T4(80 %adubação+bactéria), T5(60 %adubação+bactéria), T6(50 %adubação+bactéria), T7(100 %bactéria).

Quadro 7 – Análise à seiva para visualização da quantidade de NO_3^- , presente na planta em (ppm) nos tratamentos T1 (100 % adubação), T2 (100 % adubação + bactéria), T3(90 % adubação+bactéria), T4(80 % adubação+bactéria), T5(60 % adubação+bactéria), T6(50 % adubação+bactéria), T7(100 % bacteria).

| Análise à Seiva | | | | |
|-----------------|-----------------------|-----|---------------------|-------|
| Tratamentos | NO_3^- (ppm) | pH | Na^+ (ppm) | °Brix |
| T1 | 2000 | 6,1 | 160 | 9 |
| T2 | 1500 | 6,3 | 100 | 4 |
| T3 | 1300 | 6,4 | 91 | 3 |
| T4 | 2000 | 6,6 | 140 | 3 |
| T5 | 1800 | 6,5 | 120 | 3 |
| T6 | 1600 | 6,5 | 160 | 3 |
| T7 | 1100 | 6,7 | 140 | 2 |

Através do Quadro 7, tendo como referência os tratamentos 1 e 7 (que correspondem, respetivamente, ao tratamento em que não foi aplicada bactéria e ao tratamento em que foi apenas aplicada a bactéria), verifica-se que o tratamento 4 atingiu os níveis de NO_3^- iguais aos do tratamento 1; o tratamento 5, apesar de não atingir esses valores, manteve-se próximo, uma vez que foi aplicada a bactéria em ambos os tratamentos e houve uma redução na adubação; o tratamento 3 e 7 apresentaram valores abaixo do ideal comparativamente ao tratamento 1, onde foi feita a adubação segundo o manual de fertilização. Após uma pesquisa aprofundada, constatou-se que ainda não há referências bibliográficas com valores de referência concretos para esta cultura, visto que, de país para país, os valores são muito díspares. Acresce o facto de as plantas serem muito jovens, o que torna mais difícil a busca por valores concretos.

Estudos com outras culturas, como o de Pascual et al. (2020) que analisaram o efeito da aplicação da bactéria *Methylobacterium sp.* em plantas de arroz, milho e uva de mesa (Quadro 8), têm demonstrado que a aplicação desta bactéria permite reduzir a fertilização azotada e manter bons resultados no crescimento e produtividade das plantas. Nesse estudo, a produtividade das culturas foi maior quando se reduziu a fertilização em 50 % do que quando se aplicou 100 % da fertilização. Os mesmos autores explicam essa situação como resultado de uma deficiência nutricional em azoto (50 % N). Essa deficiência terá estimulado a simbiose entre a planta e a bactéria.

No presente estudo, os resultados obtidos com os tratamentos T4 e T5, que corresponderam a uma redução de fertilização de 20 % e 40 %, respetivamente, foram aqueles que nos pareceram os mais promissores, tendo-se observado teores de NO_3^- superiores aos dos outros tratamentos com redução da fertilização. A redução de 100 % de fertilização mostrou um desenvolvimento reduzido e os teores de açúcar na planta foram menores do que os outros tratamentos.

Quadro 8 - Ensaio de campo onde foi aplicado *Methylobacterium symbioticum sp.nov.* Adaptado de: Pascual et al., 2020

| | Sem inoculação | Com inoculação | % de redução | Sem inoculação | Com inoculação | % de maior Produção |
|----------------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------------|
| <i>Arroz</i> 1 | 267 | 156 | 42 | 7031 | 8001 | 14 |
| <i>Arroz</i> 2 | 210 | 126 | 40 | 8124 | 8134 | 0 |
| <i>Milho</i> 1 | 237 | 142 | 40 | 14312 | 17539 | 23 |
| <i>Milho</i> 2 | 293 | 175 | 40 | 16881 | 17511 | 4 |
| <i>Milho</i> 3 | 480 | 295 | 39 | 14346 | 18335 | 28 |
| <i>Milho</i> 4 | 230 | 161 | 30 | 10515 | 11828 | 12 |
| <i>Milho</i> 5 | 276 | 188 | 32 | 13937 | 12863 | 3 |
| <i>Uva de vinho</i> 1 | 25 | 25 | 0 | 13937 | 16464 | 18 |
| <i>Uva de vinho</i> 2 | 18 | 18 | 0 | 14029 | 19776 | 41 |

Unidades de fertilização azotado Produção média (Kg por hectare)

5. Considerações finais

O ensaio realizado teve como objetivo avaliar o efeito da bactéria *Methylobacterium symbioticum* no crescimento de plantas de laranjeira, em viveiros. Foram realizados sete tratamentos onde se aplicou a bactéria e diferentes níveis de adubação azotada. Apesar de não se terem verificado diferenças significativas entre tratamentos, os resultados obtidos, permitiram tecer algumas considerações:

- As plantas do tratamento T2 com 100 % de adubo e bactéria, mostraram baixos resultados dos componentes de crescimento bem como nas concentrações de NO_3^- , relativamente ao tratamento 1 que, apresentou valores mais elevados, sendo este o tratamento controle, em que não houve interferência da bactéria.
- As plantas dos tratamentos T4 (com aplicação de bactéria e redução em 20 % da fertilização) e T5 (com aplicação de bactéria e redução em 40 % da fertilização) apresentaram, em média, uma altura total maior do que as plantas dos restantes tratamentos. Em contrapartida, o menor crescimento em altura ocorreu nas plantas do tratamento T7, onde apenas se aplicou a bactéria. Pese embora a variação do diâmetro basal ter sido similar em todos os tratamentos, foi também no tratamento T5 onde se observou o maior aumento no diâmetro basal.
- De uma maneira geral, o crescimento das plantas parece ter sido mais evidente nos tratamentos com redução de fertilização de 20 % e 40 % quando comparados com os resultados obtidos nos tratamentos com reduções mais elevadas e nos tratamentos em que não houve redução de fertilização. Este facto pode ser explicado pela deficiência nutricional, provocada pela necessidade de azoto que promoveu simbiose, enquanto com a adição nutricional completo de (100 % N) isso não terá acontecido.
- Com base nos resultados obtidos, parece ser viável reduzir a adubação azotada sem comprometer o desenvolvimento das plantas, o que permitirá diminuir a quantidade de nitratos que lixiviados nos solos.
- O ensaio realizado teve várias limitações que poderão ter afetado o desenvolvimento das plantas tais como, a falta de controlo de temperatura e humidade dentro da estufa. Em dias muito quentes, as plantas podem cessar o crescimento podendo perder área foliar devido a

esse stress. Temperaturas elevadas também podem comprometer o bom funcionamento da bactéria.

- A falta de evidências para confirmar a colonização da bactéria foi um dos fatores que contribuiu para essa incerteza. Este tipo de ensaios são muitas vezes difíceis de confirmar devido a existirem muitas variáveis que provocam alterações que nem sempre são perceptíveis.

Em suma, os resultados do presente trabalho apontam para a possibilidade de um potencial benefício na aplicação da bactéria e uma redução de 20% a 40% da fertilização azotada, mesmo que não tenha sido estatisticamente robusto ao nível de significância utilizado. Há indícios que sugerem resultados promissores com os tratamentos T4 e T5, o que pode indicar que, sob condições específicas, a presença deste biofertilizante pode influenciar positivamente o crescimento das plantas de laranjeira, embora essa conclusão precise de ser analisada com maior detalhe. A ausência de diferenças estatisticamente significativas não deve ser interpretada como ausência total de efeitos, mas sim como uma indicação de que as variações observadas podem ser devidas a fatores não completamente considerados neste estudo. Dessa forma, sugere-se que investigações mais detalhadas sejam realizadas para elucidar as nuances e os possíveis benefícios do tratamento T4 em relação ao crescimento das plantas, considerando variações experimentais adicionais e análises mais aprofundadas dos mecanismos envolvidos. Além dos aspetos avaliados, poderia ser interessante avaliar a taxa de respiração para verificar o efeito das diferentes dosagens de azoto nas plantas. Seria também interessante confirmar a vitalidade da bactéria nas plantas e realizar este estudo noutras localizações e em diferentes culturas além de tratamentos com diferentes percentagens da dosagem de nutrição mineral.

- Com o desenvolvimento de novos produtos deste tipo, gera-se a necessidade cada vez maior de aferir a sua viabilidade agronómica e económica. Se os resultados positivos forem confirmados, poderá haver uma diminuição do uso de fertilizantes sintéticos, o que contribuirá para restaurar ou melhorar a qualidade dos solos e águas.

Referencias bibliográficas

Alva, M., De la Rosa, A., & López-Reyes, J. A. (2018). Visual symptoms of plant nutritional disorders: A review. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1651. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01651>

Ahmad, 1996. Nitrogen Economy in Tropical Soils. Proceedings of the International Symposium on Nitrogen Economy in Tropical Soils, held in Trinidad, W.I., January 9-14, 1994. *Developments in Plant and Soil Sciences*. Vol. 69. Kluwer Academic Publishers as cited in Ladeira, L., 2017. Valor agronómico de fertilizantes enriquecidos com microrganismos fixadores de azoto.

Araújo, M. (2021) Estudos para o Melhoramento de um Consórcio Microbiano com Potencial Bioestimulante em Mudanças de *Eucalyptus*.

Barros, J (2020). Universidade de Évora, Fertilidade do solo e Nutrição das plantas.

Bogas, A (2010). Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Avaliação da interação entre *Methylobacterium* spp. e citros.

Brian M. Hoffman, Dmitriy Lukoyanov, Zhi-Yong Yang, Dennis R. Dean, Lance C. Seefeldt. (2014). Mechanism of Nitrogen Fixation by Nitrogenase: The Next Stage.

Coutinho, M (2000). Instituto Politécnico de Bragança. Eficiência de utilização do azoto pelas plantas.

Carvalho, P. (1997). Ciclo interno do azoto em árvores. Lisboa: ISA, 69 p.

Comissão Europeia. Utilização sustentável dos nutrientes. https://agriculture.ec.europa.eu/sustainability/environmental-sustainability/low-input-farming/nutrients_pt, 1 de janeiro de 2023

Dourado, M.N. (2010). Ecologia de *Methylobacterium* spp. na planta hospedeira. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

Duarte, A. 2014. Breves Notas Sobre a Citricultura Portuguesa. Faculdade de Ciências e Tecnologia Universidade do Algarve.

Gasparotto, L., Bueno.N.(1999). Embrapa Amazônia Ocidental. Sintomas de Deficiência Nutricionais em Citrinos.

Hubel Verde (2021). Apresentação Blue-N.

INTAGRI.2018.Fijacion Biológico de Nitrógeno Atmosférico. Serie Nutrición Vegetal Núm 126. Artigo Técnicos de INTAGRI.Mexico.4p

Instituto Nacional de Estatística (INE), 2022. Estatísticas Agrícolas - 2022 Lisboa, Portugal: INE.

Jen-Hshuan Chen. (2006). Workshop Internacional sobre Manejo Sustentado do Sistema Solo-Rizosfera para Produção Agrícola Eficiente e Uso de Fertilizantes

Köberl, M., Müller, H., Ramadan, EM e Berg, G. (2011). A agricultura no deserto se beneficia do potencial microbiano em solos áridos e promove a diversidade e a saúde das plantas.

Lantican, MA, Pingali, PL e Rajaram, S. (2003). A pesquisa sobre terras marginais está se atualizando? O caso de ambientes desfavoráveis para o cultivo de trigo. *Agrícola Econ.*

Marscher, H. (1995). *Mineral nutrition of higher plants*. 3ª Edição.

Militão,C. (2004). Estudo do Ciclo do Azoto. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Nações Unidas. (2022). População mundial deve ultrapassar marca de 8 bilhões.

Pascual, JA, Ros, M., Martínez, J. *et al.* *Methylobacterium symbioticum* sp. nov., uma nova espécie isolada de esporos de *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* . *Curr Microbiol* 77 , 2031–2041 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02101-4>

Pascual,J.,Ros,M.,Martinez,J.,Carmona,F.,Bernabé,A.,Torres,R.,Lucena,T.,Aznar,R.,Arahal,D.,& Fernández,F.(2020). *Methylobacterium symbioticum* sp. nov., a new species isolated from spores of *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum*.

Paredes & Primo-Millo, (1988), Capítulo 1, Introdução à Nutrição de Plantas

- Santos, M. J., Carvalho, A. M., & Teixeira, J. P. (2017). Efeito de microrganismos do solo na nutrição da laranjeira-clementina. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 39(4), 1053-1060.
- Santos, J.Q. (2015). Fertilização: fundamentos agroambientais da utilização dos adubos e corretivos.
- Santos, M. A., & Silva, A. V. (2023). Citrus production and consumption in the world: a review. *Food Reviews International*, 39(2), 100037.
- Silva, M.P.M.G. - Avaliação da influência da adubação azotada nítrica e amoniacal no crescimento e na actividade de algumas enzimas em oliveiras jovens (*Olea europaea* L. cv Cobrançosa). Lisboa: ISA, 2010, 62 p.
- Silva, A. M., Santos, M. A., & Ferreira, P. (2022). Taxonomia e morfologia da laranjeira.
- Silva, R., Santos, J., & Souza, P. (2022). Efeitos da deficiência de nitrogênio em laranjeiras.
- Smith, M., & Jones, R. B. (2016). Soil and water pollution from agricultural fertilizers: A review. *Environmental Pollution*, 213, 253-265.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.02.042>
- Subhaswaraj,P., Jobina,R., Parasuraman,P., Siddhardha,B. (2017). Plant Growth Promoting Activity of Pink Pigmented Facultative Methylo troph - *Methylobacterium extorquens* MM2 on *Lycopersicon esculentum* L.
- Tomas, J.2016. Variedades e porta-enxertos de citrinos. Direção Regional de Agricultura e Pesca do Algarve.
- Unkovich.M, David Herridge, Mark Peoples, Georg Cadisch, Bob Boddey, Ken Giller, Bruno Alves and Phillip Chalk, (2008). Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems.
- Varenes, J. F. (2003). Nutrição mineral das plantas. Lisboa, Portugal: Instituto Superior de Agronomia.

Xavier, J. T. N., Carvalho, A. M., & Santos, M. J. (2020). Estratégias de nutrição sustentável para laranjeiras-clementinas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 42(4), 789-797.

Anexos

Tabela - Anova do Desenvolvimento da Altura durante o Ensaio

| ANOVA | | | | | | |
|--------------------------|-------------|-----------|-----------|----------|----------------|------------------|
| <i>Fonte de variação</i> | <i>SQ</i> | <i>gl</i> | <i>MQ</i> | <i>F</i> | <i>valor P</i> | <i>F crítico</i> |
| Entre grupos | 326,6714286 | 6 | 54,44524 | 1,08503 | 0,395249 | 2,445259 |
| Dentro de grupos | 1405 | 28 | 50,17857 | | | |
| Total | 1731,671429 | 34 | | | | |

Tabela - Anova do Desenvolvimento do Diâmetro Basal durante o Ensaio

| ANOVA | | | | | | |
|--------------------------|-----------|-----------|-----------|------------|----------------|------------------|
| <i>Fonte de variação</i> | <i>SQ</i> | <i>gl</i> | <i>MQ</i> | <i>F</i> | <i>valor P</i> | <i>F crítico</i> |
| Entre grupos | 0,142857 | 6 | 0,0238095 | 2,41545894 | 0,0523373 | 2,445259395 |
| Dentro de grupos | 0,276 | 28 | 0,0098571 | | | |
| Total | 0,418857 | 34 | | | | |

Tabela - Anova do Desenvolvimento da Área Foliar

| ANOVA | | | | | | |
|--------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------------|------------------|
| <i>Fonte de variação</i> | <i>SQ</i> | <i>gl</i> | <i>MQ</i> | <i>F</i> | <i>valor P</i> | <i>F crítico</i> |
| Entre grupos | 939123,4 | 6 | 156520,6 | 1,5067492 | 0,2123 | 2,445259395 |
| Dentro de grupos | 2908630 | 28 | 103879,6 | | | |
| Total | 3847753 | 34 | | | | |