

MONALIZA MIRELLA DE MORAIS ANDRADE

**Populações bacterianas nodulíferas de leguminosas em solos
da caatinga com distintos períodos de regeneração**

RECIFE
2013

MONALIZA MIRELLA DE MORAIS ANDRADE

Populações bacterianas nodulíferas de leguminosas em solos da caatinga com distintos períodos de regeneração

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência do Solo.

Orientadora: Dr^a Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos

Conselheira: Dr^a. Ana Dolores Santiago de Freitas

RECIFE
2013

Ficha Catalográfica

A553p Andrade, Monaliza Mirella de Morais
Populações bacterianas nodulíferas de leguminosas em
solos da caatinga com distintos períodos de regeneração /
Monaliza Mirella de Morais Andrade. -- Recife, 2013.
86 f.

Orientador (a): Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos.
Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência do
Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Departamento de Agronomia, Recife, 2013.
Inclui referências e apêndice.

1. *Mimosa tenuiflora* 2. *Piptadenia stipulacea*
3. *Anadenanthera colubrina* 4. *Vigna unguiculata* 5. N-15
I. Santos, Carolina Etienne de Rosália e Silva, orientadora
II. Título

CDD 631.4

MONALIZA MIRELLA DE MORAIS ANDRADE

Populações bacterianas nodulíferas de leguminosas em solos da caatinga com distintos períodos de regeneração

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência do Solo.

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora em 21 de março de 2013

Orientadora:

**Dr^a Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos
(UFRPE)**

Examinadores:

**Dr^a. Everardo Valadares de Sá Barreto Sampaio
(UFPE)**

**Dr^a. Maria de Fátima Silva
(UFRPE)**

**Dr^a. Dr^a. Maria do Carmo Catanho de Lira
(IPA)**

Tudo é do Pai, toda honra e toda glória. É dele a vitória alcançada em minha vida.

(Pe. Marcelo Rossi)

Aos meus pais Manoel Leitão e Maria Heloísa,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por tudo o que sou e possuo.

À minha família: Nelito, Heloísa, Morgana e Emanuel, simplesmente por existirem em minha vida.

Ao meu esposo Yokaanan Cordeiro, pelo amor, carinho, dedicação e paciência que me são prestados todos os dias.

Às minhas orientadoras e amigas, Carolina Etienne e Ana Dolores, pelo companheirismo, amizade e ensinamentos acadêmicos e da vida.

À amiga Luciana Remígio, pela amizade sincera e apoio incondicional.

Ao colega, bolsista de iniciação científica, Arthur Jorge. Com quem compartilho o mérito da realização desse trabalho.

Aos companheiros do Laboratório de Microbiologia do solo: Iracir, prof^o Newton, Fátima, Nina, Shirlei, Jessyca, Shirleane, Stella, Augusto e Fábio pelos auxílios no laboratório e casa de vegetação, e pelos momentos alegres que me proporcionaram.

Ao colega, Clayton Souza, pela amizade e auxílio na análise dos dados deste trabalho.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, em especial ao PPGCS, pelo acolhimento nos cursos de graduação e mestrado.

A todos os funcionários da UFRPE que, mesmo inconscientemente, colaboram para realização de todos os trabalhos desenvolvidos na instituição.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO GERAL.....	xii
GENERAL ABSTRSCT.....	xiv
INTRODUÇÃO GERAL	1
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	4
REFERÊNCIAS.....	15
Capítulo I - Diversidade e eficiência de bactérias de nódulos de leguminosas ao longo do processo de regeneração da caatinga utilizando o feijão-caupi como planta isca.....	24
RESUMO.....	25
ABSTRACT	27
INTRODUÇÃO	28
MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS.....	47
Capítulo II: nodulação e fixação de nitrogênio por leguminosas arbóreas em simbiose com bactérias nativas de áreas com diferentes tempos de regeneração da caatinga.....	50
RESUMO.....	51
ABSTRACT	53
INTRODUÇÃO	54
MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS.....	64
CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
APÊNDICE.....	69

Lista de figuras

Capítulo I

- Figura 1** - Modificação do pH do meio de cultura YMA de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi cultivado em Neossolo sob diferentes tempos de regeneração da vegetação de caatinga..... 37
- Figura 2** - Quantidade de muco produzido em meio YMA por bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi cultivado em Neossolo sob diferentes tempos, em anos, de regeneração da vegetação da caatinga..... 38
- Figura 3**- Dendrograma de similaridade baseado em características fenotípicas culturais de isolados de bactérias que nodulam feijão caupi, oriundos de área de caatinga com 4 anos de regeneração..... 39
- Figura 4**- Dendrograma de similaridade baseado em características fenotípicas culturais de isolados de bactérias que nodulam feijão caupi, oriundos de área de caatinga com 19 anos de regeneração..... 40
- Figura 5**- Dendrograma de similaridade baseado em características fenotípicas culturais de isolados de bactérias que nodulam feijão caupi, oriundos de área de caatinga com 41 anos de regeneração..... 41
- Figura 6**- Dendrograma de similaridade baseado em características fenotípicas culturais de isolados de bactérias que nodulam feijão caupi, oriundos de área de caatinga com mais de 50 anos de regeneração..... 42

Lista de tabelas

Capítulo I

- Tabela 1:** Características do solo em áreas de caatinga com diferentes tempos de regeneração no Nordeste do Brasil..... 31
- Tabela 2:** Codificação das características morfofisiológicas dos isolados de nódulos de feijão-caupi cultivado em solo de áreas com diferentes tempos de regeneração da vegetação nativa, no semiárido da Paraíba..... 33
- Tabela 3:** Biomassa e nodulação do feijão-caupi cultivado em um Neossolo Litólico sob diferentes tempos de regeneração da vegetação natural no semiárido da Paraíba..... 36
- Tabela 4:** Índices de diversidade (Shanon-Wiener), dominância (Simpson), equitabilidade J e riqueza de espécies (Jackknife 1ª ordem) de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi cultivado em um Neossolo Litólico sob diferentes tempos de regeneração da vegetação da caatinga..... 43
- Tabela 5:** Abundância natural do ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$ (‰)) no capim buffel e no feijão-caupi e Nitrogênio derivado da atmosfera (%N_{dda}) no feijão-caupi, cultivados em vasos com 2Kg de Neossolo Litólico coletado em áreas com diferentes de tempos de regeneração da vegetação nativa (caatinga)..... 45
- Tabela 6:** Concentração e acúmulo de N total e N fixado no feijão-caupi, cultivados em Neossolo Litólico com diferentes de tempos de regeneração da vegetação nativa (caatinga)..... 45

Capítulo II

- Tabela 1.** Características do solo em áreas de caatinga com diferentes tempos de regeneração no Nordeste do Brasil..... 56
- Tabela 2.** Nodulação de *Mimosa tenuiflora*, *Piptadenia stipulacea* e *Anadenathera columbrina* cultivados em vasos com 2Kg de Neossolo Litólico coletados de áreas com diferentes períodos

de regeneração da vegetação natural no semiárido da Paraíba.....	60
Tabela 3: Biomassa da parte aérea e de raiz de <i>Mimosa tenuiflora</i> , <i>Piptadenia stipulacea</i> e <i>Anadenathera columbrina</i> cultivados em vasos com 2Kg de Neossolo Litólico coletados em áreas com diferentes períodos de regeneração da vegetação natural no semiárido da Paraíba.....	60
Tabela 4: Concentração de nitrogênio (%) na biomassa aérea de plantas nodulantes e não nodulantes cultivadas em vasos com 2Kg de Neossolo Litólico coletados em áreas com diferentes tempos de regeneração da vegetação natural no semiárido da Paraíba.....	61
Tabela 5: Abundância natural de ^{15}N (‰) em folhas de plantas nodulantes e não nodulantes cultivadas em vasos com 2Kg de Neossolo Litólico coletados em áreas com diferentes períodos de regeneração da vegetação natural no semiárido da Paraíba.....	62
Tabela 6: Concentrações de N, Nitrogênio derivado da atmosfera (N _{dda}) e nitrogênio fixado (N _{fix}) por <i>Mimosa tenuiflora</i> cultivada em vasos com 2Kg de Neossolo Litólico coletados em áreas com diferentes períodos de regeneração da vegetação natural no semiárido da Paraíba.....	63
Tabela 7: Nitrogênio acumulado na biomassa de leguminosas fixadoras (<i>Mimosa tenuiflora</i> , <i>Piptadenia stipulacea</i> e <i>Anadenathera columbrina</i>) cultivadas em vasos com 2Kg de Neossolo Litólico coletado em áreas com diferentes períodos de regeneração da vegetação natural no semiárido da Paraíba.....	63

ANDRADE, MONALIZA MIRELLA DE MORAIS MSc. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Março de 2013. Populações bacterianas nodulíferas de leguminosas em solos da caatinga com distintos períodos de regeneração. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos. Conselheira: Dr^a. Ana Dolores Santiago de Freitas.

RESUMO GERAL

Devido aos sistemas de produção agrícola predominantes, a vegetação atual do semiárido brasileiro é um mosaico de pequenas áreas com distintos tempos de regeneração, entremeadas a poucas áreas de caatinga madura preservada. As áreas nos estádios iniciais da regeneração são dominadas por leguminosas nodulantes, enquanto que áreas bem preservadas apresentam baixas proporções dessas espécies. Apesar de ser uma fonte essencial de nitrogênio para ecossistemas terrestres, ainda não está estabelecida a importância do processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN), através da simbiose entre leguminosas e bactérias do grupo dos rizóbios, ao longo do processo de regeneração da caatinga. O objetivo deste trabalho foi fazer um levantamento da ocorrência e eficiência de populações nativas de bactérias de nódulos de leguminosas em áreas sob diferentes tempos de regeneração. Para tanto, foram lançados dois experimentos em casa-de-vegetação, utilizando amostras compostas de solo coletadas aleatoriamente, em parcelas demarcadas em áreas com diferentes tempos de abandono após utilização como pastagem (4 ano, 19 anos, 41 anos e 50 anos sem corte e/ou pastoreio), localizadas na Fazenda Tamanduá, município de Santa Terezinha (PB). Para cada área as amostragens foram repetidas em três parcelas. No primeiro experimento, foram determinadas as características culturais e estimada a diversidade e a eficiência das populações de bactérias que formam nódulos em leguminosas (BNL) utilizando o feijão-caupi como planta isca. No segundo experimento, foram determinadas a ocorrência e a eficiência das populações de rizóbios nativas das áreas, capazes de formar simbiose com leguminosas arbóreas nodulantes nativas da região (jurema preta, jurema branca e angico). Em ambos os experimentos a eficiência das populações de

BNL foi avaliada através da produção de biomassa seca da parte aérea, número e biomassa seca dos nódulos, teores e quantidades de N total e N fixado (técnica da abundância natural do ^{15}N) nas leguminosas utilizadas. Os dados foram submetidos à análise da variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, no nível de 5 % de probabilidade, considerando cada tempo de regeneração como um tratamento de efeito fixo. Os resultados obtidos demonstraram que em áreas de caatinga em pousio existe uma ampla população de bactérias capazes de nodular o feijão-caupi, que é uma espécie considerada promíscua, e a jurema preta, que é uma espécie nativa. Entretanto, para o angico e a jurema branca, as populações são mais restritas, induzindo baixa nodulação e nenhuma fixação no macrossimbionte. O tempo de regeneração da vegetação da caatinga influencia as populações nativas de bactérias de nódulos de leguminosas, quando se utiliza o feijão-caupi como planta isca. Essas diferenças podem ser observadas em termos de características culturais (modificação do pH do meio de cultura e produção de muco) e de nodulação. A fixação biológica de nitrogênio contribuiu com a nutrição nitrogenada de *Mimosa tenuiflora* em todos os tempos de regeneração estudados, sendo encontradas altas proporções de N_{dda} nas plantas, chegando a 86%.

Palavras-chave: *Mimosa tenuiflora*, *Piptadenia stipulacea*, *Anadenanthera colubrina*, *Vigna unguiculata*; N-15.

ANDRADE, MONALIZA MIRELLA DE MORAIS MSc. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Março de 2013. Populações bacterianas nodulíferas de leguminosas em solos da caatinga com distintos períodos de regeneração. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos. Conselheira: Dr^a. Ana Dolores Santiago de Freitas.

GENERAL ABSTRACT

Due to the present agricultural systems, the native vegetation in the Brazilian semi-arid region is a mosaic of small areas with different regeneration periods, interspaced with preserved mature caatinga areas. The areas in the initial regeneration stages are dominated by nodulating legume species, while the mature caatingas have small populations of these species. In spite of being an essential nitrogen source to the land ecosystems, the importance of biological N fixation (BNF), through the symbiosis of legume species and bacteria belonging to the rhizobia group, along the process of vegetation regeneration of caatinga areas is not well established. The objective of this study was to determine the occurrence and efficiency of native bacteria populations in the nodules of legume plants grown in soil collected from areas with different caatinga regeneration periods (4, 19, 41 and > 60 years) after being used as pasture. Two greenhouse experiments were established, using soil collected in random spots from three plots in each of these regeneration areas, located in Fazenda Tamanduá. Santa Terezinha municipality, Paraíba state. In the first experiment, culture characteristics and the diversity and efficiency of nodule forming bacteria populations were determined, using cowpea as the trap plant. In the second experiment, the occurrence and efficiency of these bacteria were determined, using native nodulating legume species (*Mimosa tenuiflora*, *Piptadenia stipulacea*, *Anadenanthera colubrina*) as trap plants. In both experiments, the efficiency of the populations was evaluated by the shoot and nodule biomass production and by the N concentration and fixation (¹⁵N abundance technique) of the legume plants. The data were submitted to analysis of variance and the averages compared by the Tukey test, considering each regeneration period as a fixed treatment. The results indicate that in

regenerating caatinga areas there is an ample population of bacteria able to nodulate cowpea, a promiscuous species, and also the native *M. tenuiflora* species. The population of *A. colubrina* and *P. stipulacea* nodulating bacteria is more restricted, leading to low nodulation and absence of N fixation. The period of caatinga regeneration influenced the bacteria populations when cowpea was used as the trap. Differences in culture characteristics (media pH and mucous production) and nodulation were observed. The symbiotic N fixation contributed to the N content of *M. tenuiflora* grown in soil from all the different regeneration areas, reaching up to 86% of the N content of the plants.

Key words: *Mimosa tenuiflora*, *Piptadenia stipulacea*, *Anadenanthera colubrina*, *Vigna unguiculata*; N-15.

INTRODUÇÃO GERAL

A caatinga é o único bioma exclusivamente brasileiro, compreendendo parte dos estados do CE, RN, PB, PE, SE, AL, BA e norte de MG. Apresenta grande variedade de paisagens, relativa riqueza biológica e endemismo (Queiroz, 2009). O nome caatinga é originário do tupi-guarani e significa “mata branca”. Decorre da paisagem esbranquiçada apresentada pela vegetação durante o período seco: a maioria das plantas perde as folhas e os troncos tornam-se esbranquiçados e secos; mas voltam a brotar e ficar verdes nos curtos períodos de chuvas.

Os ecossistemas do bioma Caatinga encontram-se bastante alterados, com a substituição de espécies vegetais nativas por cultivos e pastagens. O desmatamento e as queimadas são ainda práticas comuns no preparo da terra para a agropecuária que, além de destruir a cobertura vegetal, prejudica a manutenção de populações da fauna silvestre, a qualidade da água, e o equilíbrio do clima e do solo (IBAMA 2013). Este cenário de desmatamento e queima é muito comum e resulta no abandono temporário das terras, o pousio, antes de se iniciar um novo ciclo. É neste período de pousio que as plantas nativas se estabelecem, sem ação antrópica.

O nitrogênio (N) é um elemento essencial ao crescimento e desenvolvimento das plantas e o aporte via fixação biológica do N₂ atmosférico (FBN) é a principal forma de entrada do elemento em um sistema natural (Cleveland et al, 1999). Portanto, a FBN é de suma importância para o restabelecimento da vegetação nativa nas áreas em pousio após exploração agropecuária.

A FBN em leguminosas se dá através de associações simbióticas com bactérias específicas que são diazotróficas e rizosféricas. Essas bactérias invadem os pelos das raízes, formando nódulos onde o nitrogênio que está livre na atmosfera é convertido em nitrogênio fixado para assimilação ou estoque pela planta. Portanto, se faz necessário o estudo a cerca de espécies nativas capazes de associar-se a bactérias diazotróficas, bem como da diversidade populacional destes micro-organismos.

Na maioria dos sistemas e biomas existem espécies de leguminosas fixadoras, com potencial de FBN suficiente para atender sua demanda de N para altas produções, desde que existam populações de rizóbios compatíveis e sejam eliminados os fatores limitantes à nodulação e à simbiose.

Em fragmentos de caatinga madura, a proporção de leguminosas fixadoras é baixa (Sampaio, 1996) e, por isto, as quantidades de N fixadas simbioticamente também são baixas, em torno de 10 kg ha⁻¹ (Freitas et al., 2010). Entretanto, em áreas em processo de regeneração da vegetação nativa, predominam espécies fixadoras, durante grande parte do processo de sucessão (Sampaio et al., 1998, Pereira et al., 2003), sendo esperado que tenham um maior aporte de N via simbiose. De maneira contrária à essa hipótese, Souza et al. (2012) demonstraram que a FBN de leguminosas arbóreas pode ser ausente ou muito baixa em áreas em regeneração, apesar da dominância de leguminosas nodulantes na vegetação. Em espécies herbáceas das mesmas áreas, a FBN representou proporções muito altas do N das plantas nas áreas em regeneração e na caatinga madura, mas com aportes relativamente baixos de N devido às baixas biomassas (Freitas et al., 2012). A ausência de FBN em leguminosas nativas de áreas em regeneração desafia a visão tradicional da vantagem ecológica da capacidade de nodulação de leguminosas e as causas do baixo desempenho da simbiose não foram esclarecidas.

A nodulação e/ou a eficiência do processo de FBN podem ser restringidas por diversas condições relacionadas à planta, ao microssimbionte e às condições de clima e solo que afetam a simbiose. Logicamente, na ausência de populações nativas de bactérias capazes de nodular determinada espécie vegetal, a simbiose não se estabelece. Geralmente populações de rizóbios capazes de nodular leguminosas são abundantes em solos de regiões de onde as espécies são nativas (Bala et al., 2003). Mas, pode ocorrer que, mesmo na presença de populações de rizóbios compatíveis, a simbiose não seja eficiente (Faye et al, 2007). Tanto o crescimento de rizóbios em vida livre nos solos, como sua capacidade de nodular as plantas e fixar nitrogênio, são sensíveis a condições ambientais e podem ser dependentes da qualidade do solo. Diferentes coberturas vegetais ou manejos afetam a diversidade de rizóbios (Pereira et al., 2007; Lima et al., 2009), podendo favorecer, de forma

diferenciada, populações mais ou menos eficientes. O objetivo deste trabalho foi fazer um levantamento da ocorrência e eficiência de populações nativas de bactérias de nódulos de leguminosas em áreas sob diferentes tempos de regeneração da vegetação da caatinga.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Bioma Caatinga

O termo “caatinga” é de origem Tupi e significa “mata branca”, referindo-se ao aspecto da vegetação durante a estação seca, quando a maioria das árvores perde as folhas e os troncos esbranquiçados e brilhantes dominam a paisagem (Prado, 2003). O bioma caatinga ocupa uma extensa área, estimada em cerca de 850.000 Km², correspondendo à maior parte da região semiárida do Nordeste do Brasil (QUEIROZ, 2009). É o único bioma restrito ao território brasileiro, ocupando basicamente a Região Nordeste, com algumas áreas no Estado de Minas Gerais (TABARELLI et al., 2003).

O clima da caatinga é caracterizado pela concentração das baixas e irregulares precipitações pluviais em um período muito curto do ano. Devido a esta característica, muitas espécies vegetais perdem suas folhas, estrategicamente, para reduzir a perda de água no período de estresse hídrico, renovando-as no período chuvoso. É comum encontrar nessas regiões solos rasos, ricos em minerais, mas pobres em matéria orgânica e com baixa capacidade de armazenamento da água proveniente das chuvas (NIMER 1972; QUEIROZ 2009).

Araujo et al.(1999) evidenciam a diversificação fisionômica da caatinga em razão das variações fisiográficas e climáticas, podendo surgir espécies arbóreas e arbustivas, ocorrendo sobre diferentes tipos de solos. Atualmente, a vegetação da caatinga apresenta-se, predominantemente, com formação arbóreo-arbustiva e arbustiva pouco densa. Onde antes as florestas de caatingas eram altas, agora escassas, pequenas e fragmentadas (PRADO, 2003).

No semiárido brasileiro, os sistemas de produção agrícola predominantes são baseados na conversão de áreas nativas em áreas de cultivo, com corte e queima da vegetação nativa, exploração e subsequente abandono (pousio), antes de novo ciclo de derrubada e queima. A Caatinga também faz parte do ciclo de agricultura itinerante, além de ser a principal forma de pasto nativo da extensa atividade pecuária da região.

Fixação Biológica do Nitrogênio

A fonte primária de N para a biosfera é o gás N_2 atmosférico. Para que o elemento seja utilizado pelas plantas, ele precisa ser reduzido ou oxidado pela ação de micro-organismos (fixação simbiótica e não simbiótica), por descargas elétricas na atmosfera (fixação elétrica - chuvas), ou fixado quimicamente (processos industriais). Em um sistema natural, o aporte de nitrogênio (N) via fixação biológica do N_2 atmosférico (FBN) é a principal forma de entrada do elemento (CLEVELAND et al., 1999).

Apenas algumas bactérias diazotróficas são capazes de transformar o N_2 da atmosfera em NH_3 , ou aminoácidos, que são produtos utilizáveis pelas plantas. A capacidade diazotrófica está restrita a Bacteria e Archaea, incluindo cianobactérias e bactérias Gram positivas e Gram negativas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). As bactérias diazotróficas desenvolveram um complexo enzimático chamado nitrogenase, necessário para transformar o N_2 em amônia, subseqüentemente assimilada em aminoácidos e proteínas (NEVES & RUMJANEK, 1998). A nitrogenase é capaz de promover a reação de quebra da molécula de N_2 à temperatura ambiente e pressão normal, utilizando energia de processos foto e quimiossintéticos, ou obtida a partir de carboidratos (provenientes da fermentação ou respiração) e armazenada sob forma de adenosina trifosfato (SANTOS et al., 2008).

Por ser uma enzima redutora, é reprimida ou inativada pelo O_2 , quando já sintetizada e em funcionamento (REIS et al., 2006). Os micro-organismos diazotróficos aeróbios beneficiam-se de alguns mecanismos de proteção que podem atuar quando o processo de FBN está ativo. Portanto a inibição ou não da enzima nitrogenase vai depender da disponibilidade energética da célula, da idade fisiológica, da concentração de O_2 , presença de alguns aminoácidos essenciais e do excesso de N, entre outros.

Os micro-organismos capazes de fixar N_2 podem ser de vida livre, associativos ou simbióticos. Os de vida livre sobrevivem bem no solo e não são caracterizados como espécie-específicos. Eles formam associações superficiais com os tecidos radiculares. Um segundo grupo de micro-organismos coloniza os tecidos internos das plantas e são denominados endofíticos. O sistema simbiótico rizóbio-leguminosa destaca-se, pois além de

representar processo de grande importância, é responsável pela incorporação de quantidades consideráveis do N atmosférico, tanto em sistemas naturais como agrícolas (SANTOS et al. 2008; OLIVEIRA et al. 2008).

Na simbiose rizóbio-leguminosa, normalmente as bactérias infectam os tecidos do sistema radicular das plantas e formam estruturas altamente especializadas denominadas nódulos. Com o estabelecimento de um nódulo funcional, ocorre a fixação do nitrogênio atmosférico em seu interior transferindo-o para a planta, que em troca cede foto-assimilados (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Independentemente do tipo de associação entre a planta e a bactéria, o genótipo da planta exerce grande influência na fixação do N₂. Na simbiose, a especificidade hospedeira é um exemplo desse controle entre os componentes da interação. No caso das associativas, endofíticas e de vida livre, essa associação é menos exigente (REIS et al., 2006).

Embora presente em grande número de espécies, a capacidade de fixação biológica do nitrogênio (FBN) não é comum a todas as leguminosas, variando entre sub-famílias, gêneros e até mesmo entre espécies de um mesmo gênero (ALLEN & ALLEN 1981).

Vários trabalhos têm relatado a influência do genótipo da planta na eficiência da FBN, além de outros fatores químicos, físicos e biológicos que também interferem na FBN. Com isso, as plantas diferem entre si quanto à quantidade de N fixado. Dependendo da promiscuidade do hospedeiro, da eficiência do simbionte, e outros fatores abióticos (FIGEIREDO et al., 2008).

Devido à importância ecológica e econômica dos rizóbios, a diversidade dessas bactérias tem sido investigada extensivamente e a taxonomia rizobiana vem sofrendo mudanças significativas nas últimas três décadas (LIU et al., 2005).

Geralmente populações de rizóbios capazes de nodular leguminosas são abundantes em solos de regiões de onde as espécies são nativas (BALA et al., 2003). Mas, pode ocorrer que, mesmo na presença de populações de rizóbios compatíveis, a simbiose não seja eficiente (FAYE et al., 2007). Diferentes coberturas vegetais, ou manejos, afetam a diversidade de rizóbios (PEREIRA et al., 2007; LIMA et al., 2009), podendo favorecer, de forma diferenciada, populações mais ou menos eficientes.

Em fragmentos de caatinga madura, a proporção de leguminosas fixadoras é baixa (SAMPAIO, 1996) e, por isto, as quantidades de N fixadas simbioticamente também são baixas, em torno de 10 kg ha⁻¹ (FREITAS et al., 2010). Entretanto, nas áreas em processo de regeneração da vegetação nativa, predominam espécies fixadoras, durante grande parte do processo de sucessão (SAMPAIO et al., 1998, PEREIRA et al., 2003), sendo esperado que tenham um maior aporte de N via simbiose.

Existem poucos trabalhos que relacionem a FBN com a ocorrência e diversidade de rizóbios nativos e com as diversas características dos solos de caatinga. Apesar dos estudos taxonômicos envolvendo rizóbios isolados de nódulos de algumas espécies brasileiras, incluindo *Mimosa tenuiflora* (CHEN et al., 2005; REIS Jr et al., 2010), muito pouco se sabe sobre os microssimbiontes das leguminosas nativas da caatinga. Estudos recentes observaram que a capacidade de FBN em *Mimosa tenuiflora*, *Piptadenia stipulacea* e *Anadenanthera colubrina*, de reconhecida capacidade de FBN (FREITAS et al., 2010), pode variar entre áreas com diferentes tempos de regeneração da caatinga (Souza et al. 2012). Faye et al. (2007) avaliando a fixação biológica do nitrogênio em *Acacia nilotica* crescida em ambiente semiárido na África, relataram ausência de fixação, apesar de ser uma espécie altamente fixadora, e não conseguiram encontrar uma explicação conclusiva para esta observação.

Quantificação da FBN em leguminosas

As taxas de fixação biológica de nitrogênio podem ser acessadas através da utilização de técnicas que permitem estimar a contribuição da FBN. Algumas dessas técnicas são: diferença do N total do sistema solo-planta, redução de acetileno, balanço de nitrogênio e técnicas isotópicas (incorporação de ¹⁵N₂ gás, diluição isotópica e abundância natural de ¹⁵N) (DOBEREINER, 1972; RUSCHEL, 1975; URQUIAGA, 1992; BODDEY, 1995; YONEYAMA, 1997; RESENDE, 2000; POLIDORO, 2000, BODEY, 2001).

A técnica da diferença do N total do sistema solo-planta baseia-se em cultivar uma planta referência (não fixadora) e a planta teste (fixadora) em meios pobres em nitrogênio. Assim, estando o meio pobre ou livre de

nitrogênio, as únicas fontes de nitrogênio existentes seriam a própria semente, o disponível no meio e o ar. Como premissa básica, esta técnica assume que tanto a planta teste como a testemunha acumulam a mesma quantidade de nitrogênio derivado do meio de cultivo (solo, substrato, etc). Assim, estando as plantas crescendo em condições e períodos idênticos, analisa-se o N-total acumulado pelas duas plantas, fixadora e testemunha, separadamente e, subtraindo-se o N- total acumulado pela planta teste do N-total acumulado pela planta testemunha, obtém-se por diferença a contribuição da FBN para a planta teste. O percentual de contribuição desta fonte às plantas é determinado calculando-se esta proporção (PEOPLES et al., 1989).

A técnica da redução do acetileno fundamenta-se na atividade da enzima nitrogenase, que reduz N_2 a amônia e acetileno a etileno. Essa técnica é relativamente rápida, simples e de custo não muito elevado, uma vez que não exige utilização de equipamentos sofisticados, podendo ser medido num cromatógrafo a gás. É caracterizada por ser uma medida instantânea da atividade da nitrogenase, já que não considera o N fixado já incorporado nos tecidos vegetais. O principal problema deste método é a modificação da pressão de O_2 , visto que sistemas nodulantes apresentam queda imediata da atividade da nitrogenase após distúrbios físicos aplicados ao sistema radicular, mesmo sabendo que barreiras físicas protegem os nódulos do efeito inibidor do O_2 (MINCHIN & WITTY, 1983).

A estimativa da contribuição da FBN realizada pelo balanço de nitrogênio é uma técnica bastante difundida no meio científico e baseia-se em medir as entradas e saídas de N no sistema solo-planta-atmosfera, calculando-se a diferença entre ambos e obtendo-se ganhos de N quando ocorrer fixação. O balanço deve incluir todas as entradas e saídas de N, incluindo-se fertilizantes, chuvas, água de irrigação, lençol freático, lixiviação, desnitrificação, volatilização de amônia, etc., monitorando-se assim todas as formas sólidas, dissolvidas e gasosas de nitrogênio (BODDEY, 1987). Assim, estima-se o N total do solo, da semente, dos adubos, desde o início do crescimento até a colheita e, novamente, ao final, quantificar o N total na planta e no solo. Diminuindo o teor inicial do final, tem-se o balanço de N (REIS et al, 2006). É uma técnica de baixo custo e ainda permite explorar sistemas pioneiros, ou seja, onde não existam dados de contribuição de FBN. Como o N

total do solo normalmente é bem maior do que o da planta, o N derivado da FBN somente representa uma pequena fração do N total do sistema que, na maioria dos casos, fica abaixo da sensibilidade do método (BODDEY et al, 1994).

Práticas mais modernas vêm sendo utilizadas para medir a contribuição da FBN através do uso de isótopos. Na natureza existem dois isótopos estáveis do nitrogênio, o de massa 14 e o de massa 15. No ar, a proporção média em que são encontrados é de 99,6337 e 0,3663% de átomos de ^{14}N e ^{15}N , respectivamente (JUNK & SVEC, 1958), sendo essa proporção denominada abundância natural de ^{15}N . Esta proporção tem pequenas variações tanto no solo como nas plantas (SHEARER & KOHL, 1986). Os isótopos estáveis do nitrogênio têm sido utilizados, quase que exclusivamente como marcadores, há mais de 50 anos em estudos dos diferentes aspectos do ciclo do nitrogênio (BOARETTO et al, 2004).

As técnicas isotópicas partem do princípio de que qualquer material existente na natureza que possua nitrogênio em sua constituição apresentará uma proporção de 0,366‰ de átomos de ^{15}N em relação ao total de N, que em sua maioria é composto do isótopo ^{14}N (ALVES et al, 2005).

A incorporação de $^{15}\text{N}_2$ gás é uma das técnicas isotópicas para se estimar a FBN, que consiste no cultivo de plantas num sistema de atmosfera controlada contendo N_2 enriquecido com ^{15}N . É necessário que o $^{15}\text{N}_2$ utilizado seja livre de outros compostos enriquecidos com ^{15}N , como amônia, e o enriquecimento do $^{15}\text{N}_2$ utilizado seja suficiente para promover um enriquecimento significativo de ^{15}N do N da planta, acima das variações de abundância natural (BODDEY et al, 1994).

Os maiores problemas identificados na utilização da técnica do $^{15}\text{N}_2$ são as perdas de gases, pela dificuldade de vedação da câmara de crescimento da planta, que deve ser de tal forma que impossibilite a saída do $^{15}\text{N}_2$, e impeça a entrada do N_2 do ar, que promove a diluição do enriquecimento de $^{15}\text{N}_2$ interno e também o controle de concentrações de O_2 e CO_2 , temperatura, umidade relativa, intensidade e qualidade de luz, que devem ser similares às condições naturais para desenvolvimento das plantas, é de difícil realização. Por exemplo, se a contribuição for muito pequena no período de incubação, erros advindos de variações na aplicação da técnica podem ocasionar valores de acúmulo de

$^{15}\text{N}_2$ menores que os da plantas-controles (MORRIS et al, 1985). Portanto, o uso desta técnica torna-se pouco viável ou quase inútil, principalmente em condições de campo, ou em situações que se quer comparar diferentes membros envolvidos na simbiose.

A técnica de diluição isotópica de ^{15}N consiste na utilização de compostos nitrogenados em que parte do teor de N esteja na forma de ^{15}N adicionado na forma de fertilizante ao solo para ser absorvido pelas plantas. Se o enriquecimento de ^{15}N do N que a planta absorver do solo é conhecido, a quantidade de N não marcado, derivado do ar via FBN, será proporcional à diluição do enriquecimento de ^{15}N do N marcado extraído do solo. Para isso é necessário cultivar a planta fixadora e uma planta controle, que deve apresentar características bem parecidas e não ser fixadora, no mesmo solo marcado sob condições idênticas de manejo. Daí o enriquecimento de ^{15}N da planta-controle é considerado como enriquecimento de ^{15}N do N que a planta fixadora absorveu do solo. Uma vez que a planta absorve o isótopo ^{15}N juntamente com o ^{14}N , pode-se discriminar essa absorção utilizando um espectrômetro de massa (BARRIE et al. 1996)

A técnica da abundância natural de ^{15}N baseia-se no fato de que geralmente, o N do solo é levemente enriquecido em ^{15}N em comparação ao N do ar (SHEARER et al, 1978). Portanto, o seu princípio é o mesmo que o da técnica da diluição isotópica, na qual a quantidade do N derivado do ar é proporcional à diferença de enriquecimento de ^{15}N entre o N derivado do solo (estimado como o enriquecimento da planta-controle) e o enriquecimento do N da planta fixadora. O uso da equação desenvolvida por Shearer e Kohl (1986) para cálculo do nitrogênio derivado do ar (%N_{dda}) é dependente da premissa básica da técnica da diluição isotópica que tanto a planta controle como a planta fixadora acumulam N do solo com o mesmo enriquecimento de ^{15}N .

A técnica da abundância natural tem uma dificuldade adicional: o fracionamento isotópico que ocorre durante a assimilação de N pelas plantas (ALVES et al, 2005). Sua grande vantagem consiste na não necessidade de adição de materiais enriquecidos com ^{15}N , nem a perturbação do solo ou vegetal.

Como a maioria dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ do solo são positivos e os valores de $\delta^{15}\text{N}$ do ar atmosférico são próximos de zero, uma vez que o ar atmosférico

é o padrão, as plantas que fixam nitrogênio da atmosfera tendem a ter valores de $\delta^{15}\text{N}$ variando entre zero e o valor isotópico do solo em que vivem. A presença ou não da fixação somente pode ser feita de forma comparativa, ou seja, entre uma planta supostamente fixadora e outra não fixadora, desde que tenham a mesma condição de cultivo.

Paulino et al. (2009) avaliaram a FBN e a transferência do N derivado da FBN das espécies leguminosas gliricídia (*Gliricidia sepium*), crotalária (*Crotalaria juncea*) e feijão-guandu anão (*Cajanus cajan*) para um pomar orgânico de mangueira e gravioleira, pelo método da abundância natural de ^{15}N . A gliricídia apresentou maior potencial de FBN (80%), seguida da crotalária (64,5%) e feijão-guandu (45%).

Como as principais fontes de nitrogênio encontram-se no solo, faz-se necessário conhecer as formas de N encontradas no meio em que as plantas foram cultivadas, pois as reações de oxiredução envolvem o fracionamento isotópico variável e essa variação geralmente é elevada (Martinelli, 2009).

Diversidade de rizóbios

O estudo de diversidade de rizóbios busca entender suas relações ecológicas e evolutivas, visando encontrar genótipos tolerantes aos distintos estresses ambientais que vão limitar a simbiose, levando a um manejo mais eficiente dessa interação (STRALIOTTO & RUMJANECK, 1999).

A ampla diversidade de espécies vegetais, em especial as que compõem a família Leguminosae, mostra a necessidade de elucidar gêneros e espécies de bactérias que formam nódulos em leguminosas, quanto à sua especificidade ou promiscuidade, para assim estabelecer manejos mais rentáveis e sustentáveis.

A diversidade de procaríotos pode ser avaliada por meio de características morfológicas, bioquímicas, fisiológicas e genéticas (MOREIRA, 2008). As características culturais e morfológicas dos rizóbios fornecem informações importantes para sua identificação e agrupamento (PELCZAR et al., 1997)

Para diferenciar os gêneros de rizóbio descritos até o momento, avalia-se características culturais e morfológicas em meio “Yeast Malt Agar” - YMA

(VINCENT, 1970), além das técnicas de biologia molecular. Segundo Martins et al. (1997), tempo de crescimento das colônias, reação ácida ou básica em meio de cultura YMA, diâmetro de colônia, produção de exopolissacarídeos são os principais parâmetros para diferenciar rizóbios.

Os rizóbios de crescimento rápido formam colônias em até 3 dias de incubação e os de crescimento lento são visualizadas após 4 dias de incubação (MELLONI *et al.*, 2006). A alteração do pH do meio de cultura divide os isolados em três classes: estirpes que apresentam reação ácida, reação básica ou reação neutra em meio de cultura YMA, utilizando azul de bromotimol como solução indicadora, com pH em torno de pH 6,8. Rizóbios de crescimento lento tendem a alcalinizar o meio de cultura, modificando a cor para azul, enquanto os rizóbios de crescimento rápido tendem a acidificar o meio, alterando a cor para amarelo (MARTINS et al., 1997). As mudanças de pH promovidas pelo rizóbio no meio de cultura são devido à utilização preferencial de açúcares pelas estirpes de crescimento rápido, seguida da excreção de ácidos orgânicos, e de compostos nitrogenados pelas estirpes de crescimento lento e consequente liberação de cátions (TAN & BROUGHTON, 1981).

O diâmetro da colônia é um parâmetro que apresenta correlação com outras características culturais. Colônias com diâmetro menor que 1 mm possuem superfície seca ou pouca produção de exopolissacarídeos e colônias maiores tendem a produzir mais exopolissacarídeos (MARTINS et al., 1997).

O conceito de diversidade de espécies pode ser avaliado por meio de dois componentes: 1- riqueza das espécies, baseada no número total de espécies presentes e, 2- equitabilidade de uniformidade baseada na abundância relativa de espécies no grau de dominância (ODUM, 1988). Esses componentes podem ser acessados a partir da utilização de índices de diversidades que permitem avaliar a dinâmica populacional de uma determinada comunidade frente a diferentes manejos.

Segundo Margurran (1988), a dificuldade de se definir diversidade reside no fato de se constituir, basicamente, de dois componentes: variedade e abundância relativa das espécies. O número de espécies e a igualdade entre elas são as bases para vários índices matemáticos para medição da diversidade local ou regional de grupos taxonômicos selecionados (DUELLI,

1997). Os índices matemáticos têm sido propostos com finalidades específicas. O índice de Shannon-Wiener (1948), já tradicionalmente designado como índice de Shannon, é a medida de diversidade mais consagrada, apropriado para amostras aleatórias de espécies de uma comunidade ou sub-comunidade de interesse (ROSSO, 1996; RODRIGUES, 2007). Assume que os indivíduos são amostrados ao acaso de uma população indefinidamente grande e que todas as espécies estão representadas na amostra coletada, sendo relativamente independente do tamanho da amostra (PIELOU, 1983; MATOS et al. 1999).

O índice de Simpson (1949) foi o primeiro a ser usado em estudos ecológicos e mostra a concentração de dominância, uma vez que, quanto maior o valor, maior a dominância por uma ou pouca espécies. Ele considera o número de espécies e o total de indivíduos, e também a proporção de ocorrência de cada espécie. Ou seja, ele exprime, basicamente, a abundância das espécies mais comuns, sendo, conseqüentemente, mais sensível a mudanças que ocorrem nessas espécies (MATOS et al. 1999; MAGURRAN, 1988; RODRIGUES, 2007).

Equitabilidade refere-se à distribuição dos indivíduos entre as espécies, sendo proporcional à diversidade e inversamente proporcional a dominância (RODRIGUES, 2007). De modo geral, a equitatividade é a relação entre a diversidade observada e a diversidade máxima, situando-se estes valores entre zero e um (ROSSO, 1996).

A riqueza de espécies de uma determinada comunidade pode ser estimada pelo índice matemático Jackknife de 1ª ordem, que leva em consideração o número de espécies observadas e o número de espécie que está presente em apenas um agrupamento (RODRIGUES, 2007).

É possível encontrar duas comunidades que possuam índices de diversidades semelhantes, entretanto uma ter valor de uniformidade alto e baixo valor de riqueza, enquanto a outra possuir uniformidade baixa e riqueza alta. Uniformidade e riqueza precisam ser consideradas na avaliação da diversidade (KENNEDY, 1999).

A interpretação dos índices de diversidade deve ser feita relacionando-se estes valores com as diferentes alterações sofridas recentemente pelo ecossistema, uma vez que manejos aplicados podem reduzir drasticamente a

população total de organismos do solo. Entretanto, algumas espécies resilientes podem ter sua redundância até aumentada. Estes índices têm sido utilizados por serem relativamente simples e permitirem comparações de amostras com diferentes tamanhos de populações (ODUM, 1988; MAGURRAN, 1988).

Saber a diversidade de espécies numa área é fundamental para a compreensão da natureza e, por extensão, para otimizar o gerenciamento da área em relação a atividades de exploração de baixo impacto, conservação de recursos naturais ou recuperação de ecossistemas degradados (MELO, 2008)

REFERÊNCIAS

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

ALVES, B. J. R.; ZOTARELLI, L.; JANTALIA, C. P.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. (2005) Emprego de isótopos estáveis para estudo do carbono e nitrogênio no sistema solo-planta. Em: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. (Eds) *Processos biológicos no sistema solo-planta: Ferramenta para uma agricultura sustentável*. Embrapa Agrobiologia. – Brasília-DF: Embrapa informação tecnológica, 343-368 p.

ARAUJO, F. S., MARTINS, F. R. (1999) Fisionomia e organização da vegetação do carrasco no planalto da Ibiapaba, estado do Ceará. *Acta. Bot. Bras.* 13(1),1-13.

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

BARRIE, A.; PROSSER, S. J. (1996) Automated analysis of light-element stable isotopes by isotope ratio mass spectrometry. In: BOUTTON, T. W.; YAMASAKI, S. (Eds) *Mass spectrometry of soils*. San Diego: Academic Press, 1-46 p.

BOARETTO, A. E.; TRIVELIN, P. C. O.; MURAOKA, T. (2004) Uso de isotopos como traçadores em fertilidade do solo e nutrição de plantas. Centro de Energia Nuclear na Agricultura- USP – Piracicaba – SP. *Anais. FERTBIO 2004*.

BODDEY, R. M.; POLIDORO, J. C.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J.R.; URQUIAGA, S. (2001) Use of the ¹⁵N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N₂ fixation to grasses and cereals. *Australian Journal of Plant Physiology*, v. 28, 1-7 p.

BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. (1995) Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 174, 195-209 p.

BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. (1994) Quantificação da fixação biológica de nitrogênio associada à plantas utilizando o isótopo ^{15}N . Em: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Embrapa- Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão – Centro Nacional de Pesquisa de Soja. Brasília: Embrapa- SPI, 471-487 p.

BODDEY, R. M. (1987) Methods for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. *CRC Crit.Rev. Plant Sci.*, v. 6, 209-266 p.

BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. (1992) Calculations and assumptions involved in the use of the A-value and ^{15}N isotope dilution techniques for the estimation of the contribution of plant-associated biological N_2 fixation. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 145, 151-155 p.

CHEN, W.M.; FARIA, S.M.; STRALIOTTO, R.; PITARD, R.M.; SIMÕES ARAÚJO, J.L.; CHOU, J.H.; CHOU, Y.J.; BARRIOS, E.; PRESCOTT, A.R.; ELLIOTT, G.N.; SPRENT, J.I.; YOUNG, J.P.W.; JAMES, E.K. (2005) Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel *Mimosa* nodulating strains from South America. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 71, n.11, p.7461–7471.

CLEVELAND, C.C., TOWNSEND, A.R., SCHIMEL, D.S., FISHER, H., HOWARTH, R.W., HEDIN, L.O., PERAKIS, S.S., LATTY, E.F., VON FISCHER, J.C., ELSEROD, A., WASSON, N.F. (1999) Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N_2) fixation in natural ecosystems. *Global Biogeochemical Cycles*, 13: 623-645.

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M.; DART, P. J. (1972) Nitrogenase activity in the rhizosphere of sugar cane and some other tropical grasses. *Plant and Soil*, The Hague, v. 37, 191-196 p.

DUELLI, P. (1997) Biodiversity evaluation in agricultural landscapes: an approach at two different scales. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 62, 81-91p.

DUETE, C.; MURAOKA, T.; SILVA, E. C.; AMBROSANO, E. J.; TRIVELIN, P. C. O. (2009) Acúmulo de nitrogênio (^{15}N) pelos grãos de milho em função da fonte nitrogenada em latossolo vermelho. *Bragantia*, Campinas, v.68, n.2, 463-472 p.

FAYE, A.; SALL, S.; CHOTTE, J.L.; LESUEUR, D. (2007) Soil bio-functioning under *Acacia nilotica* var. *tomentosa* protected forest along the Senegal River. *Nutr Cycl. Agroecosist*, 79: 35-44.

FIGUEIREDO, M.V.B., LIRA Jr, M.A., ARAÚJO, A.S.F., MARTINEZ, C. R. (2008) Fatores bióticos e abióticos à fixação biológica de N_2 . In: FIGUEIREDO, M.V.B., BURITY, H.A., STAMFORD, N.P., SANTOS, C.E.R.S. (Eds) *Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura*. Guaíba: Agrolivros 43-68p.

FREITAS A.D.S.; SAMPAIO E.V.S.B.; FERNANDES A.R.; SANTOS, C.E.R.S. (2010) Biological nitrogen fixation in legume trees of the Brazilian caatinga. *Journal of Arid Environments*, v. 74, 344-349 p.

FREITAS, A.D.S.; SAMPAIO, E. V.S.B.; SILVA, B.L.R.; ALMEIDA-CORTEZ, J.S.; MENEZES, R.S.C. (2012) How much nitrogen is fixed by biological symbiosis in tropical dry forests? 2. Herbs. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, v. 94, 181-192 p.

FREITAS, J. R.; VICTORIA, R. L.; RUSCHEL, A. P.; VOSE, P. B. (1984) Estimation of N_2 -fixation by sugar cane, *Saccharum* sp. and soybean, *Glycine max*, grown in soil with ^{15}N labelled organic matter. *Plant and Soil*, The Hague, v. 82, 257-261 p.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (2013) Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/caatinga.htm> Acessado em: 16/01/2013.

JUNK, G.; SVEC, H. J. (1958) The absolute abundance of the nitrogen isotopes in the atmosphere and compressed gas from various sources. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Oxford, v. 14, 234- 243 p.

KENNEDY, A.C. (1999) Bacterial diversity in agroecosystems. *Agricultural Ecosystems and Environment*, v. 7, 65-67 p.

LIMA, A.S.; NÓBREGA, R.S.A.; BARBERI, A.; SILVA, K.; FERREIRA, D.F.; MOREIRA, F.M.S. (2009) Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macropitilium atropurpureum*). *Plant Soil*, v. 319, 127-145 p.

LIMA, E.; BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. (1987) Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using an ^{15}N aided nitrogen balance. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 19, 165-170 p.

LIU, J; WANG, E.T.; CHEN, W.X. (2005) Diverse rhizobia associated with woody legumes *Wisteria sinensis*, *Cercis racemosa* and *Amorpha fruticosa* grown in the temperate zone of the China. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 28, n. 5, 465-77 p.

MAGURRAN, A. E. (1988) Ecological diversity and its measurement. London: Croom Helm, 179 p.

MARTINELLI, L. A.; OMETTO, J. P. H. B.; FERRAZ, E. S.; VICTORIA, R. L.; CAMARGO, P. B. (2009) Desvendando questões ambientais com isótopos estáveis. São Paulo: Oficina de Textos, 144 p.

MARTINS, L. M. V., NEVES, M. C. P., RUMJANECK, N. G. (1997) Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the northeast of Brazil. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 29, n.5-6, 1005-1010 p.

MATOS, R.M.B.; SILVA, E.M.R.; BERBARA, R.L.L. (1999) Biodiversidade e índices. Seropédica: Embrapa Agrobiologia (Embrapa-CNPAB Documentos 107), 20p.

MELO, A. S. (2008) O que ganhamos 'confundindo' riqueza de espécies e equabilidade em um índice de diversidade? *Biota Neotrop.*, v. 8, n. 3, 21-27 p.

MELLONI, R., MOREIRA, F. M. S., NÓBREGA, R. S. A., SIQUEIRA, J. O. (2006) Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walpi] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. *Rvista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 30, 235-246 p.

MINCHIN, F. R.; WITTY, J. F.; SHEEHY, J. E.; MULLER, M. (1983) A major error in the acetylene reduction assay: decreases in nodular nitrogenase activity under assay conditions. *J. Exp. Bot.*, v. 34, 641-649 p.

MOREIRA, F. M. S. (2008) Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosae. In: Moreira, F. M. S., Siqueira, J. O., Brusaard, L.(Eds) Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros. Ed.: UFLA, 621-680 p.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. (2006). *Microbiologia e bioquímica do solo*. Lavras: Ed.: UFLA, 726p.

MORRIS, D. R.; ZUBERER, D. A. & WEAVER, R.W. (1985) Nitrogen fixation by intact grass-soil cores using ¹⁵N and acetylene reduction. *Soil Biol. Biochem.*, v. 17, 87-91 p.

NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, G. (1998). Ecologia de bactérias diazotróficas de solos tropicais. In: Ecologia microbiana. Eds. Melo, I. S.; Azevedo, J. L., Jaguariúna, Embrapa-CNPMA. p.15-60.

NIMER, E. (1972) Climatologia da região Nordeste do Brasil. Introdução à climatologia dinâmica. *Rev. Brasil. Geogr.*, V. 34, 3-51p.

ODUM, E. *Ecologia*. Ed. Guanabara Koogan, 1988.

OLIVEIRA, J. P., SILVA, M. L.R.B., LIRA, M.C.C.P., BURITY, H.A. (2008) Fixação do N₂ associativa e em vida livre. In: FIGUEIREDO, M.V.B., BURITY, H.A., STAMFORD, N.P., SANTOS, C.E.R.S. (Eds) Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura. Guaíba: Agrolivros 97-118p.

PAULINO, G. M.; ALVES, B. J. R.; BARROSO, D. G.; URQUIAGA, S.; ESPINOLA, J. A. A. (2009) Fixação biológica e transferência de nitrogênio por leguminosas em pomar orgânico de mangueira e gravioleira Pesq. agropec. bras., Brasília, v.44, n.12, 1598-1607 p.

PELCZAR, JR.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. (1997). Microbiologia do solo e do ar. In: Pelczar, Jr.; Chan, E. C. S.; Krieg, N. R. Microbiologia: Conceitos e aplicações. Makron Books do Brasil Editora Ltda., v. 2, 306-336p.

PEOPLES, M. B.; FAIZAH, A. W.; RERKASEM, B.; HERRIDGE, D. F. (1989) Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field. Canberra: ACIAR, (ACIAR Monograph, 11) 76 p.

PEREIRA, A.A.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; KASCHUK, G.; CHUEIRE, L.M.O.; CAMPO, R.J.; TORRES, E. (2007) Variações qualitativas e quantitativas na microbiota do solo e na fixação biológica do nitrogênio sob diferentes manejos com soja. R. Bras. Ci. Solo, v. 31, 1397-1412p.

PEREIRA, I.M.; ANDRADE, L.A.; SAMPAIO, E.V.S.B.; BARBOSA, M.R.V. (2003) Use-history effects on structure and flora of Caatinga. Biotropica, 35(2): 154–165p.

PIELOU, E.C. (1983) Population and community ecology. – Principles and methods, 432 p.

POLIDORO, J. C.; QUESADA, D. M.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. (2000) Estimativa da contribuição da fixação biológica de N₂ na cultura da cana-de-açúcar, através do uso da técnica de abundância natural de ¹⁵N (δ ¹⁵N), em lavouras comerciais no Brasil. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE

PLANTAS, 24 REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 8 SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 6., REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 3.(2000) Biodinâmica do solo. Santa Maria: SBCS, SBM, 2000. FERTBIO 2000. CD ROM.

PRADO, D. E. (2003) As caatingas da América do Sul. In: LEAL, I. R., TABARELLI, M., SILVA, J. M. C. (Eds) Ecologia e conservação da caatinga. Ed. Universitária da UFPE. Cap. 1. 3-73 p.

QUEIROZ, L. P. (2009) Leguminosas da caatinga- Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, 467p.

REIS JR, F.B.; SIMON, M.F.; GROSS, E.; BODDEY, R.M.; ELLIOTT, G.N.; NETO, N.E.; LOUREIRO, M.F.; QUEIROZ, L.P.; SCOTTI, M.R.; CHEN, W.M.; NORE´N, A.; RUBIO,M.C.; FARIA, S,M.; BONTEMPS, C.; GOI, S.R.; YOUNG, J.P.W.; SPRENT, J.I.; JAMES, E.K. (2010) Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. *New Phytologist*, v. 186, 934–946p.

REIS, V. M.; OLIVEIRA, A. L. M.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I. (2006) Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, S. M. Nutrição mineral de plantas. Viçosa-MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 153-174 p.

RESENDE, A.S. (2000) A fixação biológica de nitrogênio (FBN) como suporte da produtividade e fertilidade nitrogenada dos solos na cultura de cana-de-açúcar: Uso de adubos verdes. Dissertação (Mestrado em Agronomia, área de concentração em Ciência do Solo) - Universidade federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 145 p.

RODRIGUES, W.C. (2007). DivEs - Diversidade de espécies - Guia do usuário. Seropédica: Entomologistas do Brasil. 9p. Disponível em: <http://www.ebras.bio.br/dives/>.

ROSSO, S. (1996) Amostragem, repartição especial e diversidade/dominância de comunidades de costões rochosos: uma abordagem metodológica. Laboratório de Ecologia Marinha/USP. 30 p.

RUSCHEL, A. P.; HENIS, Y.; SALATI, E. (1975) Nitrogen- ^{15}N train of N fixation with soil-grown sugar cane seedlings. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v. 7, p. 181-182.

SAMPAIO, E.V.S.B.; ARAÚJO, E.L.; SALCEDO, I.H.; TIESSEN, H. (1998) Regeneração da vegetação de caatinga após corte e queima, em Serra Talhada, PE. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 33, 621-632p.

SAMPAIO, E.V.S.B. Fitossociologia. In: SAMPAIO, E.V.S.B.; MAYO, S.J.; BARBOSA, M.R.V. (1996) Pesquisa botânica nordestina: progresso e perspectivas. Recife, Sociedade Botânica do Brasil, 203-224 p.

SANTOS, C. E. R. S; FREITAS, A. D. S; VIEIRA, I. M. M. B.; COLAÇO, W. (2008) Fixação do N_2 em leguminosas tropicais. In: FIGUEREDO, M. V.B; BURITY, H. A.; SANTOS C. E. R. S. (Eds) Microbiologia e agrobiodiversidade: O novo desafio para agricultura. Guaíba: Agrolivros, 17-41p.

SHANNON, C. E. & WIENER, W. The mathematical theory of communication. Urbana: University Illinois Press, 1949.

SHEARER, G.; KOHL, D. H. (1986) N_2 fixation in field settings: estimations based on natural ^{15}N abundance. Australian Journal of Plant Physiology, Victoria, v. 13, 699-756p.

SHEARER, G.; KOHL, D. H.; CHIEN, S. H.(1978) The nitrogen-15 abundance in wide variety of soils. Soil Science Society of American Journal, Madison, v. 42, 899-905 p.

SILVA, L.L.G.G., ALVES, G.C., RIBEIRO, J.R.A., URQUIAGA, S., SOUTO, S.M., FIGUEIREDO, M.V.B. E BURITY, H.A. (2010) Fixação biológica de nitrogênio em pastagens com diferentes intensidades de corte. Arch. Zootec., v. 59 (225), 21-30 p.

- SIMPSON, E. H. (1949). Measurement of diversity . Nature 163 . ,688 p.
- SOUZA, L.Q., FREITAS, A.D.S., SAMPAIO, E.V.S.B., MOURA, P.M., MENEZES, R.S.C. (2012) How much nitrogen is fixed by tropical dry forest? 1. Trees and shrubs. Nutr. Cycl. Agroecosyst.
- STRALIOTTO, R. & RUNJANEK , N.G. (1999) Aplicação e evolução dos métodos moleculares para estudo da biodiversidade do rizóbio . EMBRAPA. Doc 93.
- TABARELLI, M., SILVA, J. M. C. (2003) Áreas e ações prioritárias para conservação da biodiversidade da caatinga. In: LEAL, I. R., TABARELLI, M., SILVA, J. M. C. (Eds) Ecologia e conservação da caatinga. Recife – ed. Universitária da UFPE. Cap. 20, 777-796 p.
- TAN, I. K. P., BROUGHTON, W. J. (1981) Rhizobia in tropical legumes. XIII Biochemical basis of acid and alkali reations. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v. 13, 389-393 p.
- URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. (1992) Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-¹⁵ and nitrogen balance estimates. Soil Science Society of America Journal, Madison, v. 56, p. 105-114.
- VINCENT, J. M. (1970). Manual for the practical study of root nodule bacteria. Scientific Publications Oxford: Blackwell Scientific, 164p.
- YONEYAMA, T.; MURAOKA, T.; KIM, T. H.; DACANAY, E. V.; NAKANISHI, Y. (1997) The natural ¹⁵N abundance of sugarcane and neighbouring plants in Brazil, the Philippines and Miyako (Japan). Plant and Soil, Dordrecht, v. 189, 239-244 p.

Capítulo I

Diversidade e eficiência de bactérias de nódulos de leguminosas ao longo do processo de regeneração da caatinga utilizando o feijão-caupi como planta isca.

ANDRADE, MONALIZA MIRELLA DE MORAIS MSc. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Março de 2013. Capítulo I - Diversidade e eficiência de bactérias de nódulos de leguminosas ao longo do processo de regeneração da caatinga utilizando o feijão-caupi como planta isca. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos. Conselheira: Dr^a. Ana Dolores Santiago de Freitas.

RESUMO

A fixação biológica do N₂ atmosférico é um processo de suma importância para o restabelecimento da vegetação nativa. São poucas as informações sobre as populações de rizóbios ao longo do processo de regeneração da caatinga. O objetivo deste trabalho foi determinar as características culturais e estimar a diversidade e a eficiência das populações de bactérias que formam nódulos em leguminosas (BNL) em áreas sob diferentes tempos de regeneração da caatinga, utilizando o feijão-caupi como planta isca. Amostras compostas de solo foram coletadas de forma aleatória em parcelas demarcadas em áreas com diferentes tempos de abandono após utilização como pastagem (4 anos, 19 anos, 41 anos e >60 anos sem corte e/ou pastoreio) para condução de experimento em casa de vegetação. O feijão-caupi, cultivar IPA 206, foi cultivado em vasos contendo 2kg da mistura solo:areia lavada e autoclavada (1:1). Aos 45 dias, as plantas foram colhidas e foram determinados o número e o peso dos nódulos, a produção de biomassa aérea e os teores de N total e ¹⁵N. Dos nódulos, foram isoladas bactérias, e estas caracterizadas em meio YMA. Foram calculados índices para estimativa da diversidade, dominância, equitabilidade e riqueza dos isolados. Todas as plantas nodularam abundantemente em todas as áreas, demonstrando a ocorrência de amplas populações de bactérias capazes de nodular o feijão-caupi. Essas populações apresentam diferenças em índices de diversidade e capacidade de nodulação e fixação de N. Embora a maior diversidade de bactérias seja encontrada na área de caatinga madura (>60 anos), os nódulos são maiores e as contribuições da FBN são mais altas (Ndda ≥ 50%) nas plantas cultivadas nas áreas com menores tempos de regeneração, resultando

em maiores quantidades de N fixado. Esses resultados sugerem que as populações de bactérias de nódulos de leguminosas de áreas de caatinga madura são menos eficientes quanto à capacidade de fixar nitrogênio.

Palavras chaves: rizóbio, *Vigna unguiculata*, ^{15}N , fixação biológica de nitrogênio, semiárido.

ANDRADE, MONALIZA MIRELLA DE MORAIS MSc. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Março de 2013. Capítulo I - Diversidade e eficiência de bactérias de nódulos de leguminosas ao longo do processo de regeneração da caatinga utilizando o feijão-caupi como planta isca. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos. Conselheira: Dr^a. Ana Dolores Santiago de Freitas.

ABSTRACT

The biological fixation of atmospheric N₂ is a highly important process for the regeneration of native vegetation. Information on rhizobia population along the process of caatinga regeneration is scarce. The objective of this study was to determine culture characteristics and to estimate the diversity and efficiency of bacteria populations able to form root nodules that were present in areas with different regeneration periods, using cowpea as the trap plant. Composite soil samples were collected at random in plots with different abandonment periods after being used as pasture (4, 19, 41 and > 60 years). The samples were used in a greenhouse experiment, growing cowpea cultivar IPA 206 in pots with 2 kg of a mixture of soil and washed and autoclaved sand (1:1). The plants were harvested 45 after emergence and the number and weight of the nodules, the shoot biomass and the concentration of N and ¹⁵N were determined. Bacteria were isolated from the nodules using the YMA medium. Diversity, dominance, equitability and richness indices were calculated for the isolates. All plants growing in soil from all areas nodulated abundantly, indicating the presence of bacteria able to form symbiosis with cowpea. The populations had different diversity indices. The highest diversity occurred in the soil of the mature caatinga (> 60 years of regeneration) but the nodules were larger and the contribution of the biological fixation to the plant N were greater when the plants were grown in the soils of areas with shorter regeneration periods, resulting in larger amounts of fixed N. These results suggest that the populations of N₂-fixing bacteria in the mature caatinga are less efficient in N fixation.

Key words: rhizobia, *Vigna unguiculata*, ¹⁵N, biological N fixation, semi-arid

INTRODUÇÃO

Na região semiárida do Brasil, a vegetação nativa (Caatinga), que abrangeria uma área estimada entre 6 e 9×10^5 km² (SAMPAIO, 1995), faz parte do ciclo de agricultura itinerante, além de ser a principal forma de pasto nativo da extensa atividade pecuária da região. Como resultado, anualmente, uma infinidade de pequenas áreas é abandonada para regeneração espontânea e, dessa forma, a vegetação atual do semiárido é um imenso mosaico de pequenas áreas com distintos tempos de regeneração, entremeadas a poucas áreas preservadas por muito tempo.

A regeneração da vegetação depende, entre outros fatores, do restabelecimento dos estoques iniciais de nutrientes, perdidos juntamente com a biomassa vegetal cortada e queimada. Para o nitrogênio (N), a principal forma de aporte a sistemas naturais, sem uso de fertilizantes, é a fixação biológica do N₂ atmosférico (FBN) (CLEVELAND et al, 1999) e, por conseguinte, esse é um processo de suma importância para o restabelecimento da vegetação nativa.

A nodulação e/ou a eficiência do processo de FBN podem ser restringidas por diversas condições relacionadas à planta, ao microssimbionte e às condições de clima e solo que afetam a simbiose. Tanto o crescimento de rizóbios em vida livre nos solos, como sua capacidade de nodular as plantas e fixar nitrogênio, são sensíveis a condições ambientais e podem ser dependentes da qualidade do solo. Diferentes coberturas vegetais ou manejos afetam a diversidade de rizóbios (PEREIRA et al., 2007; LIMA et al., 2009), podendo favorecer, de forma diferenciada, populações mais ou menos eficientes.

Na literatura não são encontrados trabalhos relacionados à caracterização e diversidade de bactérias diazotróficas nativas de solos de caatinga, ao longo do processo de regeneração. Portanto, faz-se necessário a investigação da ocorrência de populações bacterianas nodulíferas nativas, bem como a eficiência na fixação biológica do nitrogênio, para que se estabeleçam manejos adequados em áreas de regeneração da vegetação nativa, ou mesmo para conhecimento da dinâmica destas populações bacterianas em distintos

períodos de regeneração. O objetivo deste trabalho foi determinar as características culturais e estimar a diversidade e a eficiência das populações de bactérias que formam nódulos em leguminosas (BNL) em áreas sob distintos períodos de regeneração da caatinga, utilizando o feijão-caupi como planta isca.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área do estudo e amostragem do solo

Foram coletadas amostras de solo em áreas com diferentes tempos de regeneração da vegetação nativa e em áreas de caatinga madura, localizadas na Fazenda Tamanduá, município de Santa Terezinha (PB). A fazenda está situada entre as latitudes 06°59'13" e 07°00'14"S e as longitudes 37°18'08" e 37°20'38"O, com altitude entre 250 e 350 m acima do nível do mar. O clima da região é do tipo Bsh, definido como semiárido quente e seco de acordo com a classificação de Köppen. A precipitação média anual é de cerca de 600 mm, com grande variação de ano para ano, concentrados em três meses, geralmente de março a maio. A temperatura média anual é de 28 °C, com poucas flutuações sazonais e diárias. O tipo de solo na área de estudo é o Neossolo Litólico.

Foram selecionadas três áreas para cada um dos quatro tempos de regeneração (4 anos, 19 anos, 41 anos e >60 anos), que foram consideradas como repetições. Em cada uma delas foi estabelecida uma parcela na qual foi feita amostragem, totalizando 12 parcelas amostradas. Essas áreas estão localizadas aproximadamente na mesma altitude, apresentando o mesmo tipo de solo e distando menos de 3 km uma das outras. Todas as parcelas foram cercadas quatro anos antes das amostragens do solo, que ocorreu em 2011, para evitar a entrada de animais. Os quatro tempos de regeneração e os respectivos históricos de uso das áreas estudadas foram: 1) áreas com quatro anos de regeneração: sofreram corte da vegetação nativa no ano de 1965 e foram cultivadas com algodão arbóreo até o ano de 1970, quando foram plantadas com *Cenchrus ciliaris* L. (capim buffel) e utilizadas como pastagem até 2007. Essas áreas apresentam-se cobertas com uma vegetação herbácea;

2) áreas com dezenove anos de regeneração: plantadas com algodão e *C. ciliaris* nas mesmas épocas das áreas descritas anteriormente, mas abandonadas em 1992. Apresentam-se dominadas por uma única espécie de leguminosa arbórea (jurema preta), com projeção total de copas de 6045 m² ha⁻¹; 3) áreas com quarenta e um anos de regeneração, também plantadas com algodão em 1965 e abandonadas em 1970. Cobertas com espécies arbustivas e arbóreas, com projeção total de copas de 6278 m² ha⁻¹, e 4) áreas com mais de 60 anos de regeneração, com vegetação de caatinga madura, sem corte ou outro tipo de distúrbio desde pelo menos 1950. Essas áreas estão cobertas com arbustos e árvores com projeção de copa de 8458 m² ha⁻¹ (Souza et al. 2012).

Nas áreas estudadas ocorrem 10 espécies de leguminosas herbáceas (*Arachis pusilla* Benth., *Centrosema brasilianum* (L.) Benth, *Centrosema pascuorum* Mart. ex Benth, *Chamaecrista nictitans* (L.) Moench, *Chamaecrista serpens* (L.) Greene, *Macroptilium gracile* (Poepp. ex Benth) Urb., *Stylosanthes humilis* Kunth, *Senna obtusifolia* (L.) H.S. Irwin & Barneby e duas espécies não identificadas (Freitas et al. 2012). Ocorrem também quatro espécies de leguminosas arbóreas: *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir, *Piptadenia stipulacea* [Benth.] Ducke, *Anadenanthera colubrina* [Vell.] Brenan e *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Souza et al. 2012).

As amostras de solo foram coletadas dentro de cada parcela na camada de 0 a 20 cm, de maneira inteiramente casualizada. Em cada parcela foram coletadas cinco amostras compostas de solo, obtidas a partir de 10 amostras simples. As amostras de solo foram homogeneizadas, peneiradas (5 mm) e utilizadas em experimento em casa-de-vegetação. Sub-amostras foram separadas para análises físicas e químicas (tabela 1), de acordo com a metodologia da EMBRAPA (1997).

Tabela 1. Características do Neossolo Litólico em áreas de caatinga com diferentes tempos de regeneração no Nordeste do Brasil.

Tempos (anos)	pH	P	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	C	N	Areia	Silte	Argila
4	5.86b	2.72a	0.25b	0.12a	4.31a	1.37a	8.37c	0.70c	638a	93a	269a
19	5.94b	1.55a	0.29ab	0.11a	5.02a	1.66a	8.61c	0.78c	645a	117a	239a
41	5.79b	1.65a	0.31a	0.13a	3.91a	1.29a	14.10a	1.18a	668a	93a	239a
> 60	6.41a	2.62a	0.29ab	0.11a	5.22a	1.36a	11.62b	1.06b	648a	123a	229a

Médias seguidas pelas mesmas letras, nas colunas, não são significativamente diferentes ao nível de 0,05 de probabilidade pelo teste de Tuckey.

Delineamento experimental

Foi conduzido um experimento em casa-de-vegetação utilizando o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), cultivar IPA 206, como planta-isca. Utilizou-se um delineamento em blocos ao acaso, com 3 repetições, para cada uma das 12 parcelas amostradas. O feijão-caupi foi cultivado em vasos contendo 2 kg de mistura solo: areia (lavada e autoclavada), na proporção 1:1. Vasos extras foram preparados para cultivo do capim buffel, que foi utilizado como planta referência para estimativa do N fixado na leguminosa.

As sementes do feijão-caupi foram desinfestadas com álcool etílico a 70%, por 30 segundos, e com hipoclorito de sódio a 1%, por 1 minuto. Em seguida foram lavadas com água destilada seis vezes por 30 segundos. Foram semeadas quatro sementes por vaso. Aos 10 dias após o plantio foi realizado o desbaste das plântulas, mantendo duas plantas por vaso. Aos 45 dias, as plantas foram colhidas, as partes aéreas foram separadas das raízes e secas em estufa (60°C). Todos os nódulos foram coletados, colocados em tubos de ensaio contendo sílica gel para desidratação e preservados até o momento do isolamento das bactérias.

Isolamento de bactérias de nódulos do feijão-caupi

O isolamento foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Primeiramente, os nódulos armazenados em sílica gel foram contados e pesados, e depois tratados com uma solução de álcool etílico a 70%, por 1 minuto, para quebrar a tensão superficial, e com uma solução de hipoclorito de sódio a 1%, por 2 minutos, para desinfestação superficial e, em seguida, lavados, por cinco vezes, com água destilada e esterilizada, para retirar o excesso de hipoclorito. Em seguida, foram levemente pressionados com uma pinça sobre uma placa de Petri, contendo o meio de cultura YMA (extrato de levedura, manitol e ágar), utilizando como solução indicadora o vermelho do Congo, conforme descrito por Fred e Waksman (1928). Após o isolamento, as placas foram incubadas a 28°C até o aparecimento e desenvolvimento das colônias. As colônias isoladas, características de rizóbio, foram purificadas em placas de Petri contendo meio de cultura YMA com azul de bromotimol e caracterizadas morfofisiologicamente.

Caracterização morfofisiológica dos isolados

A caracterização dos isolados foi realizada de acordo com metodologia adaptada de Vincent (1970), sendo observadas, em cada um dos isolados as seguintes características: 1) tempo necessário, em dias, para o aparecimento de uma colônia; 2) modificação do pH do meio após o crescimento celular (determinado pela coloração do meio de cultura YMA contendo azul de bromotimol: os isolados acidificantes tornam o meio amarelado, os alcalinizantes tornam o meio esverdeado ou azulado e os neutros não modificam a coloração do meio de cultura); 3) tamanho da colônia (variando de puntiforme a >2mm); 4) forma da colônia (circular ou irregular); 5) borda da colônia (lisa ou irregular); 6) aparência da colônia (homogênea ou heterogênea); 7) transparência da colônia; 8) cor da colônia (branca, amarela, creme, rósea); 9) elevação da colônia na superfície do meio. Também foram observadas características do muco produzido pelas células: 1) quantidade de muco (pouco, médio e muito); 2) faixa de alça ou limpa (observada pela

formação ou não de faixa quando se faz um risco, com auxílio de alça de platina, transversal ao sentido de crescimento do muco); 3) elasticidade (observada a partir da formação ou não de fio, no momento da remoção do muco do meio de cultura com o auxílio da alça de platina). Após caracterização, as bactérias foram armazenadas em eppendorf, devidamente identificados, contendo meio TY (Somasegaran & Hoben; 1994) com 15% de glicerol, para conservação em freezer a -4°C (Embrapa, 1994).

Codificação, agrupamento e estimativa da diversidade dos isolados

Após a caracterização morfofisiológica, os dados foram codificados em um sistema binário (Tabela 2).

Tabela 2: Codificação das características morfofisiológicas dos isolados de nódulos de feijão-caupi cultivado em solo de áreas com diferentes tempos de regeneração da vegetação nativa, no semiárido da Paraíba.

Características	Codificação Binária	
	0	1
Tempo de crescimento (dias)	1	>1
Forma da colônia	Circular	Irregular
Borda da colônia	Regular	Irregular
Tamanho da colônia	Puntiforme a 2mm	>2mm
pH	Ácido	Neutro ou alcalino
Elevação	Sem	Com
Transparência	Não	Sim
Cor	Translúcida/Branca	Creme/Amarela
Presença de muco	Não	Sim
Quantidade de muco	Pouco	Médio/Muito
Limpa	Não	Sim
Elasticidade	Não	Sim
Aparência da colônia	Homogênea	Heterogênea

Os isolados obtidos das plantas cultivadas em cada um dos tempos de regeneração foram agrupados pelo programa NtsysPC, utilizando distância taxonômica entre as espécies, analisadas pelo algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Average) e a matriz de similaridade de Jaccard. Uma vez construídas as matrizes, foram feitos quatro dendrogramas, com a finalidade de separar os grupos de isolados com maior similaridade (ROHLF, 1994). Com os isolados agrupados, procederam-se os cálculos dos índices de diversidade de Shanon-Wiener, dominância de Simpson, equitabilidade J e riqueza de espécies Jackknife 1ª ordem, utilizando o software DivEs v2.0 para estimativa da diversidade e riqueza de espécies (Rodrigues, 2007).

Avaliação da eficiência das bactérias que formam nódulos em leguminosas

A eficiência das comunidades de BNL presentes em cada área foi acessada através da determinação da produção de biomassa seca da parte aérea, do número e biomassa seca dos nódulos, dos teores e quantidades de N total e N fixado nas plantas de feijão-caupi. Após a pesagem, a parte aérea de cada planta foi moída e preparada para determinação dos teores de N total, pelo método micro Kjeldahl e ^{15}N , por espectrometria de massa. Os nódulos foram contados e os resultados transformados em $(x+1)^{0,5}$.

O N total foi expresso em % e os teores de ^{15}N , em unidades de “delta” (δ) que é o desvio por mil (‰) da abundância de ^{15}N da amostra em relação a abundância do N_2 atmosférico, que é o padrão, com δ igual a 0 (zero):

$$\delta = (R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}} - 1) \times 1000$$

Onde: R_{amostra} e $R_{\text{padrão}}$ são as razões $^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$ da amostra e do padrão (N_2 atmosférico), respectivamente.

Para estimar a fixação biológica do nitrogênio no feijão-caupi foi utilizado o método da abundância natural do ^{15}N . O percentual de nitrogênio da planta

derivado do ar (%N_{da}) foi calculado utilizando a fórmula descrita por Shearer e Kohl (1986):

$$\%N_{da} = [(\delta^{15}N_{(referência)} - \delta^{15}N_{(fixadora)}) / \delta^{15}N_{(referência)} - B] \times 100$$

onde $\delta^{15}N_{(referência)}$ é o valor médio dos $\delta^{15}N$ da planta referência (capim buffel) em cada tratamento, $\delta^{15}N_{(fixadora)}$ é o valor médio de $\delta^{15}N$ do feijão-caupi para cada parcela e B é o valor de $\delta^{15}N$ para plantas fixadoras cultivadas na ausência de N. Foi utilizado o valor de B = -1,51‰, determinado para *Vigna unguiculata* por Nguluu et al. (2001).

O conteúdo de N total no feijão-caupi foi determinado através do produto do teor deste nutriente e da biomassa seca da parte aérea das plantas. A quantidade de N fixado na parte aérea das plantas foi estimada multiplicando o valor de %N_{da} pelo conteúdo de N de cada planta.

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise da variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, no nível de 5 % de probabilidade. Cada tempo de regeneração foi considerado um tratamento de efeito fixo e as médias foram calculadas considerando, para cada tempo de regeneração, todas as repetições das áreas e dos vasos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Biomassa seca da parte aérea e nodulação

O feijão-caupi nodulou abundantemente no Neossolo Litólico estudado, independentemente do tempo de regeneração da cobertura vegetal, demonstrando a existência de uma ampla população de bactérias nodulantes estabelecida no solo das quatro áreas (Melo e Zilli, 2009). O número de nódulos variou entre 39 e 67 e a biomassa da parte aérea entre 1,70 e 2,34 g (Tabela 3). A biomassa específica dos nódulos das plantas cultivadas na área com menor tempo de regeneração (7,36 mg) foi superior aos demais tempos

avaliados (Tabela 3), que tiveram nódulos equivalentes a apenas um terço desse valor (entre 2,08 e 2,73 mg). Nódulos pequenos e não funcionais podem representar um dreno de fotoassimilados (Atkins, 1984), por isso a avaliação do tamanho dos nódulos é importante para uma estimativa da eficiência das bactérias associadas às leguminosas. Apesar de capazes de formar nódulos maiores, as bactérias nativas da área com 4 anos de regeneração não demonstraram eficiência para promover maior produção de biomassa aérea no feijão-caupi.

Tabela 3 - Biomassa e nodulação do feijão-caupi cultivado em vasos com 2Kg de Neossolo Litólico coletado em áreas com diferentes tempos de regeneração da vegetação natural no semiárido da Paraíba.

Tempos de regeneração (anos)	n	Número de nódulos	Biomassa seca dos nódulos (g)	Biomassa específica dos nódulos (mg)	Biomassa seca da parte aérea (g)
4	9	41	0,29 a	7,36 a	2,34 a
19	9	67	0,16 ab	2,73 b	2,09 a
41	3	46	0,12 ab	2,09 b	1,70 a
> 60	9	45	0,11 a	2,68 b	2,30 a

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$),

Caracterização cultural das bactérias que formam nódulos em leguminosas (BFNL)

Foram isoladas 460 bactérias dos nódulos do feijão-caupi, sendo 132 nativas da área com 4 anos, 93 da área com 19 anos, 126 da área com 41 anos e 109 do solo coberto com a caatinga madura (>60 anos). Todos os isolados apresentaram crescimento rápido (1 ou 2 dias), sendo 31% dos isolados de área de caatinga madura com crescimento em 48 horas e os demais com crescimento em 24 horas, característica comum entre rizóbios nativos de solos do semiárido brasileiro (Martins et al., 1997; Teixeira et al., 2010). Todos os isolados apresentaram colônias de forma redonda e bordas

regulares. Considerando toda a coleção, a maioria apresentou reação neutra, colônias puntiformes brancas, cremes ou amarelas e com produção de muco. Entretanto, houve diferença entre as características predominantes nas populações de cada uma das áreas estudadas. Da mesma forma que para as áreas mais antigas (com 41 anos de regeneração e na caatinga madura), na área com menor tempo de regeneração predominaram bactérias que não modificaram o pH do meio de cultura, porém nessa última houve um maior equilíbrio entre os três tipos de reação de pH. Nesse parâmetro, a população mais diferenciada foi a nativa da área com 19 anos, que apresentou, em sua maioria, reação ácida (Figura 1). Com relação à produção de muco, a população dessa área também foi bastante diferenciada, com predominância de colônias secas (32%), contrastando com presença de muco nas colônias provenientes do solo das outras áreas em todas as áreas, apresentou muco (Figura 2).

Figura 1 - Modificação do pH do meio de cultura YMA de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi cultivado em um Neossolo Litólico sob diferentes tempos de regeneração da vegetação de caatinga.

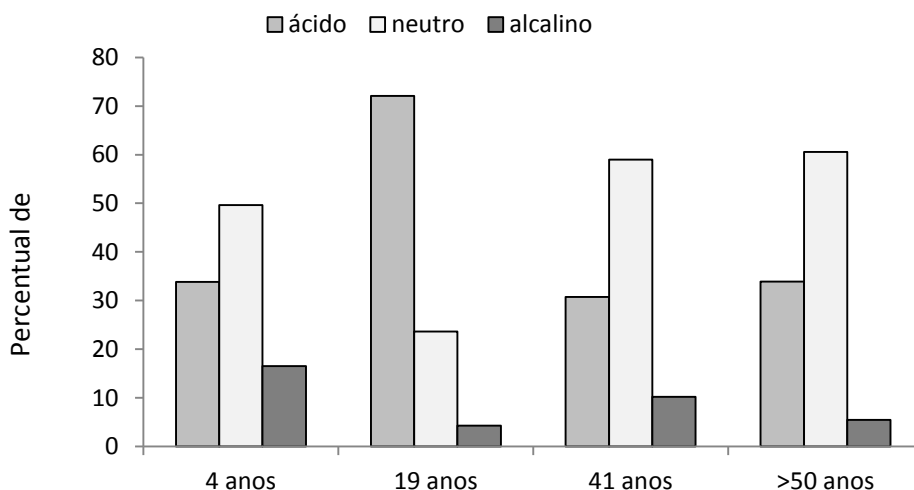
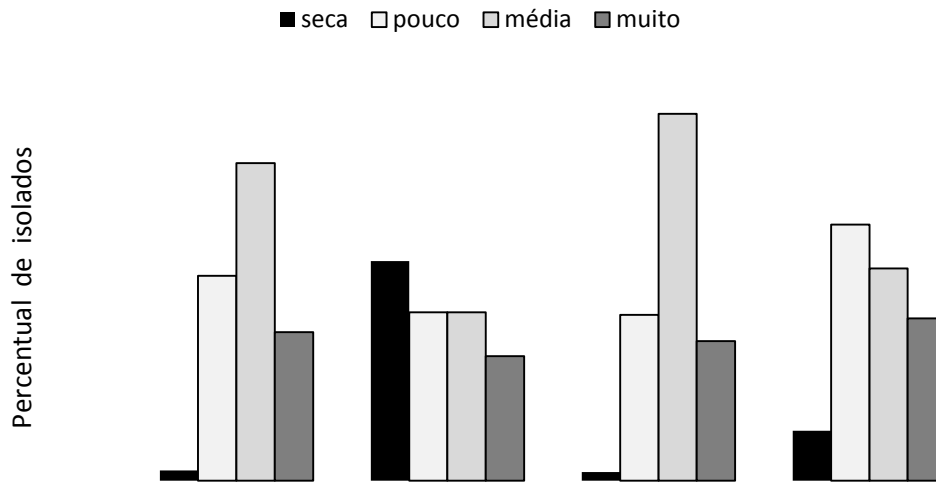


Figura 2 - Quantidade de muco produzido em meio YMA por bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi cultivado em Neossolo sob diferentes tempos de regeneração da vegetação da caatinga.



Os isolados obtidos em cada área foram agrupados de acordo com suas características culturais e distribuídos em grupos a 75% de similaridade. Foram formados 12 grupos para a área de 4 anos de regeneração (figura 3), 15 grupos para a área de 19 anos (figura 4), 10 grupos para a área de 41 anos (figura 5) e 16 grupos para área com mais de 60 anos (figura 6).

Figura 3: Dendrograma de similaridade baseado em características culturais de isolados de bactérias que nodulam feijão caupi, oriundos de área de caatinga com 4 anos de regeneração.

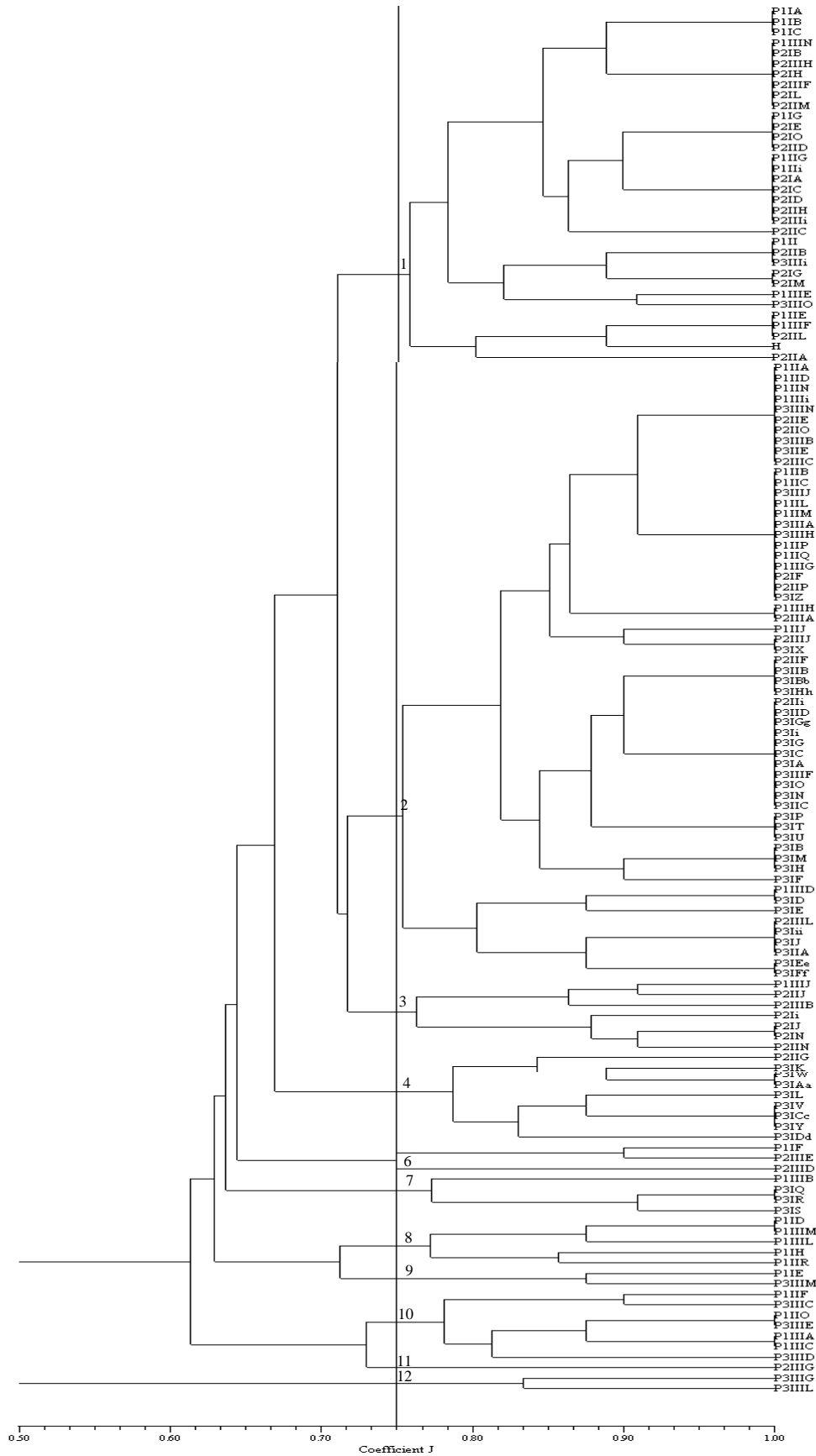


Figura 4: Dendrograma de similaridade baseado em características culturais de isolados de bactérias que nodulam feijão caupi, oriundos de área de caatinga com 19 anos de regeneração.

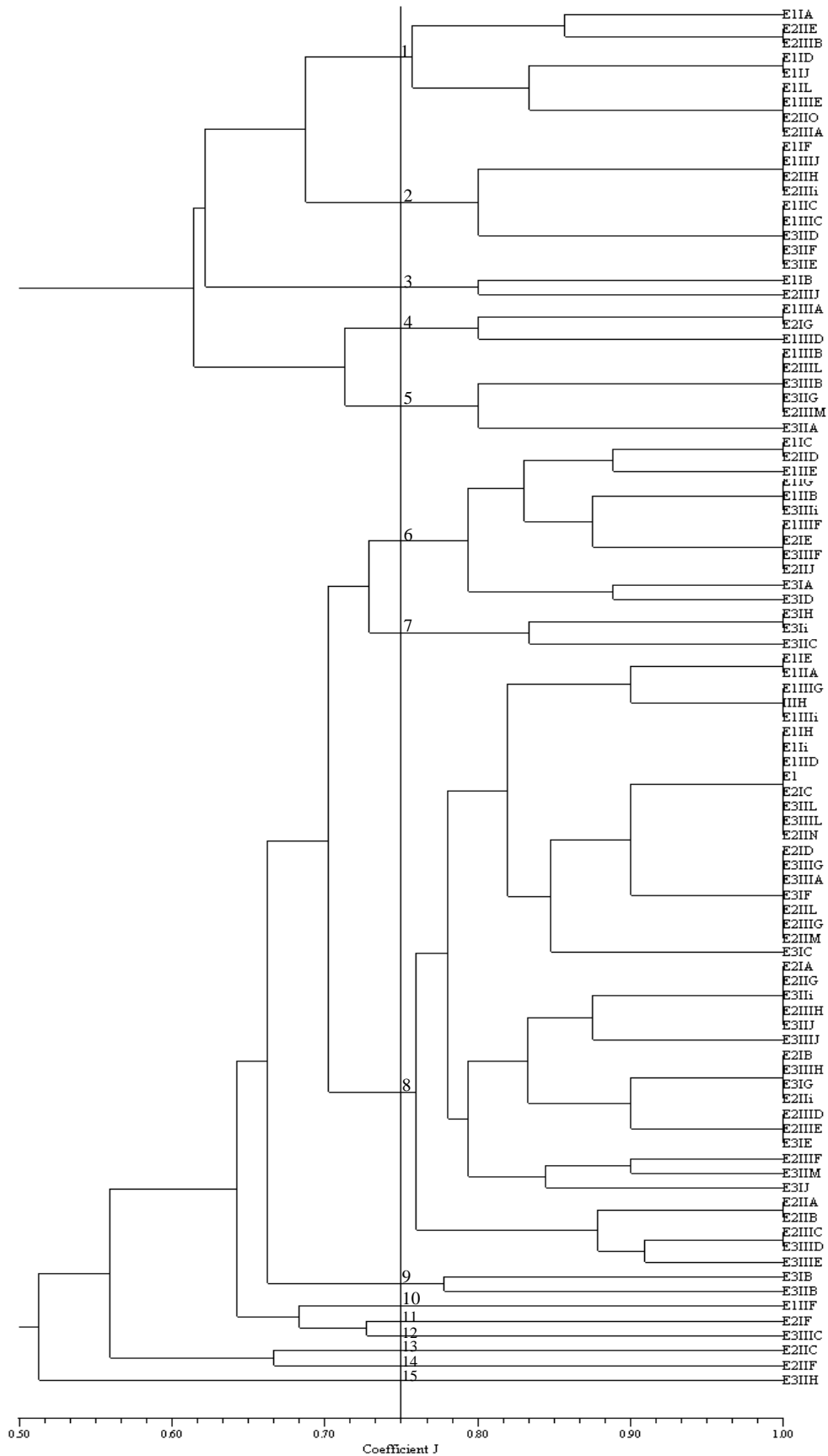
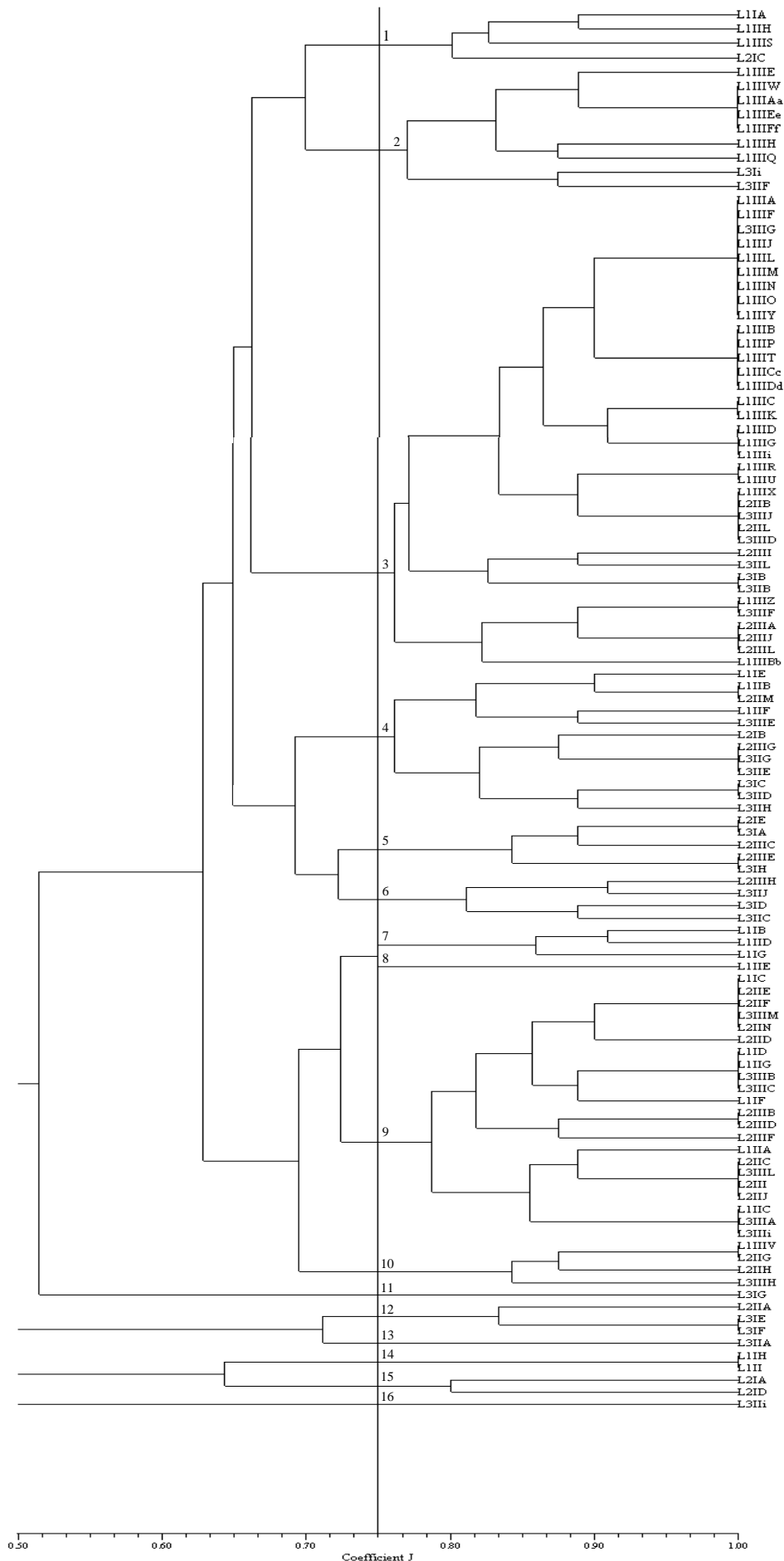


Figura 6: Dendrograma de similaridade baseado em características culturais de isolados de bactérias que nodulam feijão-caupi, oriundos de área de caatinga com mais de 60 anos de regeneração.



Índices de diversidade das bactérias dos nódulos

Os tempos de regeneração da caatinga influenciaram na diversidade fenotípica das bactérias dos nódulos (Tabela 4). O índice de Shannon-Wiener, que estima a diversidade de espécies em uma comunidade foi maior na área de caatinga madura (>60 anos), assim como a equitabilidade e a riqueza, sugerindo que nesta área há grande número de espécies, distribuídas uniformemente, ou seja, sem a dominância forte de quaisquer espécies. O menor índice de diversidade ocorreu na área de caatinga mais jovem, e os com 4 anos de regeneração, e os valores aumentaram com o tempo de regeneração, exceto na área com 41 anos de regeneração, onde o índice de Shannon, a equitabilidade e a riqueza de espécies foram menores que os das áreas com 19 anos, bem como. Considerando que a equitabilidade é inversamente proporcional à dominância, o índice de Simpson que faz referência a essa segunda característica, mostrou maior valor na área com 4 anos de regeneração.

Tabela 4: Índices de diversidade (Shannon-Wiener), dominância (Simpson), equitabilidade J e riqueza de espécies (Jackknife 1ª ordem) de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi cultivado em um Neossolo Litólico sob diferentes tempos de regeneração da vegetação da caatinga.

Índices	Tempos de regeneração			
	4 anos	19 anos	41 Anos	>60 anos
Shannon	0,42	0,61	0,49	0,84
Simpson	0,57	0,38	0,48	0,18
Equitabilidade J	0,50	0,59	0,58	0,78
Jackknife	7	11	7	12

Estimativa da eficiência das bactérias que formam nódulos em feijão-caupi

Quando cultivado nos solos das áreas sob os diferentes tempos de regeneração, o sinal de ^{15}N na parte aérea do feijão-caupi foi significativamente menor que o da planta de referência, o capim-buffel (tabela 5). Esse resultado demonstra que a leguminosa de fato absorveu parte de seu N através da simbiose com as bactérias nativas dos solos das áreas estudadas. As diferenças entre os sinais da leguminosa e o do capim buffel, foram sempre maiores que duas unidades de $\delta^{15}\text{N}$, permitindo estimativas seguras da proporção do N da planta derivado da atmosfera (%Ndda) (Hogberg, 1997). Entretanto, esses percentuais só foram elevados (maiores que 50%) nas duas áreas com menores tempos de regeneração (considerando o valor B intermediário). O feijão-caupi é uma espécie considerada capaz de nodular com uma ampla faixa de rizóbios, inclusive com bactérias nativas de solos do semiárido brasileiro (Martins et al., 1997; Santos et al 2007). Poucos trabalhos, entretanto, estimaram a eficiência dessa simbiose em solos da região semiárida do Brasil. Freitas et al (2012 b) estimaram o %Ndda em variedades locais de feijão-caupi cultivadas em solo do semiárido da Paraíba e observaram que, em média, as plantas, em simbiose com bactérias nativas (não inoculadas) podem obter mais de >60% de seu N através da FBN.

O principal fator definindo o acúmulo de N no feijão-caupi foi a produção de biomassa, pois os teores de N (Tabela 6) foram igualmente semelhantes em todas as situações, porém inferiores aos relatados por Freitas et al (2012 b). As maiores quantidades de N foram fixadas nas plantas cultivadas nas áreas com menores tempos de regeneração (31 e 28 mg por vaso, respectivamente. Freitas et al (2012 a) demonstraram, para as mesmas áreas que foram utilizadas nesse trabalho, que a maior diversidade e biomassa de leguminosas herbáceas ocorre na áreas com menor tempo de regeneração, mas que não houve diferenças nos %Ndda das espécies nativas.

Tabela 5: Abundância natural do ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$ (‰)) no capim buffel e no feijão-caupi e nitrogênio derivado da atmosfera (%N_{dda}) no feijão-caupi, cultivados em um Neossolo Litólico com diferentes de tempos de regeneração da vegetação nativa (caatinga).

Tempos de regeneração (anos)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)		%N _{dda}		
	<i>Cenchrus ciliaris</i>	<i>Vigna unguiculata</i>	I ⁽¹⁾	II ⁽¹⁾	III ⁽¹⁾
4	6,03	2,18 **	63,43 a	51,09 a	47,97 a
19	6,05	0,52 **	89,90 a	73,20 a	68,74 a
41	6,62	4,52	31,76 a	25,86 a	24,39 a
>60	4,34	1,89 **	60,20 a	45,16 a	41,67 a

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

** Estatisticamente diferente do sinal do capim buffel, cultivado no solo com o mesmo tempo de regeneração, pelo teste de Tuckey ($P < 0,01$).

⁽¹⁾ I: B = 0 (‰); II: B = -1.51‰ (Nguluu et al., 2001); III: B = -2‰

Tabela 6: Concentração e acúmulo de N total e N acumulado em feijão-caupi, cultivado em vasos com 2Kg de Neossolo Litólico coletados em áreas com diferentes de tempos de regeneração da vegetação nativa (caatinga).

Tempos de regeneração (anos)	Concentração de N (%)	Acúmulo de N (mg planta ⁻¹)	N fixado (mg planta ⁻¹)		
			I ⁽¹⁾	II ⁽¹⁾	III ⁽¹⁾
4 anos	2,15 a	50,00 a	34 a	28 a	26 a
19 anos	2,04 a	42,48 ab	38 ab	31 ab	29 ab
41 anos	1,52 b	26,01 b	10 b	8 b	7 b
>60 anos	1,97 ab	45,55 ab	25 b	18 b	17 b

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

⁽¹⁾ I: B = 0 (‰); II: B = -1.51‰ (Nguluu et al., 2001); III: B = -2‰

CONCLUSÕES

Em áreas com diferentes tempos de regeneração da vegetação de caatinga existem amplas populações de bactérias capazes de nodular o feijão-caupi. Essas populações apresentam diferenças em índices de diversidade e capacidade de nodulação e fixação de N. Embora a maior diversidade de bactérias seja encontrada na área de caatinga madura (>60 anos), os nódulos são maiores e as contribuições da FBN são mais altas ($N_{dda} \geq 50\%$) nas plantas cultivadas nas áreas com menores tempos de regeneração, resultando em quantidades mais expressivas de N fixado. Esses resultados sugerem que as populações de bactérias de nódulos de leguminosas de áreas de caatinga madura são menos eficientes quanto a suas capacidades de fixar nitrogênio.

REFERÊNCIAS

ATKINS, C.A. (1984) Efficiencies and inefficiencies in the legume/ *Rhizobium* symbiosis - a review. **Plant and Soil**, v.82, 273-284 p.

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

EMBRAPA (1997). Manual de métodos de análises de solo. 2 ed. Rio de Janeiro, 212p

EMBRAPA (1994). Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Araujo, R. S.; Hungria, M. Eds. Brasília. Embrapa-SPI. 542p.

FRED, E.B. & WAKSMAN, S.A. (1928). Laboratory manual of general microbiology. New York, McGraw-Hill Book Company, 143p.

FREITAS, A.D.S., SAMPAIO, E. V.S.B., SILVA, B.L.R., ALMEIDA CORTEZ, J.S., MENEZES, R.S. C. (2012a) How much nitrogen is fixed by biological symbiosis in tropical dry forests? 2. Herbs. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 1-12 p.

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

HÖGBERG, P. (1997) ¹⁵N natural abundance in soil-plant systems. *New Phytol* 137:179–203.

LIMA, A.S.; NÓBREGA, R.S.A.; BARBERI, A.; SILVA, K.; FERREIRA, D.F.; MOREIRA, F.M.S. (2009) Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in

soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macropitilium atropurpureum*). Plant Soil, v. 319, 127-145p.

MAGURRAN, A. E. (1988) Ecological diversity and its measurement. London: Croom Helm, 179 p.

MARTINS, L. M. V., NEVES, M. C. P., RUMJANECK, N. G. (1997) Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the northeast of Brazil. Soil Biology and Biochemistry, v. 29, n.5-6, 1005-1010 p.

MATOS, R.M.B.; SILVA, E.M.R. da; BERBARA, R.L.L. (1999) Biodiversidade e índices. Seropédica: Embrapa Agrobiologia (Embrapa-CNPAB Documentos 107), 20p.

MELLONI, R., MOREIRA, F. M. S., NÓBREGA, R. S. A., SIQUEIRA, J. O. (2006) Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walpi] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 30, 235-246 p.

NGULUU, S.N.; PROBERT, M.E.; McCOWN, R.L. et al. (2002) Isotopic discrimination associated with symbiotic nitrogen fixation in stylo (*Stylosanthes hamata* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* L.). Nutrient Cycling in Agroecosystems, v.62, 10-13p.

PEREIRA, A.A.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; KASCHUK, G.; CHUEIRE, L.M.O.; CAMPO, R.J.; TORRES, E. (2007) Variações qualitativas e quantitativas na microbiota do solo e na fixação biológica do nitrogênio sob diferentes manejos com soja. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 31, 1397-1412p.

RODRIGUES, W.C. (2007). DivEs - Diversidade de espécies - Guia do usuário. Seropédica: Entomologistas do Brasil. 9p. Disponível em: <http://www.ebras.bio.br/dives/>.

ROHLF, F. J. (1997). NTSYSpc: numerical taxonomy and multivariate analyses system. Version 2.0. New York: Exeter Publications.

ROSSO, S. (1996) Amostragem, repartição espacial e diversidade/dominância de comunidades de costões rochosos: uma abordagem metodológica. Laboratório de Ecologia Marinha/USP. 30 p.

SAMPAIO, E.V.S.B. (1995). Overview of the Brazilian caatinga. In: Bullock, S.H.; Mooney, H.A.; Medina, E. (eds). *Seasonally dry tropical forests*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, p. 35-63.

SANTOS, C.E.R.S.; STAMFORD, N.P.; NEVES, M.C.P.; RUNJANEK, N.G.; BORGES, W.L.; BEZERRA, R.V.; FREITAS, A.D.S. (2007). Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. *Rev. Bras. Ciênc. Agrár.* 2 (4), 249-256.

SHANNON, C. E. & WIENER, W. The mathematical theory of communication. Urbana: University Illinois Press, 1949.

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

SIMPSON, E. H. (1949). Measurement of diversity . *Nature* 163 . ,688 p.

SOUZA, L.Q., FREITAS, A.D.S., SAMPAIO, E.V.S.B., MOURA, P.M., MENEZES, R.S.C. (2012) How much nitrogen is fixed by tropical dry forest? 1. Trees and shrubs. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* DOI 10.1007/s10705-012-9531-z.

TEIXEIRA, F.C.P.; BORGES, W.L.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G. (2010). Characterization of indigenous rhizobia from caatinga. *Braz. J. Microbiol.* 41, 201-208.

VINCENT, J. M. (1970). Manual for the practical study of root nodule bacteria. Scientific Publications Oxford: Blackwell Scientific, 164p.

Capítulo II

NODULAÇÃO E FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO POR LEGUMINOSAS ARBÓREAS EM SIMBIOSE COM BACTÉRIAS NATIVAS DE ÁREAS COM DIFERENTES TEMPOS DE REGENERAÇÃO DA CAATINGA.

ANDRADE, MONALIZA MIRELLA DE MORAIS MSc. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Março de 2013. Capítulo II - Nodulação e fixação de nitrogênio por leguminosas arbóreas em simbiose com bactérias nativas de áreas com diferentes tempos de regeneração da caatinga. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos. Conselheira: Dr^a. Ana Dolores Santiago de Freitas.

RESUMO

O aporte de nitrogênio (N) via fixação biológica do N₂ atmosférico (FBN) é de suma importância para o restabelecimento da vegetação nativa. Como a nodulação e/ou a eficiência do processo de FBN podem ser restringidas por diversas condições relacionadas à planta, ao microsimbionte e às condições de clima e solo que afetam a simbiose, o objetivo do estudo foi avaliar a capacidade de fixação biológica de nitrogênio de bactérias formadoras de nódulos de leguminosas, nativas de áreas sob diferentes tempos de regeneração da vegetação da caatinga. Foi realizado um experimento em casa de vegetação na Universidade Federal Rural de Pernambuco, em blocos ao acaso, com vasos contendo amostras compostas de solo coletadas aleatoriamente em parcelas de 60 x 30m, anteriormente demarcadas, em áreas com diferentes tempos de abandono após utilização como pastagem (4 anos, 19 anos, e mais de 60 anos sem corte e/ou pastoreio). Cultivando leguminosas nativas dessas áreas como *Mimosa tenuiflora*, *Piptadenia stipulacea* e *Anadenanthera colubrina*. Vasos extras foram cultivados com canafístula e mororó como espécies controle para estimativa da FBN pelo método da abundância natural do N¹⁵. Aos 120 dias foram determinados o número e a biomassa e os teores de N(%) e ¹⁵N (‰). Foram estimadas as proporções (%N_{dda}) e as quantidades de N fixado. A *Mimosa tenuiflora* teve nodulação abundante independente do tempo de regeneração, enquanto as outras espécies praticamente não nodularam. Refletindo o padrão de nodulação, apenas a *Mimosa tenuiflora* apresentou sinal de ¹⁵N diferente do das plantas de referência, permitindo estimativas de %N_{dda}, que foram altas (>70%). Para

essa espécie, as plantas cultivadas no solo com 4 anos de regeneração apresentaram maior acúmulo de N total e fixado.

Palavras chave: *Mimosa tenuiflora*, *Piptadenia stipulacea*, *Anadenanthera colubrina*, abundância natural do ^{15}N .

ANDRADE, MONALIZA MIRELLA DE MORAIS MSc. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Março de 2013. Capítulo II - Nodulação e fixação de nitrogênio por leguminosas arbóreas em simbiose com bactérias nativas de áreas com diferentes tempos de regeneração da caatinga. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos. Conselheira: Dr^a. Ana Dolores Santiago de Freitas.

ABSTRACT

In spite of being an essential nitrogen source to the land ecosystems, the importance of biological N fixation (BNF), through the symbiosis of legume species and bacteria belonging to the rhizobia group, along the process of vegetation regeneration of caatinga areas is not well established. The objective of this study was to determine the occurrence and efficiency of native bacteria populations in the nodules of legume plants grown in soil collected from areas with different caatinga regeneration periods (4, 19, 41 and 60 years) after being used as pasture. A greenhouse experiment was established, using soil collected in random spots from three plots in each of these regeneration areas, located in Fazenda Tmanduá, Santa Terezinha municipality, Paraíba state. The occurrence and efficiency of legume nodule bacteria were determined, using native nodulating legume species (*Mimosa tenuiflora*, *Piptadenia stipulacea*, *Anadenathera columbrina*) as trap plants. In both experiments, the efficiency of populations was evaluated by the shoot and nodule biomass production and by the N concentration and fixation (^{15}N abundance technique) of the legume plants. The data were submitted to analysis of variance and the averages compared by the Tukey test, considering each regeneration period as a fixed treatment. The results indicate that in regenerating caatinga areas there is an ample population of bacteria able to nodulate *Mimosa tenuiflora*. The population of *Anadenathera columbrina* and *Piptadenia stipulacea* nodulating bacteria is more restricted, leading to low nodulation and absence of N fixation. The symbiotic N fixation contributed to the N content of *Mimosa tenuiflora* grown in soil from all the different regeneration areas, reaching up to 86% of the N content of the plants.

Key words: *Mimosa tenuiflora*, *Piptadenia stipulacea*, *Anadenathera columbrina*, ^{15}N natural abundance.

INTRODUÇÃO

No sistema de agricultura itinerante, predominante no semiárido Nordeste, grandes áreas são abandonadas após sofrerem desmatamento, queima, cultivo e/ou superpastejo. Como parte deste ciclo, extensas áreas correspondem a distintos estádios de regeneração da vegetação nativa nessas regiões (caatinga). Nos estádios iniciais da regeneração observa-se a dominância de espécies leguminosas como *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir (Pereira et al 2003; Sampaio et al 1998), que tem capacidade de obter grandes proporções de seu N através do processo de FBN em simbiose com rizóbios (Freitas et al. 2010). Em contraste, estas espécies nodulantes têm baixas densidades em áreas de vegetação madura, que são dominadas por não leguminosas ou leguminosas não nodulantes (Sampaio, 1996; Alcoforado Filho et al., 2003).

Em consequência dessa diferença de proporção de espécies nodulantes, espera-se que a contribuição da FBN em caatinga bem preservada seja menor que em áreas em processo de regeneração (Freitas et al., 2010). Entretanto, trabalho recente desenvolvido no semiárido paraibano demonstrou que a FBN das leguminosas arbóreas foi ausente ou muito baixa nas parcelas com menores tempos de regeneração, apesar da dominância de leguminosas nodulantes na vegetação. Por outro lado, no fragmento com vegetação madura, todas as espécies potencialmente fixadoras apresentaram grande proporção de N derivado da atmosfera, mas com baixa densidade de indivíduos (Souza et al., 2012).

A ausência de FBN em espécies nativas de áreas em regeneração desafia a visão tradicional da vantagem ecológica da capacidade de nodulação de leguminosas e as causas do baixo desempenho da simbiose não são claras (Souza et al., 2012). A nodulação e/ou a eficiência do processo de FBN podem ser restringidas por diversas condições ambientais, que podem afetar a ocorrência de populações nativas de bactérias (Bala et al., 2003) ou a eficiência do processo, mesmo na presença de populações de rizóbios compatíveis (Faye et al, 2007).

O objetivo desse trabalho foi determinar a ocorrência e a eficiência das populações de rizóbios nativas de áreas com diferentes tempos de

regeneração da caatinga, capazes de formar simbiose com leguminosas arbóreas nodulantes nativas da região (jurema preta, jurema branca e angico).

MATERIAIS E MÉTODOS

Área do estudo e amostragem do solo

Foram coletadas amostras de solo em áreas com diferentes tempos de regeneração da vegetação nativa e áreas de vegetação de caatinga madura, localizadas na Fazenda Tamanduá, município de Santa Terezinha (PB). A área estudada está situada entre as latitudes 06°59'13" e 07°00'14"S e as longitudes 37°18'08" e 37°20'38"O, com altitude entre 250 e 350 m acima do nível do mar. O clima da região é do tipo Bsh, definido como semiárido quente e seco de acordo com a classificação de Köppen. A precipitação média anual é de cerca de 600 mm, com grande variação de ano para ano, concentrados em três meses, geralmente de março a maio. A temperatura média anual é de 28 °C, com poucas flutuações sazonais e diárias. O tipo de solo na área de estudo é o Neossolo Litólico.

Foram selecionadas três áreas para cada um de três tempos de regeneração (4 anos, 19 anos e >60 anos), que foram consideradas como repetições, totalizando nove áreas amostradas. Essas áreas estão localizadas aproximadamente na mesma altitude, apresentando o mesmo tipo de solo e distando menos de 3 km uma das outras. Todas foram cercadas quatro anos antes da amostragem do solo, que ocorreu em 2011, para evitar a entrada de animais. Os quatro tempos de regeneração e os respectivos históricos de uso das áreas estudadas foram: 1) áreas com 4 anos de regeneração: sofreram corte da vegetação nativa no ano de 1965 e foram cultivadas com algodão arbóreo até o ano de 1970, quando foram plantadas com *Cenchrus ciliaris* L. (capim buffel) e utilizadas como pastagem até 2007. Essas áreas apresentam-se cobertas com vegetação herbácea; 2) áreas com 19 anos de regeneração, plantadas com algodão e *C. ciliaris* nas mesmas épocas das áreas descritas anteriormente, mas abandonadas em 1992. Apresentam-se dominadas por

uma única espécie de leguminosa arbórea (jurema preta), com projeção total de copas de 6045 m² ha⁻¹; 3) áreas designadas como > 60-anos com vegetação de caatinga madura, sem corte ou outro tipo de distúrbio desde pelo menos 1950. Essas áreas estão cobertas com arbustos e árvores com projeção de copa de 8458 m² ha⁻¹ (Souza et al 2012).

Nas áreas estudadas ocorrem 10 espécies de leguminosas herbáceas (*Arachis pusilla* Benth., *Centrosema brasilianum* (L.) Benth, *Centrosema pascuorum* Mart. ex Benth, *Chamaecrista nictitans* (L.) Moench, *Chamaecrista serpens* (L.) Greene, *Macroptilium gracile* (Poepp. ex Benth) Urb., *Stylosanthes humilis* Kunth, *Senna obtusifolia* (L.) H.S. Irwin & Barneby e duas espécies não identificadas) (Freitas et al. 2012). Ocorreram também leguminosas arbóreas (*Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir, *Piptadenia stipulacea* [Benth.] Ducke, *Anadenanthera colubrina* [Vell.] Brenan, *Caesalpinia pyramidalis* Tul.) (Souza et al. 2012).

As amostras de solo foram coletadas dentro de cada área na camada de 0 a 20 cm, de maneira inteiramente casualizada. Para cada área foram coletadas 5 amostras compostas de solo, obtidas a partir de 10 amostras simples. As amostras de solo foram homogeneizadas, peneiradas (5 mm) e utilizadas para realização do experimento em casa-de-vegetação. Subamostras foram separadas para análises físicas e químicas, de acordo com a metodologia da EMBRAPA (1997).

Tabela 1. Características do solo em áreas de caatinga com diferentes tempos de regeneração no Nordeste do Brasil.

Tempos (anos)	pH	P	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	C	N	----- g kg ⁻¹ -----		
									Areia	Silte	Argila
		mg kg ⁻¹	----- cmol _c kg ⁻¹ -----								
4	5.86b	2.72a	0.25b	0.12a	4.31a	1.37a	8.37c	0.70c	638a	93a	269a
19	5.94b	1.55a	0.29ab	0.11a	5.02a	1.66a	8.61c	0.78c	645a	117a	239a
41	5.79b	1.65a	0.31a	0.13a	3.91a	1.29a	14.10a	1.18a	668a	93a	239a
>60	6.41a	2.62a	0.29ab	0.11a	5.22a	1.36a	11.62b	1.06b	648a	123a	229a

Médias seguidas pelas mesmas letras, nas colunas, não são significativamente diferentes ao nível de 0,05 de probabilidade pelo teste de Tuckey.

Avaliação da eficiência das bactérias formadoras de nódulos em leguminosas

Delineamento experimental

Foi conduzido um experimento em casa-de-vegetação utilizando um delineamento em blocos ao acaso, com 3 repetições, para cada uma das 12 parcelas amostradas. As leguminosas arbóreas jurema preta (*Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir), jurema branca (*Piptadenia stipulacea* [Benth.] Ducke) e angico (*Anadenanthera colubrina* [Vell.] Brenan) foram cultivadas em vasos contendo 2 kg de mistura solo: areia (lavada e autoclavada), na proporção 1:1. Vasos extras foram preparados, para cada uma das áreas estudadas, e cultivados com mororó (*Bauhinia cheilanta*) e canafístula (*Sena* sp), leguminosas arbóreas não nodulantes que foram utilizadas como plantas controle para estimativa da FBN. As sementes foram desinfestadas com álcool etílico a 70%, por 30 segundos, e com hipoclorito de sódio a 1%, por 1 minuto. Em seguida foram lavadas com água destilada seis vezes por 30 segundos. Foram semeadas quatro sementes por vaso. Aos 10 dias após o plantio foi realizado o desbaste das plântulas, mantendo duas plantas por vaso.

A colheita foi realizada aos 120 dias após o plantio. A parte aérea das plantas foi separada das raízes, das quais foram coletados os nódulos, que foram armazenados em sílica gel para determinação da biomassa seca e posterior isolamento das bactérias. A parte aérea de cada planta foi seca em estufa (60°C), para determinação da biomassa seca, e preparada para determinação dos teores de N total, pelo método micro Kjeldahl, de ^{15}N , por espectrometria de massa.

O N total foi expresso em % e os teores de ^{15}N , em unidades de “delta”, que é o desvio por mil (‰) da abundância de ^{15}N da amostra em relação ao N_2 atmosférico, tomado como padrão:

$$\delta = (R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}} - 1) \times 1000$$

onde R_{amostra} e $R_{\text{padrão}}$ são as razões $^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$ da amostra e do padrão (N_2 atmosférico), respectivamente.

Para estimar a fixação biológica do nitrogênio nas leguminosas nodulantes, foi utilizado o método da abundância natural do ^{15}N . O percentual de nitrogênio da planta derivado do ar (%Ndda) foi calculado utilizando a fórmula descrita por Shearer e Kohl (1986):

$$\%Ndda = [(\delta^{15}\text{N}_{(\text{referência})} - \delta^{15}\text{N}_{(\text{fixadora})}) / \delta^{15}\text{N}_{(\text{referência})} - B] \times 100$$

onde $\delta^{15}\text{N}_{(\text{referência})}$ é o valor médio dos $\delta^{15}\text{N}$ das plantas de referência (canafístula e mororó) em cada tratamento, $\delta^{15}\text{N}_{(\text{fixadora})}$ é o valor médio de $\delta^{15}\text{N}$ de cada leguminosa (jurema branca, jurema preta e angico) para cada parcela e B é o valor de $\delta^{15}\text{N}$ para plantas fixadoras cultivadas na ausência de N. Foi utilizado o valor $B = -1,5\text{‰}$, determinado por Reis Jr et al (2010) para o sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*).

O conteúdo de N total na biomassa aérea das plantas foi determinado através do produto do teor deste nutriente e da biomassa seca da parte aérea. A quantidade de N fixado, na parte aérea das plantas, foi estimada multiplicando o valor de %Ndda pelo conteúdo de N de cada planta.

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise da variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, no nível de 5 % de probabilidade. Cada tempo de regeneração foi considerado um tratamento de efeito fixo e as médias foram calculadas considerando, para cada tempo de regeneração, todas as repetições das áreas e dos vasos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Mimosa tenuiflora teve nodulação abundante (variando entre 119-327 nódulos), independente do tempo de regeneração (tabela 2), confirmando o relato de Reis Jr et al. (2010) que verificaram alta capacidade de nodulação de *Mimosa* spp. com bactérias nativas de solos de cerrado e caatinga. A nodulação das outras duas espécies foi insignificante. O menor número de nódulos foi observado em *Piptadenia stipulacea* cultivada no solo da área com 19 anos de regeneração e em *Anadenathera columbrina* cultivada em solo da área com mais de 60 anos de regeneração. A biomassa seca dos nódulos foi condizente com o número de nódulos, porém o tamanho dos nódulos, estimado pela biomassa específica, foi bem maior em *Anadenathera columbrina*. Os resultados de nodulação podem indicar que as áreas com diferentes tempos de regeneração apresentam bactérias nativas com maior ou menor especificidade por determinado hospedeiro. Quanto às biomassas da parte aérea e raiz, o padrão de resposta foi parecido com o de nódulos, sendo as maiores biomassas de *Mimosa tenuiflora* (tabela 3). Os tempos de regeneração da caatinga influenciaram na biomassa da parte aérea e de raiz, sendo o maior valor de biomassa encontrado no menor tempo de regeneração. Porém não houve influência dos tempos em *Piptadenia stipulacea* e *Anadenathera columbrina*.

Tabela 2: Nodulação de *Mimosa tenuiflora*, *Piptadenia stipulacea* e *Anadenathera columbrina* cultivados em vasos com 2Kg de Neossolo Litólico coletados em áreas com diferentes períodos de regeneração da vegetação natural no semiárido da Paraíba

Tempos de regeneração (anos)	n	Número de nódulos	Biomassa seca dos nódulos (g)	Biomassa específica dos nódulos (mg)
<i>Mimosa tenuiflora</i>				
4	9	327 aA	0,49 aA	1,66 aA
19	9	119 aA	0,18 aB	1,51 aA
>60	6	174 aA	0,25 aB	1,52 abA
<i>Piptadenia stipulacea</i>				
4	8	3 bA	0,03 bA	6,15 aA
19	9	0,11 cA	0,001 aA	1 aB
>60	9	5 bA	0,05 bA	5,47 aAB
<i>Anadenathera columbrina</i>				
4	8	2 bAB	0,01 bA	1,07 aA
19	8	13 bA	0,02 aA	0,71 aA
>60	6	1 bB	0,01 bA	1,00 bA

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula entre as espécies vegetais e maiúscula entre os tempos de regeneração, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 3: Biomassa da parte aérea e de raiz de *Mimosa tenuiflora*, *Piptadenia stipulacea* e *Anadenathera columbrina* cultivados em vasos com 2Kg de Neossolo Litólico coletados em áreas com diferentes períodos de regeneração da vegetação natural no semiárido da Paraíba.

Tempos de regeneração (anos)	n	Biomassa seca da parte aérea (g)	Biomassa seca das raízes (g)
<i>Mimosa tenuiflora</i>			
4	9	5,56 aA	3,00 aA
19	9	3,02 aB	1,72 aB
>60	6	3,11 aB	2,02 aAB
<i>Piptadenia stipulacea</i>			
4	8	1,42 bA	0,94 bA
19	9	0,61 bA	0,47 bA
>60	9	0,87 bA	0,45 bA
<i>Anadenathera columbrina</i>			
4	8	0,41 bA	1,40 bA
19	8	0,46 bA	1,22 abA
>60	6	0,44 bA	1,18 abA

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula entre as espécies vegetais e maiúscula entre os tempos de regeneração, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Apenas *Sena spectabilis* diferiu estatisticamente das demais. Quanto à concentração de N na biomassa de parte aérea, quando cultivada em solo da área com mais de 60 anos de regeneração (Tabela 4). Houve variação entre 1,65 e 2,30% na concentração de N na biomassa de plantas nodulantes (*Mimosa tenuiflora*, *Piptadenia stipulacea*, *Anadenathera columbrina*), e de 1,71 e 2,95% nas plantas não nodulantes ou plantas de referência (*Sena spectabilis* e *Bauhinia cheilanta*).

Tabela 4: Concentração de nitrogênio (%) na biomassa aérea de plantas nodulantes e não nodulantes cultivadas em vasos com 2Kg de Neossolo Litólico coletados em áreas com diferentes tempos de regeneração da vegetação natural no semiárido da Paraíba.

Espécies	Tempos de regeneração (anos)		
	4	19	>60
<i>Mimosa tenuiflora</i>	1,80 aA	1,93 aA	1,75 bA
<i>Piptadenia stipulacea</i>	1,64 aA	1,92 aA	1,65 bA
<i>Anadenathera columbrina</i>	2,30 aA	1,85 aA	1,78 bA
<i>Sena spectabilis</i>	2,41 aAB	1,82 aB	2,95 aA
<i>Bauhinia cheilanta</i>	1,79 aA	1,83 aA	1,71 bA

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ médios nas folhas de *Sena spectabilis* e *Bauhinia cheilanta* foram elevados nas três áreas: 8,31‰ na área com 4 anos, 8,06‰ na área com 19 anos e 6,37‰ para área com mais de 60 anos de regeneração (tabela 5). Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ da *Mimosa tenuiflora* e das referências diferiram por mais de duas unidades de $\delta^{15}\text{N}$ ‰, permitindo segurança nas estimativas da fixação biológica de nitrogênio (Högberg, 1997). Portanto procedeu-se o cálculo de N_{dda} (nitrogênio derivado da atmosfera) e N_{fix} (nitrogênio fixado) apenas para *Mimosa tenuiflora*. Já os valores de $\delta^{15}\text{N}$ apresentados por *Piptadenia stipulacea* e *Anadenathera columbrina* não diferiram estatisticamente das plantas não nodulantes, ou referências. Esse padrão de composição isotópica de nitrogênio também foi encontrado por Freitas et al. (2010) em plantas arbóreas da caatinga. O efeito da discriminação isotópica associada ao processo de fixação biológica do nitrogênio é muito pequeno, portanto, o impacto de usar B=0 ou B=-1,51‰ nas estimativas do %N_{dda} é de apenas poucas unidades percentuais. Por esta razão, para maior simplicidade, optou-

se por apresentar apenas os resultados utilizando B = -1,51‰, que são mais conservadores, possivelmente subestimando um pouco as quantidades de nitrogênio fixadas.

Tabela 5: Abundância natural de ^{15}N (‰) em folhas de plantas nodulantes e não nodulantes cultivadas em vasos com 2Kg de Neossolo Litólico coletados em áreas com diferentes períodos de regeneração da vegetação natural no semiárido da Paraíba.

Espécies	Tempos de regeneração (anos)		
	4	19	>60
Referência arbórea	8,31 (6)	8,06 (6)	6,37 (4)
<i>Sena spectabilis</i>	8,45 (3)	8,94 (3)	8,94 (3)
<i>Bauhinia cheilanta</i>	8,17 (3)	7,18 (3)	5,51 (3)
Nodulantes			
<i>Mimosa tenuiflora</i>	1,44 (3)**	0,02 (3)**	0,26 (3)**
<i>Piptadenia stipulacea</i>	7,35 (3)	6,36 (3)	5,87 (3)
<i>Anadenanthera colubrina</i>	7,37 (3)	5,91 (3)	7,06 (3)

¹ números entre parêntesis referem-se ao número de análises, pois foi feita uma amostra composta, devido a pouca biomassa e ao custo das análises.

** estatisticamente diferente da média das espécies referência

A fixação biológica de nitrogênio contribuiu com a nutrição nitrogenada de *Mimosa tenuiflora* nas três áreas estudadas, sendo encontradas altas proporções do nitrogênio nas plantas, chegando a 86% (tabela 6). Freitas et al. (2011) encontraram proporções de até 85% em estudos com forrageiras em solos do semiárido paraibano. Adjei-Nsiah et al. (2008) em estudo com feijão caupi, encontraram valores de %N_{dda} em torno de 70%. Souza et al. (2012) trabalharam com solos de áreas de caatinga em diferentes tempos de regeneração, e perceberam o melhor desempenho e capacidade de fixação de nitrogênio em *Mimosa tenuiflora*, com proporções de nitrogênio derivado da atmosfera em torno de 62%. A maior quantidade de N acumulado na biomassa das plantas cultivadas foi encontrado na área com 4 anos de regeneração, cerca de 70 mg.planta⁻¹ (Tabela 7). Apesar do reconhecimento da importância da FBN para restabelecimento da vegetação nativa, as estimativas da quantidade de nitrogênio fixado via simbiose em áreas de caatinga são quase inexistentes.

Tabela 6: Concentrações de N, Nitrogênio derivado da atmosfera (Ndda) e nitrogênio fixado (Nfix) por *Mimosa tenuiflora* cultivada em vasos com 2Kg de Neossolo Litólico coletados em áreas com diferentes períodos de regeneração da vegetação natural no semiárido da Paraíba.

Tempos de regeneração (anos)	N (%)	Ndda (%)*	Nfix (mg.planta ⁻¹)*
4	1,80 a	72,0 a	70,1 a
19	1,93 a	86,5 a	50,4 a
>60	1,75 a	80,3 a	45,6 a

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

*Ndda e Nfix usando o valor B=-1,5%

Tabela 7: Nitrogênio acumulado na biomassa de leguminosas fixadoras (*Mimosa tenuiflora*, *Piptadenia stipulacea* e *Anadenathera columbrina*) cultivadas em vasos com 2Kg de Neossolo Litólico coletado em áreas com diferentes períodos de regeneração da vegetação natural no semiárido da Paraíba.

Tempos de regeneração	N acumulado (mg)
4 anos	35,8 a
19 anos	19,7 b
>60 anos	20,2 b

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

CONCLUSÕES

A fixação biológica de nitrogênio contribuiu com a nutrição nitrogenada de *Mimosa tenuiflora* nas três áreas estudadas. Mas não com as de *Piptadenia stipulacea* e *Anadenathera columbrina* que formaram poucos nódulos, aparentemente não funcionais. O maior valor de nitrogênio acumulado na biomassa das plantas cultivadas foi alcançado quando elas foram cultivadas em solos da área com quatro anos de regeneração da vegetação da caatinga.

REFERÊNCIAS

ADJEI-NSIAH S, KUYPER TW, LEEUWIS C, ABEKOE MK, COBBINAH J, SAKYI-DAWSON O, GILLER KE (2008) Farmers' agronomic and social evaluation of productivity, yield and N₂-fixation in different cowpea varieties and their subsequent residual N effects on a succeeding maize crop. *Nutr Cycl Agroecosyst*, v. 80, 199–209 p.

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

ALCOFORADO-FILHO, F.G., SAMPAIO, E.V.S.B., RODAL, M.J.N. (2003) Florística e fitossociologia de um Remanescente de vegetação caducifólia espinhosa arbórea em Carururu, Pernambuco, *Acta Bot. Brasilica*, v. 17, 287 p.

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

EMBRAPA (1997). *Manual de Métodos de análises de solo*. 2^a ed. Rio de Janeiro, 212p.

FAYE, A.; SALL, S.; CHOTTE, J.L.; LESUEUR, D. (2007) Soil bio-functioning under *Acacia nilotica* var. *tomentosa* protected forest along the Senegal River. *Nutr Cycl. Agroecosist*, v. 79, 35-44 p.

FREITAS, A.D.S., SAMPAIO, E. V.S.B., SILVA, B.L.R., ALMEIDA CORTEZ, J.S., MENEZES, R.S. C. (2012) How much nitrogen is fixed by biological symbiosis in tropical dry forests? 2. Herbs. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*.1 – 12 p.

FREITAS A.D.S.; SAMPAIO E.V.S.B.; FERNANDES A.R.; SANTOS, C.E.R.S. (2010) Biological nitrogen fixation in legume trees of the Brazilian caatinga. *Journal of Arid Environments*, v. 74, 344-349 p.

HÖGBERG, P. (1997) ^{15}N natural abundance in soil-plant systems. *New Phytol* v. 137, 179–203 p.

NDIAYE, M., GANRY F (1997) Variation in the biological N_2 fixation by tree legumes in three ecological zones from the North to the south of Senegal. *Arid Soil Res Rehab*, v. 11, 245–254 p.

PEREIRA, I.M.; ANDRADE, L.A.; SAMPAIO, E.V.S.B.; BARBOSA, M.R.V. (2003) Use-history effects on structure and flora of Caatinga. *Biotropica*, v. 35, 154–165 p.

RADDAD, A.Y., SALIH, A.A., EL FADL, M., KAARAKKA, V., LUUKKANEN, O., (2005). Symbiotic nitrogen fixation in eighth *Acacia senegal* provenances in dryland clays of the Blue Nile Sudan estimated by the ^{15}N natural abundance method. *Plant and Soil*, v.275, 261-269 p.

REIS JÚNIOR, F. B.; SIMON, M. F.; GROSS, E.; BODDEY, R. M.; ELLIOTT, N. G.; NETO, N. E.; LOUREIRO, M. F.; QUEIROZ, L. P.; SCOTTI, M. R.; CHEN, W. M.; NORÉN, A.; RUBIO, M. C.; FARIA, S. M.; BONTEMPS, C.; GOI, S. R.; YOUNG, J. P. W.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. (2010) Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. *New Phytologist*, v.186, n.4, 934-946 p.

SAMPAIO, E.V.S.B.; ARAÚJO, E.L.; SALCEDO, I.H.; TIESSEN, H. (1998) Regeneração da vegetação de caatinga após corte e queima, em Serra Talhada, PE. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 33, 621-632 p.

SAMPAIO, E.V.S.B. Fitossociologia. In: SAMPAIO, E.V.S.B.; MAYO, S.J.; BARBOSA, M.R.V. (1996) Pesquisa botânica nordestina: progresso e perspectivas. Recife, Sociedade Botânica do Brasil, 203-224 p.

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

SHEARER G, KOHL DH, VIRGINIA RA, BRYAN BA, SKEETERS JL, NILSEN ET, SHARIFE MR, RUNDEL PW (1983) Estimates of N₂-fixation from variation in the natural abundance of ¹⁵N in Sonoran Desert ecosystems. Ecologia v. 56, 365–373 p.

SOUZA, L.Q., FREITAS, A.D.S., SAMPAIO, E.V.S.B., MOURA, P.M., MENEZES, R.S.C. (2012) How much nitrogen is fixed by tropical dry forest? 1. Trees and shrubs. Nutr. Cycl. Agroecosyst.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo com diversidade de bactérias que formam nódulos em leguminosas, nativas de áreas de caatinga em regeneração, ainda são bastante escassos. Portanto o presente trabalho vem contribuir com elucidações acerca de fatores que interferem na fixação biológica do nitrogênio nessas áreas onde não há intervenção do homem. Ou seja, em áreas de regeneração natural da vegetação nativa. Nesse trabalho notamos que a Área de caatinga madura possui maior diversidade de bactérias capazes de formar nódulos em *Vigna unguiculata*. E, dentre as leguminosas arbóreas nodulantes estudadas, apenas *Mimosa tenuiflora* apresentou valores de $\delta^{15}\text{N}$ estatisticamente diferentes das plantas não nodulantes, ou plantas de referência. Quanto às bactérias capazes de formar nódulos em leguminosas, as nativas da área com menor tempo de regeneração, apresentou maior capacidade de fixar nitrogênio tanto em *Vigna unguiculata* como em *Mimosa tenuiflora*.

APÊNDICES

Apêndice 1: Quantidade de isolados por grupos formados a 75% de similaridade, para área com 4 anos de regeneração da caatinga

Grupos	Quantidade de isolados
1	33
2	58
3	7
4	9
5	2
6	1
7	4
8	5
9	2
10	7
11	1
12	2

Apêndice 2: Quantidade de isolados por grupos formados a 75% de similaridade, para área com 19 anos de regeneração da caatinga

Grupos	Quantidade de isolados
1	9
2	9
3	2
4	3
5	6
6	12
7	3
8	42
9	2
10	1
11	1
12	1
13	1
14	1
15	1

Apêndice 3: Quantidade de isolados por grupos formados a 75% de similaridade, para área com 41 anos de regeneração da caatinga.

Grupos	Quantidade de isolados
1	64
2	10
3	22
4	7
5	6
6	2
7	6
8	4
9	4
10	1

Apêndice 4: Quantidade de isolados por grupos formados a 75% de similaridade, para área com mais de 60 anos de regeneração da caatinga.

Grupos	Quantidade de isolados
1	4
2	9
3	36
4	12
5	5
6	4
7	3
8	1
9	22
10	4
11	1
12	3
13	1
14	2
15	2
16	1