

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

CURSO DE LICENCIATURA PLENA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**OCORRÊNCIA E POTENCIAL SIMBIÓTICO DE POPULAÇÕES DE RIZÓBIOS
NATIVAS DE SOLOS DO SEMIÁRIDO**

ANDRESSA SILVA DE OLIVEIRA

RECIFE

2019

ANDRESSA SILVA DE OLIVEIRA

**OCORRÊNCIA E POTENCIAL SIMBIÓTICO DE POPULAÇÕES DE RIZÓBIOS
NATIVAS DE SOLOS DO SEMIÁRIDO**

Monografia apresentada ao
Curso de Licenciatura Plena em
Ciências Biológicas/UFRPE
como requisito parcial para
obtenção do grau de Licenciado
em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Ana Dolores
Santiago de Freitas

RECIFE

2019

ANDRESSA SILVA DE OLIVEIRA

**OCORRÊNCIA E POTENCIAL SIMBIÓTICO DE POPULAÇÕES DE
RIZÓBIOS NATIVAS DE SOLOS DO SEMIÁRIDO**

Comissão Avaliadora:

Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas – UFRPE
Orientadora

Dra. Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos – UFRPE
Titular

Dr. Vinícius Santos Gomes da Silva – IFPE
Titular

MS. Edilândia Farias Dantas– UFPE
Suplente

RECIFE
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

- O48o Oliveira, Andressa Silva de.
Ocorrência e potencial simbiótico de populações de rizóbios
Nativas de solos do semiárido / Andressa Silva de Oliveira. – Recife,
2019.
38 f.: il.
- Orientador(a) : Ana Dolores Santiago de Freitas.
Coorientador(a) : Aleksandro Ferreira da Silva
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento em Ciências
Biológicas, Recife, BR-PE, 2019.
Inclui referências.
1. Bactérias de nódulos 2. Fixação biológica de nitrogênio
3. Simbiose I. Freitas, Ana Dolores Santiago de, orient. II. Silva,
Aleksandro Ferreira da, coorient. II. Título

CDD 574

“Que todos os nossos esforços estejam sempre focados no desafio à impossibilidade. Todas as grandes conquistas humanas vieram daquilo que parecia impossível.”

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu coragem para vencer todos os obstáculos e dificuldades enfrentadas durante o curso, que me socorreu espiritualmente, dando-me serenidade e forças para continuar.

Agradeço à minha família, em especial a minha mãe Verônica, que foi protagonista deste momento. Pelo esforço contínuo para que tudo fosse possível, pelas dificuldades enfrentadas e pela confiança depositada em mim. A minha avó Marieta por cultivar em mim, valores que me transformaram na pessoa que sou. Aos meus tios Paulo, Jorge, Vânia e Jacira por todo carinho e amor. Ao meu irmão Anderson, Cunhada Fernanda e prima Vanessa pela amizade, por todos os conselhos, incentivo e cumplicidade durante o curso.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, por todo acolhimento e oportunidades concedidas.

À minha orientadora Ana Dolores, por toda dedicação, presteza e competência com que conduz sua profissão meu muito obrigada pelos ensinamentos, pela orientação e por todo o carinho e amor recebido durante esses anos.

A todos do Grupo de Fixação Biológica de Nitrogênio, em especial a Vinícius e Aleksandro, pela amizade e contribuição profissional e pessoal, meus sinceros agradecimentos.

Agradeço também aos meus colegas de sala, especialmente a três queridos amigos, Pablo, Anthony e Marcos, pela amizade concedida e pela oportunidade maravilhosa de poder compartilhar tantos momentos juntos.

Com toda certeza, isto foi resultado de um esforço coletivo. Obrigada a todos, essa vitória também é de vocês.

Dedico esta monografia
a minha mãe, pelo exemplo
de coragem e simplicidade
que com muito carinho e dedicação
me ensinou a correr atrás
dos meus sonhos.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. OBJETIVOS	03
1.1.1. Objetivo geral	
1.1.2. Objetivo específico	
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	04
2.1. A Caatinga: caracterização geral do bioma.....	05
2.2. Leguminosas da Caatinga	06
2.3. Feijão-caupi: aspectos gerais.....	07
2.4. Fixação biológica de nitrogênio em leguminosas	07
3. METODOLOGIA	08
3.1. Descrição, localização e coletas dos solos.....	08
3.2. Experimento com planta isca para obtenção dos nódulos radiculares	10
3.3. Isolamento e caracterização morfofisiológica dos isolados bacterianos.....	11
3.4. Autenticação dos isolados pela capacidade de renodular seus hospedeiros de origem e teste de eficiência.....	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
4.1. Descrição, localização e coletas dos solos.....	16
4.2. Experimento com planta isca para obtenção dos nódulos radiculares.....	20
4.3. Autenticação dos isolados pela capacidade de renodular seus hospedeiros de origem e teste de eficiência.....	22
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	24
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informações gerais dos municípios de coleta distribuídos nas zonas climáticas (ZC) do Agreste e Sertão, Semiárido do estado de Pernambuco, Brasil.....	09
--	-----------

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Distribuição dos pontos de coleta no Semiárido de Pernambuco..... **08**
- Figura 2:** Nódulo de feijão-caupi oriundos de solos do Semiárido do estado de Pernambuco, Brasil..... **10**
- Figura 3 -** Visão geral do experimento conduzido com feijão-caupi para acessar comunidades rizobianas nativas de solos do Semiárido do estado de Pernambuco, Brasil..... **11**
- Figura 4:** Caracterização morfofisiológica das bactérias..... **13**
- Figura 5:** Visão geral do experimento conduzido com feijão-caupi para eficiência dos isolados e capacidade de re-nodular seu hospedeiro de origem..... **15**
- Figura 6 -** Número de nódulos de feijão-caupi cultivado em 7 classes de solo do Semiárido de Pernambuco (NL: Neossolo Litólico; LUV: Luvisolo; ARG: Argissolo; PLA: Planossolo; NR: Neossolo Regolítico; LA: Latossolo; NQ: Neossolo Quartzarênico)..... **16**
- Figura 7 -** Massa seca da parte aérea de feijão-caupi cultivado em 7 classes de solo do Semiárido de Pernambuco (NL: Neossolo Litólico; LUV: Luvisolo; ARG: Argissolo; PLA: Planossolo; NR: Neossolo Regolítico; LA: Latossolo; NQ: Neossolo Quartzarênico)..... **17**
- Figura 8 -** Massa seca de nódulos de feijão-caupi cultivado em 7 classes de solo do semiárido de Pernambuco (NL: Neossolo Litólico; LUV: Luvisolo; ARG: Argissolo; PLA: Planossolo; NR: Neossolo Regolítico; LA: Latossolo; NQ: Neossolo Quartzarênico)..... **19**
- Figura 9 -** Massa seca de raiz de feijão-caupi cultivado em 7 classes de solo do

semiárido de Pernambuco (NL: Neossolo Litólico; LUV: Luvissolo; ARG: Argissolo; PLA: Planossolo; NR: Neossolo Regolítico; LA: Latossolo; NQ: Neossolo Quartzarênico)..... **19**

Figura 10 - Distribuição de isolados de rizóbios de nódulos de feijão-caupi nativos de solos do Semiárido de Pernambuco em função do tempo de crescimento..... **20**

Figura 11 - Distribuição de isolados de rizóbios de nódulos de feijão-caupi nativos de solos do Semiárido de Pernambuco em função da alteração do pH em meio de cultura..... **21**

Figura 12 - Distribuição de isolados de rizóbios de nódulos de feijão-caupi nativos de solos do Semiárido de Pernambuco em função da quantidade de muco (exopolissacarídeos)..... **23**

Ocorrência e potencial simbiótico de populações de rizóbios nativas de solos do Semiárido

RESUMO

O uso de bactérias fixadoras de nitrogênio por meio da simbiose rizóbio-leguminosa é uma solução de base sustentável para reduzir os possíveis impactos ambientais causados pelo uso de fertilizantes industrializados e queima de combustíveis fósseis. Para isso, é necessário selecionar rizóbios eficientes e adaptados às condições edafoclimáticas de cada região. Sendo assim, este trabalho objetivou avaliar a ocorrência e o potencial simbiótico das populações de rizóbios de feijão-caupi naturalmente estabelecidas em solos do Semiárido. Para a captura dos isolados foram selecionados pontos em áreas com cobertura de caatinga densa (com pouca interferência antrópica) e nas principais classes de solos ocorrentes no bioma: Argissolo, Neossolo Litólico, Neossolo Quartzarênico, Neossolo Regolítico, Latossolo, Luvisolo e Planossolo em diferentes municípios localizados no Agreste e no Sertão de Pernambuco. Foi conduzido um experimento em blocos casualizados, com três repetições utilizando como planta-isca foi o feijão-caupi (*Vigna unguiculata*(L.) Walp), variedade BRS Pujante. Cinco nódulos foram escolhidos aleatoriamente de cada repetição para se proceder ao isolamento. Após o isolamento e crescimento das colônias isoladas, foi realizada a caracterização morfofisiológica dos isolados avaliando a reação de pH em meio de cultura, tempo de crescimento e produção de exopolissacarídeos. Foram obtidos 338 isolados, em sua maioria de crescimento rápido, que acidificam o meio de cultura e produzem muito muco. Essas características já têm sido relatadas para bactérias nodulíferas de diferentes espécies de leguminosas nativas das regiões semiáridas do Brasil

Palavras-chaves: bactérias de nódulos, fixação biológica de nitrogênio, simbiose.

ABSTRACT

The use of nitrogen-fixing bacteria through the rhizobium-legume symbiosis is a sustainable baseline solution to reduce potential environmental impacts caused by the use of industrialized fertilizers and the burning of fossil fuels. For this, it is necessary to select efficient rhizobia adapted to the edaphoclimatic conditions of each region. Thus, this work aimed to evaluate the occurrence and symbiotic potential of the bean rhizobia populations naturally established in semi-arid soils. In order to capture the isolates, areas with dense caatinga cover (with little anthropic interference) and the main soil classes occurring in the biome were selected: Argissolo, Neolithic, Quartzarenic Neosol, Regolithic Neosol, Latosol, Luvisol and Planosol of different municipalities located in Agreste and Sertão de Pernambuco. A randomized block experiment with three replicates was conducted. The species used as plant-bait was cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), BRS Pujante variety. Five nodules were randomly chosen from each replicate to proceed to isolation. After the isolation and growth of the isolated colonies, the morphophysiological characterization of the isolates was evaluated, evaluating the reaction of pH in culture medium, growth time and exopolysaccharide production. Bean Cowpea developed normally, presenting 100% survival. For nodulation, in all soil classes studied, populations of rhizobia capable of nodulating the crop were observed. 338, mostly fast growing, were included that acidify the culture medium and have a lot of mucus. The characteristics have been used for these noduliferous species of different species of legumes natives of semi-arid regions of Brazil

Key words: nodule bacteria, nitrogen megafross, symbiosis.

1. INTRODUÇÃO

Ocupando um território de aproximadamente 850.000 km² (QUEIROZ, 2009), a caatinga é a principal formação vegetal do Semiárido brasileiro (LIMA JÚNIOR et al., 2014). Distribui-se por quase todos os estados da região Nordeste do Brasil (PiauÍ, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Alagoas, Sergipe, Bahia e Pernambuco), abrangendo ainda parte do norte do estado de Minas Gerais (ARAÚJO FILHO, 2013). Segundo Pareyn (2013), é a floresta seca mais extensa da América do Sul e tem seus limites inteiramente restritos ao território nacional. É considerado um ecossistema frágil por natureza (ALVES et al., 2009), facilmente degradável e de difícil recuperação devido a irregularidades das chuvas locais (NUNES et al., 2006).

A caatinga é constituída principalmente de espécies herbáceas, arbustivas e arbóreas de pequeno porte que geralmente são dotadas de espinhos (ARAÚJO FILHO, 2013). Cerca de 930 espécies já foram catalogadas, das quais 380 são endêmicas. Para Castro & Cavalcante (2011), o total de espécies vegetais da caatinga pode ultrapassar 2000. Neste Bioma, Fabaceae é uma das famílias mais importantes devido a sua grande contribuição para a diversidade florística (QUEIROZ, 2009). Estão catalogadas mais de 290 espécies de leguminosas, pertencentes a 77 gêneros, e com alto grau de endemismo. Além da importância para a flora da caatinga, a maioria das espécies da família assume grande importância por se beneficiarem da fixação biológica de nitrogênio (FBN) quando em associação com bactérias do grupo dos rizóbios.

Em ecossistemas naturais (CLEVELAND et al., 2010) e em sistemas agrícolas de subsistência, como os praticados predominantemente no Semiárido brasileiro, a FBN é a principal porta de entrada do nitrogênio (FREITAS et al., 2015). Na caatinga, a distribuição de leguminosas tem forte influência do tipo de substrato, com floras bem distintas entre áreas de embasamento cristalino ou sedimentos arenosos (COSTA et al., 2015). Juntamente com a variabilidade de condições edafoclimáticas, essa variabilidade na diversidade de espécies de leguminosas da caatinga pode estar proporcionando a manutenção de uma também igual diversa população de rizóbios nos solos do bioma, visto que as populações de rizóbios são

altamente influenciadas pela rizosfera. Estudos apontam que os solos do Semiárido brasileiro abrigam alta diversidade de rizóbio (SANTOS et al., 2007; MARTINS et al., 1997; TEIXEIRA et al., 2010; FREITAS et al., 2014), mas informações sobre a estrutura dessas populações em estudos mais representativos são escassas.

A simbiose rizóbio-leguminosa constitui o mais importante sistema simbiótico entre micro-organismos e plantas devido à eficiência do processo, amplitude e distribuição geográfica dos hospedeiros, redução do impacto econômico para a agricultura e redução dos impactos ambientais. Por ser o sistema simbiótico mais bem estudado, várias espécies de rizóbios já foram descritas e estão distribuídas em gêneros como: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Burkholderiae* *Microvirga* (BERRADA & BENBRAHIM, 2014).

A taxonomia dos rizóbios tem sofrido com mudanças significativas nas últimas décadas, e a diversidade desses micro-organismos tem sido estudada extensivamente, principalmente por conta da importância ecológica e econômica dessas bactérias. Em função da grande diversidade de espécies nativas de rizóbios que apresentam variabilidade na eficiência simbiótica da FBN, é necessária a obtenção de estirpes com alto desempenho, capazes de sobreviver no solo e competir pelos sítios de nodulação. Estudos dessa natureza são de grande relevância em regiões áridas e semiáridas por apresentarem condições edafoclimáticas adversas e permitirem a obtenção de micro-organismos mais adaptados e competitivos pelos sítios de nodulação.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Geral

Traçar um perfil das populações de microssimbiontes de feijão-caupi naturalmente estabelecidas em diferentes classes de solos do Semiárido de Pernambuco.

1.1.2. Específicos

- Avaliar a ocorrência e o potencial simbiótico das populações de rizóbios de feijão-caupi naturalmente estabelecidas em solos do Semiárido sob vegetação de caatinga.
- Determinar características fenotípicas desses isolados.
- Determinar a capacidade de nodular e a eficiência de promover o crescimento das plantas de isolados de nódulos de feijão-caupi nativos de solos do Semiárido de Pernambuco sob vegetação de caatinga;

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. A Caatinga: caracterização geral do bioma

O Nordeste do Brasil abrange uma área de aproximadamente 1.600.000 km² (PEREIRA FILHO & BAKKE, 2010). Dependendo da latitude e do relevo, é possível encontrar nesta região grande variação de formações vegetais (BARBOSA et al., 2006). Contudo, devido a sua extensão, a Caatinga é considerada o principal ecossistema da região (SOUZA, 2009). Sobrepondo-se em sua maior parte ao semiárido mais extenso da América do Sul (KILL et al., 2013) e à região também conhecida como “polígono das secas” (ARAÚJO & SOUZA, 2011), a Caatinga ocupa uma superfície de aproximadamente 850.000 km² (QUEIROZ, 2009).

A caatinga distribui-se por quase todos os estados da região Nordeste do Brasil, excetuando-se o estado do Maranhão, abrangendo ainda uma parte do norte do estado de Minas Gerais (ARAÚJO FILHO, 2013). Levando em consideração o espaço geográfico de 969.589,4 km² do Semiárido brasileiro (CASTRO & CAVALCANTE, 2011), o bioma chega a compor cerca de 88% desta região. Segundo Pareyn (2013), a caatinga é a floresta seca mais extensa da América do Sul e tem seus limites inteiramente restritos ao território nacional.

Embora esteja localizada no Semiárido nordestino, com clima quente e seco (TEIXEIRA, 2004), e uma evapotranspiração potencial que pode alcançar os 2700 mm anuais (ARAÚJO FILHO, 2013), a caatinga apresenta grande variedade de paisagens e relativa riqueza biológica (ARAÚJO & SILVA, 2010).

Os principais fatores que determinam a existência da caatinga são a escassez de água durante uma grande parte do ano e a irregularidade temporal na distribuição das chuvas (QUEIROZ, 2009). Seus índices pluviométricos são bastante baixos, com precipitações entre 250 e 800 mm ano⁻¹ (MAIA, 2012), geralmente concentradas em três a cinco meses (CASTRO & CAVALCANTE, 2011). O total das chuvas pode variar, ultrapassando 1000 mm em anos chuvosos e ficando abaixo de 200 mm em anos de seca (MAIA, 2012). Esta condição de sazonalidade climática delimita duas estações muito distintas: uma estação chuvosa curta, que dura de três a cinco meses, e uma

longa estação seca, que dura o restante do ano, podendo se estender por anos (LIMA, 2012). Além disso, o bioma é caracterizado por apresentar temperaturas médias anuais elevadas, em torno de 27°C (CASTRO & CAVALCANTE, 2011), embora nas serras e chapadas com altitudes acima de 500 m a temperatura média seja alguns graus menor (ALVES et al., 2009).

2.2. Leguminosas da caatinga

Incluindo mais de 19.000 espécies e 727 gêneros, a família Fabaceae (terceira maior família de angiospermas, após Orchidaceae e Asteraceae), apresenta ampla distribuição geográfica e compõe um dos principais e mais importantes grupos de vegetais do planeta. Do ponto de vista econômico, é superada apenas pelas gramíneas (QUEIROZ, 2009).

A maioria das espécies da família possui reconhecida importância ambiental, e muitas são cultivadas desde a antiguidade como alimentícias, forrageiras, oleaginosas, adubo verde, fornecedoras de celulose, melíferas, medicinais, florestais, ornamentais, etc. (MIOTTO, 2008). Uma característica marcante (típica da família) é apresentar o fruto do tipo legume, também conhecido como vagem. Dependendo de suas estruturas florais, as espécies podem estar distribuídas em três subfamílias muito distintas: Papilionoideae (Faboideae), Mimosoideae e Caesalpinioideae (JUDD et al., 2009).

Segundo Lima et al. (2014), no Brasil, são conhecidas 2764 espécies e 215 gêneros, sendo 1487 espécies e 16 gêneros considerados endêmicos. Na caatinga, Fabaceae é uma das famílias botânicas mais importantes devido a sua grande contribuição para a diversidade florística do bioma. Com isto, estão catalogadas 293 espécies, pertencentes a 77 gêneros, e com alto grau de endemismo (QUEIROZ, 2006). As leguminosas deste ecossistema apresentam uma grande diversidade de hábitos, indo desde árvores de grande porte até ervas anuais ou perenes ou, ainda, trepadeiras ou lianas (QUEIROZ, 2009).

Para a população rural do Semiárido, a utilização das leguminosas vai além da alimentação e ornamentação. Algumas espécies apresentam grande potencial para utilização madeireira, pastagens naturais, adubação verde, carvão, material para construção, produtos medicinais, recuperação de áreas degradadas e até mesmo fazem parte do folclore e de rituais religiosos

(QUEIROZ, 2009).

Ao longo dos últimos anos algumas espécies do bioma têm recebido particular atenção devido ao seu comprovado potencial simbiótico. A contribuição da FBN em espécies de ocorrência na caatinga como jurema preta e angico pode ser observada nos trabalhos de Freitas et al. (2010) e Souza et al. (2012). Nestes, os autores encontraram porcentagens de nitrogênio derivado da atmosfera (%N_{dda}) que ultrapassam os 50% para jurema preta. Para o angico a porcentagem foi superior a 45% (SOUZA et al., 2012) e 30% (FREITAS et al., 2010). Para outras espécies, como o mulungu, apesar de serem reconhecidamente capazes de nodulação, não há relatos da estimativa da FBN na literatura. Apenas trabalhos de caracterização morfológica e genética de seus microssimbiontes são descritos (MENEZES et al., 2013; SOUZA et al., 2013).

2.3. Feijão-caupi: aspectos gerais

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata*(L.)Walp), feijão-de-corda ou feijão-macassar é a principal fonte de proteína para os agricultores familiares das regiões Norte e Nordeste do Brasil. É uma cultura bastante versátil em termos de mercado, podendo ser comercializado na forma de grãos secos, grãos verdes ou vagens verdes, farinha para acarajé e sementes. (ANDRADE et al., 2005).

O feijão-caupi é a principal leguminosa cultivada no Nordeste, fazendo parte da dieta alimentar da maioria de famílias da região. Além disso, também é utilizado como forragem verde, feno, silagem, farinha para alimentação animal e, ainda, como adubação verde e proteção do solo (ANDRADE JÚNIOR, 2000).

2.4. Fixação biológica de nitrogênio em leguminosas

Em regiões semiáridas, um dos principais fatores limitantes da produtividade agrícola, é a deficiência de N, por ser um elemento essencial para as plantas, sendo constituinte de moléculas vitais. Yahdjian et al. (2011) relataram que uma alternativa para aumentar a produtividade sem aplicação de

fertilizantes químicos seria a inclusão de estirpes de rizóbios eficientes e adaptadas às condições locais e uso de espécies de leguminosas com potencial para a FBN.

Apesar de não ser uma característica comum a todas as leguminosas, a capacidade de nodular e realizar a FBN em simbiose com bactérias do grupo dos rizóbios é a grande particularidade ecológica das leguminosas (SANTOS et al., 2008). A presença de um complexo enzimático denominado nitrogenase, capaz de reduzir o N^2 à amônia (NH_3), é o que permite que esses micro-organismos sejam capazes de realizar a FBN. Este tipo de simbiose envolve a troca de benefícios entre o macro (leguminosa) e o microsimbionte (rizóbio), de modo que a planta assimila o amônio (NH_4^+) que é formado a partir da NH_3 fornecida pelas bactérias, e em troca fornece os carboidratos provenientes da atividade fotossintética como fonte de energia (LINDSTRÖM et al., 2010). Até o momento, sabe-se que os rizóbios pertencem, principalmente, às classes das alfa e beta-proteobactérias (BERRADA & BENBRAHIM, 2014).

Em função da importância que a FBN representa para o setor agrícola no Brasil e no mundo, diversas instituições de ensino e pesquisa tem buscado ao longo dos últimos anos a otimização da FBN em diversas culturas. Da mesma forma, em ecossistemas naturais, espécies arbóreas também têm sido estudadas quanto à capacidade de realizar a FBN. Esforços como estes podem ser observados nos trabalhos de Chagas Júnior et al. (2009) estudando a FBN em feijão-caupi na Amazônia Central; Cusak et al. (2009) avaliando a contribuição da FBN em duas florestas tropicais do Caribe; Marcondes et al. (2010) estudando a efetividade de isolados de nódulos de amendoim; Freitas et al. (2010) e Souza et al. (2012) com estudos de estimativas da FBN na caatinga

3. METODOLOGIA

3.1. Descrição e localização dos pontos amostrais e coleta dos solos

Para a amostragem, em cada área (total de 43) foram estabelecidas três parcelas com dimensões de 20 x 20 m, e em cada parcela foram coletadas três subamostras do horizonte superficial (camada de 0-20 cm) para compor a amostra composta da parcela, totalizando 129 pontos amostrais.

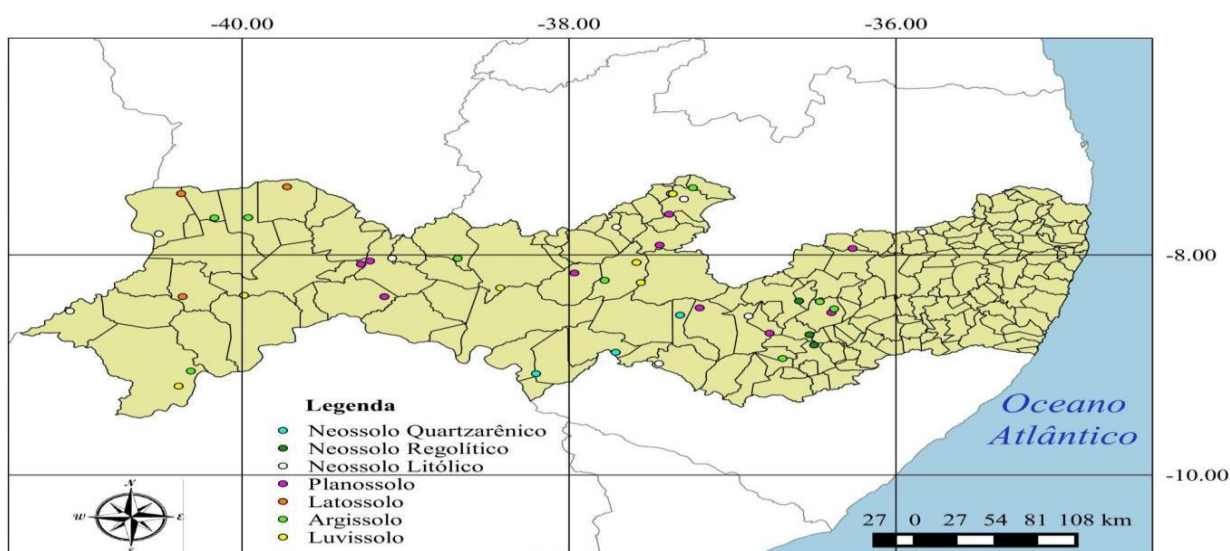


Figura 1: Distribuição dos pontos de coleta no Semiárido de Pernambuco

Cada amostra composta da parcela representou uma repetição no experimento em casa de vegetação. Após a coleta, as amostras de solo foram acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e armazenadas a temperatura ambiente. Utilizou-se 7 classes de solo (Neossolo litólico, Neossolo quartzarênico, Neossolo regolítico, Argissolo, Latossolo, Luvisolo e Planossolo) coletadas em áreas de caatinga densa de 36 municípios distribuídos pelo Agreste e Sertão de Pernambuco. As amostras de solo foram identificadas e armazenadas a temperatura ambiente pelo menor tempo possível (apenas o tempo necessário para os procedimentos de secagem, destorroamento, homogeneização e peneiramento (peneira com malha de abertura de 2 mm) até montagem do experimento de captura em casa de

vegetação. A fitofisionomia caatinga densa, com a vegetação em estágio menos perturbado, foi utilizada para padronizar o uso do solo entre as diferentes áreas amostrais.

Tabela 1 - Informações gerais dos municípios de coleta distribuídos nas zonas climáticas (ZC) do Agreste e Sertão, Semiárido do estado de Pernambuco, Brasil.

ZC	Municípios	Coordenadas	Altitude (m)	Precipitação média anual (mm)	Temperatura média anual
Agreste	Buíque	8° 36' 51" S / 37° 9' 39" W	846	691,4	21
	Capoeiras	8° 44' 7" S / 36° 37' 38" W	871	673,9	20,5
	Garanhuns	8° 53' 27" S / 36° 29' 48" W	841	873,1	20,4
	Itaíba	8° 56' 54" S / 37° 25' 37" W	465	627,1	22,9
	Pedra	8° 29' 50" S / 36° 56' 28" W	617	687,2	23
	Saloá	8° 57' 5" S / 36° 43' 22" W	943	894,9	21
	Sanharó	8° 21' 35" S / 36° 33' 59" W	661	644,3	24
	S.C. Capibaribe	7° 56' 32" S / 36° 13' 54" W	457	416,2	23,1
	S.B. Uma	8° 31' 20" S / 36° 26' 37" W	619	616,1	23,8
	Tupanatinga	8° 45' 12" S / 37° 20' 27" W	707	735,5	21,6
	Venturosa	8° 34' 33" S / 36° 52' 30" W	549	734,1	23
	V.Lério	7° 46' 17" S / 35° 51' 1" W	468	746,5	23,6
Sertão do Pajeú e Moxotó	Betânia	8° 16' 31" S / 38° 2' 15" W	429	497,2	24,5
	Custódia	8° 4' 55" S / 37° 38' 58" W	531	551,2	22,7
	Iguaracy	7° 50' 21" S / 37° 30' 37" W	565	611,9	22,7
	Inajá	8° 54' 14" S / 37° 49' 44" W	354	487,9	24
	Ingazeira	7° 40' 38" S / 37° 27' 34" W	528	583,7	23
	Itapetim	7° 22' 39" S / 37° 11' 26" W	629	643,9	23,7
	S. Terezinha	7° 22' 43" S / 37° 28' 52" W	796	647,4	22,9
	S.J Belmonte	7° 51' 37" S / 38° 45' 35" W	479	676	23,7
	S.J. Egito	7° 28' 49" S / 37° 16' 26" W	579	516,5	24
	S. Talhada	7° 59' 7" S / 38° 17' 34" W	443	647,5	23,8
	Tacaratu	9° 6' 9" S / 38° 8' 57" W	516	660,5	22,9
	Afrânio	8° 30' 42" S / 41° 0' 36" W	540	464,3	24,7
Sertão de Brígida e Terra Nova	Araripina	7° 34' 41" S / 40° 29' 48" W	621	758,8	23,7
	Bodocó	7° 46' 14" S / 39° 55' 41" W	449	685,7	24,7
	Cabrobó	8° 29' 40" S / 39° 18' 1" W	312	517,3	25,5
	Exú	7° 30' 50" S / 39° 42' 33" W	506	697,2	24,2
	Ipubi	7° 39' 41" S / 40° 8' 37" W	540	756,5	24,4
	Petrolina	9° 23' 39" S / 40° 30' 35" W	380	427,8	24,8
	Salgueiro	8° 4' 3" S / 39° 7' 27" W	421	570,6	24,2
	Santa Cruz	08° 14' 24" S / 40° 20' 05" W	515	502	24,3
	S.M.B. Vista	8° 47' 17" S / 39° 49' 22" W	407	492,9	24,7
	Terra Nova	8° 13' 50" S / 39° 23' 0" W	385	682,6	24,3
	Verdejante	7° 55' 7" S / 38° 58' 17" W	475	504,3	23,8

3.2. Experimento com planta isca para obtenção dos nódulos radiculares

As populações de rizóbios das amostras de solo foram acessadas em ensaios de promoção de crescimento de plantas-isca em casa de vegetação, utilizando vasos de polietileno. O delineamento experimental adotado foi o de blocos casualizados com três repetições. O feijão-caupi (*Vigna unguiculata*(L.) Walp), variedade BRS Pujante, foi utilizado como planta-isca e as sementes obtidas do Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA). Antes da semeadura as sementes foram desinfetadas superficialmente em álcool 98% por 3 minutos, hipoclorito de sódio 1% por 3 minutos e lavagens sucessivas em água estéril (COSTA et al., 2014). Quatro sementes foram semeadas por unidade experimental (vasos com capacidade para 2 kg). O desbaste foi realizado 15 dias após o plantio, deixando-se uma planta por vaso.



Figura 2: Nódulo de feijão-caupi oriundos de solos do Semiárido do estado de Pernambuco, Brasil

Na ocasião da coleta (45 dias após o plantio), as raízes foram separadas da parte aérea para a melhor obtenção dos nódulos. Após lavagem das raízes, os nódulos foram destacados, contados e armazenados em sílica gel para preservação e posterior isolamento das bactérias. As raízes e a parte aérea foram acondicionadas em sacos de papel e submetidas à secagem em estufa de circulação forçada de ar a 65°C por 72 h, sendo posteriormente pesadas após obtenção de peso constante. O potencial das populações de rizóbios foi estimado através da determinação da massa seca da parte aérea, número e biomassa seca de nódulos e teor de nitrogênio no tecido das plantas.



Figura 3 - Visão geral do experimento conduzido com feijão-caupi para acessar comunidades rizobianas nativas de solos do Semiárido do estado de Pernambuco, Brasil.

3.3. Isolamento e caracterização morfofisiológica dos isolados bacterianos

Cinco nódulos foram escolhidos aleatoriamente para cada repetição e reidratados com água destilada autoclavada por 60 minutos. Em capela de fluxo laminar, os nódulos foram desinfestados superficialmente com etanol

comercial por 30 segundos, para quebrar a tensão superficial, e hipoclorito de sódio (5%) por 5 minutos. Em seguida lavados 10 vezes com água destilada e autoclavada para remover o hipoclorito de sódio.

Com auxílio de uma pinça, antes dos nódulos serem pressionados em placa de Petri contendo meio YMA (pH 6.8) (VINCENT, 1970) com adição do corante vermelho congo (SOMASEGARAN & HOBEN, 1994), foram rolados em uma parte da placa para certificar que não havia nenhuma contaminação na parte externa dos nódulos. As placas foram incubadas em estufa tipo BOD a 28 °C até o aparecimento das colônias bacterianas.

Após o aparecimento das colônias características, os isolados foram transferidos para placas de Petri contendo meio YMA com azul de bromotimol como indicador de pH e incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente, por um período de até 10 dias, e o aparecimento das colônias sendo monitorado diariamente.

Os isolados foram caracterizadas quanto a reação de pH em meio de cultura (AC: ácida; AL: alcalina; N: neutra); tempo de crescimento (rápido – colônias isoladas aparecem até três dias depois de repicadas; intermediário – colônias aparecem de quatro a seis dias; e lento – colônias aparecem depois de seis dias) e quanto a presença de muco (sim ou não).

Depois de caracterizados, os isolados, devidamente identificados, foram estocados em tubos de polipropileno (com capacidade para 1,5 mL) contendo 1,0 mL de meio YM com glicerina (25%), para estudos subsequentes.

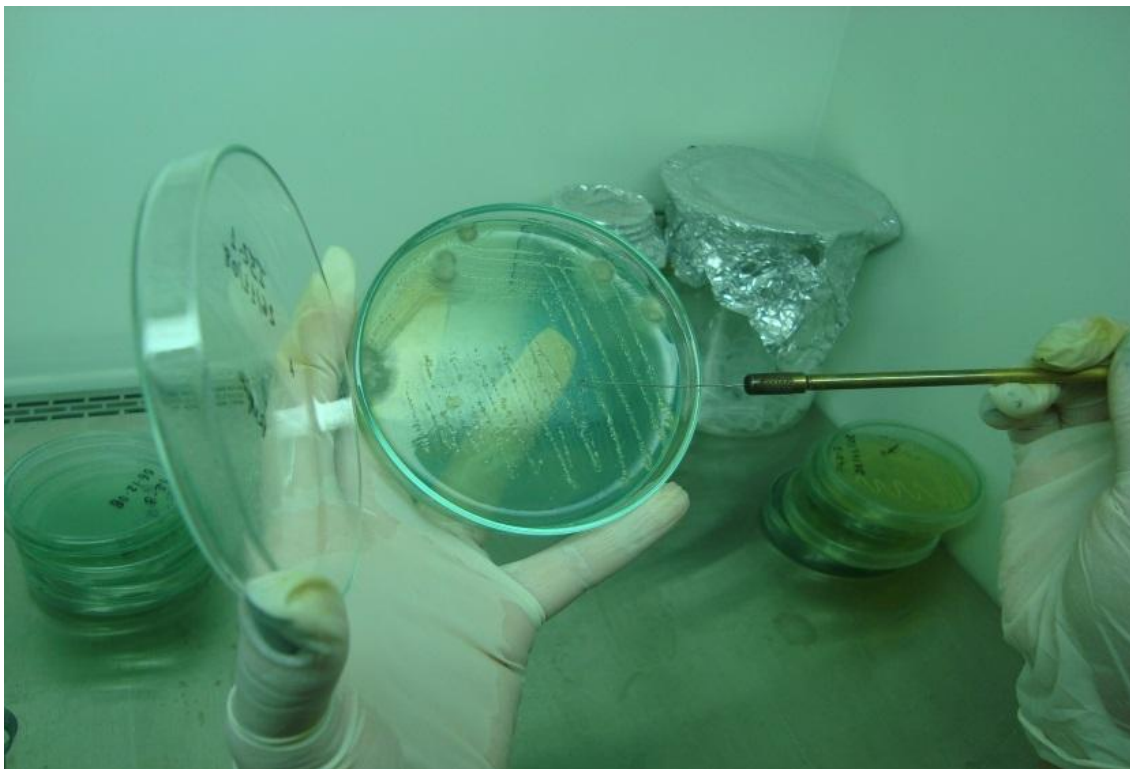


Figura 4: Caracterização morfofisiológica das bactérias.

3.4. Autenticação dos isolados pela capacidade de renodular seus hospedeiros de origem e teste de eficiência

A confirmação do status de rizóbio foi realizada verificando a capacidade dos isolados de renodular seu hospedeiro de origem. Foi conduzido um experimento em casa-de-vegetação no Departamento de Agronomia da UFRPE em delineamento inteiramente casualizado. Tendo em vista que a eficiência dos isolados foi avaliada no mesmo experimento, os tratamentos foram: Os 60 isolados obtidos (após agrupamento pelo método de ARDRA (realizado em laboratório da Embrapa Semiárido)); dois controles positivos (um com a estirpe recomendada e o outro com N mineral); e um controle negativo (sem qualquer fonte de N), com três repetições para cada tratamento.

O plantio foi realizado em copos plásticos de poliestireno com capacidade para 500 mL. O substrato utilizado foi areia e vermiculita autoclavadas (pressão de 1,0 atm e temperatura de 120 °C por 1 hora, durante dois dias consecutivos) na proporção de 2:1 (v:v). Na ocasião da semeadura, as sementes foram desinfestadas conforme descrito anteriormente e semeadas 3 sementes por vaso. Após o desbaste (quinze dias após o plantio) foi deixada

uma planta por unidade experimental. A inoculação foi realizada em duas etapas a fim de garantir maior número de células por unidade experimental, utilizando suspensões dos isolados em teste e das estirpes referência como inóculo. A primeira inoculação foi realizada na semente (1 mL do inóculo) e a segunda após o desbaste (1 mL do inóculo).

Para o preparo do inóculo, as bactérias estocadas nos tubos de polipropileno foram riscadas em placas de Petri em meio YMA. Após o crescimento das colônias puras, foi repicada uma pequena quantidade da cultura bacteriana utilizando-se uma alça de platina e inoculada em 10 mL de meio YM contido em tubos de ensaio (VINCENT, 1970). As bactérias foram cultivadas sob agitação orbital a 150 rotações por minuto (rpm) por três dias, para os isolados de crescimento rápido, por quatro a seis dias, para isolados de crescimento intermediário e por mais que seis dias, para isolados de crescimento lento, à temperatura ambiente.

A inoculação foi realizada em duas etapas a fim de garantir maior número de células por unidade experimental, utilizando suspensões em meio YM dos isolados em teste. A primeira inoculação foi realizada na semente (1 mL do inóculo) e a segunda após o desbaste (1 mL do inóculo).

O fornecimento de nutrientes às plantas foi realizado utilizando solução nutritiva de Norris & Date (1976) excluindo-se o N. A fim de evitar os riscos de contaminação, a irrigação foi realizada com água destilada estéril. As plantas foram colhidas aos 45 dias após o plantio. Para verificar a capacidade nodulífera dos isolados, as raízes foram lavadas e os nódulos destacados e contados.



Figura 5: Visão geral do experimento conduzido com feijão-caupi para eficiência dos isolados e capacidade de re-nodular seu hospedeiro de origem.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Experimento com planta isca para obtenção dos nódulos radiculares

Todas as plantas de feijão-caupi apresentaram nodulação abundante, quando cultivadas nos vasos contendo amostras das principais classes de solos ocorrentes no Semiárido de Pernambuco, evidenciando que os solos estudados abrigam populações de rizóbios naturalmente estabelecidas que são capazes de nodular a espécie (Figura 6).

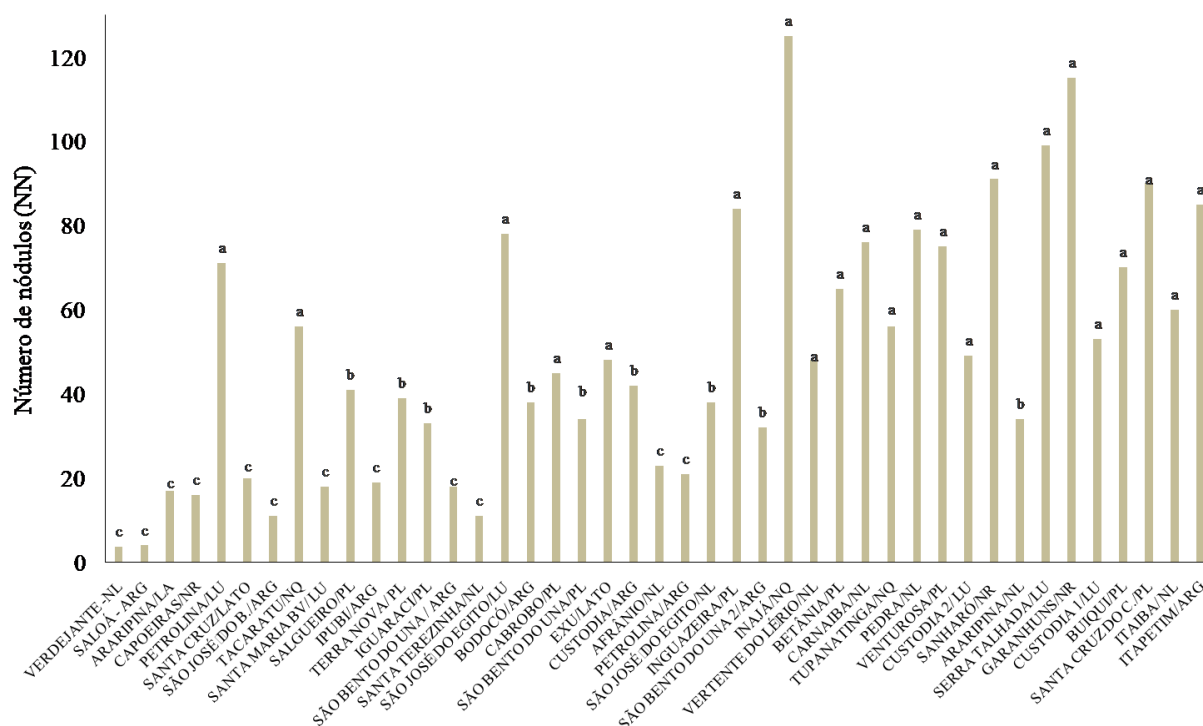


Figura 6 - Número de nódulos de feijão-caupi cultivado em 7 classes de solo do Semiárido de Pernambuco (NL: Neossolo Litólico; LUV: Luvisolo; ARG: Argissolo; PLA: Planossolo; NR: Neossolo Regolítico; LA: Latossolo; NQ: Neossolo Quartzarênico).

Este é um resultado muito importante tanto em relação à compreensão dos fatores edafoclimáticos que condicionam a ocorrência de rizóbios, quanto em relação ao estabelecimento de programas de recomendação de estirpes selecionadas para inoculação do feijão-caupi cultivado no Semiárido. De

acordo com Brockwell et al. (1995), respostas positivas à inoculação são dependentes do local e inversamente relacionadas com o tamanho, a eficiência e a competitividade da população rizobiana estabelecida. Diversos autores (Fening & Danso, 2002; Zilli et al., 2004; Kimiti & Odee, 2010) relatam que aumentos significativos na densidade da população rizobiana no solo foram observados somente em resposta ao cultivo do feijão-caupi, sugerindo que a presença dessa leguminosa favorece o estabelecimento de grupos de rizóbios específicos.

Pode-se afirmar que o número de nódulos é proporcional ao tamanho da população de rizóbios nativa de cada solo estudado, que apresentou variações significativas entre os diversos locais de coleta mas, no entanto, essas variações não podem ser atribuídas à classe de solo.

O feijão-caupi pode responder aos diferentes estímulos do meio ambiente mudando a sua partição de matéria seca ao longo do ciclo, como resposta fisiológica para garantir a produtividade de grãos ao final do ciclo (SUBRAMANIAN; MAHESWARI, 1992; PRAXEDES et al., 2009; SILVA et al., 2009).

Para massa seca das folhas verificou-se que alguns tratamentos foram superiores em relação a outros de diferentes classes de solo (figura3). As mudas de feijão-caupi se desenvolveram apresentando crescimento normal em todas as plantas. Os tratamentos que proporcionaram uma maior massa seca da parte aérea foram: Argissolo (Itapetim), Neossolo Litólico (Itaíba) e Planossolo (Santa cruz do Capibaribe e Buíque). As classes de solos que proporcionaram uma maior nodulação, também promoveram uma maior biomassa, evidenciando que a presença de bactérias nodulíferas nessas plantas, está contribuindo para um maior desenvolvimento das mesmas.

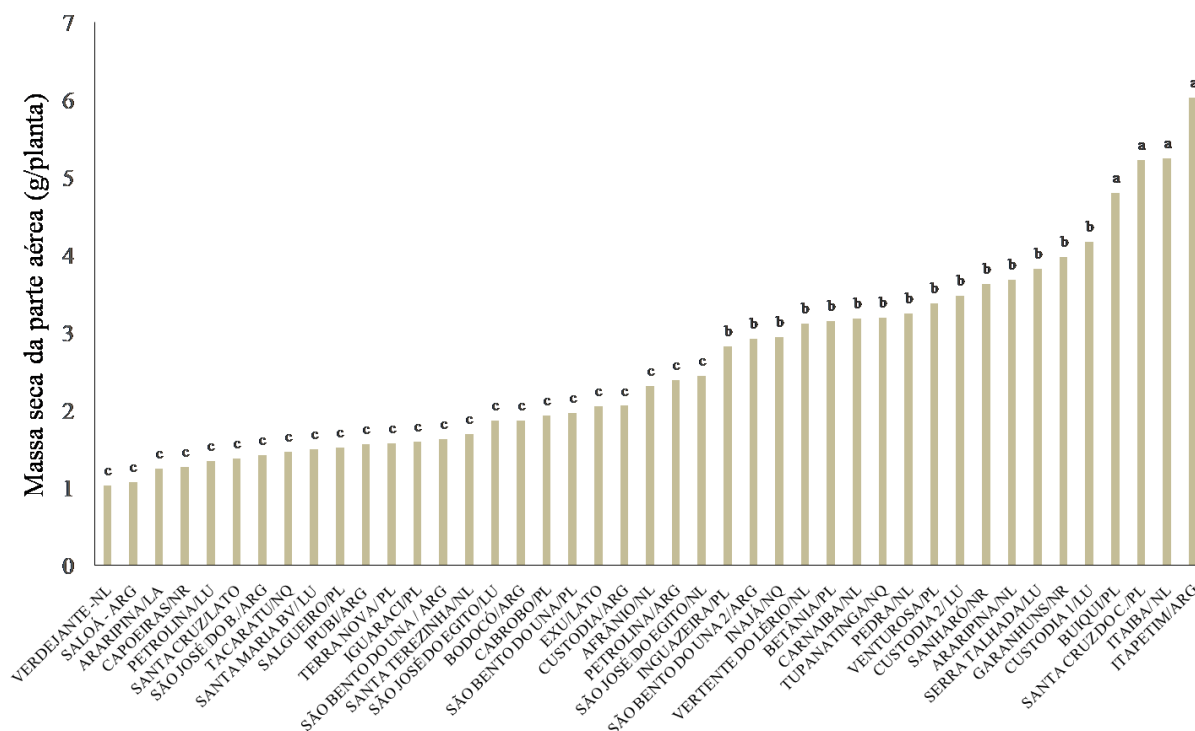


Figura 7 - Massa seca da parte aérea de feijão-caupi cultivado em 7 classes de solo do Semiárido de Pernambuco (NL: Neossolo Litólico; LUV: Luvisolo; ARG: Argissolo; PLA: Planossolo; NR: Neossolo Regolítico; LA: Latossolo; NQ: Neossolo Quartzarênico).

A biomassa de nódulos produzida pelas plantas apresentou diferenças significativas entre as diferentes classes de solo (Figura 4), o que corrobora os resultados de Silva et al. (2012). O experimento conduzido em casa de vegetação mostrou alta nodulação nos tratamentos sem inoculante, com massa de nódulos acima de 150 mg para plantas cultivadas em Neossolo Quartzarênico o que indica a presença de rizóbios já estabelecidos no solo.

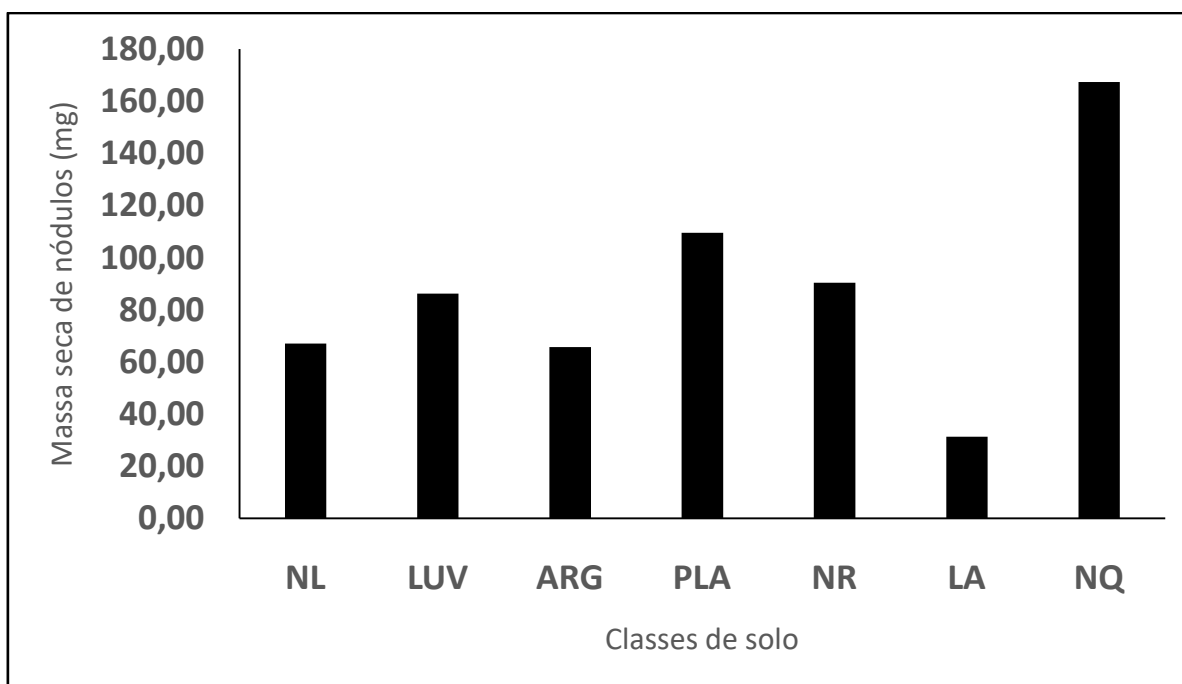


Figura 8 - Massa seca de nódulos de feijão-caupi cultivado em 7 classes de solo do semiárido de Pernambuco (NL: Neossolo Litólico; LUV: Luvisolo; ARG: Argissolo; PLA: Planossolo; NR: Neossolo Regolítico; LA: Latossolo; NQ: Neossolo Quartzarênico).

Houve efeito significativo das classes de solo em relação massa seca do sistema radicular.

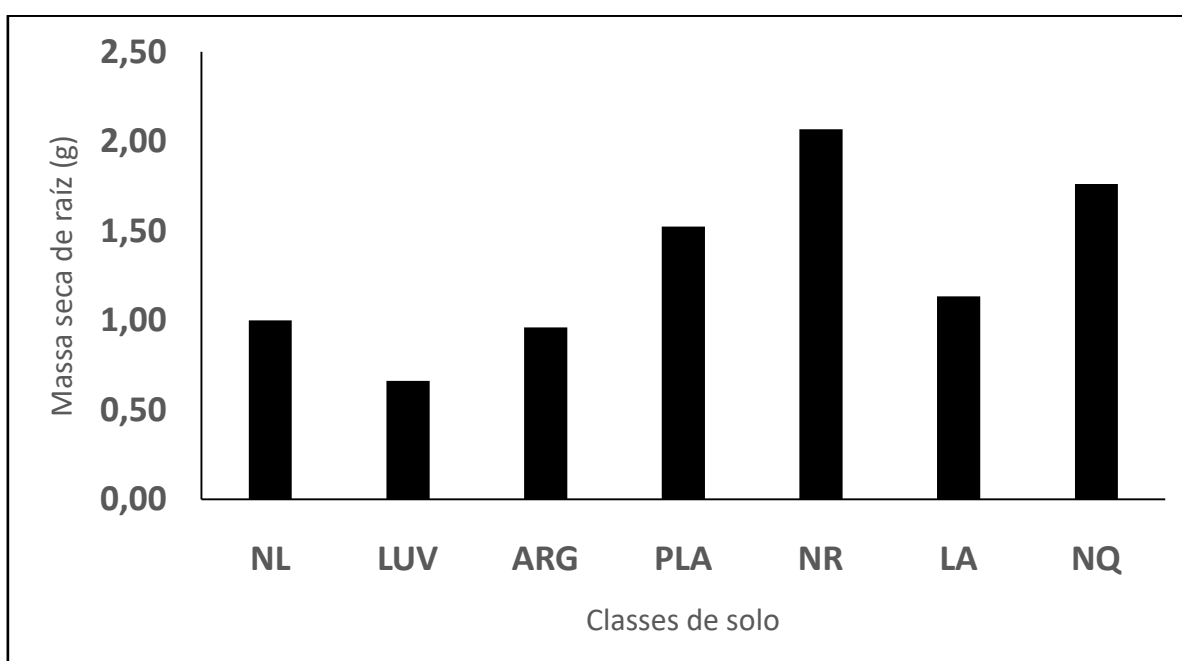


Figura 9 - Massa seca de raiz de feijão-caupi cultivado em 7 classes de solo do semiárido de Pernambuco (NL: Neossolo Litólico; LUV: Luvisolo; ARG: Argissolo; PLA: Planossolo; NR: Neossolo Regolítico; LA: Latossolo; NQ: Neossolo Quartzarênico).

4.2. Isolamento e caracterização morfofisiológica dos isolados bacterianos

Foram obtidos 338 isolados, em sua maioria de crescimento rápido, que acidificam o meio de cultura e produzem muito muco. Essas características já têm sido relatadas para bactérias nodulíferas de diferentes espécies de leguminosas nativas das regiões semiáridas do Brasil (TEIXEIRA et al., 2010; FREITAS et al., 2014) e são, geralmente, atribuídas a estratégias de sobrevivência das bactérias, em função das altas temperaturas e baixa disponibilidade hídrica, comumente encontradas nessas regiões.

Sprent (1994) sugeriu que bactérias de crescimento rápido são mais comuns em regiões áridas, porque a habilidade de fixar o N_2 não é prioridade para essas bactérias, mas sim a sua sobrevivência, o que indica que pode ser esperado um alto grau de rizóbio de crescimento rápido nodulando leguminosas tropicais nativas. No presente estudo, aproximadamente 78% dos isolados são de crescimento rápido, 13 % intermediário e 9 % lento (Figura 6).

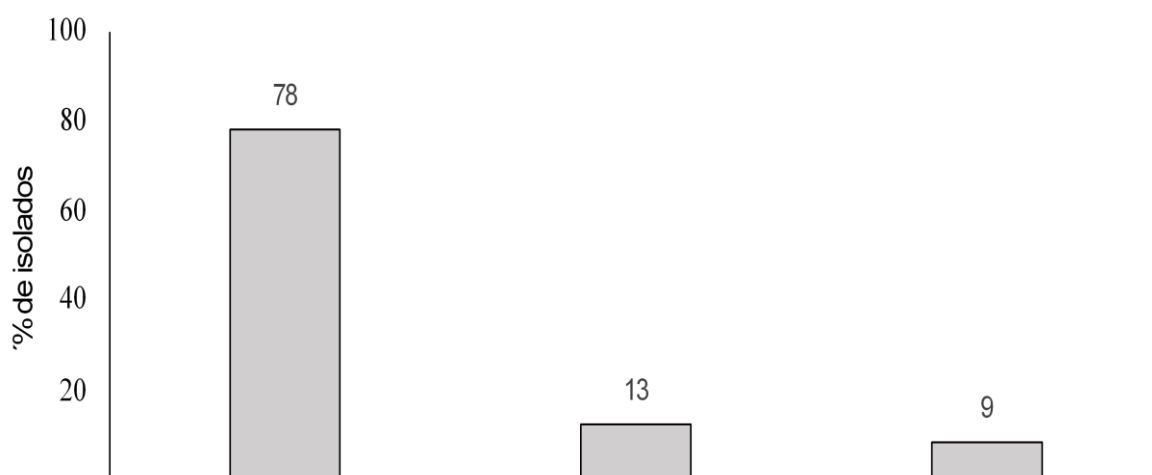


Figura 10 - Distribuição de isolados de rizóbios de nódulos de feijão-caupi

nativos de solos do Semiárido de Pernambuco em função do tempo de crescimento.

Os rizóbios podem ser divididos em três classes quanto à alteração de pH do meio de cultura: estirpes que acidificam o meio, estirpes que alcalinizam o meio e estirpes que não alteram o pH do meio de cultura. Martins et al. (1997) mostrou que a maioria das estirpes de crescimento rápido acidificam o meio, enquanto as de crescimento lento alcalinizam. Em relação a alteração do pH, 69% dos isolados acidificaram o meio de cultura, 30% não modificaram o pH e 1% alterou o pH para alcalino (Figura 11).

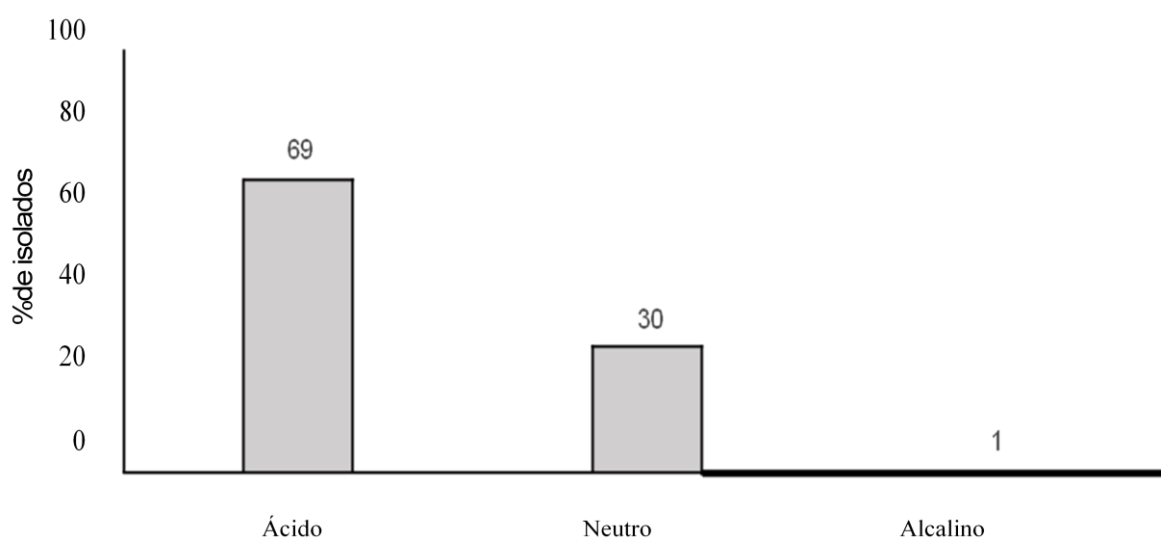


Figura 11 - Distribuição de isolados de rizóbios de nódulos de feijão-caupi nativos de solos do Semiárido de Pernambuco em função da alteração do pH em meio de cultura.

Segundo (Ahmad et al. 1981) rizóbios nativos de solos de regiões semiáridas que nodulam feijão-caupi geralmente produzem polissacarídeos que podem agir como uma barreira protetora contra fatores bióticos e abióticos, possibilitando a sobrevivência e persistência dessas bactérias no solo. No presente estudo predominaram isolados com capacidade de produção de muito muco (exopolissacarídeos) (54%) (Figura 12). Polissacarídeos extracelulares

são importantes na retenção de água, contribuindo com a formação de um microambiente que protege o micro-organismo. Hollingsworth et al. (1985) mostraram que outra característica que tem sido associada a rizóbios que nodulam feijão-caupi é a produção de muco relacionada a capacidade de sobrevivência dessas bactérias a altas temperaturas. A produção de exopolissacarídeos também pode estar relacionada à sobrevivência das bactérias sob estresse relacionado a solo e clima (COUTINHO et al., 1999). De acordo com Rahmeier (2009), os exopolissacarídeos tornam as bactérias mais resistentes à antibióticos, aumentando sua capacidade de competição com outros microrganismos.

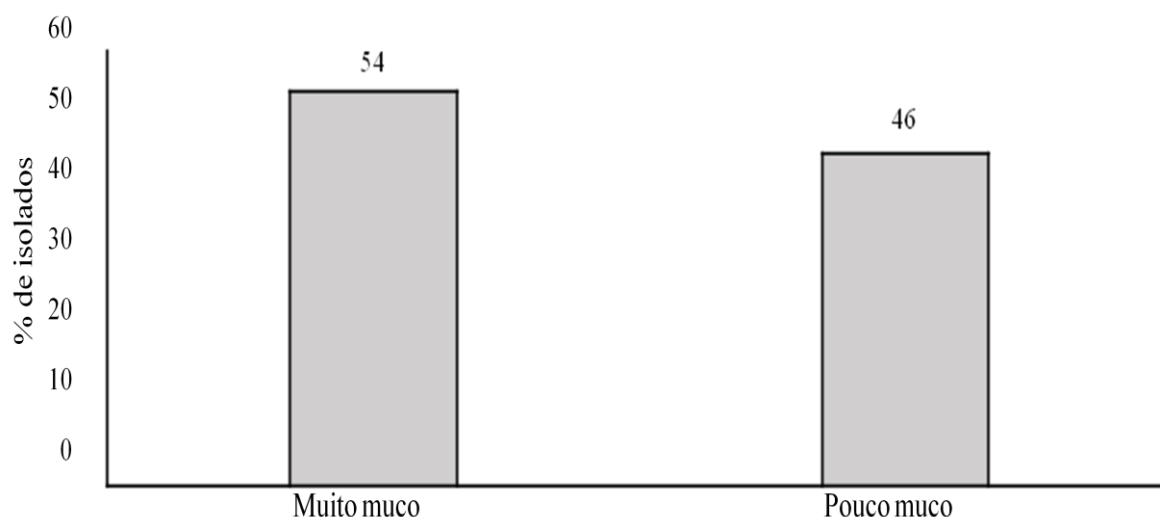


Figura 12 - Distribuição de isolados de rizóbios de nódulos de feijão-caupi nativos de solos do Semiárido de Pernambuco em função da quantidade de muco (exopolissacarídeos).

4.3 Autenticação dos isolados pela capacidade de renodular seus hospedeiros de origem e teste de eficiência

Das 60 estirpes testadas, verificou-se que 90% produziram nódulos quando re-inoculadas no feijão-caupi. Essa situação também já foi relatada por Vieira Neto et al. (2008). O tratamento sem inoculação e N mineral (testemunhas absoluta e nitrogenada, respectivamente) obtiveram ausência de nodulação, diferente dos 60 demais tratamentos.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desta pesquisa demonstram que os solos do Semiárido abrigam uma população abundante de rizóbios capazes de formar simbiose com o feijão-caupi. A maioria dos isolados obtidos são de rápido crescimento e com reação ácida em meio de cultura, além de produtores de grande quantidade de muco.

Essa informação pode contribuir para o avanço no conhecimento da ecologia de rizóbios naturalmente estabelecidos em solos do Brasil, bem como representa um passo inicial para o conhecimento dos componentes da biodiversidade brasileira. Soma-se ainda, uma contribuição à compreensão global da biogeografia de micro-organismos fixadores de N, especialmente para regiões de clima seco e quente, típico do Semiárido brasileiro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. L. G. ALCÂNTARA, R. M. C. M. DE; NÓBREGA, R. S. A.; NÓBREGA, J. C. A; LEITE, L. F. C.; SILVA, J. A. L. da. Produtividade do feijão-caupi cv BR 17 Gurguéia inoculado com bactérias diazotróficas simbióticas no Piauí. Revista Brasileira de Ciências Agrárias, Recife, v. 5, n. 3, p. 364-369, 2010. Disponível em: <DOI:10.5039/agraria.v5i3a795>.

ARAÚJO, C.S.F. & SOUSA, A.N. Estudo do processo de desertificação na caatinga: uma proposta de educação ambiental. Ciência & Educação, v.17, n.4, p.975-986, 2011

ARAÚJO, L.V.C. & SILVA, J.A. Unidade experimental Fazenda Belo Horizonte - Mossoró/RN. In: GARIGLIO, M.A.; SAMPAIO, E.V.S.B; CESTARO, L.A. & KAGEYAMA,P.Y. Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da caatinga. 2.ed. Brasília, DF: Serviço Florestal Brasileiro, p.205-213,2010.

BARBOSA, M.R.V.; SOTHERS, C.; MAYO, S.; GAMARRA-ROGAS, C.F.L. & MESQUITA, A.C. (orgs.). Checklist das plantas do nordeste brasileiro: Angiospermas e Gymnospermas. Brasília: Ministério de Ciência e Tecnologia, 2006. 156p.

BERRADA, H. & BENBRAHIM, K. F. Taxonomy of the Rhizobia: Current Perspectives. British Microbiology Research Journal, v. 4, n. 6, p. 616-639,2014.

BRADY, N. C.; WEIL, R. R. Elementos da natureza e propriedades dos solos. 3. ed. Porto Alegre: Bookman, 2013. 716 p. caatinga: uma investigação ecogeográfica. Revista Caatinga, v. 22, n. 3, p. 126-135, 2009.

CASTRO, A. S. & CAVALCANTE, A. Flores da caatinga. Campina Grande: Instituto Nacional do Semiárido, 2011.116p.

CHAGAS JUNIOR, A.F.; OLIVEIRA, L.A.; OLIVEIRA, A.N. & WILLERDING,

A.L.Efetividade de rizóbios e caracterização fenotípica dos isolados que nodulam feijão caupi em solos da Amazônia Central. *Acta Amazônica*, v.39, n.3, p.489-494, 2009. Characterization of indigenous rhizobia from Caatinga. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 41, p. 201-208, 2010.

COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; SILVA, A. F. T.; FERREIRA, L. V. M.; NÓBREGA, J.C. A. & MOREIRA, F. M. S. Resposta de duas cultivares de feijão-caupi à inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio em ambiente protegido. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v. 9, n. 4, p. 489-494, 2014.

COSTA, G. M.; CARDOSO, D.; QUEIROZ, L. P. & CONCEIÇÃO, A. A. Variações locais na riqueza florística em duas ecorregiões de caatinga. *Rodriguésia*, v. 66, n. 3, p. 685-709, 2015.

CUSACK, D.F.; SILVER, W. & MCDOWELL, W.H. Biological nitrogen fixation in two tropical forests: ecosystem level pattern and effects of nitrogen fertilization. *Ecosystems*, v.12, p.1299-1315,2009.

FREITAS, A. D. S.; BORGES, W. L.; ANDRADE, M. M. M.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SANTOS, C. E. R. S.; PASSOS, S. R.; XAVIER, G. R.; MULATO, B. M.; LYRA, M. C. C. P. Characteristics of nodule bacteria from *Mimosa* spp grown in soils of the Brazilian semiarid region. *African Journal of Microbiology Research*, Abuja, v.8, n. 8, p.788-796, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.5897/AJMR2013.6518>>.

FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SANTOS, C. E. R. S.; FERNANDES, A. R. Biological nitrogen fixation in tree legumes of the Brazilian semi-arid caatinga. *Journal of Arid Environments*, Trelew, v. 74, n. 3, p. 344-349, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaridenv.2009.09.018>>.

FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SANTOS, C. E. R. S.; SILVA, A. F. & SOUZA, R. J. C. Fixação biológica de nitrogênio no Semiárido Brasileiro. *Revista Brasileira de Geografia Física*, v.08, número especial IV SMUD, p. 585-597, 2015.

FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SILVA, B. L. R.; CORTEZ, J. S. A.; MENEZES, R. S. C. How much nitrogen is fixed by biological symbiosis in tropical dry forests? 2. Herbs. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, Ithaca, v. 94, p. 181-192, 2012b. Disponível em: <DOI: 10.1007 / s10705-012-9545-6>.

FREITAS, A. D. S.; SILVA, A. F.; SAMPAIO, E. V. S. B. Yield and biological nitrogen fixation of cowpea varieties in the semi-arid region of Brazil. *Biomass and Bioenergy*, Oxford, v. 45, p. 109-114, 2012a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.05.017>>.

FREITAS, A.D.S.; SAMPAIO, E.V.S.B.; SANTOS, C.E.R.S. & FERNANDES, A.R. Biological nitrogen fixation in tree legumes of the Brazilian semiarid caatinga. *Journal of Arid Environments*, v.74, n.3, p.344-349, 2010.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F. & DONOGHUE, M.J. *Sistemática vegetal: um enfoque filogenético*. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 632p.

KILL, L.H.P.; TERAPO, D. & ALVAREZ, I.A. *Plantas ornamentais da caatinga*. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 139p.

LIMA JÚNIOR, C.; ACCIOLY, L. J. O.; GIONGO, V.; LIMA, R. L. F. A.; SAMPAIO, E. V. S. B. & MENEZES, R. S. C. Estimativa de biomassa lenhosa da caatinga com uso de equações alométricas e índice de vegetação. *CientiaForestalis*, v. 42(102), p. 289- 298, 2014

LIMA, B.G. *Caatinga: espécies lenhosas e herbáceas*. Mossoró – RN: Editora da UFERSA, 2012. 316p.

MARCON, E. C.; ROMIO, S. C.; MACCARI, V. M.; KLEIN, C.; LÁJUS, C. R. Uso de diferentes fontes de nitrogênio na cultura da soja. *Revista Thema*, Pelotas, v. 14, n. 2, p. 298-308, 2017. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.15536/thema.14.2017.298-308.427>>.

MARCONDES, J.; FERRAUDO, A.S.; SCAQUITTO, D.C.; ALVES, L.M.C. & LEMOS, E.G.M. Efetividade na fixação biológica do nitrogênio de bactérias nativas isoladas de plantas de amendoim. *Ciência & Tecnologia*, Jaboticabal, SP, v.1(1), p.21-32, 2010.

MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P. & RUMJANEK, N. G. Growth characteristic sand symbiotic efficiency of rhizobial solate dfrom cowpea nodules of the Northe astregion of Brazil. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 29, p. 1005-1010, 1997.

MENEZES, K.A.S.; NUNES, G.F.O.; SAMPAIO, A.A.; SILVA, A.F.; MARTINS, L.M.V. & FERNANDES JÚNIOR, P.I. Caracterização fenotípica de bactérias isoladas de angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan) em solos do semiárido. In: XXXIV Congresso Brasileiro de Ciência do Solo. Florianópolis. Anais... Florianópolis: SBCS, 2013.

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

NORRIS, D. O. & DATE, R. A. Legume Bacteriology. In: SHAM, N.H.; BRYAN, W.W. (ed). *Tropical Pasture Research – Principle sand Methods*. Hurley: COMMON WEALT BUREAU OF PASTURES AND FIELD CROPS. p. 134-174, 1976.

NUNES, L.A.P.L.; ARAÚJO FILHO, J.A. & MENEZES, R.I.Q. Impacto da queimada e do pousio sobre a qualidade de um solo sob caatinga no semiárido nordestino. *Revista Caatinga*, v.9, p.200-208, 2006.

PAREYN, F. Dinâmica da regeneração da caatinga sob manejo florestal. In: SILVA, M. V.; MACEDO, A. J.; PAIVA, P. M. G.; CASSANDRA, L. & BAUMVOL, I. J. R. *A Caatinga e seu potencial Biotecnológica*. Recife. Editora

da UFPE, p. 21-35, 2013.

PEREIRA FILHO, J.M. & BAKKE, O.A. Produção de forragem de espécies herbáceas da caatinga. In: GARIGLIO, M.A.; SAMPAIO, E.V.S.B; CESTARO, L.A. & KAGEYAMA, P.Y. Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da caatinga. 2.ed. Brasília, DF, Serviço Florestal Brasileiro, p.146-159, 2010.

QUEIROZ, L. P. Leguminosas da Caatinga. Feira de Santana, UEFS, 2009. 914p

QUEIROZ, L.P. Flower ing plants of the Brazilian semi-arid. In: QUEIROZ, L.P.; RAPINI, A. & GIULIETTI, A.M. (eds.). Towards greater know ledge of the Brazilian semi-aridbio diversity. Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasília. p.49-53, 2006.

SANTOS, C. E. R. E. S.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G.; WARDSON, L. B.; BEZERRA, R. V. & FREITAS, A. D. S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. Revista Brasileira de Ciências Agrárias, v. 2, p. 249-256, 2007.

SAYYED, R. Z.; JAMADAR, D. D.; PATEL, P. R. Production of exopolysaccharide by Rhizobium sp. Indian Journal of Microbiology, Delhi, v. 51, p. 294-300, 2011. Disponível em: < doi:10.1007/s12088-011-0115-4>.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical Biochemistry, Maryland, v. 160, p. 47–56, 1987

SILVA JÚNIOR, E. B.; SILVA, K.; OLIVEIRA, S. S.; OLIVEIRA, P. J.; BODDEY, R. M.; ZILLI, J. E.; XAVIER, G. R. Nodulação e produção de feijão-caupi em resposta à inoculação com diferentes densidades rizobianas. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 49, p. 804-812, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2014001000007>.

SOUZA, L.Q.; FREITAS, A.D.S.; SAMPAIO, E.V.S.B.; MOURA, P.M. &

MENEZES, R.S.C. How much nitrogen is fixed by biological symbiosis in tropical dry forests? 1. Trees and shrubs. Nutrient Cycling in Agroecosystems, v.94, p.171-179, 2012.

SOUZA, P.F. Análise da vegetação de um fragmento de caatinga na microbacia hidrográfica do açude jatobá - PARAÍBA. Patos: UFCG, 2009. 51p. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Campina Grande, 2009.

SOUZA, L.S.B.; MENEZES, K.A.S.; NUNES, I.A.; SOUZA, C.C.B.; SEIDO, S.L.; GAV A, C.A.T.; MARTINS, L.M.V. & FERNANDES JÚNIOR, P.I. Variabilidade Genética de Novas Bactérias Nodulando *Erythrina velutina* Willd. In: VIII Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Semiárido. Petrolina. Anais... Petrolina: CPATSA, 2013.

TEIXEIRA, F. C. P.; BORGES, W. L.; XAVIER, G. R. & RUMJANEK, N. G. TEIXEIRA, F.C.P. Ecofisiologia de *Cratylia mollis* Mart. ex Benth.: Estudos de base para seu uso racional na caatinga. Rio de Janeiro: UFRJ, 2004. 98p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.

VINCENT, J.M. A manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1970.

WANG, Y. P. Using direct methods to constrain symbiotic nitrogen fixation rates: a case study from an Amazonian rain forest. Biogeochemistry, v. 99, p. 1-13, 2010.

YAHDJIAN, L.; GHERARDI, L. & SALA, O. E. Nitrogen limitation in arid-subhumid ecosystems: a meta-analysis of fertilization studies. Journal Arid Environments, v. 75, p. 675-680, 2008.

YAHDJIAN, L.; GHERARDI, L.; SALA, O. E. Nitrogen limitation in arid-subhumid ecosystems: a meta-analysis of fertilization studies. Journal of Arid

Environments, Trelew, v. 75, p. 675-680, 2011. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2011.03.003>>.