

## FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM AGROECOSSISTEMAS DA REGIÃO SEMIÁRIDA DO NORDESTE

*Ana Dolores Santiago de Freitas  
Paulo Ivan Fernandes-Júnior*

### **Introdução**

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo natural conduzido por um conjunto de procariotos que apresentam a capacidade de reduzir o  $N_2$  atmosférico à amônia, uma das formas assimiláveis pelas plantas; é considerado o segundo processo biológico mais importante da natureza, atrás apenas da fotossíntese (Moreira; Siqueira, 2006). Pelas suas características, esse é o principal processo de entrada de nitrogênio (N) nas cadeias alimentares, o que ressalta a importância ecológica desse processo nos ambientes naturais.

A FBN tem sido explorada, nos sistemas agrícolas e silviculturais, por meio da utilização de inoculantes que contêm microrganismos fixadores de N (chamados coletivamente de diazotróficos), que são previamente selecionados para a eficiência na fixação em condições de campo. A disponibilização desses produtos no mercado nacional só foi possível graças à atuação de diversos grupos de pesquisa no País com o foco na seleção de novas bactérias e na adaptação das técnicas de cultivo. No Brasil, essas pesquisas se iniciaram na década de 1950 pela iniciativa, principalmente, de pesquisadores como a Dra. Johanna Döbereiner, da Embrapa

Agrobiologia<sup>3</sup>, e o Dr. João Ruy Jardim Freire, da Seção de Bacteriologia da Secretaria Estadual de Agricultura do Rio Grande do Sul (onde trabalhou de 1946-1950)<sup>4</sup>.

Hoje, após mais de 70 anos do início das pesquisas em microbiologia do solo com ênfase em FBN no Brasil, há diversos grupos espalhados pelas instituições brasileiras que participam de redes de parcerias nacionais e internacionais e que têm colaborado para o avanço do conhecimento científico e para o desenvolvimento tecnológico no campo da FBN. Essas pesquisas resultaram em uma longa lista com 104 bactérias diazotróficas oficialmente recomendadas para 89 espécies de leguminosas e gramíneas. Esses números colocam o Brasil como o país com maiores sucessos e resultados positivos na produção de inoculantes no mundo.

Para os agroecossistemas da região Nordeste do Brasil, principalmente da região semiárida, a seleção de estirpes de rizóbio com o objetivo de recomendar novas bactérias para a produção de inoculantes é de fundamental importância, pois as bactérias podem aumentar a resistência das espécies vegetais às condições edafoclimáticas locais e podem proporcionar ganhos de produção em frente a cenários desfavoráveis. Além disso, o enquadramento da maioria dos produtores da região em sistemas de produção familiares (o que implica baixo emprego de tecnologia) explica a demanda por tecnologias de baixo custo e baixo impacto ambiental, como a tecnologia de inoculação, por exemplo. Indo ao encontro dessas demandas regionais, ao longo dos anos, grupos de pesquisa que trabalham com diversos aspectos da FBN e de suas tecnologias, têm-se consolidado na região.

Pesquisas de isolamento, avaliação da diversidade e seleção de microrganismos fixadores de N em leguminosas na região semiárida iniciaram-se na década de 1980 com estudos para avaliar a diversidade e a eficiência de rizóbios de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] (Stamford; Santos, 1985;

<sup>3</sup>Essa instituição era anteriormente conhecida como Centro Nacional de Ensino e Pesquisas Agronômicas do Ministério da Agricultura (de 1950 a 1973), Unidade de Apoio à Pesquisa em Biologia do Solo da Embrapa Solos (de 1973 a 1989) e, desde então, passou a ser Embrapa Agrobiologia.

<sup>4</sup>Posteriormente, Freire continuou suas pesquisas na Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (Fepagro) do Rio Grande do Sul (de 1950 a 1976) e na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS (de 1975 a 2015).

Santos et al., 1990; Stamford et al., 1990) e de espécies forrageiras (Burity et al., 1990). Essas iniciativas inéditas de pesquisa e desenvolvimento foram conduzidas, de forma pioneira, pelos grupos de pesquisa da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e do Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) em Recife, PE sob a liderança dos pesquisadores/professores Newton Pereira Stamford e Hélio Almeida Burity, respectivamente.

Já nos anos 1990, pesquisadores da região Nordeste concluíram o seu doutoramento em centros com excelência no trabalho de seleção e avaliação da diversidade de bactérias fixadoras de N. Em estudos conduzidos na Embrapa Agrobiologia (Seropédica, RJ), houve grande avanço na caracterização e seleção de bactérias diazotróficas isoladas de feijão-caupi em solos do Semiárido, com o levantamento da grande biodiversidade de rizóbios da região (Martins et al., 1995, 1997; Xavier et al., 1998), o que resultou em posterior recomendação oficial de uma estirpe ao Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Mapa (Martins et al., 2003).

A partir dos anos 2000, pesquisadores e professores com formação na área se estabeleceram em centros de pesquisa e ensino superior da região Nordeste e passaram a difundir a geração de conhecimento sobre diversidade de rizóbio e outras bactérias fixadoras de N na região, inclusive no perímetro semiárido. A expansão dos centros de ensino superior e a consolidação de programas de pós-graduação com o credenciamento de pesquisadores que trabalham com diferentes aspectos da FBN têm resultado na elaboração de uma série de dissertações e teses com informações consistentes sobre o tema. Entre os diversos programas de pós-graduação da região, podem-se destacar os cursos nas áreas de Ciência do Solo [UFRPE, Universidade Federal da Paraíba, (UFPB) e Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, (UFRB)], Horticultura Irrigada [Universidade do Estado da Bahia, (Uneb)], Recursos Naturais [Universidade Federal do Vale do São Francisco (Univasf) e Universidade Federal do Ceará (UFC)], Ciências Agrárias [Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)], Tecnologias Energéticas Nucleares [Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)], Microbiologia Agrícola (UFRB) e Produção Vegetal (UFRPE e Univasf), além da Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio), por meio dos quais a região tem formado recursos humanos qualificados e capacitados para a condução de pesquisas e aplicação prática de conhecimentos relacionados à FBN e à tecnologia de inoculação.

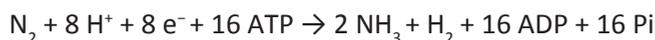
Neste capítulo, serão discutidos alguns dos principais avanços na geração de conhecimento sobre a FBN e suas tecnologias na região Nordeste, com ênfase na região semiárida, e abordados principalmente os aspectos de seleção de estirpes de bactérias fixadoras e de estimativas das quantidades de N fixadas em condições de campo.

## Aspectos gerais e aplicações da fixação biológica de nitrogênio

A FBN é um processo natural conduzido por procariotos que podem apresentar vida livre ou estar em associação com espécies vegetais. As associações com vegetais apresentam especial interesse para a agricultura, pois é na exploração dessas associações que se baseia o princípio da inoculação com estirpes previamente selecionadas. Os microrganismos diazotróficos apresentam o complexo enzimático nitrogenase, que é formado por duas subunidades: a dinitrogenase redutase, que é uma proteína Fe-Mo<sup>5</sup> responsável pela redução da unidade catalítica, e a dinitrogenase, que é uma proteína Fe responsável pela clivagem do N<sub>2</sub> e sua redução à amônia (Seefeldt et al., 2009).

A dinitrogenase redutase pode, em alguns microrganismos, ter o Mo substituído pelo Fe ou vanádio (V), o que gera nitrogenases com diferentes eficiências energéticas na fixação do N<sub>2</sub> (Nunes et al., 2003). Entretanto a grande maioria do conhecimento acumulado sobre a nitrogenase se baseia nas proteínas Fe-Mo por serem as mais abundantes nos microrganismos de interesse agrícola.

A equação geral da FBN pode ser descrita abaixo. Nessa síntese, é possível observar que a reação é altamente demandante de energia biológica, uma vez que, para cada mol de amônia sintetizado, há a demanda de 8 moles de ATP, além de 4 moles de elétrons e prótons.



<sup>5</sup> Fe: ferro; Mo: molibdênio.

Entre todas as bactérias fixadoras de N e as espécies vegetais, a associação íntima entre as bactérias dos grupos dos rizóbios e as plantas da família das leguminosas é a mais bem-estudada e caracterizada (Moreira; Siqueira, 2006). Nessa associação, há a formação de nódulos radiculares e/ou caulinares, que são estruturas especializadas na realização da FBN e que maximizam o uso do N fixado pelas espécies hospedeiras. Os estudos baseiam-se na seleção tanto de macro quanto de microsimbiontes, com o objetivo de entender os mecanismos envolvidos na FBN para a sua maximização em condições de campo.

Diversas espécies de bactérias pertencentes às subclasses  $\alpha$  e  $\beta$ -proteobactéria já foram descritas como nodulantes de leguminosas. Entre as  $\alpha$ -proteobactérias, encontram-se os gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Ensifer* e *Mesorhizobium*, conhecidos como os gêneros “clássicos” de rizóbio. Ainda na mesma subclasse, encontram-se os gêneros “novos” de rizóbio: *Ochrobactrum*, *Devosia*, *Aminobacter*, *Microvirga*, *Methylobacterium*, *Phyllobacterium* e *Shinella* (Peix et al., 2015). Na subclasse  $\beta$ -proteobactéria, estão classificados os gêneros de “novos” rizóbios *Paraburkholderia* e *Cupriavidus* (Sawana et al., 2014; Peix et al., 2015). Os avanços na taxonomia de rizóbio só foram possíveis com a utilização de diversas técnicas moleculares e fenotípicas em procedimentos que foram desenvolvidos ao longo dos anos. O avanço no entendimento dessa diversidade facilita o trabalho de seleção de estirpes com foco em novos inoculantes.

Os estudos de seleção e avaliação de simbiontes culminaram em resultados muito expressivos dos pontos de vista tanto econômico quanto ambiental, e o mais expressivo deles é a soja (*Glycine max*) brasileira. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), a área plantada de soja no Brasil na safra 2015/2016 foi de 33,252 milhões de ha, com produtividade média de 2,8 mil kg ha<sup>-1</sup>. Em toda essa área, não houve a aplicação de fertilizantes nitrogenados; toda a demanda de N da cultura foi suprida por inoculantes que continham bactérias do gênero *Bradyrhizobium* recomendadas para a cultura da soja no Brasil. Estabelecendo a demanda de N da cultura em 100 kg ha<sup>-1</sup> para a obtenção de altas produtividades, é possível calcular a economia de mais de 6,5 milhões de toneladas de ureia aplicadas nos campos de soja brasileiros. Com o custo em torno de R\$ 3,50 por kg da ureia (no mercado local em Petrolina, PE), a economia atinge o patamar de R\$ 23

bilhões, o que equivale a US\$ 7 bilhões como saldo positivo para a balança comercial agrícola do Brasil.

Números como os da soja são animadores e impulsionam a pesquisa com outras leguminosas no Brasil, principalmente aquelas cultivadas em sistemas agrícolas da região semiárida. Nessa perspectiva, esforços em selecionar bactérias e genótipos vegetais, fazer melhoramento genético, desenvolver tecnologia de inoculantes e quantificar a FBN ao longo dos anos têm dado resultados promissores, inclusive na região Nordeste.

## **Seleção de estirpes de rizóbio: os exemplos do feijão-caupi e do amendoim, os “carros chefes”**

A região semiárida apresenta, como vegetação predominante, as diferentes fitofisionomias do domínio das Caatingas. Nessas áreas, há a predominância de espécies de leguminosas, das quais mais de 80 gêneros e 617 espécies foram descritas até o presente momento (Zappi et al., 2015). Muitas dessas leguminosas apresentam a capacidade de nodular com estirpes de rizóbios nativas, o que resultou, ao longo dos anos, na colonização das áreas da Caatinga com rizóbios eficientes na nodulação das leguminosas e altamente adaptados às condições edafoclimáticas locais. Provavelmente por esse motivo, nas áreas de cultivo com leguminosas, mesmo em primeiro cultivo, há nodulação abundante.

Por sua elevada adaptação às condições locais e capacidade de nodulação com leguminosas introduzidas, as estirpes nativas podem ser selecionadas para a inoculação de leguminosas de interesse agrícola. Para que esse objetivo seja atingido, um exaustivo trabalho de isolamento, identificação e avaliação da eficiência simbiótica e agronômica é necessário. Para a região semiárida, a cultura mais bem-caracterizada nesse aspecto é o feijão-caupi, a respeito do qual trabalhos de isolamento e caracterização de rizóbio foram iniciados na década de 1980, como citado anteriormente.

Para o feijão-caupi, atualmente há quatro estirpes de rizóbio autorizadas para a produção de inoculantes no Brasil: BR 3267, INPA 03-11B, UFLA 03-64 e BR 3262 (Brasil, 2011). A estirpe BR 3267 (SEMIA 6462), da espécie *Bradyrhizobium yuanmigenense*, foi isolada de solos de área de produtores em

Petrolina, PE (Martins et al., 2003). As estirpes de *Bradyrhizobium* sp. INPA 03-11B (SEMIA 6463) e UFLA 03-64 (SEMIA 6461) foram isoladas de nódulos de feijão-caupi cultivado em solos do Amazonas e de Rondônia, respectivamente (Lacerda et al., 2004). Finalmente, a estirpe BR 3262 (SEMIA 6464) da espécie *Bradyrhizobium pachyrhizi* é o rizóbio mais recentemente recomendado para a cultura, tendo sido isolada de um sistema agroecológico de produção no estado do Rio de Janeiro (Zilli et al., 2009). Essas estirpes já recomendadas para a produção de inoculantes em feijão-caupi têm demonstrado boa eficiência agrônômica em estudos de campo em solos das regiões semiáridas dos estados de Pernambuco, da Bahia (Marinho et al., 2014) e do Piauí (Almeida et al., 2010; Alcântara et al., 2014), além de outras regiões mais úmidas do Nordeste, como o ecótono Cerrado-Caatinga do oeste do Piauí (Ferreira et al., 2013) e as regiões úmidas do estado do Maranhão (Gualter et al., 2011).

O feijão-caupi nodula preferencialmente com isolados do gênero *Bradyrhizobium*, como tem sido demonstrado em trabalhos em diversas regiões tropicais e subtropicais (Leite et al., 2017; Tampakaki et al., 2017). Na região semiárida do Brasil, o feijão-caupi também nodula preferencialmente com estirpes de *Bradyrhizobium*, como demonstrado em estudos conduzidos no Sertão de Pernambuco (Martins et al., 2003; Leite et al., 2017; Marinho et al., 2017) e do Piauí (Zilli et al., 2004). Entretanto a diversidade de rizóbios em solos da região semiárida é muito elevada, e bactérias com características dos gêneros *Rhizobium* e *Ensifer* têm sido encontradas em nódulos de feijão-caupi, o que indica a possibilidade de simbiose dessa leguminosa com bactérias pertencentes a outros gêneros, além do *Bradyrhizobium* (Leite et al., 2009; Fernandes Júnior et al., 2012; Sousa et al., 2014).

Como o feijão-caupi é uma leguminosa muito promíscua, ou seja, apresenta a capacidade de nodular com grande diversidade de microssimbiontes, os estudos conduzidos com essa espécie, ao longo dos anos, têm isolado grande diversidade de bactérias, o que pode assegurar a elevada diversidade de rizóbios nos solos da região. Essa hipótese vem sendo confirmada inclusive com a descrição de nova espécie de rizóbio originária da região do Baixo São Francisco, no estado de Sergipe (Martins et al., 1997), nomeada *Microvirga vignae* por Radl et al. (2014). Embora *Microvirga* seja um gênero com poucas espécies nodulíferas descritas até hoje, a caracterização de *M.*

*vignae*, a partir de uma coleção com bactérias isoladas há mais de 20 anos, indica que a biodiversidade presente nas coleções de culturas espalhadas nas instituições de pesquisa e ensino na região Nordeste é muito elevada e que novos *taxa* estão nelas depositados a espera de serem descritos. A estirpe do tipo *M. vignae* também já foi avaliada quanto à sua eficiência agrônômica nas regiões de Teresina, PI (Almeida et al., 2010), de Petrolina, PE, e de Juazeiro, BA (Marinho et al., 2014); os resultados foram estatisticamente iguais aos das estirpes já recomendadas para a produção de inoculantes.

Com relação à eficiência agrônômica, os *Bradyrhizobium* nativos podem apresentar resultados significativos em condições de campo. Essa hipótese foi primeiramente confirmada com as conclusões que subsidiaram a recomendação da estirpe BR 3267 para a produção de inoculantes no Brasil (Martins et al., 2003). Essa bactéria foi isolada de um solo de área de produção de feijão-caupi em condições de dependência de chuva no município de Petrolina, PE. Desde 2003, estudos de caracterização de bactérias isoladas de feijão-caupi na região de Petrolina não haviam sido conduzidos com o objetivo de seleção de isolados para eficiência em campo, apesar de os resultados indicarem que os solos da região são repositórios de bactérias fixadoras de N com potencial biotecnológico (Leite et al., 2009; Martins, 1997). Recentemente, Marinho et al. (2017) classificaram e avaliaram a eficiência agrônômica de duas estirpes de *Bradyrhizobium* obtidas desses solos. Os isolados ESA 17 e ESA 18 foram classificados como pertencentes aos grupos *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*, respectivamente, e apresentaram elevada eficiência agrônômica que culminou com um rendimento de grãos de mais de 1,8 mil kg ha<sup>-1</sup> e teores de proteínas nos grãos superiores a 25%. Avaliações em outras regiões do Semiárido, como no estado do Piauí, demonstraram que novas estirpes de *Bradyrhizobium* nativas de Minas Gerais também apresentam eficiência agrônômica satisfatória em condições de dependência de chuva (Costa et al., 2011; Ferreira et al., 2013), o que indica que diversos *Bradyrhizobium*, mesmo os alóctones, podem apresentar adaptação às condições locais.

Extrapolando a questão da produção em condições de campo, a inoculação do feijão-caupi com rizóbios eficientes pode resultar numa interação positiva entre genótipo e bactéria, por exemplo, de modo a garantir menores índices de infestação pelo caruncho-do-feijão (*Callosobruchus maculatus*)

em grãos armazenados (Torres et al., 2016; Silva et al., 2017b). O investimento de novos esforços de pesquisa nessa linha pode resultar em mais uma aplicação tecnológica dos rizóbios de feijão-caupi na região semiárida.

Além do feijão-caupi, há outras culturas de interesse econômico sobre as quais já foi levantado um conjunto de informações com relação à diversidade e aplicação tecnológica de rizóbios nativos, entre elas destaca-se o amendoim (*Arachis hypogaea*). Para o amendoim, apenas a estirpe SEMIA 6144 de *Bradyrhizobium* sp. está autorizada pelo Mapa para a produção de inoculantes no Brasil há mais de 20 anos. Esse isolado é originário do Zimbábue e foi recomendado após experimentos realizados pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC).

A seleção de rizóbio de amendoim por meio da avaliação de sua diversidade e eficiência simbiótica já é conduzida há alguns anos por instituições de pesquisa do Nordeste (Santos et al., 2005, 2017a, 2017c; Lyra et al., 2013; Cunha, 2014). Esses resultados têm indicado grande diversidade dos isolados e sua eficiência simbiótica; entretanto dados sobre a eficiência agrônômica das bactérias nativas ainda são escassos. Em um estudo realizado em três diferentes localidades do Nordeste (Barbalha, CE, Campina Grande, PB, e Abreu e Lima, PE), Sizenando et al. (2016) avaliaram a eficiência agrônômica da estirpe ESA 123 (isolada de um nódulo de *A. hypogaea* cultivar BR1) cultivada em um solo do município de Barbalha, pertencente ao gênero *Bradyrhizobium* (Cunha, 2014), e depositada na Coleção de Culturas de Micro-organismos de Interesse Agrícola da Embrapa Semiárido (CMISA). Nesses ensaios, a bactéria ESA 123 apresentou elevada eficiência agrônômica em duas variedades comerciais, nas quais promoveu produtividade de vagens igual ou superior à observada no tratamento que recebeu o inoculante comercial.

Assim como os resultados já obtidos com o feijão-caupi, a seleção de novas estirpes de amendoim em condições de campo pode resultar em desempenho igual ou superior ao observado com as estirpes já autorizadas para a produção de inoculantes para essa cultura. Na continuação dos trabalhos de avaliação dessas bactérias, os grupos de pesquisa almejam aumentar a lista de bactérias recomendadas para a produção de inoculantes no Brasil e incluir esses novos isolados potenciais, o que pode incrementar a produtividade e a adoção da tecnologia de inoculação na região.

Além do feijão-caupi e do amendoim, estudos com outras culturas, como o jacatupé (*Pachyrhizus erosus*) (Freitas et al., 2007) e o guandu (*Cajanus cajan*) (Freitas et al., 2003), já foram conduzidos na região semiárida do Brasil. Apesar de sua importância para a região, esses trabalhos relatam algumas ações pontuais dos grupos de pesquisa e não têm um encadeamento, como nos estudos com o feijão-caupi e com o amendoim. Por serem pontuais, esses trabalhos não têm o foco de selecionar estirpes com o objetivo de recomendação de novos inoculantes. Esse cenário indica a necessidade de novos investimentos em pesquisa, para que estudos mais sistemáticos com o objetivo de seleção de novas estirpes de rizóbio para leguminosas de interesse econômico sejam realizados.

## Seleção de estirpes de rizóbio: leguminosas nativas da Caatinga

Como ressaltado acima, há aproximadamente 617 espécies de leguminosas nativas da Caatinga já descritas e catalogadas. Muitas dessas espécies apresentam a capacidade de nodular com rizóbios nativos. A diversidade de bactérias capazes de formar nódulos com essas espécies começou a ser estudada há pouco mais de uma década. Estudos pioneiros para avaliar a taxa de FBN em cratília (*Cratylia mollis*) foram realizados por meio da técnica da abundância natural do <sup>15</sup>N (Teixeira et al., 2006) (mais detalhes no tópico a seguir). Até a publicação deste livro, não havia sido levantada qualquer outra informação sobre os aspectos relacionados à FBN em espécies nativas da região semiárida, sendo esse um trabalho muito importante e pioneiro para a região.

Muito recentemente, a partir de 2010, resultados sobre as diversidades fenotípica e molecular dos isolados de rizóbios de espécies nativas começaram a ser publicados. A espécie pioneira estudada nesses trabalhos foi a jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*), cuja diversidade de rizóbios associados foi avaliada por meio da técnica de análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) por Teixeira et al. (2010). Os autores demonstraram haver elevada diversidade de bactérias nativas, que guardam poucas semelhanças com as bactérias de referência pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*.

A primeira identificação de isolados de rizóbio de espécies nativas da região, relatada no estudo de Reis Júnior et al. (2010), foi feita em nódulos de jurema-preta de solos da cidade de Feira de Santana, no Semiárido baiano; esses rizóbios foram identificados como pertencentes ao gênero *Burkholderia* (atualmente *Paraburkholderia*).

Mais recentemente, uma quantidade maior de informações sobre a diversidade de rizóbios de espécies de leguminosas nativas tem sido disponibilizada. Freitas et al. (2014) identificaram elevadas diversidades cultural e molecular, por meio da técnica de ARDRA, em bactérias isoladas das espécies *Mimosa tenuiflora* e *Mimosa paraibana*. Nesse estudo, mais uma vez, a existência de poucas semelhanças entre os novos isolados de rizóbio e os isolados utilizados como estirpes de referência corrobora a hipótese da elevada diversidade de rizóbios capazes de nodular espécies nativas em solos do Semiárido.

Na identificação dos isolados bacterianos nodulantes de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*) nativos de solos da região semiárida de diferentes estados do Nordeste, a predominância de *Paraburkholderia* spp. foi identificada por meio das análises de sequências do gene 16S rRNA (Martins et al., 2015a). Nesse estudo, a variabilidade genética dos novos isolados foi muito elevada e as sequências apresentaram pouca similaridade com aquelas disponíveis nos bancos de dados públicos, o que indica a presença de novos grupos taxonômicos entre os isolados obtidos.

Os estudos conduzidos ao longo da última década tinham em foco a avaliação da diversidade de rizóbios de espécies do gênero *Mimosa*, que indicou a predominância de isolados de *Paraburkholderia* em nódulos dessas leguminosas na região semiárida. Para outros grupos taxonômicos de leguminosas nativas do Semiárido, a geração de conhecimento sobre a diversidade é ainda escassa. Nesse sentido, alguns resultados de pesquisa começaram a ser publicados recentemente.

Para oito espécies de leguminosas do gênero *Chamaecrista* (Caesalpinioideae, Caesalpineae) coletadas em sete municípios do Semiárido baiano, a avaliação da diversidade filogenética dos isolados de rizóbio, por meio de um estudo robusto com a abordagem de *multilocus sequence analysis* (MLSA), indicou que 100% dos 47 isolados obtidos foram classificados dentro do gênero *Bradyrhizobium*, porém enquadrados em dife-

rentes grupos. Especial destaque foi dado para um grupo com 33 isolados bacterianos sem afiliação aos clados clássicos de *Bradyrhizobium*, o que é um forte indicativo de sua afiliação a novas *taxa* (Santos et al., 2017b).

Em três trabalhos publicados recentemente, a diversidade e a eficiência simbiótica de isolados de rizóbio do mulungu (*Erythrina velutina*) em solos das Caatingas pernambucana e baiana foram avaliadas. Esses trabalhos demonstraram elevada variabilidade fenotípica com relação ao metabolismo de fontes de carbono, resistência intrínseca a antibióticos, resistência à salinidade e a elevadas temperaturas, além da produção de auxinas in vitro (Menezes et al., 2016; Rodrigues et al., 2018). A análise do posicionamento taxonômico por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA dos isolados obtidos por Menezes et al. (2016) foi realizada por Menezes et al. (2017), que resultou no enquadramento das nove bactérias em três gêneros diferentes, o que indica a capacidade do mulungu de nodular com rizóbios de diferentes *taxa*. Na avaliação da eficiência simbiótica dos isolados, destacaram-se as bactérias ESA 71 (*Burkholderia* sp.), ESA 74 (*Bradyrhizobium* sp.) e ESA 70 (*Rhizobium* sp.), bem como a estirpe de referência BR 5609 (*Bradyrhizobium elkanii*) por induzirem maiores acúmulos de N na parte aérea em comparação com os demais tratamentos. Os resultados obtidos por Rodrigues et al. (2018), ao avaliarem a diversidade de rizóbios de mulungu em solos dos municípios de Serra Talhada e Caruaru, PE, também demonstraram que os dez rizóbios avaliados foram enquadrados em três gêneros: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Paraburkholderia*. Entre essas bactérias, a eficiência simbiótica das bactérias ESA 90 (*Rhizobium* sp.), ESA 96 (*Paraburkholderia* sp.) e ESA 100 (*Bradyrhizobium* sp.) destacou-se das demais. Esses resultados indicam que essas bactérias, que estão depositadas na CMISA, poderão ser utilizadas em estudos de validação para a recomendação de produção de inoculantes comerciais para o mulungu.

A relação do povo sertanejo com a Caatinga é muito próxima e a exploração dos recursos vegetais disponíveis para diversos usos (forragem, utilização da madeira e da lenha, uso medicinal, entre outros) é muito forte na região. Essas características reforçam a demanda pela seleção de rizóbios para essas espécies nativas, que podem ser utilizados em aplicações

para a produção de mudas mais saudáveis e com maior probabilidade de sucesso no campo. Essas mudas podem ser aplicadas em plantios visando à utilização sustentável, o manejo da Caatinga, a recuperação de áreas degradadas, etc.

## Microrganismos diazotróficos em espécies não leguminosas nativas da Caatinga

Se, para as leguminosas, a quantidade de informações disponíveis na literatura científica sobre a diversidade de microssimbiontes diazotróficos é muito pequena, para as espécies nativas de plantas não leguminosas, esse cenário é ainda pior. A elevada diversidade de espécies pertencentes a diferentes famílias botânicas ainda não foi avaliada quanto à comunidade microbiana associada, principalmente no que tange aos microrganismos fixadores de N. Em um estudo pioneiro, Kavamura et al. (2013) isolaram bactérias promotoras de crescimento vegetal (não diazotróficas) da rizosfera de cactos nativos de diferentes regiões da Caatinga. Entre essas bactérias, dois isolados (*Pantoea* sp. e *Bacillus* sp.) foram selecionados por apresentarem a capacidade de promover a tolerância de plantas de milho (*Zea mays*) à seca. Essa é, com certeza, uma característica desejável para os inoculantes microbianos desenvolvidos para a região semiárida.

Em outro estudo também pioneiro, Fernandes Júnior et al. (2015) isolaram bactérias diazotróficas associadas à gramínea nativa tolerante à dessecação *Tripogon spicatus*. Essas bactérias foram avaliadas quanto a suas características fenotípicas; alguns de seus isolados se destacaram por apresentar elevada tolerância ao estresse salino in vitro. Ao utilizar o arroz (*Oryza sativa*) como planta-modelo, foi possível observar que três isolados (*Pantoea* sp., *Rhizobium* sp. e *Bacillus* sp.) apresentaram a capacidade de promover o crescimento vegetal em taxas superiores às observadas no tratamento de inoculação com uma estirpe de *Azospirillum brasilense*, utilizada no inoculante comercial para o arroz.

Esses estudos recentes foram desenvolvidos por meio de abordagens inovadoras, sob óticas de pesquisa que objetivaram o entendimento da diversidade de bactérias promotoras do crescimento vegetal,

associadas a plantas nativas e sua utilização na inoculação das plantas cultivadas. Os resultados obtidos pelos grupos de pesquisa indicam que a seleção de isolados bacterianos, para culminar em aumentos de produtividade em culturas de não leguminosas do Semiárido, deve ser conduzida com essas abordagens.

## **Estimativas da fixação biológica de nitrogênio em agroecossistemas do Semiárido**

O desenvolvimento de qualquer tecnologia para incrementar o processo de FBN requer a quantificação precisa de N fixado nos diferentes agroecossistemas. Estimativas da FBN são importantes para determinar: 1) a capacidade de fixar  $N_2$  em diferentes genótipos de plantas (espécies e variedades); 2) o efeito de práticas de manejo sobre a FBN; 3) o balanço entre as quantidades de N aportadas e exportadas pelos cultivos; e 4) a importância da FBN para o funcionamento de um ecossistema natural (Unkovitch et al., 2008). Para a produção agropecuária do Nordeste, essas quantificações são ainda mais importantes do que para outras regiões, porque o alto custo do insumo e as incertezas climáticas, que reduzem as respostas das culturas, comprometem a viabilidade da aplicação de fertilizantes nitrogenados por agricultores familiares.

Nesse contexto, as culturas e pastagens contam apenas com o N disponibilizado pela mineralização da matéria orgânica do solo e pela FBN. Nos cultivos irrigados, como o de frutas nos solos arenosos do Submédio São Francisco, por exemplo, em que a utilização de insumos é mais intensiva, o cultivo de plantas de cobertura (adubos verdes) pode diminuir a necessidade de fertilizantes nitrogenados, além de minimizar a rápida mineralização da matéria orgânica associada às condições de altas temperaturas, radiação ultravioleta e umidade do solo (Parton et al., 2007; King et al., 2012; Lee et al., 2014). Assim, para os sistemas produtivos do Semiárido, estimativas da FBN podem responder a perguntas como: “Quantos quilogramas de N são fixados em 1 ha dos principais tipos de cultivo de sequeiro do Semiárido?”; “Quantos quilogramas de N são fixados em 1 ha de cultivos irrigados ao se utilizarem adubos verdes?”; “Quantos quilogramas de N são fixados, anualmente, em 1 ha de Caatinga?”.

## Métodos utilizados para quantificação da fixação biológica de nitrogênio no Semiárido

Para calcular as quantidades de N fixadas em determinado agroecossistema, é necessário fazer estimativas simultâneas das quantidades de N total acumuladas na biomassa vegetal produzida e das proporções desse N que são derivadas da atmosfera por meio da FBN. As quantidades de N estocadas na biomassa são calculadas mediante multiplicação das quantidades de biomassa pelos respectivos teores de N total, estes últimos determinados analiticamente. Estimativas da biomassa em cultivos podem ser facilmente realizadas por meio de amostragens destrutivas. Em espécies arbóreas de sistemas naturais, tais estimativas geralmente são calculadas por meio de equações alométricas.

Existem diversos métodos para quantificar as proporções de N derivado da atmosfera; todos eles apresentam vantagens e desvantagens, de acordo com o sistema estudado (Freitas et al., 2010a). Essas metodologias podem ser agrupadas em três linhas gerais de abordagem: 1) incremento líquido de N em um sistema solo-planta (método do balanço de N); 2) identificação do compartimento de origem (solo ou atmosfera) do N total da planta (métodos isotópicos, diferença de N e ureídeos); e 3) medição da atividade da nitrogenase, a enzima responsável pela FBN (métodos de redução do acetileno e evolução de hidrogênio) (Unkovich et al., 2008).

Os métodos isotópicos têm sido os mais amplamente utilizados para estimativas da FBN em agroecossistemas por todo o mundo e, entre eles, os principais são o método da abundância natural e o método da diluição isotópica. Esses métodos são baseados no princípio de que, se a concentração do isótopo  $^{15}\text{N}$  no  $\text{N}_2$  atmosférico difere significativamente da concentração isotópica do N no solo disponível para as plantas, é possível calcular a FBN com base em análises isotópicas do N de plantas fixadoras e de plantas não fixadoras (Unkovich et al., 2008). No método da diluição isotópica, plantas potencialmente fixadoras e plantas-referência não fixadoras são cultivadas em solo e recebem a mesma quantidade de fertilizantes isotopicamente marcados, que são compostos caros. Em contraste, no método da abundân-

cia natural, nada é adicionado ao sistema solo-planta (não há perturbação do ambiente), o que o torna particularmente útil para analisar ecossistemas naturais para os quais é muito difícil marcar o substrato (Freitas et al., 2010a); este último método também pode ser utilizado para leguminosas anuais cultivadas (Martins et al., 2015b).

O padrão isotópico do Semiárido (solos naturalmente enriquecidos em  $^{15}\text{N}$ ) propicia estimativas bastante confiáveis da FBN, utilizando-se o método da abundância natural (Freitas et al. 2015). A metodologia baseia-se na comparação entre a abundância de  $^{15}\text{N}$  de uma espécie fixadora de N (que obtém N do  $\text{N}_2$  atmosférico além das fontes de N do solo) e a abundância de uma espécie-referência não fixadora (que conta apenas com o N derivado do solo), ou seja, espera-se que plantas não fixadoras (que retiram todo seu N do solo) sejam mais abundantes em  $^{15}\text{N}$  do que plantas fixadoras (que recebem parte de seu N do ar via FBN) (Freitas et al., 2010a). O cálculo do percentual de N da planta derivado da atmosfera é feito por meio da equação a seguir (Shearer; Kohl, 1986):

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

em que:

$\%N_{\text{dda}}$  = percentual de N da planta fixadora que é derivado do ar.

$\delta^{15}\text{N}_{(\text{referência})}$  = abundância de  $^{15}\text{N}$  da planta-referência não fixadora (que reflete a abundância de  $^{15}\text{N}$  do N do solo disponível para as plantas).

$\delta^{15}\text{N}_{(\text{fixadora})}$  = abundância de  $^{15}\text{N}$  da planta fixadora.

B = valor de  $\delta^{15}\text{N}$  de plantas fixadoras cultivadas na ausência de N (é a abundância de  $^{15}\text{N}$  do N fixado na planta fixadora).

No Semiárido brasileiro, estimativas da FBN com métodos isotópicos só começaram a surgir a partir dos anos 2000 e ainda são bastante escassas, o que explica a grande lacuna de informações sobre as quantidades de N fixadas nos agroecossistemas existentes nas diferentes condições edafoclimáticas. A maior parte dos dados publicados ou em fase de publicação são resultados dos esforços de um grupo de pesquisadores pertencentes às seguintes instituições: UFRPE, UFPE, IPA, Instituto Federal de Pernambuco

(IFPE), Embrapa Semiárido, Uneb e Centro de Energia Nuclear na Agricultura (Cena), da Universidade de São Paulo. Esse grupo tem realizado estimativas da FBN que geram informações quantitativas sobre a fixação em fragmentos de Caatinga, em cultivos tradicionais do Semiárido, em sistemas agroflorestais e em sistemas que utilizam adubação verde. A seguir, será apresentado um panorama das metodologias utilizadas e dos resultados já publicados pelo grupo, com alguns comentários introdutórios que objetivam ressaltar a importância dos sistemas estudados. Em futuro próximo, novas estimativas estarão disponíveis na literatura. Entretanto, considerando a diversidade ambiental do Semiárido, ainda é alta a demanda por informações sobre as quantidades de N potencialmente fixadas.

## Fixação em leguminosas arbóreas nativas da Caatinga

Florestas secas correspondem a mais de 40% da vegetação dos trópicos (Murphy; Lugo, 1995) e cobrem pouco mais de 1 milhão de quilômetros quadrados, principalmente nas Américas e na África (Miles et al., 2006), onde a família Leguminosae é a que apresenta maior dominância e diversidade de espécies (Gentry, 1995; Crews, 1999; Queiroz, 2009; Zappi et al., 2015). Entre as leguminosas nativas de florestas secas, é comum encontrar contribuições do N<sub>2</sub> atmosférico maiores do que 80% do N total absorvido pela planta (Teixeira et al., 2006; Freitas et al., 2010b; Andrews et al., 2011).

As florestas secas do Brasil (Caatingas) fazem parte do ciclo de agricultura itinerante e são a principal forma de pasto nativo; são, na verdade, um mosaico de áreas com distintos tempos de regeneração entremeadas a áreas mais preservadas, que apresentam diferentes proporções de leguminosas fixadoras no conjunto geral da vegetação (Sampaio et al., 1998; Pereira et al., 2003). Estudos pioneiros indicam que a FBN pode ser responsável por uma proporção alta do N absorvido por espécies nativas da Caatinga, como: cratília (Teixeira et al., 2006), jurema-preta, unha-de-gato [*Mimosa arenosa* (Willd.) Poir.] e jurema-branca [*Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke] (Freitas et al., 2010b). As contribuições da FBN para o N das plantas dessas espécies podem superar os 80%.

Com base na proporção de biomassa em leguminosas potencialmente fixadoras e na alta contribuição da FBN para a nutrição dessas espécies, fragmentos de Caatinga podem ser considerados como *hot spots* de FBN. Entretanto a compreensão sobre as taxas e os fatores que controlam a FBN nas Caatingas, ainda é baixa, pois os dados que relacionam as quantidades de N fixadas e a diversidade de condições edafoclimáticas em que essas florestas secas ocorrem, ainda são escassos. Até o momento, estimativas das quantidades de N fixadas em áreas com diferentes proporções de leguminosas na vegetação arbustiva e arbórea na Caatinga foram publicadas por Silva et al. (2017a) e Souza et al. (2012). De maneira contrária ao esperado, esses estudos têm demonstrado que os aportes de N fixado podem ser nulos ou muito baixos mesmo em áreas dominadas por leguminosas nodulantes (Souza et al., 2012) e não ter relação direta com a diversidade e abundância de leguminosas nodulantes (Silva et al., 2017a).

Essas estimativas resultaram de um pacote metodológico semelhante, que consiste na instalação de parcelas na área estudada, nas quais são realizados levantamentos florísticos e fitossociológicos para identificação de espécies potencialmente nodulantes e determinação das biomassas de folhas mediante equações alométricas desenvolvidas para espécies da Caatinga por Silva e Sampaio (2008) e Souza et al. (2012). Simultaneamente, são realizadas coletas de tecido foliar de indivíduos de dois grupos de espécies: 1) espécies-alvo, que são todas as espécies de leguminosas com capacidade de nodulação conhecida e espécies de leguminosas sobre cuja capacidade de nodulação ainda não há informações na literatura; e 2) espécies-referência, que são espécies não leguminosas ou leguminosas não nodulantes. A capacidade de nodulação é determinada de acordo com a literatura (Allen; Allen, 1981; Sprent, 2009; Freitas et al., 2010b). O tecido foliar de cada indivíduo amostrado é submetido a análises para determinação dos teores de N total (%) e da abundância natural de  $^{15}\text{N}$  em espectrômetro de massa.

Souza et al. (2012) testaram a hipótese de que as quantidades de N fixadas são maiores em fragmentos de Caatinga em regeneração, em que predominam espécies fixadoras durante grande parte do processo de sucessão (Sampaio et al., 1998; Pereira et al., 2003), do que em fragmentos maduros, em que a proporção de leguminosas fixadoras é baixa (Sampaio,

1996). As avaliações foram realizadas no município de Santa Terezinha, localizado no Sertão da Paraíba. De maneira contrária à hipótese inicial, os resultados demonstraram que a FBN das leguminosas arbóreas foi ausente ou muito baixa nas áreas em regeneração, enquanto no fragmento maduro todas as espécies fixadoras – jurema-preta, jurema-branca e angico [*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan] – apresentaram grande proporção de N derivado da atmosfera (> 50%). Assim não houve aporte de N atmosférico nas áreas em regeneração, enquanto nas áreas maduras os aportes foram em torno de 6 kg ha<sup>-1</sup>, o que equivale a menos de 10% do N total estocado no compartimento foliar de todas as arbóreas do fragmento. Embora baixa, essa quantidade é similar a valores encontrados em outras florestas tropicais. Já a ausência de FBN nos fragmentos em regeneração desafia a visão de que as leguminosas fixadoras apresentam vantagem ecológica em vegetações em regeneração.

A causa do baixo desempenho simbiótico que pode ser apresentado por uma espécie nodulante, mesmo em outros fragmentos florestais (Faye et al., 2007), ainda não está esclarecida. 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, mas populações de rizóbios capazes de nodular leguminosas são abundantes em solos de regiões de onde os genótipos bacterianos são nativos (Bala et al., 2003). Mesmo na presença de populações de rizóbios compatíveis, é possível que a simbiose não seja eficiente (Faye et al., 2007), pois tanto o crescimento de rizóbios em vida livre nos solos como sua capacidade de nodular as plantas e fixar N são sensíveis a condições ambientais e podem ser dependentes dos diversos atributos do solo.

Os solos de áreas de Caatinga são geralmente pobres em fósforo (P) (Silveira et al., 2006), fator que pode limitar a FBN (Crews, 1999; Vitousek et al., 2002, 2013; Pons et al., 2007). Além disso, pouco se sabe sobre a nodulação espontânea e sobre a ocorrência de populações capazes de formar simbiose com as espécies nativas (Reis Júnior et al., 2010; Freitas et al., 2014). Silva et al. (2017a) estimaram a FBN, a disponibilidade relativa de P e de N para as plantas e a ocorrência de populações de rizóbios

em fragmentos de Caatinga em diferentes estádios de regeneração, com diferentes proporções de leguminosas, nos municípios de São João e Petrolina, localizados no Semiárido de Pernambuco. Apesar de todos os fragmentos apresentarem dominância de leguminosas, principalmente espécies nodulantes, as quantidades de N fixadas biologicamente foram baixas (até  $18 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$  em São João e até  $3,6 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$  em Petrolina). Isso ocorreu porque apenas uma parte das plantas potencialmente nodulantes estava fixando N, mesmo assim, com baixos percentuais de N derivado do ar (N<sub>da</sub>). Nesse caso, a ausência de FBN não pode ser explicada pela ausência de microssimbiontes nos solos, mas pode ser consequência da alta disponibilidade de N em relação à de P, refletida nas altas relações N:P ( $> 22$ ) nas folhas dos fragmentos estudados.

Melhor compreensão do papel da FBN na regeneração dessas matas secas demanda a geração de mais dados sobre a produção de biomassa de leguminosas e quantidades de N fixadas em diferentes condições edafoclimáticas (Freitas et al., 2015).

## **Fixação em espécies herbáceas em fragmentos de Caatinga**

---

Em pastagens naturais, a produção de biomassa normalmente é limitada pela baixa disponibilidade de água para as plantas (consequência das baixas médias de precipitação anual), pelo caráter errático das chuvas e pela predominância de solos rasos. Na Caatinga, a comunidade de plantas herbáceas, que ainda é pouco conhecida, apresenta grande diversidade (Araújo et al., 2005, 2007), com mais de 687 espécies listadas (Silva et al., 2009). A maior parte dessas ervas apresenta ciclo de vida anual e passa a ser mais visível durante a estação chuvosa (Araújo et al., 2005). Além do papel fundamental para o equilíbrio do ecossistema (Araújo et al., 2005; Reis et al., 2006), esse estrato herbáceo apresenta valor econômico por ser um componente importante da dieta dos rebanhos.

Dados sobre produção de biomassa das espécies herbáceas são escassos; a maioria dos estudos se refere à disponibilidade de herbáceas em pastagens com diferentes graus de interferência (de pouco a muito afetados

pelo homem). Embora nunca representem a maioria das espécies nem da biomassa, as leguminosas fixadoras sempre estão presentes no estrato herbáceo (Araújo et al., 2005; Moreira et al., 2006; Silva et al., 2009; Santana et al., 2011), com alguns gêneros recorrentes (por exemplo, *Centrosema*, *Macroptilium* e *Phaseolus*).

O potencial de FBN de leguminosas herbáceas nativas é uma característica importante para avaliar seu potencial de uso como forrageiras e/ou adubos verdes (Mapfumo et al., 2005; Nezomba et al., 2009; Tauro et al., 2009; Onyeonagu; Asiegbu, 2011). Apesar de essa característica ainda ser pouco conhecida para as espécies nativas do Semiárido brasileiro, Freitas et al. (2011) demonstraram que, quando cultivadas em condições de casa de vegetação, leguminosas forrageiras de porte herbáceo ou subarbustivo comuns na Caatinga (*Desmanthus pernambucanus*, *Macroptilium lathyroides* e *Macroptilium martii*) podem apresentar até 85% de N<sub>dda</sub>. Com essa tendência de apresentar alto percentual de N<sub>dda</sub>, as quantidades de N fixadas pelas leguminosas são definidas pela capacidade de produção de biomassa.

Até o momento, só existe um artigo em que foi feita a quantificação do N aportado a fragmentos de Caatinga pelo estrato herbáceo (Freitas et al., 2012a) nos mesmos fragmentos estudados por Souza et al. (2012) no Sertão paraibano. A FBN foi estimada em todas as espécies identificadas como leguminosas, mediante a metodologia da abundância natural do <sup>15</sup>N. Em áreas recém-abandonadas, a produção de biomassa de herbáceas ultrapassou 6,0 Mg ha<sup>-1</sup>; na Caatinga madura, ficou em torno de 3,4 Mg ha<sup>-1</sup>. As leguminosas presentes na biomassa – *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, além de mais duas espécies não identificadas – apresentaram contribuições altas à FBN (de 52% a 88%), o que demonstra seu potencial para o enriquecimento de pastagens e a recuperação da fertilidade do solo. As quantidades de N fixadas foram baixas (de 0,28 kg ha<sup>-1</sup> a 5,22 kg ha<sup>-1</sup>) devido à baixa proporção de leguminosas (no máximo 4%) na produção total de herbáceas. Apesar disso, essas quantidades podem ter um impacto ambiental significativo considerando seus efeitos acumulados, principalmente em áreas recém-abandonadas.

## Nitrogênio fixado em sistemas de cultivo

O feijão-caupi, geralmente plantado em consórcio com o milho, é a cultura dominante na agricultura familiar do Semiárido brasileiro. Essas culturas são integradas à pecuária (principal atividade rural nas áreas mais secas, que abrange a maior proporção das terras) mediante a utilização dos restos culturais para alimentação animal ou para incorporação ao solo. Atualmente, apresentam baixíssima produtividade, que é determinada principalmente pela irregularidade e deficiência das chuvas. Em cultivos solteiros ou em consórcio, o feijão-caupi é produzido em um sistema com pouca utilização de insumos, sem aplicação de fertilizantes. Por isso, a FBN tem um papel preponderante na nutrição da planta; a simbiose é estabelecida geralmente com bactérias nativas dos solos, pois também não é comum a adoção da tecnologia de inoculação com rizóbios selecionados.

O feijão-caupi apresenta ampla diversidade genética; há um grande número de variedades melhoradas disponíveis para as condições semiáridas. Além dessas, existem diversas variedades locais, muitas vezes preferidas pelos agricultores da região, devido a características de porte, tipo de maturação, ciclo da planta, cor, forma, tamanho e características de cozimento dos grãos. Assim essa interação entre genótipos de plantas e de microsimbiontes nativos, aliada às diferentes condições edafoclimáticas e de cultivo, gera enorme potencial de variação de respostas da FBN, já observado em alguns trabalhos (MARINHO et al., 2014). Entretanto, nos últimos anos, apenas dois estudos avaliaram quantitativamente o desempenho da simbiose em feijão-caupi no Semiárido, ambos no Agreste da Paraíba (Freitas et al., 2012b; Martins et al., 2015b).

Utilizando o método da diluição isotópica (em que foram aplicados 20 kg ha<sup>-1</sup> de ureia enriquecida em <sup>15</sup>N), verifica-se que algumas variedades locais<sup>6</sup> de feijão-caupi podem absorver mais da metade do N estocado em sua biomassa por meio da FBN (Freitas et al., 2012b). Quando cultivada no município de Esperança, no Agreste paraibano, a variedade Costela de Vaca

<sup>6</sup>No caso de variedades tradicionais (não desenvolvidas por programas de melhoramento), é importante ressaltar que têm denominações locais, o que não assegura identidade dos genótipos das plantas e pode levar a situações em que variedades com a mesma denominação sejam bastante diferentes de acordo com a região em que são produzidas.

apresentou capacidade de absorver da atmosfera quase 80% do N acumulado em sua biomassa, o que equivale a um potencial de aporte de 45 kg N ha<sup>-1</sup> em cultivos não consorciados. Outras variedades (Cariri, Sedinha, Corujinha, Sempre Verde e Azul) também apresentaram alta capacidade de FBN (Ndda de 43% a 58%). Por isso as quantidades de N aportadas pela FBN foram fortemente condicionadas pela produção de biomassa (variaram entre 22 kg ha<sup>-1</sup> e 30 kg ha<sup>-1</sup>, quando cultivadas solteiras).

Em consórcio, a produtividade do feijão-caupi diminuiu, com efeito sobre a quantidade de N fixado, que também será menor. Apesar de o consórcio de feijão-caupi com milho ser comum no Semiárido, só existe uma estimativa das quantidades de N fixadas, comparando-se os sistemas tradicional e agroflorestal – entre ruas de gliricídia (*Gliricidia sepium*) + maniçoba (*Manihot glaziovii*) – no município de Taperoá, no Cariri Ocidental da Paraíba (Martins et al., 2015b). Nos dois sistemas, a simbiose com bactérias naturalmente estabelecidas no solo (não foram utilizados inoculantes) foi eficiente em fornecer N para as plantas, cuja FBN foi responsável por 62% a 68% da nutrição nitrogenada da leguminosa. A quantidade de N fixada no feijão-caupi no sistema tradicional (em consórcio com milho) foi de cerca de 30 kg ha<sup>-1</sup> N, dos quais 11 kg ha<sup>-1</sup> foram exportados nos grãos e 18 kg ha<sup>-1</sup> ficaram na palhada. Quando o milho + feijão foram cultivados entre as ruas de espécies arbóreas (sistema agroflorestal), a quantidade de N fixada foi reduzida (apenas 2,7 kg ha<sup>-1</sup>), uma vez que a produtividade de biomassa do cultivo anual foi drasticamente reduzida (Martins et al., 2015b). Essa redução era esperada, pois a presença de árvores afeta diretamente a produtividade das culturas associadas pela competição por água, nutrientes e luz (Pérez-Marin et al., 2007).

## Nitrogênio fixado em leguminosas arbóreas introduzidas em sistemas agroflorestais

A introdução de espécies arbóreas em campos agrícolas e em pastagens aumenta a produtividade de biomassa total e confere maior estabilidade aos sistemas em condições semiáridas (Martins et al., 2013; Pérez-Marin et al., 2007). Entretanto a produtividade das espécies herbáceas diminuiu quando são cultivadas nas entrelinhas de árvores (Martins et al., 2013). Essa redução pode ser compensada, em longo prazo, pela manutenção da fertili-

dade do solo propiciada pela entrada, no sistema, do N fixado nas leguminosas arbóreas. A quantificação dos inputs via FBN nesses agroecossistemas, geralmente pobres em N, é fundamental para o seu planejamento e manejo.

Estudos sobre o efeito de leguminosas nativas em sistemas agroflorestais não são comuns, mas sabe-se que o alto potencial de FBN dessas espécies pode propiciar o aporte de grandes quantidades de N (Teixeira et al., 2006; Freitas et al., 2010b), que dependerá do potencial de produção de biomassa. Algumas espécies não nativas, como gliricídia [*Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth] e leucena [*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit], têm demonstrado potencial de produção de biomassa ou capacidade de nodulação com rizóbios naturalmente estabelecidas nos solos (Martins et al., 2015b; Silva et al., 2016), mas também não existem estudos sobre quantidades de N que podem ser aportadas pelas mesmas. Em Esperança, PB, observou-se que a gliricídia nodulada por bactérias naturalmente estabelecidas no solo pode obter mais de 50% de seu N por meio da simbiose. Quando inserida em sistema agroflorestal, juntamente com maniçoba, em cultivos de capim-buffel (*Cenchrus ciliaris* L.) ou palma [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.], a leguminosa pode adicionar mais de 40 kg ha<sup>-1</sup> de N apenas pelo corte de suas folhas e ramos finos (Martins et al., 2015b).

## Fixação em gramíneas

---

Embora a principal gramínea cultivada no Semiárido seja o milho, existem também cultivos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], arroz (*Oryza sativa* L.) e capins diversos utilizados como pasto ou para corte para forragem. Além disso, gramíneas nativas são um importante componente da biomassa de herbáceas em alguns fragmentos de Caatinga. Essas espécies tropicais, de sistema fotossintético C4, apresentam alta eficiência em termos quanto à fotossíntese e à utilização de água, além de potencial de alta produção de biomassa. Diversas espécies diazotróficas (principalmente dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* e *Burkholderia*) já foram identificadas colonizando a superfície ou o interior das raízes dessas gramíneas (Montañez et al., 2009; Luna et al., 2010), mas ainda não está estabelecido se, e em que extensão, a FBN contribui para a nutrição das plantas.

Para as condições do Semiárido brasileiro, ainda não existem trabalhos publicados com evidências isotópicas de FBN em gramíneas e, conseqüentemente, não existem estimativas do N fixado nessas plantas (Freitas et al., 2015). Mesmo assim, a possibilidade de produção de grande quantidade de biomassa com utilização mínima de fertilizantes nitrogenados (que são dependentes de energia fóssil para sua fabricação) realça a importância da FBN em gramíneas. Por esse motivo, pesquisas estão sendo desenvolvidas (com cana-de-açúcar, sorgo e milho), avisando preencher a lacuna sobre o potencial de benefício da FBN em gramíneas do Semiárido, com previsão de publicação próxima.

## Considerações finais

---

Esforços de pesquisa têm sido conduzidos ao longo dos anos com o objetivo de conhecer a diversidade de microssimbiontes dos solos do Semiárido, bem como a sua seleção para a obtenção de estirpes eficientes agronomicamente. Com a recente consolidação de novos grupos de pesquisa na região e de programas de pós-graduação em ciências agrárias e áreas correlatas, muitos resultados promissores têm sido obtidos nos últimos anos. Esses resultados poderão, em um futuro não muito distante, subsidiar a indicação de novos microrganismos para a inoculação de espécies de interesse para a região. Além da indicação de novos microrganismos, os resultados de pesquisa obtidos pelos grupos de pesquisa da região Nordeste têm potencial para o subsídio de novas tecnologias, práticas e processos agropecuários para a região semiárida.

Para continuarmos progredindo na geração de conhecimento e tecnologia para a FBN na região semiárida, investimentos em pesquisa, desenvolvimento e inovação devem continuar sendo realizados com o fomento de projetos de pesquisa, bolsas de pós-graduação e infraestrutura nas instituições de pesquisa e ensino da região semiárida do Nordeste do Brasil.

## Referências

---

- ALCÂNTARA, R. M. C. M. de; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; ROCHA, M. de M.; CARVALHO, J. dos S. Eficiência simbiótica de progenitores de cultivares brasileiras de feijão-caupi. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, n. 1, p. 1-9, jan./mar. 2014. DOI: 10.1590/S1806-66902014000100001.
- ALLEN, O. N.; ALLEN, E. K. **The Leguminosae: a source book of characteristics use and nodulation**. Wisconsin: University of Wisconsin, 1981. 812 p. DOI: 10.1007/978-1-349-06142-6.
- ALMEIDA, A. L. G. de; ALCANTARA, 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**, v. 5, n. 3, p. 364-369, 2010. DOI: 10.5039/agraria.v5i3a795.
- ANDREWS, M.; JAMES, E. K.; SPRENT, J. I.; BODDEY, R. M.; GROSS, E.; REIS JUNIOR, F. B. Nitrogen fixation in legumes and actinorhizal plants in natural ecosystems: values obtained using <sup>15</sup>N natural abundance. **Plant Ecology and Diversity**, v. 4, n. 2-3, p. 131-140, 2011. DOI: 10.1080/17550874.2011.644343.
- ARAÚJO, E. de L.; CASTRO, C. C. de; ALBUQUERQUE, U. P. de. Dynamics of Brazilian Caatinga: a review concerning the plants, environment and people. **Functional Ecosystems and Communities**, v. 1, n. 1, p. 15-29, 2007. DOI: 10.1590/S0102-33062005000200011.
- ARAÚJO, E. de L.; SILVA, K. A. da; FERRAZ, E. M. N.; SAMPAIO, E. V. de S. B.; SILVA, S. I. da. Diversidade de herbáceas em microhabitats rochoso, plano e ciliar em uma área de caatinga, Caruaru-PE, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 2, p. 282-297, abr./jun. 2005. DOI: 10.1590/S0102-33062005000200011.
- BALA, A.; MURPHY, P. J.; OSUNDE, A.O.; GILLER, K. E. Nodulation of tree legumes and the ecology of their native rhizobial populations in tropical soils. **Applied Soil Ecology**, v. 22, n. 3, p. 211-223, 2003. DOI:10.1016/S0929-1393(02)00157-9.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 13, de 24 de março de 2011. Aprova as normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura, bem como as relações dos micro-organismos autorizados e recomendados para produção de inoculantes no Brasil, na forma dos Anexos I, II e III, desta Instrução. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 mar. 2011. Seção 1, p. 3-7. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-sda-13-de-24-03-2011-inoculantes.pdf>. Acesso em: 7 ago. 2017.
- BURITY, H. A.; FARIS, M. A.; COULMAN, B. E.; TA, T. C. Fixação de nitrogenio em alfalfa (*Medicago sativa* L.). Comparação entre os métodos da diferença, da diluição do isótopo e da redução de acetileno. **Caderno Ômega. Série Biologia**, n. 2, p. 63-76, jan. 1990.
- COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; MARTINS, L. de V.; AMARAL, F. H. C.; MOREIRA, F. M. de S. Nodulação e produtividade de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. por cepas de rizóbio em Bom Jesus, PI. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 1, p. 1-7, jan./mar. 2011. DOI: 10.1590/S1806-66902011000100001.

CREWS, T. E. The presence of nitrogen fixing legumes in terrestrial communities: evolutionary versus ecological considerations. **Biogeochemistry**, v. 46, n. 1-3, p. 233-246, July 1999. DOI: 10.1023/A:1006141221938.

CUNHA, J. B. A. **Diversidade de rizóbios em nódulos de acessos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.)**. 2014. 62 f. Dissertação (Mestrado em Horticultura Irrigada) – Universidade do Estado da Bahia, Juazeiro.

FAYE, A.; SALL, S.; CHOTTE, J. L.; LESUEUR, D. Soil bio-functioning under *Acacia nilotica* var. *Tomentosa* protected forest along the Senegal River. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 79, n. 1, p. 35–44, 2007. DOI: 10.1007/s10705-007-9093-7.

FERNANDES JÚNIOR, P. I.; AIDAR, S. T.; MORGANTE, C. V.; GAVA, C. A. T.; ZILLI, J. É.; SOUZA, L. S. B.; MARINHO, R. C. N.; NÓBREGA, R. S. A.; BRASIL, M. S.; SEIDO, S. L.; MARTINS, L. M. V. The resurrection plant *Tripogon spicatus* (Poaceae) harbors a diversity of plant growth promoting bacteria in northeastern Brazilian Caatinga. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 4, p. 993-1002, jul./ago. 2015.

FERNANDES JÚNIOR, P. I.; SILVA JÚNIOR, E. B.; SILVA JÚNIOR, S.; SANTOS, C. E. R. S.; OLIVEIRA, P. J.; RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R. Performance of polymer compositions as carrier to cowpea rhizobial inoculant formulations: survival of rhizobia in pre-inoculated seeds and field efficiency. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 12, p. 2945-2951, Feb. 2012. DOI: 10.5897/AJB11.1885.

FERREIRA, L. de V. M.; NÓBREGA, R. S. A.; NÓBREGA, J. C. A.; AGUIAR, F. L. de; MOREIRA, F. M. de S.; PACHECO, L. P. Biological nitrogen fixation in production of *Vigna unguiculata* (L.) Walp, family farming in Piauí, Brazil. **Journal of Agricultural Science**, v. 5, n. 4, p. 153-160, 2013. DOI: 10.5539/jas.v5n4p153.

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

FREITAS, A. D. S. de; MEDEIROS, P. J. C.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P. Fixação do N<sub>2</sub> e desenvolvimento do guandu inoculado com rizóbio em um Cambissolo salinizado do semi-árido. **Agropecuária Técnica**, v. 24, n. 2, p. 87-95, 2003. DOI: 10.5897/AJMR2013.6518.

FREITAS, A. D. S. de; SAMPAIO, E. V. de S. B.; RAMOS, A. P. de S.; BARBOSA, M. R. de V.; LYRA, R. P.; ARAÚJO, E. L. Nitrogen isotopic patterns in tropical forests along a rainfall gradient in Northeast Brazil. **Plant and Soil**, v. 391, n. 1-2, p. 109-122, June 2015. DOI: 10.1007/s11104-015-2417-5.

FREITAS, A. D. S. de; SAMPAIO, E. V. de S. B.; SANTOS, C. E. de R. e S. Abundância natural do <sup>15</sup>N para quantificação da fixação biológica do nitrogênio em plantas. FIGUEIREDO, M. do V. B.; BURITY, H. A.; OLIVEIRA, J. de P.; SANTOS, C. E. de R. e S.; STAMFORD, N. P. (ed.). **Biotecnologia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Recife: Instituto Agrônômico de Pernambuco, 2010. p. 505-517.

FREITAS, A. D. S. de; SAMPAIO, E. V. de 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**, v. 74, n. 3, p. 344-349, Mar. 2010b. DOI: 10.1016/j.jaridenv.2009.09.018.

FREITAS, A. D. S. de; SAMPAIO, E. V. de S. B. de; SILVA, B. L. R. da; ALMEIDA CORTEZ, J. S. de; MENEZES, R. S. C. How much nitrogen is fixed by biological symbiosis in tropical dry forests? 2. Herbs. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 94, n. 2-3, p. 181-192, Dec. 2012a. DOI: 10.1007/s10705-012-9545-6.

FREITAS, A. D. S. de; SILVA, A. F.; SAMPAIO, E. V. de S. B. Yield and biological nitrogen fixation of cowpea varieties in the semi-arid region of Brazil. **Biomass and Bioenergy**, v. 45, p. 109-114, Oct. 2012b. DOI: 10.1016/j.biombioe.2012.05.017.

FREITAS, A. D. S. de; SILVA, T. O. da; MENEZES, R. S. C.; SAMPAIO, E. V. de S. B.; ARAÚJO, E. R.; FRAGA, V. da S. Nodulação e fixação de nitrogênio por forrageiras da Caatinga cultivadas em solos do Semiárido paraibano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 9, p. 1856-1861, set. 2011. DOI: 10.1590/S1516-35982011000900003.

FREITAS, A. D. S. de; VIEIRA, C. L.; SANTOS, C. E. de R. e S.; STAMFORD, N. P.; LYRA, M. do C. C. P. de. Caracterização de rizóbios isolados de Jacatupé cultivado em solo salino no Estado de Pernambuco, Brasil. **Bragantia**, v. 66, n. 3, p. 497-504, 2007. DOI: 10.1590/S0006-87052007000300017.

GENTRY, A. H. Diversity and floristic composition of neotropical dry forests. In: BULLOCK, S. H.; MOONEY, H. A.; MEDINA, E. (ed.). **Seasonally dry tropical forests**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. p. 146-194. DOI: 10.1017/CBO9780511753398.007.

GUALTER, R. M. R.; BODDEY, R. M.; RUMJANEK, N. G.; FREITAS, A. C. R. de; XAVIER, G. R. Eficiência agrônômica de estirpes de rizóbio em feijão-caupi cultivado na região da Pré-Amazônia maranhense. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 303-308, mar. 2011.

KAVAMURA, V. N.; SANTOS, S. N.; SILVA, J. L.; PARMA, M. M.; ÁVILA, L. A.; VISCONTI, A.; ZUCCHI, T. D.; TAKETANI, R. G.; ANDREOTE, F. D.; MELO, I. S. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, v. 168, n. 4, p. 183-191, 2013.

KING, J. Y.; BRANDT, L. A.; ADAIR, E. C. Shedding light on plant litter decomposition: advances, implications and new directions in understanding the role of photodegradation. **Biogeochemistry**, v. 111, n. 1-3, p. 57-81, 2012. DOI: 10.1007/s10533-012-9737-9.

LACERDA, A. M.; MOREIRA, F. M. S.; ANDRADE, M. J. B.; SOARES, A. L. L. Efeitos de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão-caupi. **Revista Ceres**, v. 51, n. 293, p. 67-82, 2004.

LEE, H.; FITZGERALD, J.; HEWINS, D. B.; MCCULLEY, R. L.; ARCHER, S. R.; RAHN, T.; THROOP, H. L. Soil moisture and soil-litter mixing effects on surface litter decomposition: a controlled environment assessment. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 72, p. 123-132, May 2014. DOI: 10.1016/j.soilbio.2014.01.027.

LEITE, J.; FISCHER, D.; ROUWS, L. F. M.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I.; HOFMANN, A.; KUBLIK, S.; SCHLOTTER, M.; XAVIER, G. R.; RADL, V. Cowpea nodules harbor non-rhizobial bacterial communities that are shaped by soil type rather than plant genotype. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, article 2064, Jan. 2017. DOI: 10.3389/fpls.2016.02064.

LEITE, J.; SEIDO, S. L.; PASSOS, S. R.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V. Biodiversity of rhizobia associated with cowpea cultivars in soils of the lower half of the São Francisco river valley. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 5, p. 1215-1226, Sept./Oct. 2009. DOI: 10.1590/S0100-06832009000500015.

LUNA, M. F.; GALAR, M. L.; APREA, J.; MOLINARI, M. L.; BOIARDI, J. L. Colonization of sorghum and wheat by seed inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 8, p. 1071-1076, Aug. 2010. DOI: 10.1007/s10529-010-0256-2.

LYRA, M. do C. C. P. de; FREITAS, A. D. S. de; SILVA, T. A.; SANTOS, C. E. de R. e S. Phenotypic and molecular characteristics of rhizobia isolated from nodules of peanut (*Arachis hypogaea* L.) grown in Brazilian Spodosols. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 17, p. 2147-2156, Apr. 2013. DOI: 10.5897/AJB11.1574.

MAPFUMO, P.; MTAMBANENGWE, F.; GILLER, K. E.; MPEPEREKI, S. Tapping indigenous herbaceous legumes for soil fertility management by resource-poor farmers in Zimbabwe. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 109, n. 3-4, p. 221-233, Sept. 2005. DOI: 10.1016/j.agee.2005.03.015.

MARINHO, R. de C. N.; FERREIRA, L. de V. M.; SILVA, A. F. da; MARTINS, L. M. V.; NÓBREGA, R. S. A.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I. Symbiotic and agronomic efficiency of new cowpea rhizobia from Brazilian Semi-Arid. **Bragantia**, v. 76, n. 2, p. 273-281, Apr./June 2017. DOI: 10.1590/1678-4499.003.

MARINHO, R. de C. N.; NÓBREGA, R. S. A.; ZILLI, J. E.; XAVIER, G. R.; SANTOS, C. A. F.; AIDAR, S. de T.; MARTINS, L. M. V.; FERNANDES JUNIOR, P. I. Field performance of new cowpea cultivars inoculated with efficient nitrogen-fixing rhizobial strains in the Brazilian Semiarid. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 5, p. 395-402, maio 2014. DOI: 10.1590/S0100-204X2014000500009.

MARTINS, J. C. R.; FREITAS, A. D. S. de; MENEZES, R. S. C.; SAMPAIO, E. V. de S. B. Nitrogen symbiotically fixed by cowpea and gliricidia and agroforestry systems under semiarid conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 2, p. 178-184, fev. 2015b. DOI: 10.1590/S0100-204X2015000200010.

MARTINS, J. C. R.; MENEZES, R. S. C.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SANTOS, A. F. dos; NAGAI, M. A. Produtividade de biomassa em sistemas agroflorestais e tradicionais no Cariri Paraibano. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 6, p. 581-587, jun. 2013. DOI: 10.1590/S1415-43662013000600002.

MARTINS, L. M. V.; RUMJANEK, N. G.; NEVES, M. C. P. Diversity of cowpea nodulating rhizobia isolated from the semi-arid Northeastern region of Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 67, n. 3, p. 467-471, 1995. Suplemento 3.

MARTINS, L. M. V.; RUMJANEK, N. G.; NEVES, M. C. P. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the North-East region of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5-6, p. 1005-1010, May/June 1997. DOI: 10.1016/S0038-0717(96)00215-5.

MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; RANGEL, F. W.; RIBEIRO, J. R. A.; NEVES, M. C. P.; MORGADO, L. B.; RUMJANEK, N. G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for

improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 38, n. 6, p. 333-339, Oct. 2003. DOI: 10.1007/s00374-003-0668-4.

MARTINS, P. G. S.; LIRA JÚNIOR, M. A.; FRACETTO, G. G. M.; SILVA, M. L. R. B. da; VICENTIN, R. P.; LYRA, M. do C. C. P. de. *Mimosa caesalpinifolia* rhizobial isolates from different origins of the Brazilian Northeast. **Archives of Microbiology**, v. 197, n. 3, p. 459-469, Apr. 2015a. DOI: 10.1007/s00203-014-1078-8.

MENEZES, K. A. S.; ESCOBAR, I. E. C.; FRAIZ, A. C. R.; MARTINS, L. M. V.; FERNANDES JÚNIOR, P. I. Genetic variability and symbiotic efficiency of *Erythrina velutina* Willd. root nodule bacteria from the semi-arid region in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 41, e0160302, Feb. 2017. DOI: 10.1590/18069657rbc20160302.

MENEZES, K. A. S.; NUNES, G. F. O.; SAMPAIO, A. A.; SILVA, A. F.; SOUZA, L. S. B.; GAVA, C. A. T.; MARTINS, L. M. V.; FERNANDES JÚNIOR, P. I. Diversity of new root nodule bacteria from *Erythrina velutina* Willd., a native legume from the Caatinga dry forest (Northeastern Brazil). **Revista de Ciências Agrárias**, v. 39, n. 2, p. 222-233, 2016. DOI: 10.19084/RCA15050.

MILES, L.; NEWTON, A. C.; DE FRIES, R. S.; RAVILIOUS, C.; MAY, I.; BLYTH, S.; KAPOS, V.; GORDON, J. E. A global overview of the conservation status of tropical dry forests. **Journal of Biogeography**, v. 33, n. 3, p. 491-505, Mar. 2006. DOI: 10.1111/j.1365-2699.2005.01424.x.

MONTAÑEZ, A.; ABREU, C.; GILL, P. R.; HARDARSON, G.; SICARDI, M. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by <sup>15</sup>N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. **Biology and Fertility of Soils**, v. 45, n. 3, p. 253-263, Feb. 2009. DOI: 10.1007/s00374-008-0322-2.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. atual. ampl. Lavras: Ed. da UFLA, 2006. 729 p.

MOREIRA, J. N.; LIRA, M. de A.; SANTOS, M. V. F. dos; FERREIRA, M. de A.; ARAÚJO, G. G. L. de; FERREIRA, R. L. C.; SILVA, G. C. da. Caracterização da vegetação de caatinga e da dieta de novilhos no Sertão de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 11, p. 1643-1651, nov. 2006. DOI: 10.1590/S0100-204X2006001100011.

MURPHY, P. G.; LUGO, A. E. Dry forests of Central America and the Caribbean. In: BULLOCK, S. H.; MOONEY, H. A.; MEDINA, E. (ed.). **Seasonally dry tropical forests**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. p. 9-34. DOI: 10.1017/CBO9780511753398.002.

NEZOMBA, H.; TAURO, T. P.; MTAMBANENGWE, F.; MAPFUMO, P. Indigenous legumes biomass quality and influence on C and N mineralization under indigenous legume fallow systems. **Symbiosis**, v. 48, n. 1-2, p. 78-91, Feb. 2009. DOI: 10.1007/BF03179987.

NUNES, F. S.; RAIMONDI, A. C.; NIEDWIESKI, A. C.; NUNES, F. S. Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 872-879, nov./dez. 2003. DOI: 10.1590/S0100-40422003000600016.

ONYEONAGU, C. C.; ASIEGBU, J. E. Preliminary study of the contribution of native legumes to the nitrogen economy of natural grasslands. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 47, p. 9600-9605, Aug. 2011. DOI: 10.5897/AJB11.752.

- PARTON, W.; SILVER, W. L.; BURKE, I. C.; GRASSENS, L.; HARMON, M. E.; CURRE, W. S.; KING, J. Y.; ADAIR, E. C.; BRANDT, L. A.; HART, S. C.; FASTH, B. Global-scale similarities in nitrogen release patterns during long-term decomposition. **Science**, v. 315, n. 5810, p. 361-364, 2007. DOI: 10.1126/science.1134853.
- PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; VELÁZQUEZ, E.; BEDMARD, E. J. Bacterial associations with legumes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 34, n. 1-3, p. 17-42, 2015. DOI: 10.1080/07352689.2014.897899.
- PEREIRA, I. M.; ANDRADE, L. A.; SAMPAIO, E. V. S. B.; BARBOSA, M. R. V. Use-history effects on structure and flora of Caatinga. **Biotropica**, v. 35, n. 2, p. 154-165, June 2003. DOI: 10.1111/j.1744-7429.2003.tb00275.x.
- PÉREZ-MARIN, A. P.; MENEZES, R. S. C.; SALCEDO, I. H. Produtividade de milho solteiro ou em aléias de gliricídia adubado com duas fontes orgânicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 5, p. 669-677, maio 2007. DOI: 10.1590/S0100-204X2007000500009.
- PONS, T. L.; PERREIJN, K.; VAN KESSEL, C.; WERGER, M. J. Symbiotic nitrogen fixation in a tropical rainforest: <sup>15</sup>N natural abundance measurements supported by experimental isotopic enrichment. **New Phytologist**, v. 173, n. 1, p. 154-167, 2007. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2006.01895.x.
- QUEIROZ, L. P. de. **Leguminosas da caatinga**. Feira de Santana: Ed. da UEFS, 2009. 443 p.
- RADL, V.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; LEITE, J.; PASSOS, S. R.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; BALDANI, J. I.; ZILLI, J. E. *Microvirga vignae* sp. nov., a root nodule symbiotic bacterium isolated from cowpea grown in the semi-arid of Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 725-730, 2014. DOI: 10.1099/ijms.0.053082-0.
- REIS, A. M. S.; ARAÚJO, E. L.; FERRAZ, E. M. N.; MOURA, A. N. Inter-annual variation in the floristic and population structure of an herbaceous community of “Caatinga” vegetation in Pernambuco, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 3, p. 497-508, jul./set. 2006. DOI: 10.1590/S0100-84042006000300017.
- REIS JÚNIOR, F. B. dos; SIMON, M. F.; GROSS, E.; BODDEY, R. M.; ELLIOTT, G. N.; ELIAS NETO, N.; LOUREIRO, M. de F.; QUEIROZ, L. P. de; SCOTTI, M. R.; CHEN, W. M.; NORÉN, A.; RUBIO, M. C.; FARIA, S. M. de; BONTEMPS, C.; GOI, S. R.; YOUNG, J. P. W.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the cerrado and caatinga biomes of Brazil. **New Phytologist**, v. 186, n. 4, p. 934-946, 2010. DOI:10.1111/j.1469-8137.2010.03267.x.
- RODRIGUES, D. R.; SILVA, A. F. da; CAVALCANTI, M. I. P.; ESCOBAR, I. E. C.; FRAIZ, A. C. R.; RIBEIRO, P. R. de A.; FERREIRA NETO, R. A.; FREITAS, A. D. S. de; FERNANDES-JÚNIOR, P. I. Phenotypic, genetic and symbiotic characterization of *Erythrina velutina* rhizobia from Caatinga dry forest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 503-512, July/Sept. 2018. DOI: 10.1016/j.bjm.2017.09.007.
- SAMPAIO, E. V. S. B. Fitossociologia. In: SAMPAIO, E. V. S. B.; MAYO, S. J.; BARBOSA, M. R. V. (ed.). **Pesquisa botânica nordestina: progresso e perspectivas**. Recife: Sociedade Botânica do Brasil, Seção Regional de Pernambuco, 1996. p. 203-224.

SAMPAIO, E. V. de S. B.; ARAÚJO, E. de L.; SALCEDO HERNÁN, I.; TIESSEN, H. Regeneração da vegetação de caatinga após corte e queima, em Serra Talhada, PE. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 5, p. 621-632, maio 1998.

SANTANA, D. F. Y.; LIRA, M. de A.; SANTOS, M. V. F. dos; FERREIRA, M. de A.; SILVA, M. J. de A.; MARQUES, K. A.; MELLO, A. C. L. de; SANTOS, D. C. dos. Caracterização da caatinga e da dieta de novilhos fistulados, na época chuvosa, no Semiárido de Pernambuco. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 1, p. 69-78, jan. 2011. DOI: 10.1590/S1516-35982011000100010.

SANTOS, C. E. R. S.; SILVA, V. S. G. da; FREITAS, A. D. S. de; SILVA, A. F. da; BEZERRA, R. de V.; LYRA, M. do C. C. P. de; FERREIRA, J. da S. Prospecting of efficient rhizobia for peanut inoculation in a Planosol under different vegetation covers. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 4, p. 123-131, Jan. 2017a. DOI: 10.5897/AJMR2016.8355.

SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, I. M. de M.; SOUTO, S. M.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Efetividade de rizóbios isolados de solos da região Nordeste do Brasil, na fixação do N<sub>2</sub> em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 27, n. 2, p. 301-307, Apr./June 2005. DOI: 10.4025/actasciagron.v27i2.1849.

SANTOS, D. R.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P. Inoculação do caupi em solo salinizado da região semi-árida no Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 14, n. 3, p. 291-295, set./dez. 1990.

SANTOS, J. M. F. dos; ALVES, P. A. C.; SILVA, V. C.; KRUSCHEWSKY-RHEM, M. F.; JAMES, E. K.; GROSS, E. Diverse genotypes of *Bradyrhizobium* nodulate herbaceous *Chamaecrista* (Moench) (Fabaceae, Caesalpinioideae) species in Brazil. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 69-79, Mar. 2017b. DOI: 10.1016/j.syapm.2016.12.004.

SANTOS, J. W. M. dos; SILVA, J. F. da; FERREIRA, T. D. dos S.; DIAS, M. A. M.; FRAIZ, A. C. R.; ESCOBAR, I. E. C.; SANTOS, R. C. dos; LIMA, L. M. de; MORGANTE, C. V.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I. Molecular and symbiotic characterization of peanut bradyrhizobia from the semi-arid region of Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 121, p. 177-184, Dec. 2017c.

SAWANA, A.; ADEOLU, M.; GUPTA, R. S. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. **Frontiers in Genetics**, v. 5, article 429, Dec. 2014. DOI: 10.3389/fgene.2014.00429.

SEEFELDT, L. C.; HOFFMAN, B. M.; DEAN, D. R. Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, p. 701-722, July 2009. DOI: 10.1146/annurev.biochem.78.070907.103812.

SHEARER, G.; KOHL, D. H. N<sub>2</sub>-fixation in field settings: estimations based on natural <sup>15</sup>N abundance. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 13, n. 6, p. 699-756, 1986. DOI: 10.1071/PP9860699.

SILVA, A. F. da; FREITAS, A. D. S. de; COSTA, T. L.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I.; MARTINS, L. M. V.; SANTOS, C. E. de R. e S.; MENEZES, K. A. S.; SAMPAIO, E. V. de S. B. Biological nitrogen fixation in tropical dry forests with different legume diversity and abundance. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 107, n. 3, p. 321-334, Apr. 2017a. DOI: 10.1007/s10705-017-9834-1.

- SILVA, G. C.; SAMPAIO, E. V. S. B. Biomassas de partes aéreas em plantas da caatinga. **Revista Árvore**, v. 32, n. 3, p. 567–575, 2008. DOI:10.1590/S0100-67622008000300017.
- SILVA, K. A. da; ARAÚJO, E. de L.; FERRAZ, E. M. N. Estudo florístico do componente herbáceo e relação com solos em áreas de caatinga do embasamento cristalino e bacia sedimentar, Petrolândia, PE, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 1, p. 100-110, jan./mar. 2009. DOI: 10.1590/S0102-33062009000100013.
- SILVA, L. B.; TORRES, É. B.; NÓBREGA, R. A. S.; LOPES, G. N.; VOGADO, R. F.; PAVAN, B. E.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I. Biochemical studies of amylase, lipase and protease in *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae) populations fed with *Vigna unguiculata* grain cultivated with diazotrophic bacteria strains. **Bulletin of Entomological Research**, v. 107, p. 820-827, 2017b. DOI: 10.1017/S0007485317000463.
- SILVA, V. S. G. da; SANTOS, C. E. de R. e S.; FREITAS, A. D. S. de; STAMFORD, N. P.; SILVA, A. F. da; LYRA, M. do C. C. P. de. Systems of land use affecting nodulation and growth of tree legumes in different soils of the Brazilian semiarid area. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 40, p. 3966-3974, 2016. DOI: 10.5897/AJAR2016.11603.
- SILVEIRA, M. M. L.; ARAÚJO, M. S. B.; SAMPAIO, E. V. S. B. Distribuição de fósforo em diferentes ordens de solo do semiárido da Paraíba e de Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, n. 2, p. 281-291, 2006. DOI: 10.1590/S0100 06832006000200009.
- SIZENANDO, C. I. T.; RAMOS, J. P. C.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I.; LIMA, L. M. de; FREIRE, R. M. M.; SANTOS, R. C. dos. Agronomic efficiency of Bradyrhizobium in peanut under different environments in Brazilian Northeast. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 37, p. 3482-3487, Sept. 2016. DOI: 10.5897/AJAR2016.11294.
- SOUSA, J. B. de; PINHEIRO, M. de S.; SILVA, L. L.; MARTINS, S. C. S.; MARTINS, C. M. Caracterização de bactérias nativas de solo do semiárido isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 19, p. 2797-2806, 2014.
- SOUZA, L. Q. de; FREITAS, A. D. S. de; SAMPAIO, E. V. de 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, n. 1-2, p. 171-179, Dec. 2012. DOI: 10.1007/s10705-012-9531-z.
- SPRENT, J. I. **Legume nodulation: a global perspective**. Chichester: Wiley-Blackwell, 2009. 200 p. DOI: 10.1002/9781444316384.
- STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. de R. S. Seleção de estirpes de Rhizobium para caupi, resistentes a temperatura elevada. **Caderno Ômega. Série Agronomia**, v. 1, n. 1, p. 61-63, 1985.
- STAMFORD, N. P.; VIEIRA, I. M. de M. B.; SANTOS, D. R. dos; SANTOS, C. E. de R. e S. Seleção de *Bradyrhizobium* para caupi cultivado em solo ácido (LVA) do semi-árido do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 25, n. 4, p. 545-552, abr. 1990.
- TAMPAKAKI, A. P.; FOTIADIS, C. T.; NTATSI, G.; SAVVAS, D. Phylogenetic multilocus sequence analysis of indigenous slow-growing rhizobia nodulating cowpea (*Vigna unguiculata* L.) in Greece. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 179-189, Apr. 2017. DOI: 10.1016/j.syapm.2017.01.001.

TAURO, T. P.; NEZOMBA, H.; MTAMBANENGWE, F.; MAPFUMO, P. Germination, field establishment patterns and nitrogen fixation of indigenous legumes on nutrient-depleted soils. **Symbiosis**, v. 48, n. 1-3, p. 92-101, Feb. 2009. DOI: 10.1007/BF03179988.

TEIXEIRA, F. C. P.; BORGES, W. L.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Characterization of indigenous rhizobia from Caatinga. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 201-208, Jan./Mar. 2010.

TEIXEIRA, F. C. P.; REINERT, F.; RUMJANEK, N. G.; BODDEY, R. M. Quantification of the contribution of biological nitrogen fixation to *Cratylia mollis* using the <sup>15</sup>N natural abundance technique in the semi-arid Caatinga region of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, n. 7, p. 1989-1993, 2006. DOI: 10.1016/j.soilbio.2005.11.013.

TORRES, E. B.; NÓBREGA, R. S. A.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I.; SILVA, L. B.; CARVALHO, G. dos S.; MARINHO, R. de C. N.; PAVAN, B. E. The damage of *Callosobruchus maculatus* on cowpea grains is dependent of the plant genotype. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 12, p. 4276-4280, Sept. 2016. DOI: 10.1002/jsfa.7639.

UNKOVICH, M.; HERRIDGE, D.; PEOPLES, M.; CADISCH, G.; BODDEY, R.; GILLER, K.; ALVES, B.; CHALK, P. **Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems**. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 2008. 258 p. (ACIAR Monograph, 136).

VITOUSEK, P. M.; CASSMAN, K.; CLEVELAND, C. C.; CREWS, T.; FIELD, C. B.; GRIMM, N. B.; HOWARTH, R. W.; MARINO, R.; MARTINELLI, L. A.; RASTETTER, E.; SPRENT, J. I. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. **Biogeochemistry**, v. 57, n. 1, p. 1-45, 2002. DOI: 10.1023/A:1015798428743.

VITOUSEK, P. M.; MENGE, D. N. L.; REED, S. C.; CLEVELAND, C. C. Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 368, n. 1621, article 20130119, 2013. DOI:10.1098/rstb.2013.0119.

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea rhizobia population. **Biology and Fertility of Soils**, v. 27, n. 4, p. 386-392, Sept. 1998. DOI: 10.1007/s003740050448.

ZAPPI, D. C.; FILARDI, F. L. R.; LEITMAN, P.; SOUZA, V. C.; WALTER, B. M. T.; PIRANI, J. R.; MORIM, M. P.; QUEIROZ, L. P.; CAVALCANTI, T. B.; MANSANO, V. F.; FORZZA, R. C. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, Jan. 2015. DOI: 10.1590/2175-7860201566411.

ZILLI, J. É.; MARSON, L. C.; MARSON, B. F.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão-caupi em Roraima. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 4, p. 749-758, 2009. DOI: 10.1590/S0044-59672009000400003.

ZILLI, J. É.; VALISHESKI, R. R.; FREIRE FILHO, F. R.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Assessment of cowpea rhizobium diversity in Cerrado areas of Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 281-287, Oct./Dec. 2004. DOI: 10.1590/S1517-83822004.