

ALEKSANDRO FERREIRA DA SILVA

**FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM LEGUMINOSAS
NATIVAS DE ÁREAS COM DIFERENTES TEMPOS DE
REGENERAÇÃO DA CAATINGA**

**RECIFE – PERNAMBUCO – BRASIL
2015**

ALEKSANDRO FERREIRA DA SILVA

**FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM LEGUMINOSAS
NATIVAS DE ÁREAS COM DIFERENTES TEMPOS DE
REGENERAÇÃO DA CAATINGA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dr^a Ana Dolores Santiago de Freitas
Co-orientadores: Dr. Everardo Valadares de Sá Barretto Sampaio
Dr^a. Lindete Míria Vieira Martins

RECIFE – PERNAMBUCO – BRASIL
2015

Ficha catalográfica

S586f Silva, Aleksandro Ferreira da
Fixação biológica de nitrogênio em leguminosas nativas de áreas com diferentes tempos de regeneração da caatinga / Aleksandro Ferreira da Silva. – Recife, 2015.
99 f. : il.

Orientadora: Ana Dolores Santiago de Freitas.
Dissertação (Mestrado em Agronomia - Ciências do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 2015.
Inclui referências.

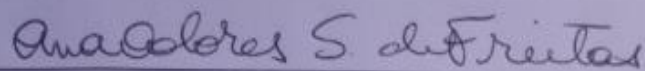
1. *Anadenanthera colubrina* 2. *Eritrina velutina* 3. *Mimosa tenuiflora* 4. Isótopo estável 5. Diversidade I. Freitas, Ana Dolores Santiago de, orientador II. Título

CDD 631.4

FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM LEGUMINOSAS
NATIVAS DE ÁREAS COM DIFERENTES TEMPOS DE
REGENERAÇÃO DA CAATINGA

ALEKSANDRO FERREIRA DA SILVA

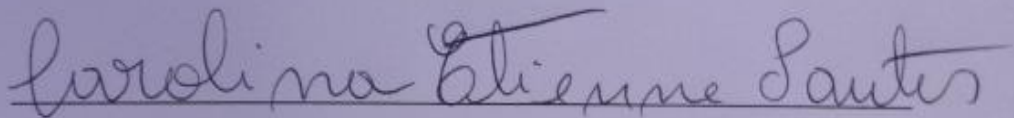
Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora em 20 de fevereiro de
2015



Dr^a Ana Dolores Santiago de Freitas

Presidente da Banca Examinadora

(Orientadora)



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

(Examinador)



Dr Everardo Valadares de Sá Barretto Sampaio (UFPE)

(Examinador)

“Provai, e vede que o Senhor é bom;
bem-aventurado o homem que nele confia”

Salmos 34:8

v

À minha Mãe, Floraci Ferreira da Silva, meu Pai, Izidorio Anacleto da Silva, meus Irmãos, Fábio Ferreira da Silva e Douglas Ferreira da Silva e minha namorada, Kelly Alexandra Souza Menezes.

DEDICO

VI

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por tudo que tenho conseguido e por ter me lapidado a cada manhã, proporcionando inconformismo construtivo, mantendo os meus pés no chão e também por não ter me deixado fugir nenhuma vez do caminho por mim escolhido.

À minha família (Floraci Ferreira da Silva, Izidorio Anacleto da Silva, Fábio Ferreira da Silva e Douglas Ferreira da Silva), por toda educação, amor, carinho, respeito e apoio durante toda minha vida.

À minha namorada, Kelly Alexandra Souza Menezes, por acreditar em mim, pela paciência, amor e companheirismo, te amo.

À minha orientadora, Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas, pela orientação, amizade, apoio, incentivo, paciência e ensinamento.

Aos co-orientadores, Dr Everardo Valadares de Sá Barretto Sampaio e Lindete Míria Vieira Martins, pelas contribuições.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, em especial ao PPGCS, pela oportunidade, acolhimento e condições concedidas para a realização do curso.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, pela parceria na realização da pesquisa, sob supervisão de Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior.

À toda equipe do Laboratório de Microbiologia do Solo da UFRPE.

Aos professores da banca examinadora, pela participação e valorosas sugestões atribuídas a este trabalho.

A todos os professores do PPGCS, pelos ensinamentos transmitidos.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste curso.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XII
RESUMO	14
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 A Caatinga: localização, distribuição e condições edafoclimáticas.....	21
2.2 Aspectos gerais da vegetação da caatinga.....	23
2.3 Leguminosas da caatinga	25
2.4 Fixação biológica de nitrogênio (FBN)	29
2.5 Técnica da abundância natural do ¹⁵ N para estimativa da FBN.....	31
2.6 Biomassa vegetal acima do nível do solo: métodos direto e indireto	34
2.7 Estimativas da FBN em ecossistemas naturais	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 Localização e descrição das áreas estudadas	38
3.2 Estimativa do N fixado em campo.....	41
3.2.1 Desenho experimental, coleta de material em campo e preparo das amostras para análise	42
3.2.2 Quantificação de N na biomassa foliar, percentual de N derivado da atmosfera (%N _{dda}) e quantidade de N fixado.....	44
3.3 Ocorrência, diversidade e eficiência das populações de rizóbios.....	45
3.3.1 Experimento para obtenção dos nódulos	45
3.3.2 Isolamento, purificação e caracterização morfofisiológica dos isolados bacterianos.....	47
3.3.3 Autenticação dos isolados bacterianos.....	49
3.4 Análise dos dados.....	51

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1 Experimento em campo	52
4.1.1 Levantamento florístico e fitossociológico	52
4.1.2 Biomassa de folhas e biomassa aérea total	59
4.1.3 Concentração de N (g kg^{-1}), abundância natural de ^{15}N e %N _{dda}	62
4.1.4 Quantidade de N total nas folhas e N fixado	65
4.2 Experimento em casa de vegetação	67
4.2.1 Nodulação e biomassa	67
4.2.2 Caracterização fenotípica dos isolados autenticados	70
5 CONCLUSÕES	79
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Coleta de solo no horizonte superficial (camada de 0-20 cm) para análises química e granulométrica.
- Figura 2:** Dados meteorológicos da Estação de Bebedouro (Petrolina-PE, 09.04° S e 40.60° W) referentes ao ano de 2014 (EMBRAPA, 2015).
- Figura 3:** Dados meteorológicos de São João referentes ao ano de 2013 (INMET, 2015).
- Figura 4:** Medições da circunferência do caule das leguminosas com diâmetro a altura do peito (DAP) igual ou superior a 3 cm.
- Figura 5:** Coleta de material vegetal para análise dos teores de N e abundância natural de ¹⁵N.
- Figura 6:** Sementes de mulungu (A), jurema preta (B), catingueira (C), angico (D) e mororó (E) utilizadas no experimento.
- Figura 7:** Indivíduos de mulungu (A), jurema preta (B), angico (C), mororó (D) e catingueira (E) após desbaste em casa de vegetação.
- Figura 8:** Nódulos de jurema preta (A), angico (B) e mulungu (C) utilizados para a captura dos isolados bacterianos.
- Figura 9:** Amplificação dos genes *nifH* e/ou *nodC* em isolados de bactérias por PCR.
- Figura 10:** Tempo de crescimento de isolados de rizóbio obtidos de nódulos de jurema preta, mulungu e angico cultivadas em solos coletados em áreas de caatinga em regeneração.
- Figura 11:** Tempo de crescimento de isolados de rizóbio obtidos de nódulos de jurema preta, mulungu e angico cultivadas em solos coletados em áreas de caatinga madura.
- Figura 12:** Alteração de pH em meio de cultura por isolados de rizóbio obtidos de nódulos de jurema preta, mulungu e angico cultivadas em solos coletados em áreas de caatinga em regeneração.

Figura 13: Alteração de pH em meio de cultura por isolados de rizóbio obtidos de nódulos de jurema preta, mulungu e angico cultivadas em solos coletados em áreas de caatinga madura.

Figura 14: Produção de exopolissacarídeos por isolados de rizóbio obtidos de nódulos de jurema preta, mulungu e angico cultivadas em solos coletados em áreas de caatinga em regeneração.

Figura 15: Produção de exopolissacarídeos por isolados de rizóbio obtidos de nódulos de jurema preta, mulungu e angico cultivadas em solos coletados em áreas de caatinga madura.

Figura 16: Dendrograma de similaridade com base nas características fenotípicas dos isolados de nódulos de jurema preta, mulungu e angico que foram autenticados (áreas de caatinga em regeneração (R) e áreas de caatinga madura (M)).

Figura 17: Dendrograma de similaridade com base nas características fenotípicas de todos os isolados de nódulos de jurema preta, mulungu e angico que foram autenticados.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Principais características das áreas de caatinga localizadas em municípios do Agreste e Sertão de Pernambuco.
- Tabela 2:** Características químicas e granulométrica de solos sob diferentes fragmentos de caatinga em regeneração (R) e caatinga madura (M) no semiárido de Pernambuco.
- Tabela 3:** Lista das espécies arbustivo-arbóreas encontradas em uma área de caatinga em regeneração (R) e duas áreas de caatinga madura (M) nos municípios de Petrolina (Sertão) e São João (Agreste), Pernambuco.
- Tabela 4:** Parâmetros fitossociológicos encontrados em uma área de caatinga em regeneração (R) e duas áreas de caatinga madura (M) nos municípios de Petrolina (Sertão) e São João (Agreste), Pernambuco.
- Tabela 5:** Índice de diversidade de Shannon (H') e equitabilidade de Pielou (J'), encontrados neste estudo e em outros ambientes de caatinga.
- Tabela 6:** Biomassa de folhas e biomassa aérea total de espécies leguminosas e não leguminosas encontrados em uma área de caatinga em regeneração (R) e duas áreas de caatinga madura (M) nos municípios de Petrolina (Sertão) e São João (Agreste), Pernambuco.
- Tabela 7:** Valores mínimos (MI), máximos (MA) e médios (ME) de $\delta^{15}N$ e concentração de N em espécies fixadoras (LF) e não-fixadoras (R) e nitrogênio derivado da atmosfera (%Ndda) em leguminosas de uma área de caatinga em regeneração (R) e uma área de caatinga madura (M) no município de São João (Agreste), Pernambuco.
- Tabela 8:** Quantidades de N total em folhas de espécies arbóreas, leguminosas e não leguminosas e quantidade de N fixado em folhas de leguminosas em uma área de caatinga em regeneração (R) e uma área de caatinga madura (M) no município de São João (Agreste), Pernambuco.

Tabela 9: Nodulação e biomassa de jurema preta, angico e mulungu cultivadas em vasos com solos coletados em áreas de caatinga em regeneração (R) e madura (M) em quatro municípios do semiárido pernambucano.

Tabela 10: Índice de diversidade de Shannon (H') e equitabilidade de Pielou (J') de comunidades bacterianas nativas de solos de caatinga em regeneração (R) e madura (M) localizados em diferentes municípios do semiárido de Pernambuco.

RESUMO

Devido aos sistemas de produção agrícola predominantes, a vegetação atual do semiárido brasileiro é um mosaico de pequenas áreas com distintos tempos de regeneração, entremeadas a poucas áreas de caatinga madura preservada. Apesar de ser uma fonte essencial de nitrogênio para ecossistemas terrestres, ainda não está estabelecida a importância do processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN), através da simbiose entre leguminosas e bactérias do grupo dos rizóbios, ao longo do processo de regeneração da caatinga. Estimativas dos “inputs” de N em áreas ocupadas por espécies pioneiras são praticamente inexistentes e a compreensão dos fatores que controlam a FBN em florestas secas é incipiente. O objetivo deste trabalho foi estimar as quantidades de nitrogênio fixado em leguminosas arbóreas nativas de áreas de caatinga com diferentes tempos de regeneração e avaliar a ocorrência, a diversidade e a eficiência das populações de seus microssimbiontes. Foram estudados fragmentos de caatinga madura e em regeneração da vegetação, localizados em quatro municípios do semiárido de Pernambuco (São João, Petrolina, Serra Talhada e Caruaru). Nos fragmentos de São João e Petrolina foram estimados os parâmetros fitossociológicos da vegetação e a estimativa da FBN foi realizada apenas nos fragmentos de São João, utilizando a metodologia da abundância natural do ^{15}N . Leguminosas arbóreas (jurema preta, angico e mulungu) foram cultivadas em amostras de solo de todos os fragmentos estudados, para avaliação da ocorrência e eficiência de rizóbios nativos e obtenção de isolados bacterianos. Após autenticação, os isolados foram caracterizados para avaliação de sua diversidade fenotípica. Apesar de apresentar precipitação média anual inferior, a caatinga madura de Petrolina apresentou maior diversidade de espécies e maior produção de biomassa foliar que a de São João. Nessa área ocorreram 3 espécies de leguminosas nodulantes, com grande predominância de jurema preta entre elas, mas com apenas 20% do total de indivíduos, 28% da área basal e 50% da biomassa da espécie em relação a área de São João. O fragmento maduro de São João apresentou maior diversidade de espécies, densidade de indivíduos e área basal total que o fragmento em regeneração, mas não houve diferença na produção de biomassa de folhas entre os dois fragmentos. A única leguminosa nodulante nestas áreas foi a jurema preta, com maior densidade (correspondendo a cerca de 88%

do total de indivíduos) que na área madura (cerca de 55% do total de indivíduos), mas sem diferenças em relação à área basal e à biomassa, significando que os indivíduos foram maiores na área em regeneração. A contribuição da FBN para a jurema preta foi alta na caatinga madura de São João, representando um aporte anual maior que 18 kg ha^{-1} . Os sinais de $\delta^{15}\text{N}$ desta espécie foram muito variáveis no fragmento em regeneração, não possibilitando uma estimativa precisa da FBN. Entretanto, é provável que alguns indivíduos de jurema preta estejam fixando na área em regeneração, garantindo um aporte que pode variar entre 3 e $4 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$. Em todas as áreas estudadas existe uma população de bactérias capazes de nodular as leguminosas arbóreas. Independentemente do tempo de regeneração da vegetação, a maioria dos isolados de rizóbios nativos de solos sob caatinga são bactérias de crescimento rápido e com reação ácida em meio de cultura. A ausência de FBN em indivíduos da área em regeneração não pode ser explicada pela ausência de rizóbios compatíveis.

Palavras chave: *Anadenanthera colubrina*, *Eritrina velutina*, *Mimosa tenuiflora*, isótopo estável, diversidade.

ABSTRACT

The present native vegetation of the Brazilian semiarid region is a mosaic of different regeneration periods, interspaced with small areas of old growth caatingas, due to the predominant agricultural system. In these regenerating caatinga areas, the importance of biological nitrogen fixation (BNF) mediated by symbiosis of rhizobia bacteria and legume species, has not been well established, in spite of the essentiality of this source of N to terrestrial ecosystems. Estimates of N inputs in areas occupied by pioneer species are virtually inexistent and understanding of the factor which control BNF is still incipient. This study aimed at estimating the amounts of N fixed by native legume trees in areas with different regeneration periods and at evaluating the occurrence, diversity and efficiency of their populations and microsymbionts. Mature and regenerating caatinga fragments in four municipalities of Pernambuco (São João, Petrolina, Serra Talhada and Caruaru) were studied. Phytosociological parameters were determined in São João and Petrolina and BNF estimation made in São João, using the ^{15}N natural abundance technique. Tree legume seedlings of jurema preta, angico and mulungu were grown in pots with soil collected from the four municipalities to evaluate the occurrence and efficiency of native rhizobia and to obtain rhizobia isolates. After authentication, the phenotypical diversity of the isolates was characterized. The mature caatinga of Petrolina had higher species diversity and leaf biomass stock than that of São João, in spite of its lower mean annual rainfall. Three nodulating legume species occurred in Petrolina, largely predominating jurema preta, but this species totaled only 20% of the plant density, 28% of the basal area and 50% of the species biomass that were present in São João. The mature fragment in São João had higher diversity, plant density and basal area than the regenerating fragment, but the leaf biomass was similar. The only nodulating legume in both these fragments was jurema preta, with higher relative density (88% of all plants) in the regenerating fragment than in the mature one (55% of all plants) but with similar basal area and biomass, indicating that jurema preta plants were larger in the regenerating fragment. BNF contribution to jurema preta in the mature fragment was high in São João, amounting to an annual input of more than 18 kg ha^{-1} . In the regenerating fragment $\delta^{15}\text{N}$ signals varied greatly, in a way that precise estimation could not be done. However, it is likely that some of the plants are fixing, with a total input of $3 \text{ to } 4 \text{ kg ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$. Soil from the

four areas had bacteria able to nodulate the tree seedlings. Independently of the caatinga regeneration period, most of the bacteria isolates had characteristics of rapid growth and acid reaction in the culture medium. Therefore, the absence of BNF in the plants of the regenerating fragment cannot be explained by absence of compatible rhizobia.

Key words: *Anadenanthera colubrina*, *Eritrina velutina*, *Mimosa tenuiflora*, stable isotope, diversity.

1. INTRODUÇÃO

A principal formação vegetal do semiárido brasileiro é a caatinga (LIMA JÚNIOR et al., 2014). Pelo fato de ser uma das regiões semiáridas mais populosas do mundo (DRUMOND et al., 2008), vem sofrendo grande pressão antrópica. Segundo Albuquerque et al. (2001), a pressão demográfica no semiárido tem requerido aumento na demanda de produtos agrícolas e florestais. Isto tem sido conseguido através da remoção da vegetação nativa para a implantação de atividades agropecuárias e a extração da madeira para a produção de lenha e carvão. Estas são algumas das práticas antropogênicas baseadas no desmatamento generalizado e queimadas sucessivas que tem contribuído para a degradação do solo, redução da biodiversidade, aumento do aquecimento global e redução do estoque de biomassa.

A remoção da vegetação nativa através de ciclos de corte e queima conduz à perda de quase 100% do carbono (C) e nitrogênio (N) e parte do fósforo (P) presente na biomassa queimada (MENEZES et al., 2012). Além das perdas com a vegetação cortada, o fogo também pode levar a perdas significativas de C e N da matéria orgânica do solo. Nunes et al. (2009) verificaram que a prática da queima tradicional de resíduos da caatinga proporcionou aumento da taxa da respiração da microbiota do solo, elevando as perdas de carbono na forma de C-CO₂. Contudo, apesar de ser um ecossistema frágil por natureza (ALVES et al., 2009), facilmente degradável e de difícil recuperação (NUNES et al., 2006), a caatinga é fundamental para a manutenção da biodiversidade.

Após cultivos agrícolas sucessivos, algumas áreas são abandonadas para regeneração da vegetação natural. Nestas, o restabelecimento dos estoques iniciais de nutrientes do solo é necessário para que ocorra, de forma mais acelerada, a recomposição da vegetação nativa. Segundo Johnson & Turner (2013), em ecossistemas florestais, o N é o nutriente que mais comumente limita o crescimento dos vegetais. Yahdjian et al. (2011) relataram que em regiões áridas e semiáridas, a limitação do N é um fenômeno generalizado. Sabe-se que em ecossistemas naturais, a FBN é a principal porta de entrada de N, seja através de relações simbióticas (entre leguminosas e rizóbios) ou por meio de micro-organismos diazotróficos endofíticos e/ou de vida livre (CLEVELAND et al., 2010). Isto tem permitido que leguminosas arbóreas (com potencial de FBN), sejam mais

bem estabelecidas (com maior crescimento) do que árvores não leguminosas quando ambas estão sobre solos pobres em N (SYLLA et al., 2002).

Nestes ecossistemas, a estimativa da FBN é uma das alternativas para que se tenha uma melhor compreensão da dinâmica do N. Segundo Boddey et al. (2000), em ecossistemas naturais, o método mais confiável para estimar a FBN é o método da abundância natural do ^{15}N . Na caatinga, por exemplo, árvores capazes de realizar a FBN podem ser claramente separadas das árvores não fixadoras de N_2 , a partir dos sinais de ^{15}N (MENEZES et al., 2012). Freitas et al. (2010a) encontraram valores de $\delta^{15}\text{N}$ que variam de 5,12 a 11,58 para espécies não fixadoras de N_2 nativas da caatinga. Já para espécies potencialmente fixadoras de N_2 , Souza et al. (2012), em fragmento de caatinga madura, encontraram valores de $\delta^{15}\text{N}$ de 0,97 e 1,87 para *Mimosa tenuiflora* e *Anadenanthera colubrina*, respectivamente. Espécies fixadoras de N_2 também foram estudadas por Freitas et al. (2010b), que encontraram valores de $\delta^{15}\text{N}$ variando de 1,59 a 4,22 para *Mimosa tenuiflora* e 1,04 a 5,59 para *Mimosa arenosa*.

Apesar de ser uma vegetação que apresenta uma ampla diversidade de leguminosas (QUEIROZ, 2009), poucas foram estudadas quanto à sua capacidade de FBN (TEIXEIRA et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2010; FREITAS et al., 2010b; FREITAS et al., 2012a; SOUZA et al., 2012). Leguminosas nodulantes representam uma pequena proporção da biomassa vegetal em áreas de caatinga bem preservada (PEREIRA et al., 2003; SAMPAIO et al., 1998) e, por esta razão, a contribuição da FBN nestas áreas também é pequena, podendo chegar a pouco mais de $11 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ (FREITAS et al., 2010b). Devido à grande produção de biomassa de espécies potencialmente fixadoras (PEREIRA et al., 2003; SAMPAIO et al., 1998), é esperado que as quantidades de N fixadas sejam mais elevadas em áreas em regeneração do que em áreas maduras. Entretanto, de maneira contrária à esta hipótese, Souza et al. (2012) observaram ausência de FBN em leguminosas arbóreas em caatinga em processo de regeneração, apesar da dominância de leguminosas potencialmente nodulantes. Por outro lado, espécies herbáceas destas mesmas áreas tiveram altas contribuições da FBN (FREITAS et al., 2012a).

A ausência de FBN em leguminosas nativas de áreas em regeneração desafia a visão tradicional da vantagem ecológica da capacidade de nodulação de leguminosas e, as causas do baixo desempenho da simbiose encontradas por Souza et al. (2012) não estão esclarecidas. Como não existem estimativas da FBN

para outras áreas, ainda não é possível determinar a importância do processo em outros fragmentos de caatinga. Uma 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.

Diversos fatores podem justificar a ausência de FBN em leguminosas nodulantes, que vão da ausência de rizóbios nativos competitivos e eficientes à limitações ambientais, que restringiriam a nodulação ou a eficiência da simbiose. Entretanto, informações sobre as respostas das leguminosas nativas da caatinga a variações ambientais, em termos de desempenho simbiótico, não são encontradas na literatura. Desta forma, a compreensão dos diversos fatores que podem interferir no processo de FBN na caatinga é limitada.

O objetivo deste trabalho foi estimar as quantidades de nitrogênio fixado em leguminosas arbóreas nativas de áreas de caatinga com diferentes tempos de regeneração e avaliar a ocorrência, diversidade e a eficiência das populações de seus microssimbiontes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Caatinga: localização, distribuição e condições edafoclimáticas

A região 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). Esta diversidade de ambientes inclui: floresta amazônica, mata atlântica, carrasco, campos rupestres, matas serranas, matas de galeria, vegetação dos tabuleiros costeiros e das restingas, manguezais, vegetação aquática dos múltiplos corpos de água e a caatinga (SAMPAIO et al., 2005). No Nordeste, o bioma Caatinga é tido como o principal ecossistema (BARBOSA et al., 2006; 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; ALVES et al., 2009), o bioma 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 (Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia), abrangendo ainda uma parte do norte do estado de Minas Gerais (PRADO, 2003; SOUZA, 2009; CASTRO & CAVALCANTE, 2011; SIQUEIRA FILHO, 2012; 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). No bioma, as espécies de abelhas, peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos que já foram descritas totalizam, juntas, mais de 1480 espécies (MMA, 2014). Contudo, não é raro ouvir declarações de que a caatinga é um ambiente pobre em diversidade. Isto se deve, em parte, à pouca disseminação das informações agregadas pelos

pesquisadores, bem como o pouco conhecimento das peculiaridades desse bioma (TEIXEIRA, 2004).

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).

Diversas denominações populares são atribuídas à caatinga em função das mais variadas formações vegetais (ARAÚJO FILHO, 2013), as quais são decorrentes das diferentes condições edafoclimáticas, tais como: agreste, sertão, cariri, seridó, carrasco, entre outras (DRUMOND, 2013). Ao longo de toda sua extensão, é possível encontrar solos que se originam tanto de formações geológicas cristalinas quanto de formações geológicas sedimentares (ALVES et al., 2009). Em sua maioria, são solos rasos (pouco desenvolvidos) (ARAÚJO & SOUZA, 2011), e com afloramentos rochosos (ALVES et al., 2009).

Os solos da caatinga, mesmo em escalas locais, são extremamente diversos (QUEIROZ, 2009), apresentando a maior variabilidade do país (SAMPAIO, 2010). Cerca de quinze classes de solos recobrem a caatinga: latossolos vermelho- amarelos, latossolos vermelho-escuros, neossolos litólicos, argissolos, luvisolos crômicos órticos, neossolos quartzarênicos, planossolos háplicos, chernossolos, planossolos nátricos, solonchaks, cambissolos, vertissolos, neossolos regolíticos, neossolos flúvicos e rendzinas (ARAÚJO FILHO, 2013). Quanto ao relevo, a principal feição geomorfológica onde se encontra a vegetação da caatinga corresponde à das grandes depressões, também conhecida como depressão

sertaneja. As depressões constituem a unidade de paisagem mais típica do bioma caatinga (QUEIROZ, 2009).

2.2 Aspectos gerais da vegetação da caatinga.

A ausência de folhas durante certa época do ano é característica da maioria das espécies vegetais da caatinga. Ao longo da paisagem seca, após abscisão foliar, é comum observar os troncos brancos e brilhosos das árvores e arbustos externando o aspecto acinzentado e claro da vegetação. São estas características que devem ter levado ao termo “caatinga”, que, em tupi-guarani significa “mata branca” (ALVES, 2007).

A diversificação em paisagens e tipos vegetacionais da caatinga é justificada pelas variações geomorfológicas, climáticas, topográficas, e à ação antrópica, que influenciam a distribuição, riqueza e diversidade de suas espécies vegetais (ARAÚJO FILHO, 2013). Deste modo, a vegetação ocorrente no bioma pode ser encontrada em parte das chapadas sedimentares, nas superfícies cársticas, nas grandes depressões e nos campos de dunas (QUEIROZ, 2009).

A cobertura vegetal neste ambiente é representada por formações xerófilas (ALVES et al., 2009), heterogêneas (MAIA, 2012) e de fisionomias e diversidades variadas, composta de uma vegetação que varia de aberta e arbustiva até fechada e florestal (SANTOS et al., 2013). Segundo Araújo Filho (2013), a vegetação é constituída, principalmente, de espécies herbáceas, arbustivas e arbóreas de pequeno porte, caducifólias, e geralmente dotadas de espinhos. O mesmo autor relatou que pelo menos 932 espécies já foram catalogadas, das quais 380 são endêmicas. Para Castro & Cavalcante (2011), o total de espécies vegetais da caatinga pode ultrapassar 2000.

Apesar da ocorrência de várias famílias botânicas na caatinga, algumas merecem destaque em função de sua grande riqueza. As famílias mais ricas são Fabaceae, Euphorbiaceae e Cactaceae (ARAÚJO FILHO, 2013). A composição dos estratos arbóreo e arbustivo recebe grande contribuição de espécies destas famílias, citando-se entre as Fabaceae as pertencentes aos gêneros *Mimosa*, *Acacia*, *Caesalpiniae* *Senna*, entre as Euphorbiaceae, *Croton* (‘velames e marmeleiros’), *Cnidocolus* (‘cansansões’ ou ‘favelas’) e *Jatropha* (‘pinhões’) e

entre as Cactaceae, *Cereus* (mandacaru), *Pilosocereus* (facheiro), *Melocactus* (cabeça-de-frade) e *Tacinga* (palma) (QUEIROZ, 2006).

As juremas (*Mimosa* spp.) e os marmeleiros (*Croton* spp.) são algumas das espécies mais abundantes na maioria dos trabalhos de levantamento realizados em áreas de caatinga (ARAÚJO FILHO, 2013). Com seus caules suculentos, áfilos e cobertos por espinhos, os indivíduos pertencentes a família Cactaceae também merecem destaque por representarem um importante elemento na paisagem. Na caatinga, 58 espécies já foram catalogadas, das quais 42 são endêmicas (QUEIROZ, 2006). Deste modo, por apresentar um montante de aproximadamente 240 espécies e 35 gêneros, o Brasil é considerado o terceiro maior centro de diversidade da família (MACHADO, 2009).

Do ponto de vista morfológico, a maioria das espécies vegetais da caatinga desenvolveu estratégias adaptativas em resposta às adversidades da região. Para Maia (2012), a adaptação à falta d'água, por exemplo, mostra-se na forma, na cor, no metabolismo, nos ciclos vitais e na organização social de todos os organismos da caatinga.

A redução da superfície foliar, que se dá pela ausência de folhas ou sua transformação em espinhos, como em cactáceas e eufórbias cactiformes, bem como pela presença de folhas compostas com folíolos reduzidos, observada em Fabaceae, Anacardiaceae, Burseraceae e Rutaceae (QUEIROZ, 2009), é uma das estratégias para diminuir as perdas de água na estação seca (CASTRO & CAVALCANTE, 2011). Outra adaptação está no armazenamento de água. Algumas espécies o fazem no caule, como acontece na barriguda, e outras armazenam em seus tecidos verdes, como em todas as cactáceas (mandacaru, facheiro, xique-xique, coroa-de-frade, etc), e algumas outras, em suas raízes, como no umbuzeiro (MAIA, 2012). Além disso, algumas espécies arbóreas, como é o caso da amburana, possuem uma entrecasca clorofilada podendo, portanto, manter um certo nível de atividade fotossintética mesmo estando sem folhas (QUEIROZ, 2009).

Ao olhar superficialmente a vegetação da caatinga, não é possível observar o quanto o bioma está alterado. Isto se deve, em parte, à alta capacidade de rebrota (após o corte) e de crescimento que algumas espécies apresentam (MAIA, 2012). No entanto, importa destacar que, em quatrocentos anos de exploração predatória, cerca de 80% da caatinga já sofreu drásticas alterações antropogênicas

decorrentes do uso da madeira, lenha, carvão e atividades agropecuárias. Estas atividades se baseiam em desmatamento generalizado e queimadas sucessivas, o que tem levado, em algumas áreas, a processos de desertificação irreversível (CASTRO & CAVALCANTE, 2011). Porém, em áreas sem interferência humana, observa-se uma situação bem diferente: vegetação fechada, camada herbácea, arbustiva, arbórea baixa e arbórea alta desenvolvidas, grande biodiversidade, árvores com altura e diâmetro bem maiores do que em outros lugares e o clima local mais ameno e agradável (MAIA, 2012). Situação como esta, descrita por Maia (2012), é quase que impossível encontrar nos dias de hoje, de modo que o atual cenário da vegetação do semiárido (após os sucessivos abandonos de pequenas áreas para regeneração espontânea) passou a ser um imenso mosaico de pequenas áreas com distintos tempos de regeneração, entremeadas a poucas áreas preservadas por muito tempo (SAMPAIO, 1995).

2.3 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, tânicas, 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 da caatinga, 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).

Em função do alto número de espécies ocorrentes na caatinga, não sendo possível descrever todas no presente estudo, são apenas fornecidas informações das leguminosas que foram utilizadas no experimento conduzido em casa-de-vegetação:

1) Jurema preta [*Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.] (Fabaceae - Mimosoideae).

Espécie também conhecida como jurema e calumbi. Ocorre em Minas Gerais e em oito dos nove estados do nordeste, excetuando-se o Maranhão (APNE/CNIP, 2014). Um indivíduo adulto pode alcançar até 7 m de altura, com acúleos esparsos (MAIA, 2012). A copa é aberta. Folhas e ramos resinosos, principalmente quando jovens (QUEIROZ, 2009). Caule ereto ou levemente inclinado, casca grosseira, rugosa, fendida longitudinalmente, entrecasca vermelho-escura (MAIA, 2012). Em geral, os ramos são castanhos quando frescos mas se tornam escuros, quase negros, quando secos. Árvore de crescimento rápido e com boa capacidade de rebrota após o corte, podendo ser uma espécie com potencial uso em projetos de recuperação de áreas degradadas (QUEIROZ, 2009). Folhas compostas, alternas, bipinadas (MAIA, 2012). As flores são brancas e surgem predominantemente de setembro a janeiro. Seus frutos amadurecem principalmente de fevereiro a abril. A madeira é utilizada como lenha, carvão, moirões, estacas, bem como na fabricação de móveis rústicos (LORENZI, 2002). Além disso, é uma planta forrageira, medicinal e utilizada na coleta apícola de néctar (ARAÚJO FILHO, 2013).

2) Angico [*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil*(Griseb.) Altshul] (Fabaceae - Mimosoideae). Também conhecida como angico-bravo, angico-de-carçoço, angico-do-mato, angico-escuro, angico-do-campo e angico-verdadeiro. Ocorre no Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso,

Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Santa Catarina, São Paulo, e todos os estados da região nordeste (APNE/CNIP, 2014). Um indivíduo adulto pode alcançar até 15 m de altura (MAIA, 2012), dependendo das condições físicas do ambiente. A copa é aberta. A casca é grossa, fendida e avermelhada. Nos indivíduos jovens é comum a presença de muitos acúleos (“espinhos”). Suas folhas são divididas em folíolos muito pequenos. Madeira pesada, compacta e muito resistente (CASTRO & CAVALCANTE, 2011). As flores são melíferas e surgem a partir de novembro, prolongando-se até janeiro. A maturação dos frutos ocorre durante os meses de julho a agosto. A madeira é utilizada na carpintaria, obras hidráulicas, construção civil, etc. É ótima para lenha e carvão. Além disso, a árvore pode ser aproveitada para arborização de parques e praças (LORENZI, 2002).

- 3) Mulungu** [*Erythrina velutina* (Willd.)] (Fabaceae - Faboideae). Também conhecida popularmente como bico-de-papagaio, canivete, eritrina, molungu e suína. Ocorre em Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e todos os estados da região nordeste (APNE/CNIP, 2014). Um indivíduo adulto pode alcançar até 20 m de altura e deter um robusto caule revestido por acúleos cônicos. A casca é levemente estriada e as folhas têm três folíolos pilosos. Madeira leve, branca e porosa. Vagem sinuosa com 1-3 sementes vermelhas. Sua floração avermelhada é singular e alcança a máxima beleza com a planta totalmente destituída de folhas (CASTRO & CAVALCANTE, 2011). As flores surgem a partir do final do mês de agosto, podendo ir até dezembro. Os frutos amadurecem durante os dois primeiros meses do ano. A madeira é empregada na confecção de tamancos, jangadas, brinquedos e caixotaria. A árvore, além de ser utilizada como cerca viva, é extremamente ornamental, principalmente quando em flor. Isto tem estimulado seu uso na arborização de ruas, jardins e alamedas (LORENZI, 2002).
- 4) Catingueira** [*Poincianella pyramidalis* (Tul.)] (Fabaceae - Caesalpinioideae). Também conhecida popularmente como catinga-de-porco, pau-de-rato, catingueira-de-mulata e catingueira-grande. É uma espécie do norte e nordeste do Brasil, ocorrendo do Maranhão e Ceará até a Bahia, com uma disjunção no estado do Amazonas (QUEIROZ, 2009). Um indivíduo adulto

pode alcançar até 12 m de altura (MAIA, 2012), dependendo das condições físicas do ambiente e nível de perturbação. Comumente, as árvores são de porte pequeno, dada a raridade de plantas de idade avançada (CASTRO & CAVALCANTE, 2011). Folhas bipinadas, coloração rosada quando novas, com 5-11 folíolos alternos ou opostos. As flores são amarelas. O fruto é uma vagem achatada, pontada, com 8-11 cm de comprimento, castanho claro e com 5-7 sementes. A floração ocorre na época de transição estação seca-chuvosa e na época chuvosa, seguida pela frutificação (MAIA, 2012). Árvore com potencial para colonização de áreas degradadas e produção de lenha (QUEIROZ, 2009). O mau cheiro exalado pelas suas folhas, quando maceradas, é o que justifica seu nome popular (CASTRO & CAVALCANTE, 2011).

5) Mororó [*Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud.] (Fabaceae - Caesalpinioideae).

Também conhecida popularmente como merosa, mororó, mororó-de-boi, mororó-do-sertão, mororó-verdadeiro e pata-de-vaca. Ocorre no Mato Grosso e em oito dos nove estados do nordeste, excetuando-se o Maranhão (APNE/CNIP, 2014). Um indivíduo adulto pode alcançar até 5 m de altura (MAIA, 2012). Ramos jovens densamente pubérulos. Folhas com lobos arredondados e revestidas por indumento tomentoso acinzentado. Flores com pétalas brancas, largas e obovais (QUEIROZ, 2009), com até 8 cm de comprimento, alvas, em cachos terminais de até 20 cm. O fruto é uma vagem achatada, castanha, com 10-13 cm de comprimento, podendo apresentar até 19 sementes. Após o início das chuvas, alcança folhagem plena em 5-6 semanas. Inicia a floração em três meses e frutifica em quatro meses. A madeira é utilizada como estacas, lenha e carvão. As flores são melíferas. A árvore tem uso na alimentação humana, medicina caseira, ornamentação, reflorestamento, sistemas agroflorestais e alimentação animal (MAIA, 2012).

Com base na literatura, das cinco espécies citadas anteriormente, três (jurema preta, angico e mulungu) têm, em parte, suas necessidades em nitrogênio (N) supridas pela fixação biológica de nitrogênio (FBN).

A contribuição da FBN em jurema preta e angico pode ser observada nos trabalhos de Freitas et al. (2010b) 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., 2010b.) Quanto ao mulungu, apesar de ser uma espécie com reconhecida capacidade de nodulação, não há relatos da estimativa da FBN na literatura. Apenas trabalhos de caracterização morfológica e genética de seus microsimbiontes são descritos (MENEZES et al., 2013; SOUZA et al., 2013).

2.4 Fixação biológica de nitrogênio (FBN)

Resultante do desgaste das rochas, após ação conjunta de alguns agentes intempéricos, o solo passa a ser uma mistura complexa de materiais orgânicos e inorgânicos vital para o funcionamento dos ecossistemas terrestres. Segundo Carneiro (2009), os processos que desencadeiam a alteração do solo no tempo e no espaço são controlados por diversas inter-relações entre os atributos físicos, químicos e biológicos. A fração biológica é um dos principais componentes do solo (HUNGRIA et al., 1994), sendo constituída por nematoides, minhocas, ácaros, colêmbolas, besouros, formigas, centopeias, aranhas, cupins, lesmas, caracóis e principalmente micro-organismos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Os micro-organismos do solo, também conhecidos coletivamente de microbiota, são representados, principalmente, por quatro grandes grupos: bactérias, fungos, actinomicetos e algas (SILVA & MEDONÇA, 2007). Segundo Mendes et al. (2011), um único grama de solo possui mais de 10000 espécies diferentes de micro-organismos. Estes, por sua vez, estão intimamente envolvidos em processos de grande interesse agrônomo, tais como: decomposição e ressíntese de resíduos orgânicos, ciclagem de nutrientes, transformações bioquímicas específicas (nitrificação, desnitrificação, oxidação e redução do enxofre), ação antagônica aos patógenos, produção de substâncias promotoras ou inibidoras de crescimento, FBN, entre outros (ANDREOLA & FERNANDES, 2007).

Realizada por uma parcela relativamente pequena de espécies de procariotos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006), a FBN é considerada o segundo processo biológico mais importante do planeta, após a fotossíntese (SILVA JÚNIOR et al., 2013).

Devido a capacidade de fixar o N_2 atmosférico, estes micro-organismos também são conhecidos como diazotróficos (BARBOSA et al., 2012). Os diazotróficos podem ser de vida livre, endofíticos obrigatórios e facultativos (que

habitam o interior ou a superfície dos tecidos) e simbióticos (que desenvolvem uma associação mutualística com seus hospedeiros) (MOREIRA et al., 2010). Graças a redução dos impactos ambientais e econômicos na agricultura, ampla distribuição geográfica dos hospedeiros e a eficiência do processo de FBN, a relação mais bem estudada tem sido a simbiose entre rizóbios e plantas da família Fabaceae (CANTARELLA, 2007).

Por ser o sistema simbiótico mais bem estudado, várias espécies de rizóbios já foram descritas e estão distribuídas em seis gêneros, a saber: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (MOREIRA, 2008). Neste tipo de simbiose, o reconhecimento entre o microsimbionte (bactéria) e o macrossimbionte (hospedeiro) é imprescindível. Sendo assim, a troca de sinais e a expressão de genes são necessárias para que ocorram as alterações fisiológicas e morfológicas que possibilitam a simbiose, e conseqüentemente a FBN (HOFFMANN, 2007). A simbiose rizóbio-leguminosa tem como consequência a troca de benefícios entre o macro e o microsimbionte, de modo que a planta assimila a amônia, que é fornecida pelas bactérias, e em troca fornece os carboidratos provenientes da atividade fotossintética aos micro-organismos (LINDSTRÖM et al., 2010).

A presença de um complexo enzimático apropriado (denominado nitrogenase), capaz de reduzir o N_2 a NH_3 , é que permite que os micro-organismos diazotróficos sejam capazes de realizar a FBN. Segundo Moreira & Siqueira (2006), a enzima é constituída por duas unidades proteicas básicas: ferro-proteína e ferro-molibdênio. Os mesmo autores ressaltaram que a primeira unidade é responsável por coletar a energia e a força redutora, enquanto que a outra reduz e coleta o substrato. Alguns fatores podem favorecer a inativação da enzima, tais como: disponibilidade energética da célula, disponibilidade de O_2 , excesso de N e presença de alguns aminoácidos essenciais (REIS et al., 2006).

Embora esteja presente abundantemente na atmosfera, o N_2 não pode ser utilizado diretamente pelos organismos eucariotos e a maioria dos procariotos do planeta. A alta estabilidade da molécula de N_2 (garantida por uma ligação tripla covalente que une os dois átomos de N) e a ausência do complexo enzimático na constituição destes organismos é que inviabiliza a FBN. Por ser o N um dos nutrientes mais limitantes ao crescimento dos vegetais, é necessário a busca

constante por diazotróficos eficientes, já que a FBN é uma das principais portas de entradas do nutriente nos sistemas agrícolas.

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 tem sido estudadas quanto a 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 em realizar a FBN; Freitas et al. (2010b) e Souza et al. (2012) com estudos de estimativas da FBN na caatinga, e Ramos et al. (2010) avaliando bactérias endofíticas em plantas de milho.

2.5 Técnica da abundância natural do ^{15}N para estimativa da FBN

Isótopos são átomos de um mesmo elemento químico que, apresentam o mesmo número de prótons mas diferentes números de nêutrons e, conseqüentemente, diferentes massas (DUCATTI et al., 2011). A maioria dos elementos químicos possui mais de um isótopo (CARVALHO, 2008). O número de elétrons e a distribuição destes nos orbitais dos átomos é que determina as propriedades químicas dos diferentes elementos. Deste modo, por possuírem o mesmo número de elétrons, os isótopos de um determinado elemento terão, praticamente, propriedades químicas idênticas e algumas propriedades físicas distintas.

Os isótopos podem ser radioativos ou estáveis (CARVALHO, 2008). Por ocorrerem na natureza em proporção quase constante (AUGUSTO, 2012) e não emitirem radiação (não causando riscos à saúde humana e ao meio ambiente), os estudos com isótopos estáveis têm sido mais frequentes do que estudos com isótopos radioativos. Os primeiros estudos envolvendo isótopos estáveis foram na geologia e arqueologia (DUCATTI et al., 2011). Segundo Pereira & Benedito (2007), o uso de isótopos estáveis tem sido crescente nos mais diferentes campos da ciência. Na agricultura, por exemplo, os trabalhos de Rondon et al. (2007);

Houngnandan et al. (2008); Freitas et al. (2012b); Oliveira (2012), são alguns dos estudos realizados com isótopos estáveis.

Em geral, para um dado elemento químico, um dos isótopos estáveis é quantitativamente mais abundante que o outro (CARVALHO, 2008). Os isótopos mais leves (^1H , ^{12}C , ^{14}N , ^{16}O , ^{32}S), em geral, são mais abundantes que os mais pesados (^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{33}S , ^{34}S , ^{36}S) (SLEIMAN et al., 2008). Por ser a matéria orgânica do solo constituída principalmente de carbono (C), oxigênio (O), hidrogênio (H) e nitrogênio (N), a maioria dos estudos em solo com isótopos estáveis tem sido sobre ciclagem de nutrientes (SILVA & MENDONÇA, 2007). Sendo um dos componentes fundamentais dos organismos vivos (GRUBER & GALLOWAY, 2008), possuindo mais de um isótopo estável de ocorrência natural e estando presente abundantemente na natureza, o N tem sido um dos principais bioelementos pesquisado com técnicas baseadas em isótopos estáveis (DUCATTI et al., 2011).

A atmosfera é um dos grandes reservatórios de N no planeta, em que o N molecular (N_2) compõe 78 % dos gases, o que equivale a uma massa de $3,9 \times 10^9$ Tg (NOVAIS et al., 2007). Deste total, aproximadamente 99,6340 % dos átomos de N se encontram na forma ^{14}N e cerca de 0,3660 % na forma ^{15}N (DUCATTI et al., 2011). A relação entre o isótopo menos frequente (^{15}N) e o isótopo mais abundante (^{14}N) corresponde à composição isotópica ou abundância natural do elemento (MARTINELLI et al., 2009), que pode apresentar variações, a depender do tipo de material, não sendo, portanto, um valor constante (MARDEGAN, 2007).

A dinâmica do N no sistema solo-planta-atmosfera tem sido mais bem compreendida a partir do uso de técnicas baseadas na abundância natural do ^{15}N . Como pode ser observado nos trabalhos de Teixeira et al. (2006), Freitas et al. (2010b), Andrews et al. (2011), Freitas et al. (2012a), Souza et al. (2012) e Nardoto et al. (2014), a técnica passou a ser utilizada com maior frequência pelos pesquisadores e vem se tornando uma ferramenta de grande utilidade na quantificação da fixação biológica do nitrogênio (FBN).

Na metodologia da abundância natural do ^{15}N para a estimativa da FBN, é assumido que o N no solo é um pouco mais enriquecido em ^{15}N que o N_2 atmosférico (SYLLA et al., 2002). Isto ocorre como resultado da discriminação isotópica entre ^{14}N e ^{15}N durante as transformações de N no solo (TEIXEIRA, 2006). Uma planta referência (não fixadora de N_2), crescendo nessas condições, terá sua

composição isotópica semelhante à do N disponível no solo. Por outro lado, os teores de ^{15}N em plantas fixadoras de N_2 podem ser menores devido ao efeito de diluição que o N_2 atmosférico causa. Nesse contexto, quando se utiliza uma planta referência como marcadora do ^{15}N presente no N mineral do solo, pode ser determinada a taxa de fixação pela proporção com que o ^{15}N foi diluído (SHEARER & KOHL, 1986). Idealmente, uma planta não fixadora deveria explorar um volume de solo semelhante ao da fixadora, apresentando, ainda, padrões de absorção e assimilação do N parecidos com os da leguminosa alvo. Para garantir esse requisito, na prática, usa-se a média do sinal de ^{15}N de algumas espécies de plantas para as quais não há histórico comprovado de FBN e que estão crescendo nas mesmas condições das plantas fixadoras. Um exemplo da aplicação dessa técnica em leguminosas tropicais foi apresentado por Freitas et al. (2012a).

A abundância natural é analisada por espectrometria de massa e expressa em unidades de “delta” ($\delta^{15}\text{N}$), que representa o desvio por mil (‰), em relação ao N_2 atmosférico, da razão entre as massas de ^{15}N e ^{14}N do N contido na amostra:

$$\delta^{15}\text{N} (\text{‰}) \text{ amostra} = ((\% \text{ átomo } ^{15}\text{N} \text{ amostra} - 0,3663)/0,3663) \times 1000 \text{ ou}$$

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

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

A utilização do espectrômetro de massa ou “Isotope Ratio Mass Spectrometers” (IRMS) é necessária para que seja possível a determinação da razão isotópica do elemento (PEREIRA & BENEDITO, 2007). A espectrometria de massa parte do princípio de separação de moléculas gasosas ionizadas de acordo com suas massas quando essas passam por um campo magnético (BOARETTO et al., 2004).

Para as estimativas do percentual de N fixado em plantas alvo (significativamente empobrecidas em ^{15}N , apresentando uma diferença de, no mínimo, duas unidades de δ em relação às médias das referências) utiliza-se a fórmula recomendada por SHEARER & KOHL (1986):

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

onde $\delta^{15}\text{N}_{(\text{refer\^encia})}$ é o valor médio dos $\delta^{15}\text{N}$ das plantas não fixadoras utilizadas como referência, $\delta^{15}\text{N}_{(\text{fixadora})}$ é o valor médio de $\delta^{15}\text{N}$ de cada leguminosa fixadora e B é o valor de $\delta^{15}\text{N}$ para plantas fixadoras cultivadas na ausência de N.

Este método fornece a proporção do N fixado, sendo necessário, para a quantificação do N fixado nas leguminosas, que se determine a quantidade de N total acumulado nestas plantas, o que requer a medição de sua biomassa e a concentração de N nesta biomassa.

2.6 Biomassa vegetal acima do nível do solo: métodos direto e indireto

O atual cenário das mudanças climáticas no mundo tem despertado o interesse de pesquisadores, empresas e instituições em desenvolver estratégias com o propósito de mitigar os possíveis impactos ambientais decorrentes da emissão de “gases de efeito estufa” (GEEs), os quais são oriundos da agricultura, pecuária, indústria, queima de combustíveis fósseis e desmatamento. Segundo o Intergovernmental Panel on Climate Change - IPCC (2007), dos GEEs emitidos a partir de atividades antropogênicas, o dióxido de carbono (CO_2) é o mais preocupante.

Nesse contexto, a importante conexão existente entre floresta, carbono e clima tem despertado o interesse de alguns países em desenvolver pesquisas sobre a biomassa florestal e o conteúdo de carbono estocado, como pode ser observado nos trabalhos de Mani & Parthasarathy (2007) na Índia, Nívar (2009) no México, Morote et al. (2012) na Espanha e Risio et al. (2014) na Argentina. No Brasil não é diferente, várias instituições de ensino e pesquisa vem desenvolvendo estudos de estimativas da biomassa florestal (OLIVEIRA et al., 2012; MORAIS et al., 2013; TORRES et al., 2013; CABRAL et al., 2013 e LIMA JÚNIOR et al., 2014).

As florestas são bens naturais que contribuem com a proteção de bacias hidrográficas, purificação do ar, produção de medicamentos, fibras, alimentos, além de sua importante contribuição na manutenção da biodiversidade e da estabilidade do clima global (WALKER et al., 2011). Sendo assim, ao longo das últimas décadas tem sido de grande relevância a obtenção de conhecimentos sobre os aspectos que envolvem o desenvolvimento, a importância, a dinâmica e formas de exploração sustentável das florestas tropicais (RATUCHNE, 2010).

Segundo Walker (2011), a biomassa florestal (importante estoque natural de carbono) é definida como sendo o peso ou a massa de seu tecido vegetal, expressa geralmente em unidades de tonelada métrica (t). A depender das condições em que o estudo está sendo desenvolvido, a biomassa pode ser expressa por massa seca ou massa verde. A massa seca é obtida após certo período de secagem do material em estufa e a massa verde refere-se ao material fresco que ainda possui em sua composição um determinado conteúdo de água (CALDEIRA, 2003).

Para a estimativa da biomassa acima do nível do solo, métodos diretos e indiretos tem sido utilizados. Na literatura, é possível encontrar diferentes técnicas utilizadas para estimar a biomassa florestal envolvendo o método direto. Técnicas como a do corte estratificado, método da parcela e o método da árvore média, são descritos por Silveira et al. (2008). Dentre outros trabalhos que envolvem o emprego do método direto, citam-se os de Araújo et al. (2004) na Paraíba e Silva & Sampaio (2008) na Bahia e Pernambuco.

Certamente, os métodos diretos são os mais precisos por consistirem na derrubada das árvores, separação dos seus componentes e pesagem ainda em campo, mas são os mais difíceis de serem executados e se restringem a um número limitado de árvores (KETTERINGS et al., 2001; CHAVE et al., 2005). Para outros autores, o método não é confiável. Segundo Brown et al. (1989), as estimativas obtidas pelo método direto não são confiáveis por serem realizadas em poucas parcelas, pequenas e tendenciosamente escolhidas. Já Vismara (2009), diz que a reduzida extensão de alguns biomas e a proteção destes por órgãos competentes, tem feito com que a obtenção de amostras destrutivas de biomassa nestes ambientes tenha sido impedida pela própria legislação.

Para áreas onde a derrubada das árvores não é permitida, métodos indiretos (não destrutivos) são utilizados para estimar a biomassa florestal. Nestas condições, para que a estimativa seja possível, equações são ajustadas correlacionando a biomassa com alguma variável de fácil medição obtida em campo, como o diâmetro do caule a 1,30 m do nível do solo, também denominado diâmetro a altura do peito (DAP), diâmetro do caule ao nível do solo (DNS) e altura da planta (H) (SAMPAIO & SILVA, 2005). Estimativas da biomassa a partir da utilização de imagens orbitais do povoamento, ou ainda de uma base de dados de um Sistema de Informações Geográficas (SIG), construída a partir de um inventário florestal, também são possíveis (FERRAZ et al, 2014).

Devido a sua praticidade, vários trabalhos envolvendo o método indireto têm sido frequentemente encontrados na literatura, dentre estes, citam-se os de Cole & Ewel (2006), Vieira et al. (2008) e Basuki et al. (2009), utilizando equações alométricas para estimar o estoque de biomassa em florestas tropicais, bem como os de Watzlawick et al. (2009) e Ferraz et al. (2014) utilizando imagens de satélite para a estimativa da biomassa.

Para algumas espécies que apresentam uma vasta distribuição na caatinga, Sampaio & Silva (2005), Silva & Sampaio (2008) e Sampaio et al. (2010) publicaram equações gerais e individuais para estimativas da biomassa aérea total e para partes aéreas das plantas. Em todos esses estudos, o DAP mostrou-se uma boa variável preditora para estimar a biomassa nos modelos alométricos. Uma das vantagens da utilização do DAP é a facilidade de medida em campo, de modo que, para propósitos práticos, muitos modelos alométricos têm relacionado à biomassa aérea a essa variável (NÁVAR, 2009).

2.7 Estimativas da FBN em ecossistemas naturais

Em ecossistemas naturais, a FBN é a principal porta de entrada de N, seja através de relações simbióticas (entre leguminosas e rizóbios) ou por meio de micro-organismos diazotróficos de vida livre (CLEVELAND et al., 2010). Isto tem permitido que leguminosas arbóreas (com potencial de FBN) tenham maior crescimento do que árvores não leguminosas quando ambas estão sobre solos pobres em N (SYLLA et al., 2002). Apesar de não ser uma característica comum a todas as espécies, a capacidade de nodular e fixar o N₂ atmosférico em simbiose com bactérias do grupo dos rizóbios é a grande particularidade ecológica das leguminosas (SANTOS et al., 2008). Das três subfamílias pertencentes à família Fabaceae, Faboideae é a que apresenta a maior percentagem de espécies nodulíferas (de todas as espécies estudadas, 96% são capazes de realizar a FBN), seguida por Mimosoideae (90%) e por último, Caesalpinioideae (23%) (FARIA et al., 1989).

Para que a dinâmica do N em ecossistemas naturais seja melhor compreendida, faz-se necessário estimar a FBN nos mais variados biomas do mundo. Segundo Boddey et al. (2000), em ecossistemas naturais, o método mais confiável para estimar a FBN é o método da abundância natural do ¹⁵N. Este

método permite que a FBN seja estimada através da comparação da abundância natural de ^{15}N de tecidos de plantas fixadoras e não-fixadoras, crescendo no mesmo ambiente, e por isso, com a mesma marcação de N do solo (TEIXEIRA, 2004). Na caatinga, por exemplo, árvores capazes de realizar a FBN podem ser claramente separadas das árvores não fixadoras de N_2 , a partir dos sinais de ^{15}N (MENEZES et al., 2012).

Freitas et al. (2010a) encontraram valores de $\delta^{15}\text{N}$ que variam de 5,12 a 11,58 para espécies não fixadoras de N_2 nativas da caatinga. Já para espécies potencialmente fixadoras de N_2 , Souza et al. (2012), em fragmento de caatinga madura, encontraram valores de $\delta^{15}\text{N}$ de 0,97 e 1,87 para *Mimosa tenuiflora* e *Anadenanthera colubrina*, respectivamente. Espécies fixadoras de N_2 também foram estudadas por Freitas et al. (2010b), que encontraram valores de $\delta^{15}\text{N}$ variando de 1,59 a 4,22 para *Mimosa tenuiflora* e 1,04 a 5,59 para *Mimosa arenosa*.

Segundo Mardegan (2007), em florestas tropicais, as entradas e saídas de N são mais frequentes, o que ocasiona um maior enriquecimento em ^{15}N nos solos. Em geral, os valores de ^{15}N das florestas tropicais são mais elevados do que aqueles de florestas temperadas (MARTINELLI et al., 1999).

Apesar das grandes áreas de florestas tropicais, as estimativas da FBN são muito raras (CLEVELAND et al., 1999). Trabalhos como os de Roggy et al. (1999), Sylla et al. (2002), Pons et al. (2007), Cusack et al. (2009), Cleveland et al. (2010), Freitas et al. (2010b), Freitas et al. (2012a), e Souza et al. (2012) têm contribuído bastante com informações da estimativa da FBN em algumas espécies arbóreas de ocorrência natural.

No Brasil, as estimativas da FBN em ecossistemas naturais também são relativamente escassas (FILOSO et al., 2006), citando-se os trabalhos de Cleveland et al. (2010), Freitas et al. (2010b), Freitas et al. (2012a) e Souza et al. (2012) como alguns dos poucos estudos que objetivaram estimar a FBN nestes ambientes. Deste modo, pesquisas são necessárias para a melhor compreensão dos diversos fatores que podem interferir no processo de FBN em ambientes naturais, que ainda são pouco conhecidos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização e descrição das áreas estudadas

Foram selecionados fragmentos de caatinga localizados em quatro municípios do semiárido de Pernambuco (São João, Petrolina, Serra Talhada e Caruaru). Em cada município, foram estudados dois fragmentos de caatinga, sendo um com vegetação madura e o outro com vegetação em regeneração, esses últimos com diferentes tempos de abandono após corte da vegetação nativa. Em São João (microrregião de São João), os fragmentos de caatinga são pertencentes a fazenda Riacho do Papagaio. O clima predominante na região é o As', que equivale a um clima quente e úmido, conforme classificação de Köppen. Segundo Santos et al. (2012), o solo da área é classificado como Neossolo Regolítico. Em Petrolina foram selecionados dois fragmentos localizados na Estação Experimental do Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Semiárido – CPATSA. Segundo a classificação de Köppen, o clima da região é do tipo BSwH', definido como semiárido, de vegetação xerófita, apresentando inverno seco. O solo da região é classificado como Argissolo Vermelho-Amarelo (SILVA et al., 2005). Em Caruaru, os fragmentos foram selecionados na Estação Experimental do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) e, em Serra Talhada, no Parque Estadual Mata da Pimenteira (área de caatinga madura) e na Fazenda Buenos Aires (caatinga em regeneração). As principais características dos municípios seguem na Tabela 1.

Tabela 1: Principais características das áreas de caatinga localizadas em municípios do Agreste e Sertão de Pernambuco.

Municípios/ Características	Caruaru	São João	Serra Talhada	Petrolina
Mesorregião	Agreste	Agreste	Sertão	Sertão
Coordenadas	8°16'53" S 35°58'25" W	08°52'32" S e 36°22'00" W	7°59'7" S 38°17'34" W	9°23'39" S 40°30'35" W
Altitude (m)	561	716	443	380
Precipitação média anual (mm)	764	885	686	577
Temperatura média anual (°C)	22,5	21,1	25,2	26,3
Tipo de solo	Argissolo Amarelo	Neossolo Regolítico	Luvissolo	Argissolo Vermelho- Amarelo

Os dois fragmentos de caatinga em regeneração (CR) e madura (CM) localizados no município de São João apresentam os seguintes históricos: CR – a vegetação nativa havia sido removida para utilização agropecuária e há dez anos encontra-se abandonada com regeneração da vegetação original do local; CM – vegetação sem interferência humana há, no mínimo, cinquenta anos. Em Petrolina, após a remoção da vegetação nativa, o fragmento de CR encontra-se abandonado há oito anos; o fragmento de CM apresenta-se sem interferência humana há, no mínimo, quarenta anos. A área de CR do município de Caruaru havia sido abandonada há no mínimo vinte anos. No município de Serra Talhada, a área de CR apresenta histórico de vinte e seis anos que foi abandonada para a regeneração natural. As áreas de CM dos dois últimos municípios apresentam o mesmo histórico do fragmento de caatinga madura do município de São João (> 50 anos).

Em cada área foram coletadas amostras compostas de solo para análises químicas e granulométrica. A amostragem foi realizada no horizonte superficial (camada de 0-20 cm) (Figura 1) em 10 parcelas delimitadas aleatoriamente em campo (detalhamento do esquema de amostragem é apresentado adiante). As amostras de solo foram secas ao ar, destorroadas, homogeneizadas e passadas em peneira com malha de abertura de 2 mm. Após estes procedimentos, foram determinados pH (água); P (Mehlich); K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Al^{3+} trocáveis, soma de bases, CTC efetiva, saturação por alumínio (EMBRAPA, 2009), e as proporções de areia, silte e argila (EMBRAPA, 1997), conforme pode ser observado na Tabela 2.



Figura 1: Coleta de solo no horizonte superficial (camada de 0-20 cm) para análises química e granulométrica.

Tabela 2: Características químicas e granulométrica de solos sob diferentes fragmentos de caatinga em regeneração (R) e caatinga madura (M) no semiárido de Pernambuco.

Características	Municípios							
	Serra Talhada (PE)		São João (PE)		Caruaru (PE)		Petrolina (PE)	
	ÁREAS							
	R	M	R	M	R	M	R	M
Tipo de solo	Luvissole		Neossolo Regolítico		Argissolo Amarelo		Argissolo Vermelho-Amarelo	
pH em água (1:2,5)	6,22a	6,37a	5,45a	5,25a	5,96a	5,97a	4,70a	5,07a
P (mg.dm ⁻³)	109a	13b	6,92a	6,74a	8,78a	6,92a	9,33a	4,12a
Ca ²⁺ (cmol _c .dm ⁻³)	3,64a	3,86a	1,80a	1,31a	2,78b	4,24a	0,43b	1,33a
Mg ²⁺ (cmol _c .dm ⁻³)	2,85a	1,44b	1,60a	0,86b	1,42a	1,55a	0,34a	0,65a
Na ⁺ (cmol _c .dm ⁻³)	0,05a	0,04a	0,12a	0,05b	0,04a	0,05a	0,02a	0,02a
K ⁺ (cmol _c .dm ⁻³)	0,81a	0,54b	0,54a	0,38b	0,50a	0,58a	0,31a	0,34a
SB (cmol _c .dm ⁻³)	7,36a	5,89b	4,06a	2,62b	4,76b	6,43a	1,11b	2,35a
Al ³⁺ (cmol _c .dm ⁻³)	0,05a	0,00a	0,17b	0,31a	0,02a	0,00a	0,05b	0,34a
t (cmol _c .dm ⁻³)	7,41a	5,89b	4,22a	2,93b	4,78b	6,43a	1,16b	2,69a
m (%)	0,67a	0,00a	3,93b	10,54a	0,44a	0,00a	4,32b	12,74a
Areia (g.k ⁻¹)	599b	766a	818a	864a	684a	685a	706a	836a
Silte (g.k ⁻¹)	232a	212a	112a	74a	229a	256a	169a	97a
Argila (g.k ⁻¹)	169a	22b	70a	62a	87a	59a	125a	67a
Classe textural	Franco arenosa	Areia Franca	Areia franca	Areia franca	Franco arenosa	Franco arenosa	Franco arenosa	Areia franca

Médias seguidas pelas mesmas letras nas linhas para cada município não são significativamente diferentes ao nível de 0,01 de probabilidade pelo teste de Tuckey.

3.2 Estimativa do N fixado em campo

As estimativas da FBN em campo foram realizadas nos fragmentos de caatinga de São João. Os dados de precipitação e temperatura mensal (referentes ao ano de coleta do material em campo) para os municípios de Petrolina e São João seguem nas figuras 2 e 3, respectivamente.

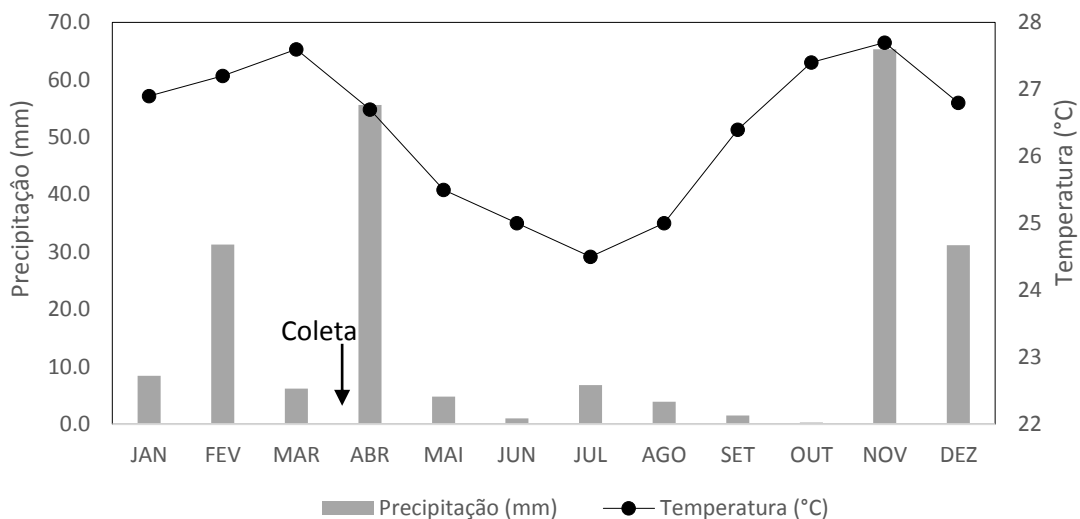


Figura 2: Dados meteorológicos da Estação de Bebedouro (Petrolina-PE, 09.04° S e 40.60° W) referentes ao ano de 2014 (EMBRAPA, 2015).

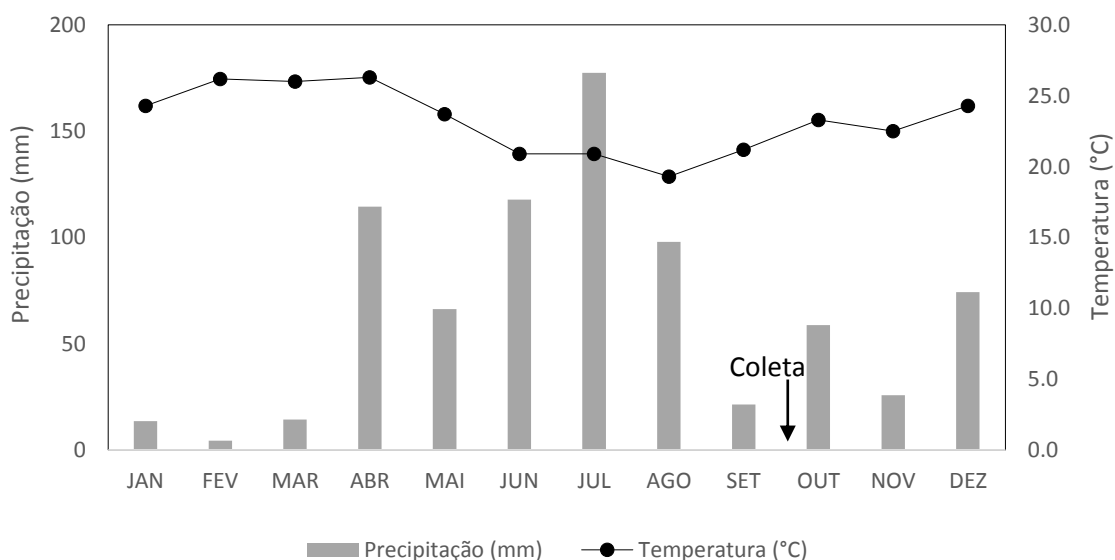


Figura 3: Dados meteorológicos de São João referentes ao ano de 2013 (INMET, 2015).

3.2.1 Desenho experimental, coleta de material em campo e preparo das amostras para análise

Em cada área de coleta foram estabelecidas, aleatoriamente, 10 parcelas com dimensões de 20 x 20 m, totalizando uma área amostral de 4000 m² (0,4 ha). Dentro de cada parcela, todas as plantas que apresentaram diâmetro de caule à altura do peito (1,30 m em relação ao nível do solo) igual ou superior a 3 cm foram identificadas e tiveram suas circunferências medidas (Figura 4). Nas plantas com mais de uma ramificação, tendo pelo menos uma de suas ramificações atendendo ao critério de inclusão, foram medidas todas as ramificações.



Figura 4: Medições da circunferência do caule das leguminosas com diâmetro a altura do peito (DAP) igual ou superior a 3 cm.

Material vegetal foi coletado para correta identificação botânica. Os valores das circunferências dos indivíduos foram anotados e transformados em área basal (AB) e posteriormente em diâmetro a altura do peito (DAP), considerando-se o caule como circular. Para os indivíduos com ramificações, foi calculada a área basal total correspondente ao somatório das áreas basais de todas as ramificações de cada indivíduo e este valor foi utilizado para o cálculo do DAP médio destes indivíduos.

Para cada espécie foram determinadas as áreas basais absolutas (somatório das áreas basais de todos os indivíduos da espécie em cada parcela) e relativas (relação entre a área basal da espécie e a área basal total de todas as espécies da parcela) e as densidades absolutas (número de indivíduos) e relativas (relação entre a densidade da espécie e a densidade total de todas as espécies da parcela).

A biomassa de folhas e a biomassa total foram estimadas para cada indivíduo das parcelas, utilizando equações alométricas desenvolvidas para espécies da caatinga por Silva & Sampaio (2008), Souza et al. (2012) e Sampaio & Silva (2005), respectivamente:

$B_{\text{folhas}} = 0,0681 \text{ DAP}^{1,5829}$, para espécies de grande porte (Equação 1)

$B_{\text{folhas}} = 0,0180 \text{ DAP}^{1,845}$, para espécies de pequeno porte (Equação 2)

$B_{\text{total}} = 0,173 \text{ DAP}^{2,295}$ (Equação 3)

Onde: B folhas é a biomassa de folhas (kg), B total é a biomassa aérea total (kg) e DAP é o diâmetro à altura do peito (cm).

Em todas as parcelas, foram realizadas coletas (Figura 5) de tecido foliar de 5 indivíduos de dois grupos de espécies: 1) espécies alvo, que foram todas as espécies de leguminosas com capacidade de nodulação conhecida e também as espécies de leguminosas sem informações na literatura sobre sua capacidade de nodulação; e 2) espécies referência, que foram espécies não leguminosas ou leguminosas não nodulantes. A capacidade de nodulação foi determinada de acordo com a literatura (ALLEN & ALLEN, 1981; KIRKBRIDE JÚNIOR, 1997; KIRKBRIDE JÚNIOR, 2002; FREITAS et al., 2010b). Para cada planta, foi coletada uma amostra composta de 10 a 20 folhas saudáveis completamente expandidas, localizadas de 1,5 a 2 m de altura da copa.



Figura 5: Coleta de material vegetal para análise dos teores de N e abundância natural de ^{15}N .

3.2.2 Quantificação de N na biomassa foliar, percentual de N derivado da atmosfera (%N_{dda}) e quantidade de N fixado.

Após a coleta, o tecido foliar de cada indivíduo amostrado foi acondicionado em saco de papel e submetido à secagem em estufa de circulação forçada de ar (72 horas a 65°C) até peso constante. Posteriormente, as amostras foram processadas em moinho de facas e maceradas quando necessário. O material foi devidamente identificado e enviado para determinação dos teores de N total (%) e abundância natural de ¹⁵N em espectrômetro de massa Thermo Quest-Finnigan Delta Plus (Finnigan-MAT; CA, USA) com interface com um Analisador Elementar (Carlo Erba model 1110; Milan, Italy), no Laboratório de Ecologia Isotópica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP).

Os valores de abundância natural de ¹⁵N foram expressos em unidades de “delta” (δ), expresso em partes por mil (‰), tendo como base o valor de abundância natural de ¹⁵N do ar (% átomos ¹⁵N = 0,3663), de acordo com a equação 4:

$$\delta = (R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}} - 1) \times 1000 \text{ (Equação 4)}$$

Quando a diferença entre o valor médio de δ¹⁵N de uma espécie alvo e o valor médio de δ¹⁵N das espécies referência em cada parcela foi maior que 2 ‰ (HÖGBERG, 1997) foi estimada a proporção de N da planta derivado da atmosfera (%N_{dda}), utilizando a metodologia da abundância natural, de acordo com a equação 5 (SHEARER & KOHL, 1986):

$$\%N_{\text{dda}} = [(\delta^{15}\text{N}_{(\text{referência})} - \delta^{15}\text{N}_{(\text{fixadora})}) / (\delta^{15}\text{N}_{(\text{referência})} - B)] \times 100 \text{ (Equação 5)}$$

Onde: δ¹⁵N_(referência) é o valor médio de δ¹⁵N das espécies referência de cada parcela; δ¹⁵N_(fixadora) é o valor médio de δ¹⁵N de cada espécie fixadora de cada parcela e B é o valor de δ¹⁵N na parte aérea da leguminosa quando a planta cresce em sistema sem nitrogênio. Neste estudo foi utilizado o valor B = -1.24‰, determinado por Reis Jr. et al. (2010) para *Mimosa caesalpinifolia* Benth.

A quantidade de N na biomassa foliar de cada espécie, em cada uma das parcelas, foi calculada multiplicando-se sua biomassa pelos teores de N médios da espécie na parcela. As quantidades de N fixadas (kg ha⁻¹ ano⁻¹) foram obtidas

multiplicando as quantidades de N total das folhas pelos resultados de %N_{dda} médios de cada espécie. Neste cálculo assume-se que a biomassa de folhas corresponde à maior parte da produção anual das plantas, já que são espécies decíduas.

3.3 Ocorrência, diversidade e eficiência das populações de rizóbios

O estudo foi realizado entre junho e outubro de 2014, em casa de vegetação e no Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa semiárido, Petrolina, PE. Este estudo foi realizado para os 8 fragmentos de caatinga descritos anteriormente (Tabela 2). As amostras de solo utilizadas para a condução do experimento foram destorroadas, homogeneizadas, passadas em peneira com malha de abertura de 2 mm e, em seguida, acondicionados em vasos de polietileno com capacidade para 500 g.

3.3.1 Experimento para obtenção dos nódulos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação em arranjo fatorial 3 x 4 x 2 (3 espécies de leguminosas nativas nodulantes, utilizadas como plantas iscas; 4 locais de coleta e duas condições da vegetação por local - caatinga madura e caatinga em regeneração), utilizando um delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições. As leguminosas nodulantes utilizadas foram: mulungu [*Erythrina velutina* Willd.], jurema preta [*Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.] e angico [*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan]. As leguminosas não nodulantes, mororó [*Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud.] e catingueira [*Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz.] foram incluídas para servirem de plantas referência para estimativa da FBN nas leguminosas arbóreas fixadoras. As sementes (Figura 6) de mulungu, angico e catingueira utilizadas no experimento foram obtidas do Laboratório de Análises de Sementes da Embrapa Semiárido – LASESA. As sementes de mororó foram obtidas a partir de plantas matrizes da caatinga de São João e as sementes de jurema preta foram coletadas de plantas matrizes de um fragmento de caatinga localizado em Patos, PB.



Figura 6: Sementes de mulungu (A), jurema preta (B), catingueira (C), angico (D) e mororó (E) utilizadas no experimento.

As sementes foram submetidas a escarificação mecânica (com lixa) e desinfestação superficial - etanol (70%) por 3 minutos para modificação da tensão superficial, hipoclorito de sódio (1%) por 3 minutos e 5 lavagens sucessivas em água destilada estéril (FREITAS et al., 2014). Quatro sementes foram semeadas por unidade experimental. O desbaste foi realizado 15 dias após emergência (DAE), deixando-se uma planta por vaso (Figura 7).

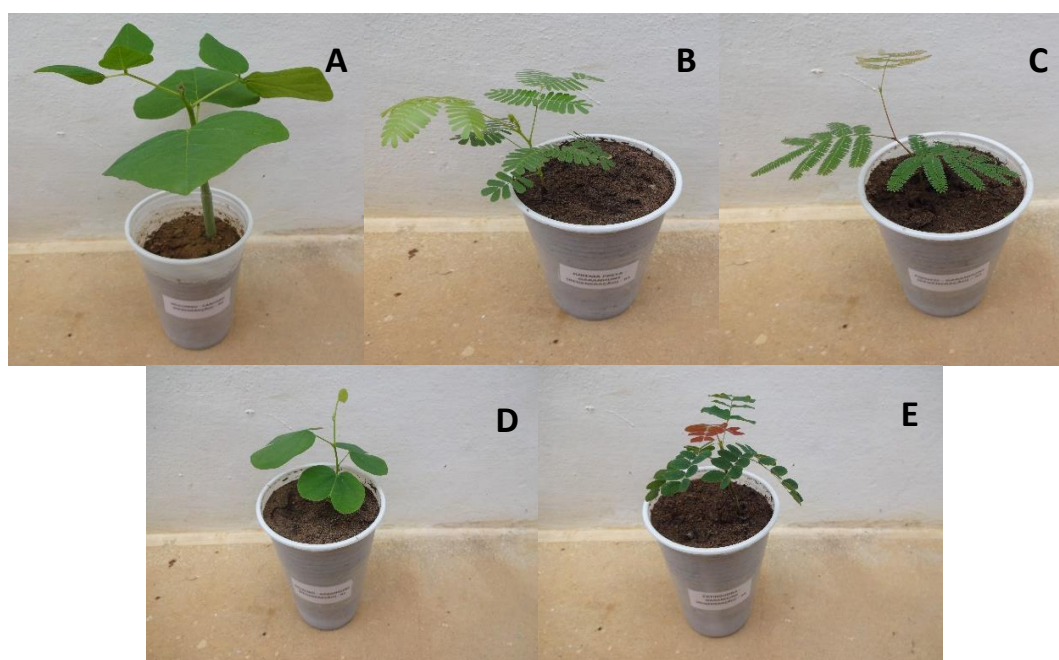


Figura 7: Indivíduos de mulungu (A), jurema preta (B), angico (C), mororó (D) e catingueira (E) após desbaste em casa de vegetação.

As plantas foram regadas conforme o necessário. A colheita foi realizada aos 83 DAE para mulungu e aos 112 DAE para jurema preta, angico, catingueira e mororó. Por ocasião da coleta, as raízes foram separadas da parte aérea para a melhor obtenção dos nódulos. Após lavagem das raízes, os nódulos foram destacados, contados e, após o isolamento, secos em estufa de circulação forçada de ar a 65°C por um período de 72 horas para a obtenção da massa seca. Para o isolamento foram utilizados 5 nódulos por unidade experimental. As raízes e a parte aérea foram acondicionadas em sacos de papel e também submetidas a secagem em estufa, sendo posteriormente pesadas. A eficiência dos isolados bacterianos presentes em cada área foi estimada através da determinação da produção de biomassa seca da parte aérea, número e biomassa seca dos nódulos.

3.3.2 Isolamento, purificação e caracterização morfofisiológica dos isolados bacterianos

O isolamento procedeu-se logo após a coleta das plantas em casa de vegetação, com os nódulos ainda frescos (Figura 8), com o objetivo de diminuir a proporção de isolados contaminantes.



Figura 8: Nódulos de jurema preta (A), angico (B) e mulungu (C) utilizados para a captura dos isolados bacterianos.

Em capela de fluxo laminar, os nódulos foram desinfestados superficialmente com etanol comercial (95,8%) por 30 segundos para a quebra da tensão superficial, hipoclorito de sódio (5%) por 5 minutos, seguidos de dez lavagens em água destilada estéril, para remoção do excesso de hipoclorito. Com o auxílio de uma pinça, os nódulos foram pressionados sobre placas de Petri com

meio de cultura contendo extrato de levedura, manitol e ágar (YMA, pH 6.8) (VINCENT, 1970), com adição de corante vermelho congo (0,25% em 0,2N de KOH). As placas foram incubadas em estufa tipo BOD a 28° C e o aparecimento das colônias monitorado diariamente. Após o aparecimento das colônias características, os isolados bacterianos 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, sendo o aparecimento das colônias monitorado diariamente.

Após ser verificado o crescimento das colônias isoladas, realizou-se a caracterização morfofisiológica dos isolados avaliando a modificação do pH do meio de cultura após o crescimento das colônias (AC: ácida; AL: alcalina; N: neutra) e as características fenotípicas: 1) tempo de crescimento (rápido – colônias isoladas apareciam até três dias depois de repicadas; intermediário – colônias apareciam de quatro a seis dias; e lenta – colônias apareciam depois de seis dias); 2) tamanho da colônia (puntiforme - colônias com diâmetro menor que 1 mm; colônias com diâmetro entre 1-2 mm e colônias com diâmetro >2 mm); 3) forma da colônia (circular ou irregular); 4) aparência da colônia (homogênea ou heterogênea); 5) transparência da colônia (opaca - quando não possui o brilho; translúcida - quando permitia a passagem da luz através da placa; e transparente – quando além de permitir a passagem da luz, percebia-se claramente o que havia do outro lado); 6) cor das colônias (branca, amarela ou rosa); 7) presença de muco (sim ou não); 8) quantidade de muco (muito ou pouco); 9) elevação (colônias elevadas ou não) e 10) tipo de muco (viscoso, butírico ou floculoso). Após ser realizada a caracterização das colônias das bactérias, estas foram estocadas em tubos tipo Eppendorf (com capacidade para 1,5 mL) contendo 1,0 mL de meio YM com glicerina (50%), para estudos subsequentes.

Os dados da caracterização morfofisiológica dos isolados autenticados foram codificados em um sistema binário (1 – positivo e 0 – negativo) a partir do qual foram gerados os dendrogramas de similaridade das áreas em regeneração, das áreas maduras e de todos os isolados, utilizando o método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) e o coeficiente de similaridade de Jaccard. Com os isolados agrupados, procederam-se os cálculos dos índices de diversidade de Shannon (H') e equitabilidade de Pielou (J').

3.3.3 Autenticação dos isolados bacterianos

Para a autenticação, os isolados foram submetidos a técnica da amplificação simultânea dos genes *nifH* e *nodC* por Polymerase Chain Reaction – PCR, como sugerido por Fernandes Jr et al. (2013). A técnica foi utilizada visando à otimização do trabalho, uma vez que o teste de autenticação em casa de vegetação demanda maior espaço de tempo. Foram considerados autenticados os isolados que amplificaram, no mínimo, um dos genes.

Extração do DNA

O DNA bacteriano foi extraído através do uso de choque térmico (FERNANDES JÚNIOR et al., 2013), utilizando a estirpe BR 3299 como controle positivo. Os isolados foram cultivados em meio YM sem indicador de pH por três dias, para as bactérias de crescimento rápido, ou sete dias, para as bactérias de crescimento lento, sob agitação orbital a 150 rotações por minuto (rpm) à temperatura ambiente.

Após o crescimento, alíquotas de 1 mL foram centrifugadas a 13.000 rpm por três minutos, descartando-se o sobrenadante. As células foram ressuspensas em água ultrapura por duas vezes consecutivas (1ª ressuspensão 500 µL e 2ª ressuspensão 200 µL de água ultrapura). Em seguida, para que ocorresse o processo de ruptura das células dos isolados bacterianos, as amostras foram congeladas à temperatura de - 20°C e, após o congelamento, as amostras foram levadas ao banho maria por 5 minutos à temperatura de fervura. Esse procedimento simultâneo de congelamento e aquecimento, provocando o choque térmico, foi realizado três vezes.

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Nas PCRs foram utilizados os iniciadores PolF (TGCGAYCCSAARGCBGACTC) e PolR (ATSGCCATCATYTTCRCCGGA) para a amplificação de um fragmento de aproximadamente 360 pb correspondente a parte do gene *nifH* no operon *nifH*KD (POLY et al., 2001) e NodCF (AYGTHGTYGAYGACGGTTC) e *nodCR* (I) (CGYGACAGCCANTCKCTATTG)

para a amplificação de um fragmento interno ao gene *nodC* com aproximadamente 980 pb (LAGURRE et al., 2001).

As reações foram dimensionadas para um volume final de 10 µL contendo tampão de reação 1X, MgCl₂ 2,5 mM, dNTP 1,2 mM, Taq DNA polimerase 1,0 U e 1,0 µM de cada iniciador PolF e PolR e 0,75 µM de cada iniciador NodCF e NodCR, além de 1 µL de DNA genômico. A amplificação consistiu em uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 10 minutos (FERNANDES JÚNIOR et al., 2013).

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% (p/v) a 100 V por 120 minutos. O gel foi corado com brometo de etídeo (8 pM) adicionado ao gel após a fusão e resfriamento da agarose. A visualização do gel (Figura 9) foi realizada em um transluminador sob luz UV.

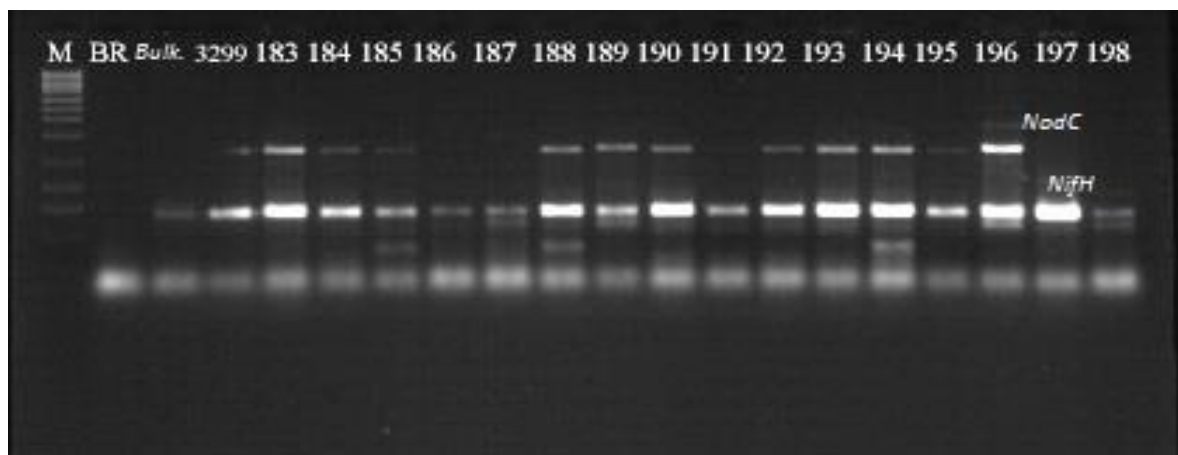


Figura 9: Amplificação dos genes *nifH* e/ou *nodC* em isolados de bactérias por PCR.

3.4 Análise dos dados

Para o experimento em campo, inicialmente foram testadas a normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias. A análise da variância das densidades, áreas basais, biomassas e quantidades de N nas folhas foi realizada para os valores totais e para os valores da jurema preta, comparando, separadamente, os fragmentos de São João (regeneração e madura) e os fragmentos de caatinga madura (de São João e de Petrolina), considerando os dados das parcelas como repetições com um delineamento inteiramente casualizado. Por serem apenas dois tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste T a 5% de probabilidade. A análise da variância das concentrações de N e valores de $\delta^{15}\text{N}$ foi realizada comparando as espécies dentro de cada fragmento de caatinga, considerando as plantas como repetições e um delineamento inteiramente casualizado. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No experimento em casa-de-vegetação, para comparar a produtividade de biomassa e a nodulação, os dados foram submetidos a análise de variância, considerando um delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial. As médias foram comparadas utilizando o teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e os dados de número de nódulos transformados em $(x + 1)^{1/2}$.

Os dendrogramas e os índices de diversidade de Shannon (H') e equitabilidade de Pielou (J') foram obtidos através do programa PAST (HAMMER et al., 2001).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento em campo

4.1.1 Levantamento florístico e fitossociológico

De acordo com o critério de inclusão empregado neste estudo ($DAP \geq 3$ cm), foram amostrados 1437 indivíduos distribuídos em 36 espécies, 24 gêneros e 15 famílias, sendo sete as espécies não identificadas até o momento. Do total amostrado, 983 indivíduos foram da caatinga de São João, com 723 indivíduos pertencentes a flora arbustivo-arbórea da área de caatinga madura (15 espécies e 9 famílias, com quatro espécies não identificadas) e 260 da área em regeneração (9 espécies e 7 famílias). A área de caatinga madura de Petrolina foi representada por 454 indivíduos (21 espécies e 9 famílias, com três espécies não identificadas). Na área de caatinga em regeneração em Petrolina, não se encontrou nenhum indivíduo com $DAP \geq 3$ cm e esta área ficou fora dos estudos fitossociológicos e, conseqüentemente, das estimativas das quantidades de N fixadas em leguminosas arbóreas. Das 36 espécies amostradas, apenas 2 foram comuns a todas as áreas (Tabela 3), sendo elas *Mimosa tenuiflora* (leguminosa nodulante) e *Commiphora leptophloeos* (espécie não leguminosa). Em outros inventários realizados na caatinga estas espécies mostraram-se presentes (BARBOSA et al., 2007; FABRICANTE & ANDRADE 2007; GUEDES et al., 2012; CABRAL et al., 2013).

Levando em consideração todas as famílias encontradas nas áreas estudadas, as que apresentaram maior diversidade de espécies foram Fabaceae (9) e Euphorbiaceae (7), que contribuíram juntas com mais de 50% do total de espécies amostradas (Tabela 3). Em levantamentos florísticos e fitossociológicos realizados na caatinga, as famílias Fabaceae e Euphorbiaceae tem sido as mais representativas, abrangendo a maior parte das espécies lenhosas da flora do bioma (AMORIM et al., 2005; BARBOSA et al., 2007; RODAL et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009; SOUZA E RODAL, 2010; TROVÃO et al., 2010; PEREIRA JÚNIOR et al., 2012; SILVA et al., 2012). As demais famílias encontradas no presente estudo (Apocynaceae, Bignoniaceae, Burseraceae, Cactaceae, Capparaceae, Caricaceae, Malvaceae, Myrtaceae, Nyctaginaceae, Rhamnaceae, Sapindaceae e Verbenaceae) foram representadas por uma única espécie cada, com exceção da Anacardiaceae que apresentou duas espécies. É importante ressaltar que na família Fabaceae estão incluídas as espécies das subfamílias Caesalpinoideae e Mimosoideae.

Tabela 3: Lista das espécies arbustivo-arbóreas encontradas em uma área de caatinga em regeneração (R) e duas áreas de caatinga madura (M) nos municípios de Petrolina (Sertão) e São João (Agreste), Pernambuco.

Espécie	Nome popular	Família	São João		Petrolina
			R	M	M
<i>Anadenanthera macrocarpa</i> (Benth.) Brenan	Angico	Fabaceae (Mimosoideae)			x
<i>Aspidosperma pyrifolium</i> Mart.	Pereiro	Apocynaceae			x
<i>Bauhinia cheilantha</i> (Bong.) Steud.	Mororó	Fabaceae (Caesalpinioideae)			x
<i>Casearia luetzelburgii</i> Sleumer	Sem informação	Sapindaceae	x		
<i>Cnidosculus vitifolius</i> Pohl.	Favela de galinha	Euphorbiaceae			x
<i>Cnidoscolus phyllacanthus</i> Mull. Arg. Pax k. Hoffm	Favela	Euphorbiaceae			x
<i>Commiphora leptophloeos</i> (Mart.) J.B.Gillett	Umburana	Burseraceae	x	x	x
<i>Croton argyrophyllodes</i> Muell. Arg.	Velame	Euphorbiaceae			x
<i>Cynophalla flexuosa</i> (L.) J.Presl	Feijão bravo	Capparaceae		x	
<i>Guapira cf. laxa</i> (Netto) Furlan	Piranha	Nyctaginaceae	x	x	
<i>Handroanthus spongiosus</i> (Rizzini) S. O. Grose	Sete cascas	Bignoniaceae			x
<i>Jacaratia corumbensis</i> Kuntze.	Mamãozinho de veado	Caricaceae			x
<i>Jatropha molíssima</i> (Pohl) Baill.	Pinhão vermelho	Euphorbiaceae			x
<i>Lippia gracilis</i> Schauer	Alecrim	Verbenaceae		x	
<i>Manihot pseudoglaziovii</i> Müll. Arg.	Maniçoba	Euphorbiaceae			x
<i>Mimosa stipulacea</i> (Benth.) Ducke	Jurema branca	Fabaceae (Mimosoideae)			x
<i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd.) Poir.	Jurema Preta	Fabaceae (Mimosoideae)	x	x	x
<i>Pilosocereus pachycladus</i> F. Ritter	Facheiro	Cactaceae			x

Continuação Tabela 3...

Espécie	Nome popular	Família	São João		Petrolina
			R	M	M
<i>Poincianella microphylla</i> (Mart. ex G. Don) L.P. Queiroz	Catingueira	Fabaceae (Caesalpinioideae)			x
<i>Poincianella pyramidalis</i> (Tul.) L.P. Queiroz	Catingueira	Fabaceae (Caesalpinioideae)	x		
<i>Pseudobombax simplicifolium</i> A. Robyns	Imbiruçu	Malvaceae			x
<i>Psidium rhombeum</i> O. Berg	Aracá	Myrtaceae		x	
<i>Sapium lanceolatum</i> Huber	Burra leiteira	Euphorbiaceae			x
<i>Sapium cf. glandulosum</i> (L.)	Burra leiteira	Euphorbiaceae	x	x	
<i>Senegalia</i> sp1	Carcará	Fabaceae (Mimosoideae)		x	
<i>Senegalia</i> sp2	Rasga beíço	Fabaceae (Mimosoideae)	x	x	
<i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl.	Baráúna	Anacardiaceae		x	x
<i>Spondias tuberosa</i> Arruda	Umbuzeiro	Anacardiaceae	x		
<i>Ziziphus joazeiro</i> Mart.	Juazeiro	Rhamnaceae	x	x	
Não identificada 1	-	-		x	
Não identificada 2	-	-			x
Não identificada 3	-	-			x
Não identificada 4	-	-			x
Não identificada 5	Bom nome	-		x	
Não identificada 6	Pimentinha	-		x	
Não identificada 7	Pitomba	-		x	

Em Petrolina, as famílias com maior número de espécies foram Euphorbiaceae (6) e Fabaceae (5) com mais de 60% do total de espécies identificadas. No levantamento fitossociológico (Tabela 4), mais de 43% dos indivíduos foram de *Manihot pseudoglaziovii* (265 ind/ha) e *M. tenuiflora* (210 ind/ha). Quanto a área basal, as espécies de maior destaque foram *M. tenuiflora* (2,79 m²/ha) e *C. leptophloeos* (2,14m²/ha). Estes valores juntos representam aproximadamente 50% da área basal total dos indivíduos amostrados. O valor de área basal obtido neste estudo, para *M. tenuiflora*, está dentro dos valores encontrados por Calixto Júnior & Drumond (2011). Estudando dois fragmentos de caatinga no sertão pernambucano, estes autores encontraram valores de área basal de 1,62 m²/ha e 3,45 m²/ha. Lima Júnior et al. (2014), também no sertão pernambucano, encontram valores de área basal inferiores aos encontrados neste estudo para *M. tenuiflora* (1,97 m²/ha) e *C. leptophloeos* (1,01 m²/ha).

Tabela 4: Parâmetros fitossociológicos encontrados em uma área de caatinga em regeneração (R) e duas áreas de caatinga madura (M) nos municípios de Petrolina (Sertão) e São João (Agreste), Pernambuco. DA = densidade absoluta, DR = densidade relativa, AB = área basal absoluta e ABR = área basal relativa.

Local/Espécie	DA Ind/ha	DR (%)	ABA m ² /ha	ABR (%)
São João - M				
<i>Commiphora leptophloeos</i>	75	4,74	0,56	9,24
<i>Cynophalla flexuosa</i>	12,5	0,79	0,06	0,99
<i>Guapira cf. laxa</i>	57,5	3,63	0,24	3,96
<i>Lippia gracilis</i>	130	8,22	0,24	3,96
<i>Mimosa tenuiflora</i>	877,5 Aa	55,45	3,68 Aa	60,72
Não identificada 1	5	0,32	0,02	0,33
Não identificada 5	10	0,63	0,02	0,33
Não identificada 6	15	0,95	0,03	0,49
Não identificada 7	2,5	0,16	0,02	0,33
<i>Psidium rhombeum</i>	2,5	0,16	0,00	0,05
<i>Sapium cf. glandulosum</i>	45	2,84	0,26	4,29
<i>Senegalia</i> sp1	147,5	9,32	0,29	4,77
<i>Senegalia</i> sp2	182,5	11,53	0,34	5,60

Continuação Tabela 4...

Local/Espécie	DA Ind/ha	DR (%)	ABA m ² /ha	ABR (%)
<i>Schinopsis brasiliensis</i>	12,5	0,79	0,26	4,28
<i>Ziziphus joazeiro</i>	7,5	0,47	0,04	0,66
Total	1582,5 Aa	100	6,06 Ab	100
São João – R				
<i>Casearia luetzelburgii</i>	2,5	0,39	0,00	0,10
<i>Commiphora leptophloeos</i>	2,5	0,39	0,02	0,40
<i>Guapira cf. laxa</i>	2,5	0,39	0,00	0,04
<i>Mimosa tenuiflora</i>	572,5 B	88,42	3,55 A	82,15
<i>Poincianella pyramidalis</i>	30	4,63	0,10	2,41
<i>Sapium cf. glandulosum</i>	2,5	0,39	0,08	1,90
<i>Senegalia sp2</i>	25	3,86	0,13	2,91
<i>Spondias tuberosa</i>	2,5	0,39	0,34	7,90
<i>Ziziphus joazeiro</i>	7,5	1,16	0,09	2,18
Total	647,5 B	100	4,32 B	100
Petrolina - M				
<i>Anadenanthera macrocarpa</i>	15	1,37	0,39	3,90
<i>Aspidosperma pyriforme</i>	2,5	0,23	0,05	0,52
<i>Bauhinia cheilantha</i>	17,5	1,60	0,05	0,50
<i>Commiphora leptophloeos</i>	47,5	4,34	2,14	21,29
<i>Cnidocolus phyllacanthus</i>	10	0,91	0,21	2,12
<i>Cnidocolus vitifolius</i>	110	10,05	0,64	6,31
<i>Croton argyrophyloides</i>	5	0,46	0,04	0,38
<i>Handroanthus spongiosus</i>	12,5	1,14	0,05	0,53
<i>Jacaratia corumbensis</i>	2,5	0,23	0,01	0,08
<i>Jatropha molíssima</i>	60	5,48	0,07	0,66
<i>Manihot pseudoglaziovii</i>	265	24,20	0,59	5,82
<i>Mimosa stipulacea</i>	35	3,20	0,14	1,39
<i>Mimosa tenuiflora</i>	210 b	19,18	2,79 b	27,69
Não identificada 2	2,5	0,23	0,10	1,03
Não identificada 3	32,5	2,97	0,41	4,09
Não identificada 4	5	0,46	0,11	1,09
<i>Pilosocereus pachycladus</i>	2,5	0,23	0,22	2,14
<i>Poincianella microphylla</i>	165	15,07	1,32	13,13
<i>Pseudobombax simplicifolium</i>	5	0,46	0,03	0,29

Continuação **Tabela 4...**

Local/Espécie	DA Ind/ha	DR (%)	ABA m ² /ha	ABR (%)
<i>Sapium lanceolatum</i>	40	3,65	0,37	3,68
<i>Schinopsis brasiliensis</i>	50	4,57	0,34	3,35
Total	1095 b	100,00	10,07 a	100,00

Letras maiúsculas comparam as áreas de São João (regeneração e madura) e letras minúsculas comparam as áreas maduras (São João e Petrolina). Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste T a 5% de probabilidade.

No município de São João, a única família com mais de uma espécie em ambas as áreas foi Fabaceae, com 30% e 33% das espécies na área de caatinga madura e em regeneração, respectivamente. Na área madura, *M. tenuiflora* representou 55% do total de indivíduos e apresentou área basal de 3,68m²/ha, a maior entre as espécies estudadas no local. Para a área em regeneração, 88% dos indivíduos são de *M. tenuiflora*. Esta espécie também foi a que apresentou maior área basal (3,55m²/ha).

No município de São João, a densidade total foi de 1585 e 647,5 ind/ha para a área madura e em regeneração, respectivamente. Em Petrolina, a densidade foi de 1095 ind/ha. Nas duas áreas maduras o número de espécies e indivíduos foi superior ao da área em regeneração, apresentando densidade mais expressiva, refletindo assim, uma resposta à diminuição do nível de perturbação. Em outros estudos, Amorim et al. (2005), Fabricante & Andrade (2007) e Guedes et al. (2012) encontraram valores de densidade superiores aos encontrados no presente estudo. A variabilidade dos parâmetros fitossociológicos encontrada nos mais diferentes locais da caatinga pode ser justificada pela grande variabilidade das fisionomias de caatinga e/ou pelas diferenças nas pressões antrópicas exercidas por diferentes tipos de usos. A área de caatinga madura do município de São João, por exemplo, apresenta densidade estatisticamente superior à área de caatinga madura de Petrolina. Estas duas áreas encontram-se em áreas fisiográficas distintas. O maior número de indivíduos na área madura de São João pode ser, em parte, justificado pelos maiores índices pluviométricos. Segundo Andrade-Lima (1981), as caatingas localizadas em regiões com elevadas precipitações apresentam maior diversidade.

M. tenuiflora foi a espécie que apresentou maior densidade nas áreas de São João. Em Petrolina *M. tenuiflora* foi a segunda espécie com maior densidade,

atrás apenas de *M. pseudoglaziovii*. A densidade de *M. tenuiflora* foi maior na área madura de São João que na área em regeneração, mas área basal não diferiu. Cabral et al. (2013) encontraram maior densidade de *M. tenuiflora* em área de sucessão inicial da caatinga. Segundo estes autores, por ser uma espécie pioneira, *M. tenuiflora* apresenta tendência à alta produtividade nos primeiros anos do processo de regeneração natural e, com o passar do tempo, esta característica tende a diminuir, o que difere dos resultados obtidos no presente estudo. Calixto et al. (2011) também referem-se à espécie como pioneira, com densidade que tende a diminuir em áreas de sucessão secundária. A capacidade que a espécie tem de colonizar áreas antropizadas também foi descrita por Queiroz (2009).

As áreas basais totais foram de 10,07, 6,08 e 4,32 para as áreas de Petrolina madura e São João madura e em regeneração, respectivamente. Estatisticamente, a área de Petrolina foi superior às demais áreas. Em estudos anteriores, realizados na mesma área em Petrolina, Lima Júnior et al. (2014) e Calixto Júnior & Drumond (2011) encontraram valores de área basal total inferiores ao encontrado neste estudo. Estudando a diversidade florística da caatinga em outros locais, Oliveira et al. (2009), Pereira Júnior et al. (2012) e Rodal et al. (2008) encontram valores de área basal superiores aos encontrados nas três áreas estudadas. Resultados como estes só confirmam a heterogeneidade da vegetação deste ambiente.

Os índices de diversidade de Shannon (H') e equitabilidade de Pielou (J') para as áreas estudadas encontram-se na tabela 5. Os maiores valores de H' foram para as duas áreas maduras de Petrolina e São João (2,30 e 1,60 nats/ind), com a maior diversidade em Petrolina. Estes valores estão dentro dos valores encontrados em outros trabalhos. O valor de H' obtido em Petrolina foi superior ao valor encontrado por Calixto Júnior & Drumond (2011) quando estes trabalhavam na mesma área, em anos anteriores. O valor obtido para a área em regeneração foi o menor entre as áreas (0,53 nats/ind), sendo a área com menor diversidade. Os baixos valores de J' nas duas áreas do município de São João indicam que houve predomínio de pelo menos uma espécie sobre as outras. Esta baixa equitabilidade foi fortemente influenciada pela alta densidade de *M. tenuiflora*.

Tabela 5: Índice de diversidade de Shannon (H') e equitabilidade de Pielou (J'), encontrados neste estudo e em outros ambientes de caatinga.

Autor	Local	H' (nats ind ⁻¹)	J'
Este estudo	Petrolina – madura	2,30	0,75
	São João – madura	1,60	0,57
	São João – regeneração	0,53	0,24
Fabricante e Andrade (2007)	Paraíba	1,96	0,63
Pessoa et al. (2008)	Rio Grande do Norte	1,10 e 0,86	0,52 e 0,44
Calixto Júnior & Drumond (2011)	Petrolina - PE	1,39	0,50
Barboza et al. (2012)	Arcoverde - PE	2,05	0,57
Guedes et al. (2012)	Santa Terezinha - PB	2,54	0,82

4.1.2 Biomassa de folhas e biomassa aérea total

No município de São João, a biomassa foliar total foi de 1685 kg ha⁻¹ para a área em regeneração e de 2373 kg ha⁻¹ para a área madura, sem diferença estatística (Tabela 6). Para *M. tenuiflora*, os valores também não apresentaram diferença estatística, com 1487 kg ha⁻¹ para a área em regeneração e 1448 kg ha⁻¹ para a área madura. Nas duas áreas, *M. tenuiflora* foi a espécie com maior contribuição na biomassa foliar total, com proporções de 88% e 61% para a área em regeneração e madura, respectivamente.

A biomassa foliar da área madura de São João foi estatisticamente inferior à de Petrolina (2601 kg ha⁻¹). Mesmo apresentando maior biomassa foliar total e um maior número de espécies nodulantes, a contribuição na biomassa foliar por estas espécies foi menor que as proporções citadas para as outras áreas (36%). Quando se faz a comparação das duas áreas maduras, para *M. tenuiflora*, o valor de biomassa da área de São João (1448 kg ha⁻¹) foi estatisticamente superior ao da área de Petrolina (795 kg ha⁻¹). A redução da contribuição das leguminosas nodulantes na biomassa foliar total em Petrolina foi resultante do aumento da biomassa das espécies não leguminosas (Tabela 6).

Tabela 6: Biomassa de folhas e biomassa aérea total de espécies leguminosas e não leguminosas encontrados em uma área de caatinga em regeneração (R) e duas áreas de caatinga madura (M) nos municípios de Petrolina (Sertão) e São João (Agreste), Pernambuco.

Espécies	Biomassa Foliar (kg ha ⁻¹)			Biomassa aérea total (kg ha ⁻¹)		
	São João		Petrolina	São João		Petrolina
	R	M	M	R	M	M
Leguminosas nodulantes	1486,9	1448,1	942,52	15864,90	16472,32	16405,67
<i>Anadenanthera macrocarpa</i>	-	-	95,52	-	-	2159,07
<i>Mimosa stipulacea</i>	-	-	51,89	-	-	564,91
<i>Mimosa tenuiflora</i>	1486,9A	1448,1Aa	795,11b	15864,90	16472,32	13681,69
Leguminosas não nodulantes	82,30	322,20	431,20	964,12	2749,95	6329,71
<i>Bauhinia cheilantha</i>	-	-	20,42	-	-	192,75
<i>Senegalia</i> sp1	-	150,30	-	-	1327,23	-
<i>Senegalia</i> sp2	42,70	171,90	-	548,09	1422,72	-
<i>Poincianella microphylla</i>	-	-	410,78	-	-	6136,96
<i>Poincianella pyramidalis</i>	39,60	-	-	416,03	-	-
Não leguminosas	116,20	603,20	1227,41	3287,34	8927,05	29371,58
<i>Aspidosperma pyriforme</i>	-	-	14,17	-	-	263,07
<i>Casearia luetzelburgii</i>	1,9	-	-	14,59	-	-
<i>Commiphora leptophloeos</i>	5,9	216,30	411,64	74,24	3107,76	14183,80
<i>Cnidoscolus phyllacanthus</i>	-	-	55,07	-	-	1118,52
<i>Cnidoscolus vitifolius</i>	-	-	199,36	-	-	3003,27
<i>Croton argyrophyllodes</i>	-	-	12,75	-	-	165,20
<i>Cynophalla flexuosa</i>	-	21,0	-	-	250,83	-
<i>Guapira cf. laxa</i>	1,0	88,20	-	5,49	1041,94	-
<i>Handroanthus spongiosus</i>	-	-	19,19	-	-	223,41
<i>Jacaratia corumbensis</i>	-	-	3,27	-	-	31,36
<i>Jatropha molíssima</i>	-	-	12,31	-	-	218,09
<i>Lippia gracilis</i>	-	43,40	-	-	882,63	-
<i>Manihot pseudoglaziovii</i>	-	-	102,00	-	-	2201,38
Não identificada 1	-	6,50	-	-	67,86	-
Não identificada 2	-	-	24,40	-	-	578,42

Continuação Tabela 6...

Espécies	Biomassa foliar (kg ha ⁻¹)			Biomassa aérea total (kg ha ⁻¹)		
	São João		Petrolina	São João		Petrolina
	R	M	M	R	M	M
Não identificada 3	-	-	115,05	-	-	2057,94
Não identificada 4	-	-	28,93	-	-	569,40
Não identificada 5	-	13,60	-	-	126,99	-
Não identificada 6	-	5,30	-	-	111,30	-
Não identificada 7	-	6,40	-	-	82,83	-
<i>Pilosocereus pachycladus</i>	-	-	-	-	-	1332,37
<i>Pseudobombax simplicifolium</i>	-	-	9,91	-	-	130,11
<i>Psidium rhombeum</i>	-	1,80	-	-	13,42	-
<i>Sapium lanceolatum</i>	-	-	110,00	-	-	1783,83
<i>Sapium cf. glandulosum</i>	20,2	117,90	-	440,62	1673,38	-
<i>Schinopsis brasiliensis</i>	-	66,40	109,36	-	1352,31	1511,41
<i>Spondias tuberosa</i>	62,4	-	-	2259,75	-	-
<i>Ziziphus joazeiro</i>	24,80	16,40	-	492,65	215,80	-
Total	1685.4A	2373,50Ab	2601,13a	20116,36	28149,32	52106,96

Letras maiúsculas comparam as áreas de São João (regeneração e madura) e letras minúsculas comparam as áreas maduras (São João e Petrolina). Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste T a 5% de probabilidade.

Em regiões semiáridas, outros autores encontraram quantidades de biomassa foliar superiores às quantidades relatadas no presente estudo. Sylla et al. (2002) e Souza et al. (2012), por exemplo, encontraram biomassa de folhas de 1824 a 3035 kg ha⁻¹ e de 2286 a 3000 kg ha⁻¹, respectivamente, em uma floresta natural do semiárido do Senegal e em uma área de caatinga no município de Santa Terezinha (PB).

As contribuições das espécies nodulantes para biomassa total da parte aérea foram de 78%, 58% e 31% para as áreas de São João (regeneração e madura) e Petrolina, respectivamente. As proporções nas duas áreas de São João são contribuições exclusivas de *M. tenuiflora*. Na área de Petrolina, além da contribuição das espécies nodulantes, a espécie não leguminosa *C. leptophloeos* teve grande influência na biomassa aérea total (27%). Segundo Cabral et al. (2013), *M. tenuiflora* apresenta tendência à alta produtividade nos primeiros anos do processo de regeneração natural e, com o passar do tempo, esta característica tende a diminuir. Estes mesmos autores relataram que mesmo em área de caatinga preservada por muito tempo, poucas espécies contribuem com a maior parte de biomassa produzida. Os valores de biomassa de *M. tenuiflora* para todas as áreas foram superiores ao valor encontrado por Lima Júnior et al. (2014) e inferior ao relatado por Araújo et al. (2004).

4.1.3 Concentração de N (g kg⁻¹), abundância natural de ¹⁵N e %N_{dda}

Inicialmente, as espécies leguminosas rasga-beiço e carcará, encontradas nos fragmentos de caatinga em São João, não foram identificadas botanicamente, e foi coletado tecido foliar de ambas para análises isotópicas. Entretanto, estas espécies foram posteriormente classificadas como *Senegalia* spp (reclassificação de *Acacia*). Por se tratar de um gênero conhecido como não nodulante (SPRENT, 2009) e por apresentar sinal médio de $\delta^{15}\text{N}$ sem diferença estatística do das demais espécies referência (Tabela 7) estas espécies também foram consideradas como referência. Desta forma, a única espécie confirmada como nodulante nas áreas de São João foi *M. tenuiflora*.

As espécies referência *C. leptophloeos* e *Senegalia* sp1 foram as que apresentaram as maiores médias de $\delta^{15}\text{N}$ das folhas na área madura do município de São João, 9,19 ‰ e 9,30 ‰, respectivamente. Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ dos indivíduos

das duas espécies variaram de 8,54 ‰ a 10,41 ‰ para *C. leptophloeos* e de 7,73 ‰ a 11,51 ‰ para *Senegalia* sp1. Os $\delta^{15}\text{N}$ médios das demais espécies referência foram semelhantes. Na área, a menor concentração média de N no tecido foliar foi da espécie referência não leguminosa *Sapium* cf. *glandulosum* (19,19 g kg⁻¹). Levando em consideração todos os indivíduos das espécies referência, este valor variou de 16,4 a 54,8 g kg⁻¹, com o maior valor para a leguminosa *Senegalia* sp1 (Tabela 7).

A única espécie potencialmente fixadora de N₂ atmosférico encontrada na área foi *M. tenuiflora*. A média de $\delta^{15}\text{N}$ da espécie foi de 4,39 ‰, significativamente diferente do valor médio das espécies referência (8,41 ‰), com indivíduos apresentando valores de 1,47 ‰ a 8,17 ‰. As diferenças entre o valor médio das espécies referência e os valores de $\delta^{15}\text{N}$ da maioria dos indivíduos de *M. tenuiflora* foram superiores a 2 ‰, o que permitiu o cálculo do %N_{dda} com confiabilidade (Högberg 1997). A proporção média de N_{dda} alcançado por *M. tenuiflora* foi superior a 40%, com indivíduos apresentando até 71% do N_{dda}. A concentração média de N no tecido foliar da espécie foi de 30 g kg⁻¹. Na caatinga, a alta capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN) por *M. tenuiflora* também foi relatada por outros autores (FREITAS et al., 2010b; SOUZA et al., 2012). Freitas et al. (2010b) em Santa Teresinha, PB, Serra Talhada, PE e Remígio, PB encontraram proporções de N_{dda} de 28, 58 e 54 %, respectivamente. Já no trabalho de Souza et al. (2012) a proporção obtida foi maior que 60% em área com caatinga madura.

Tabela 7: Valores mínimos (MI), máximos (MA) e médios (ME) de $\delta^{15}\text{N}$ e concentração de N em espécies fixadoras (LF) e não-fixadoras (R) e nitrogênio derivado da atmosfera (%Ndda) em leguminosas de uma área de caatinga em regeneração (R) e uma área de caatinga madura (M) no município de São João (Agreste), Pernambuco.

Área/espécie	n ¹	Fixação	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$			Concentração de N (g kg^{-1})			Ndda (%)		
			MI	MA	ME	MI	MA	ME	MI	MA	ME
São João - R											
<i>Poincianella pyramidalis</i>	7	R	7,05	8,24	7,72	21,27	27,19	25,13	0	0	0
<i>Senegalia</i> sp2	3	R	6,44	10,30	8,36	34,07	38,60	37,00	0	0	0
<i>Ziziphus joazeiro</i>	2	R	7,18	7,54	7,36	31,81	34,64	33,23	0	0	0
<i>Mimosa tenuiflora</i>	20	LF	3,77	9,07	6,81	23,25	33,78	27,87	0	44,75	12,92
São João - M											
<i>Commiphora leptophloeos</i>	7	R	8,54	10,41	9,19	21,78	28,99	25,26	0	0	0
<i>Guapira</i> cf. <i>laxa</i>	1	R	7,81	7,81	7,81	32,60	32,60	32,60	0	0	0
<i>Lippia gracilis</i>	2	R	7,62	8,00	7,81	20,82	41,24	31,03	0	0	0
<i>Sapium</i> cf. <i>glandulosum</i>	3	R	6,12	9,08	7,43	16,94	23,56	19,19	0	0	0
<i>Senegalia</i> sp1	10	R	7,63	11,51	9,30	39,21	54,88	45,30	0	0	0
<i>Senegalia</i> sp2	10	R	5,53	9,88	7,43	21,04	38,00	29,29	0	0	0
<i>Mimosa tenuiflora</i>	19	LF	1,47	8,17	4,39*	26,00	35,36	30,32	2,46	71,87	41,70

¹ Número de indivíduos amostrados

* significativamente diferente da média das espécies referência (Tukey, 5% de probabilidade)

Na área em regeneração, a espécie referência *Senegalia* sp1 foi a que apresentou a maior média de $\delta^{15}\text{N}$ (8,36 ‰). Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ dos indivíduos da espécie variaram de 6,44 ‰ a 10,3 ‰. A $\delta^{15}\text{N}$ média para as demais espécies referência na área também foram semelhantes. O menor valor referente a concentração média de N no tecido foliar foi da espécie referência *Poincianella pyramidalis* (25,13 g kg⁻¹). Levando em consideração todos os indivíduos das espécies referência, este valor variou de 21,27 a 38,6 g kg⁻¹, com o maior valor para a leguminosa *Senegalia* sp2. Da mesma forma que na área madura, a única espécie potencialmente fixadora de N₂ atmosférico foi *M. tenuiflora*. A média de $\delta^{15}\text{N}$ da espécie foi de 6,81 ‰, com indivíduos apresentando valores de 3,77 ‰ a 9,07 ‰. A concentração média de N no tecido foliar da espécie foi de 27,87 g kg⁻¹. Ao contrário da área madura, a diferença entre o valor médio das espécies referência (7,82 ‰) e o valor de $\delta^{15}\text{N}$ dos indivíduos de *M. tenuiflora* não foi estatisticamente diferente, não sendo possível calcular o %N_{fixado} com precisão. Situação semelhante foi descrita por Souza et al. (2012). Estes autores não conseguiram quantificar a FBN na área em regeneração por conta da proximidade dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ das espécies referência e fixadoras. Entretanto, nesta área a maioria dos indivíduos (75%) apresentaram sinais isotópicos menores que a média das referências. Destes, apenas 33% apresentaram sinais com mais de 2‰ de diferença das referências. Possivelmente, estes indivíduos podem estar fixando, com contribuições da FBN chegando a 31,7 % de N_{fixado}. Considerando a possibilidade de uma parte dos indivíduos de *M. tenuiflora* estarem fixando na área em regeneração, foram feitas estimativas da FBN para esta área, tomando o valor médio de $\delta^{15}\text{N}$ dos indivíduos com mais de 2‰ de empobrecimento em relação ao valor médio das referências da área. Uma estimativa também foi feita tomando-se o valor médio dos indivíduos amostrados, resultando em uma contribuição da FBN de aproximadamente 13%, mas sem precisão na estimativa.

4.1.4 Quantidade de N total nas folhas e N fixado

As quantidades de nitrogênio total das folhas foram de aproximadamente 71 kg ha⁻¹ na área madura de São João, e de 47,70 kg ha⁻¹ na área em regeneração (Tabela 8), próximos dos valores encontrados por Souza et al. (2012).

Na área madura de São João, a quantidade de N adicionada anualmente pela FBN foi de 18 kg ha⁻¹ ano⁻¹. Souza et al. (2012), trabalhando em áreas de caatinga com diferentes períodos de regeneração no Sertão paraibano, encontraram para a área menos alterada (com o mesmo histórico da área madura deste estudo, >50 anos) uma contribuição relativamente baixa da FBN (aproximadamente 6 kg ha⁻¹ ano⁻¹), três vezes menor que o valor encontrado neste estudo. Segundo os autores, a baixa quantidade N está associada à baixa quantidade de biomassa foliar das espécies potencialmente fixadoras, uma vez que os valores das outras variáveis utilizadas para o cálculo (concentração de N e a %N_{dda}) foram elevados. De fato, espécies nodulantes têm baixas densidades em áreas de vegetação madura, que são dominadas por não leguminosas ou leguminosas não nodulantes (SAMPAIO, 1996; ALCOFORADO-FILHO et al., 2003). Este resultado foi encontrado na caatinga madura de Petrolina, mas não na de São João. A biomassa elevada de *M. tenuiflora* encontrada nesta área condicionou a elevação da quantidade de N fixado. Além disso, as condições edafoclimáticas também podem justificar as diferenças nas quantidades de N_{dda} obtidos neste estudo e no de Souza et al. (2012), já que os estudos foram conduzidos em zonas fisiográficas distintas (Agreste e Sertão). Freitas et al. (2010b) encontraram uma contribuição da FBN de 11 kg ha⁻¹ ano⁻¹.

Considerando a possibilidade de FBN em alguns indivíduos de *M. tenuiflora* da área em regeneração em São João, o valor estimado de N fixado anualmente na área seria de 5 kg ha⁻¹ ano⁻¹ para a primeira situação, que considerou todos os valores de δ¹⁵N dos indivíduos de *M. tenuiflora*, e de 13 kg ha⁻¹ ano⁻¹ para a segunda situação, a qual levou em consideração apenas os indivíduos com diferenças de no mínimo 2‰.

Tabela 8: Quantidades de N total em folhas de espécies arbóreas leguminosas e não leguminosas e quantidade de N fixado em folhas de leguminosas em uma área de caatinga em regeneração (R) e uma área de caatinga madura (M) no município de São João (Agreste), Pernambuco.

Espécies	São João - R	São João - M
	kg ha ⁻¹ ano ⁻¹	
N total	47,70	71,00
Leguminosas fixadoras	41,40	44,00
Leguminosas não fixadora	2,40	12,00
Não leguminosas	3,90	15,00
N fixado	5,00	18,00

4.2 Experimento em casa de vegetação

4.2.1 Nodulação e biomassa

Não houve diferenças significativas no número de nódulos de *M. tenuiflora* em nenhuma das áreas (Tabela 9). *Anadenanthera macrocarpa* teve maior nodulação nas áreas de Caruaru e na área madura de Serra Talhada que nas outras áreas. Na área madura de São João a espécie não nodulou. As maiores médias de número de nódulos para *Erythrina velutina* foram para as áreas de Caruaru e Serra Talhada, não havendo nodulação nas áreas de Petrolina. A ausência de nodulação nestas áreas pode indicar a baixa população de rizóbios capazes de nodular a espécie. Entre as espécies, *M. tenuiflora* apresentou número de nódulos estatisticamente superior à *E. velutina* e *A. macrocarpa* em todas as áreas em regeneração, bem como nas áreas maduras de Petrolina e São João (Tabela 9).

Quanto a biomassa de nódulos, *M. tenuiflora* e *A. macrocarpa* não apresentaram diferenças significativas para nenhuma das áreas. As maiores médias de *E. velutina* foram nas áreas em regeneração de Caruaru, São João e Serra Talhada, bem como nas áreas maduras de Caruaru e Serra Talhada. No município de São João, a biomassa de nódulos de *E. velutina* na área em regeneração foi superior à biomassa da área madura. Na área em regeneração de Caruaru, *E. velutina* foi a espécie com maior biomassa de nódulos, enquanto que na área madura, *M. tenuiflora* apresentou média estatisticamente inferior a *E. velutina*. Para as demais áreas, não houve diferenças significativas entre as espécies.

Comparando a biomassa seca da parte aérea para cada local, tanto *M. tenuiflora* quanto *A. macrocarpa* não apresentaram diferenças significativas entre as áreas madura e em regeneração. O único local com diferenças significativas para a biomassa seca da parte aérea de *E. velutina* foi em São João. Neste município, a espécie apresentou maior biomassa na área em regeneração. O fato de não ter apresentado nodulação nas áreas de Petrolina não resultou em menor biomassa seca da parte aérea de *E. velutina*. As espécies com maior biomassa seca da parte aérea foram *E. velutina*, *M. tenuiflora* e *A. macrocarpa*, respectivamente. A biomassa de raiz de *M. tenuiflora* foi maior na área em

regeneração de São João que na área madura. Para os outros locais, as médias da espécie não diferiram. *E. velutina* e *A. macrocarpa* não apresentaram diferenças significativas para cada local.

Tabela 9: Nodulação e biomassa de jurema preta, angico e mulungu cultivadas em vasos com solos coletados em áreas de caatinga em regeneração (R) e madura (M) em quatro municípios do semiárido pernambucano.

Espécie	Caruaru		Petrolina		São João		Serra Talhada	
	R	M	R	M	R	M	R	M
	Número de nódulos planta ⁻¹							
Jurema preta	39 aA	20 aA	22 aA	15 aA	33 aA	14 aA	47 aA	12 aA
Angico	17 bA	24 aA	1 bB	3 bB	8 bB	0 bB	9 bB	17 aA
Mulungu	13 bAB	29 aA	0 bB	0 bB	3 bAB	2 bB	15 bAB	27 aA
CV (%)= 39%								
	Biomassa seca dos nódulos (g planta ⁻¹)							
Jurema preta	0,03 bA	0,02 bA	0,02 aA	0,01 aA	0,04 aA	0,00 aA	0,02 aA	0,01 aA
Angico	0,02 bA	0,04 abA	0,00 aA	0,00 aA	0,02 aA	0,00 aA	0,02 aA	0,02 aA
Mulungu	0,07 aA	0,06 aA	0,00 aC	0,00 aC	0,03 aAB	0,00 aC	0,05 aAB	0,03 aAB
CV (%)= 75%								
	Biomassa seca da parte aérea (g planta ⁻¹)							
Jurema preta	2,51 bA	2,28 bA	1,24 bAB	0,93 bB	2,21 bAB	0,97 bB	2,13 bAB	1,80 bAB
Angico	0,31 cA	0,36 cA	0,22 cA	0,14 bA	0,28 cA	0,23 bA	0,24 cA	0,32 cA
Mulungu	4,08 aA	4,25 aA	3,19 aAB	3,25 aAB	4,09 aA	2,63 aB	3,28 aAB	3,40 aAB
CV (%) = 27%								
	Biomassa seca de raiz (g planta ⁻¹)							
Jurema preta	1,75 aAB	1,68 aABC	0,95 aBCD	0,58 bD	2,26 aA	0,62 bCD	1,24 aABCD	0,80 bBCD
Angico	1,19 aA	1,42 aA	1,45 aA	0,81 bA	1,78 aA	1,24 abA	1,54 aA	1,85 aA
Mulungu	1,94 aA	1,84 aA	1,45 aA	1,97 aA	1,54 aA	1,59 aA	1,22 aA	1,73 aA
CV (%) = 29 %								

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não são significativamente diferentes ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Os dados de número de nódulos foram transformados para $(x+1)^{1/2}$.

4.2.2 Caracterização fenotípica dos isolados autenticados

Ao final do isolamento foram obtidos e caracterizados 312 isolados: 172 nativos de áreas de caatinga em regeneração (CR) e 140 de caatinga madura (CM). Do total de isolados da CR, 84 foram isolados de nódulos de jurema preta, 38 de angico e 50 de mulungu. Para a CM, 45 foram obtidos de nódulos de jurema preta, 46 de angico e 49 de mulungu. Após o isolamento, todos os isolados foram submetidos à amplificação simultânea dos genes *nifH* e *nodC* por PCR, sendo este o critério de autenticação. Do total de isolados, 67% amplificaram, sendo 124 da CR (79 isolados de nódulos de jurema preta, 31 de angico e 14 de mulungu) e 86 da CM (44 isolados de nódulos de jurema preta, 37 de angico e 5 de mulungu).

Com base nas características fenotípicas dos isolados autenticados, observou-se que, independentemente do tempo de regeneração da vegetação (se caatinga em regeneração ou madura), foi verificada maior frequência de isolados de crescimento rápido para todas as espécies estudadas, excetuando-se o mulungu que, na área de caatinga madura, apresentou maior percentual de isolados de crescimento intermediário. Todos os isolados de jurema preta e angico obtidos dos solos coletados nas áreas em regeneração apresentaram 100% de crescimento rápido. Para o mulungu, 50% dos isolados foram de crescimento rápido, 29% de crescimento intermediário e 21% de crescimento lento (Figura 10). Nas áreas de caatinga madura também verificou-se que 100% dos isolados de jurema preta e angico apresentaram crescimento rápido. Já para o mulungu, 40% dos isolados foram de crescimento rápido e 60% de crescimento intermediário (Figura 11).

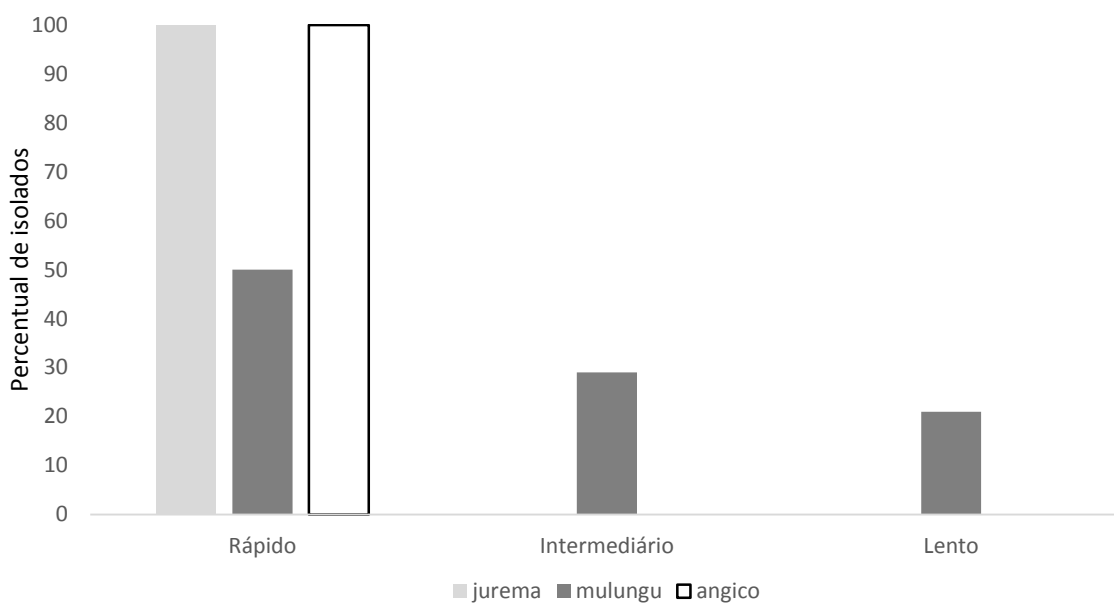


Figura 10: Tempo de crescimento de isolados de rizóbio obtidos de nódulos de jurema preta, mulungu e angico cultivadas em solos coletados em áreas de caatinga em regeneração.

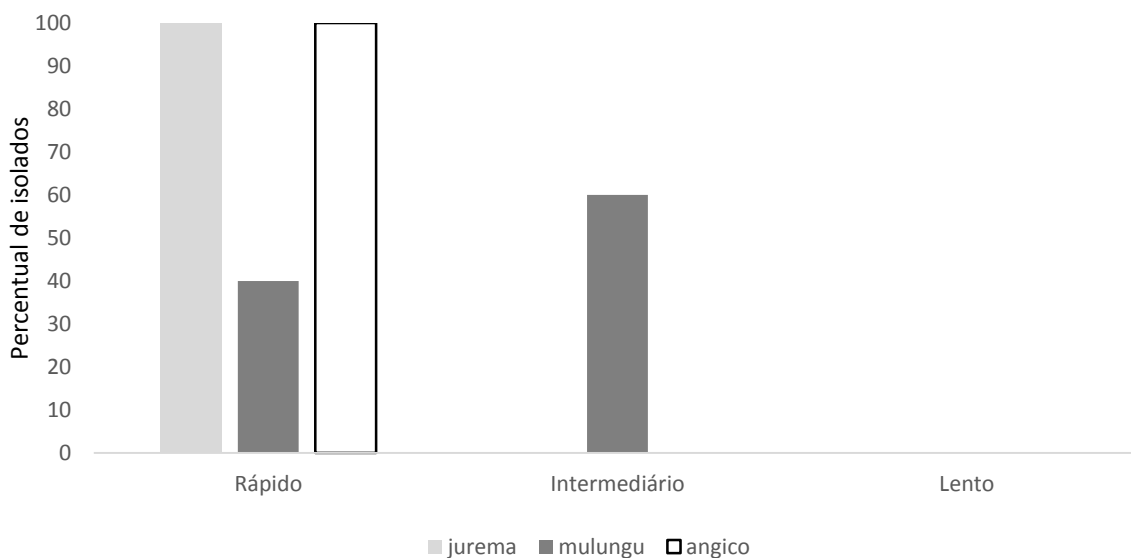


Figura 11: Tempo de crescimento de isolados de rizóbio obtidos de nódulos de jurema preta, mulungu e angico cultivadas em solos coletados em áreas de caatinga madura.

Alguns trabalhos demonstram que leguminosas arbóreas são predominantemente noduladas por rizóbios de crescimento rápido. Fterich et al. (2011), ao realizar a caracterização fenotípica de isolados de nódulos de *Prosopis farcta* cultivada em solos de regiões áridas da Tunísia, obtiveram 100% de isolados de crescimento rápido. Da mesma forma, Teixeira et al. (2010), em solos da região semiárida do nordeste brasileiro, observaram que todos os isolados obtidos a partir de *M. tenuiflora* apresentavam colônias de crescimento rápido. Na Arábia Saudita, Shetta et al. (2011) ao analisarem as características de isolados de leguminosas arbóreas, observaram que todos os isolados foram de crescimento rápido.

O gênero *Mimosa* tem sido frequentemente nodulado por β -rizóbios (REIS JÚNIOR et al., 2010; LIU et al., 2012). Segundo Bontemps et al. (2010), espécies de *Mimosa* se associam principalmente com *Burkholderia*. Algumas espécies de *Burkholderia* apresentam características de crescimento rápido (CHEN et al., 2007; CHEN et al., 2008), o que pode explicar a maior obtenção de isolados de crescimento rápido nodulando a espécie de *Mimosa* (jurema preta) utilizada no estudo. Segundo Sprent (1994), bactérias de crescimento rápido são comuns e mais adaptadas à regiões áridas. Recentemente, a obtenção de isolados de crescimento rápido nodulando o gênero *Mimosa* também foi verificada por Freitas et al. (2014). Os autores verificaram que 100% dos isolados obtidos de *M. paraibana* e *M. tenuiflora* foram de crescimento rápido.

Quanto a alteração de pH em meio de cultura, a reação ácida foi predominante nos isolados obtidos de nódulos de jurema preta e angico em ambas as áreas de coleta do solo (caatinga em regeneração e madura). 84% dos isolados de jurema preta obtidos de solos das áreas de caatinga em regeneração acidificaram o meio de cultura e 16% não alteraram o pH (Figura 12). Para os isolados de angico obtidos nestas mesmas áreas, 97% acidificaram o meio de cultura e apenas 3% não alteraram o pH. Mais de 60% dos isolados de jurema preta e angico apresentaram reação ácida quando ambas foram cultivadas em solos de caatinga madura (Figura 13). Para os isolados de mulungu obtidos das áreas de caatinga em regeneração, 50% acidificaram e 50% não alteraram o pH do meio. Já para as áreas maduras, 40% dos isolados apresentaram reação de pH ácida e os 60% restantes não alteraram o pH. A predominância de isolados com reação ácida também foi verificada por Fterich et al. (2011) em estudo com leguminosa arbórea.

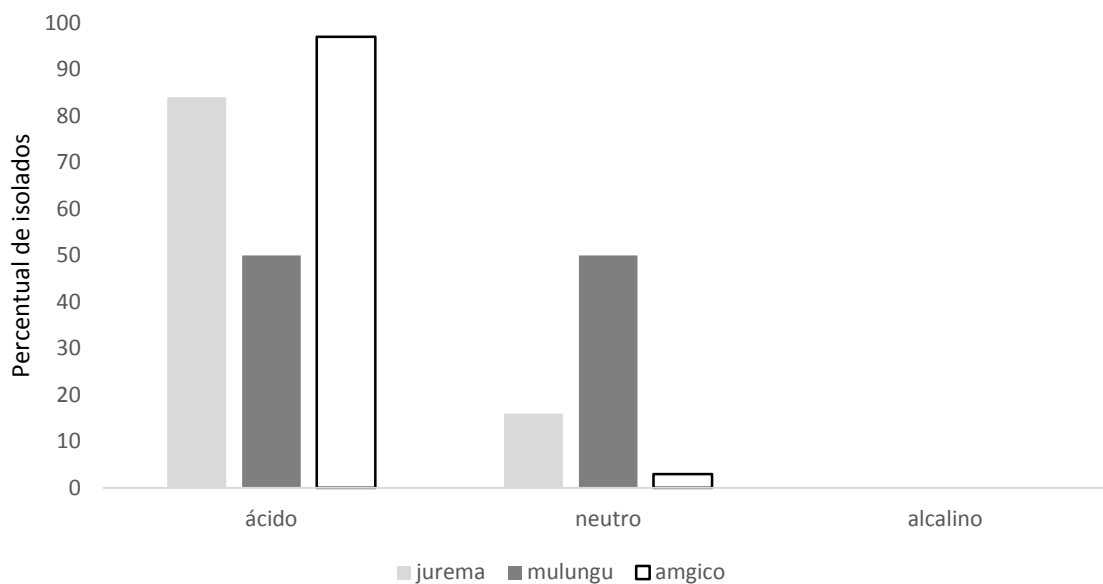


Figura 12: Alteração de pH em meio de cultura por isolados de rizóbio obtidos de nódulos de jurema preta, mulungu e angico cultivadas em solos coletados em áreas de caatinga em regeneração.

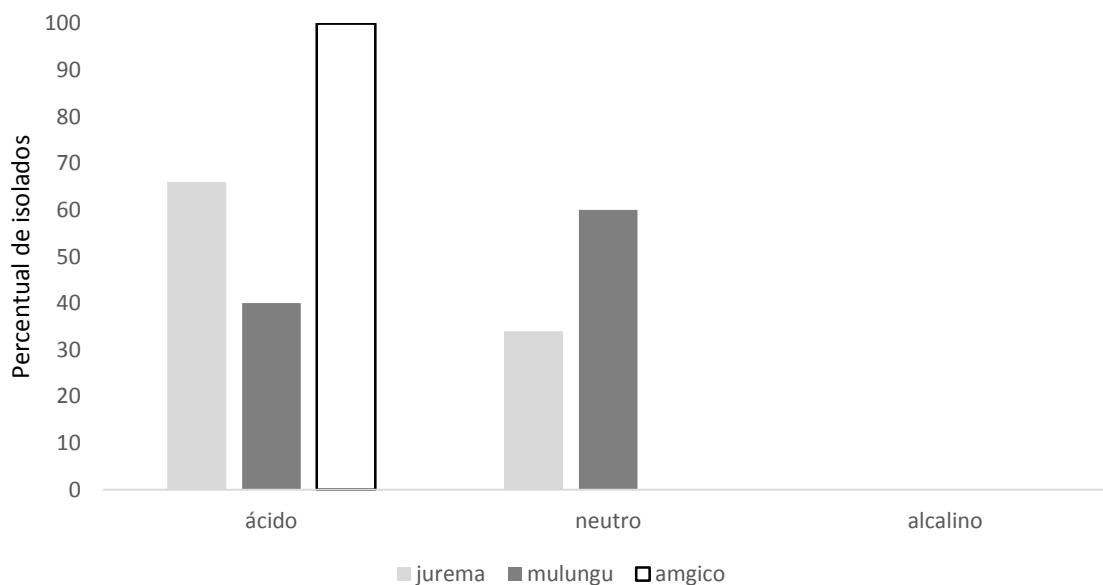


Figura 13: Alteração de pH em meio de cultura por isolados de rizóbio obtidos de nódulos de jurema preta, mulungu e angico cultivadas em solos coletados em áreas de caatinga madura.

Todos os isolados, independente da espécie e da área de coleta do solo, apresentaram capacidade de produção de muito muco (exopolissacarídeos). Nas áreas de regeneração, 97% dos isolados de jurema produziram muito muco e apenas 3% produziram pouca quantidade de muco (Figura 14). Para os isolados de nódulos de mulungu e angico, 100% produziram muito muco, independente da área de caatinga. Quanto aos isolados de jurema preta obtidos das áreas de caatinga madura, 98% foram capazes de produzir muito muco e apenas 2% pouco muco (Figura 15). A alta capacidade de produção de exopolissacarídeos tem sido abordada na literatura como uma das características que está envolvida no processo de adaptação e sobrevivência dos rizóbios em condições edafoclimáticas adversas, como por exemplo, temperatura elevada (SILVA et al., 2007).

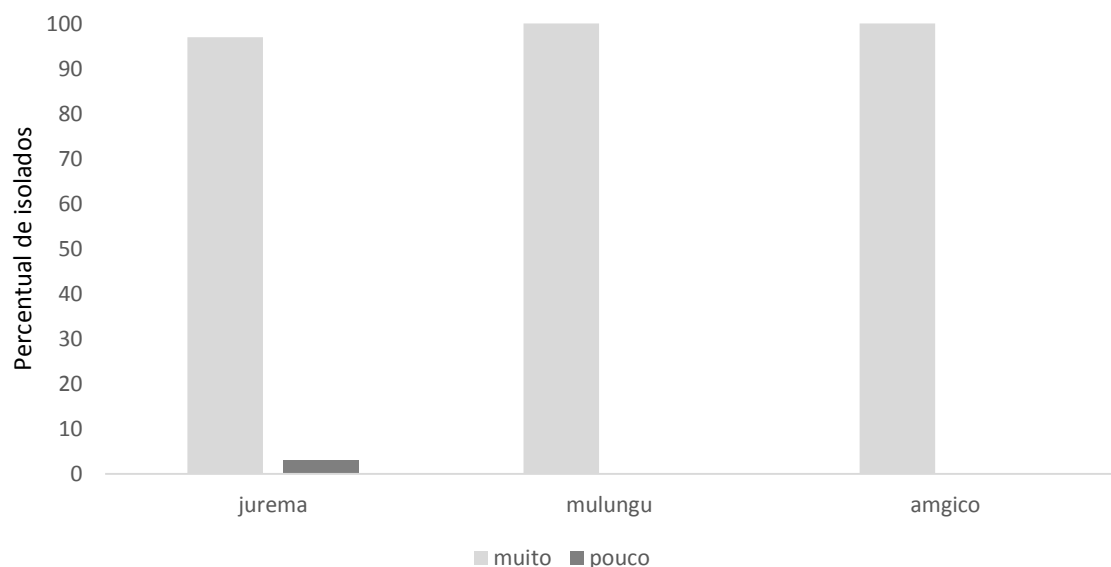


Figura 14: Produção de exopolissacarídeos por isolados de rizóbio obtidos de nódulos de jurema preta, mulungu e angico cultivadas em solos coletados em áreas de caatinga em regeneração.

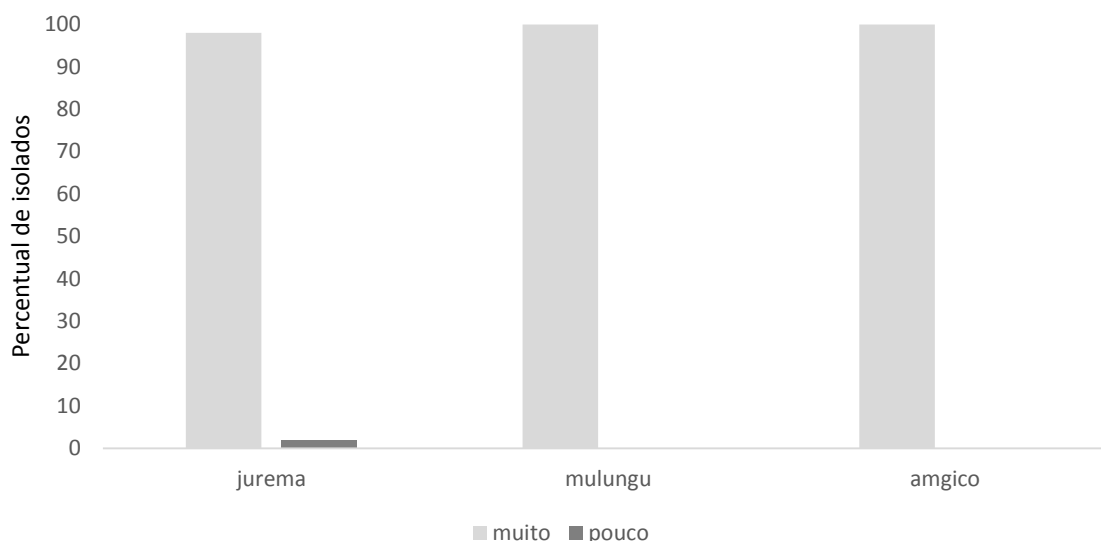


Figura 15: Produção de exopolissacarídeos por isolados de rizóbio obtidos de nódulos de jurema preta, mulungu e angico cultivadas em solos coletados em áreas de caatinga madura.

Quanto às demais características fenotípicas, não houve grande variação entre os isolados. Na sua maioria, os isolados apresentaram colônias com coloração amarela, forma circular e com tamanho variando de 1-2 mm a >2 mm.

Os isolados autenticados foram agrupados de acordo com suas características fenotípicas e distribuídos em grupos a 70% de similaridade. Os dendrogramas foram construídos com base nas características que mais diferenciaram os isolados. Três dendrogramas foram construídos: D1 - isolados obtidos das áreas de caatinga em regeneração - I, que possibilitou a formação de 7 grupos, D2 - isolados obtidos das áreas de caatinga madura – II, com 4 grupos (Figura 16) e D3 – todos os isolados (Figura 17), com 7 grupos.

O grupo C, em ambos os dendrogramas (área de caatinga em regeneração e área madura) são os mais abundantes e estão representados por isolados de todas as espécies (jurema preta, mulungu e angico). Os isolados deste grupo apresentam predominantemente: crescimento rápido, alta produção de muco e reação ácida, apresentando variações apenas no tamanho das colônias. Para o dendrograma geral, construído a partir dos isolados das duas áreas, observa-se a formação de 7 grupos. Destes, o grupo E é o mais abundante com 135 isolados. As características predominantes nos isolados pertencentes a este grupo são as mesmas descritas para os dendrogramas anteriores.

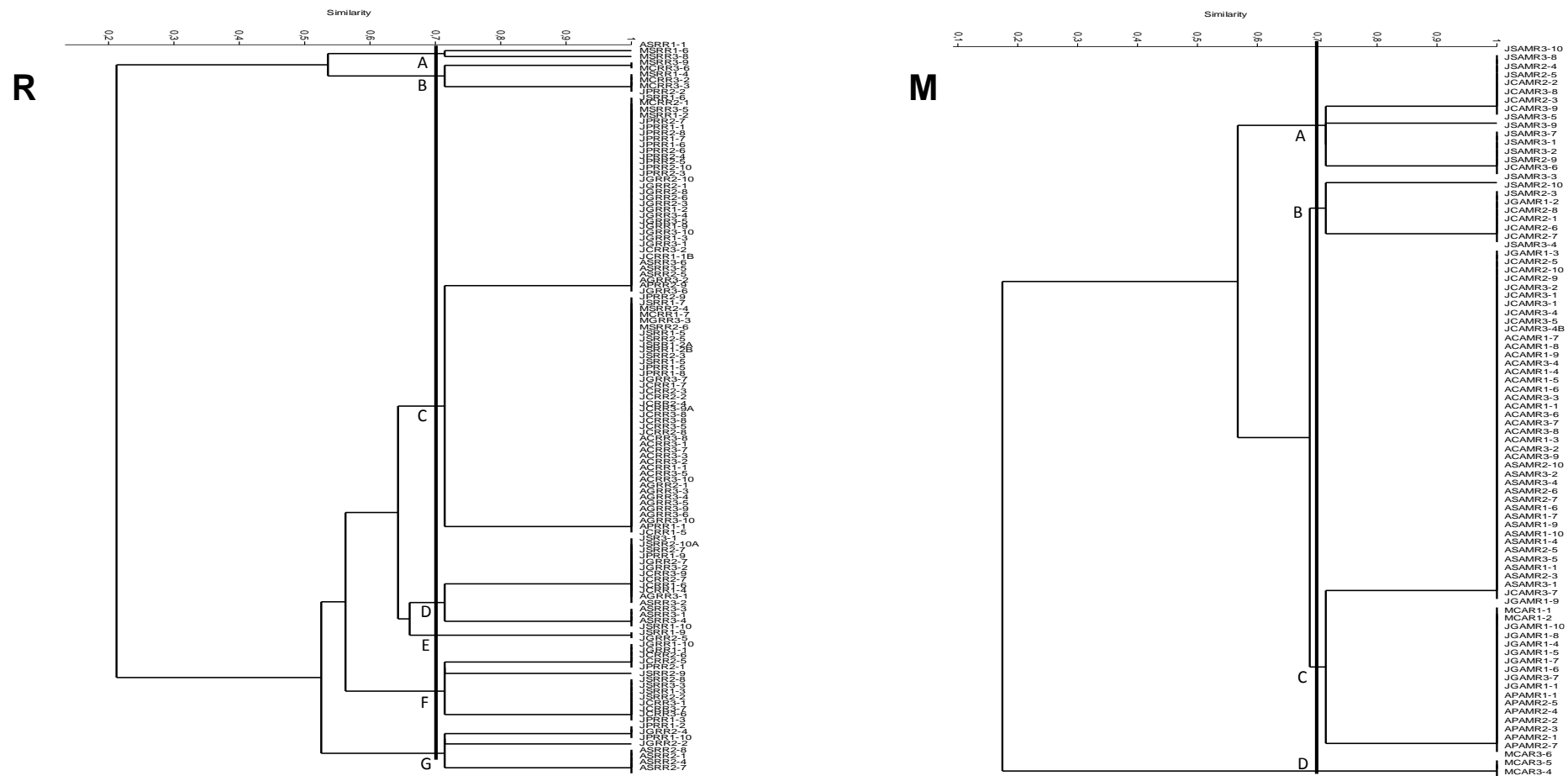


Figura 16: Dendrograma de similaridade com base nas características fenotípicas dos isolados de nódulos de jurema preta, mulungu e angico que foram autenticados (áreas de caatinga em regeneração (R) e áreas de caatinga madura (M)).

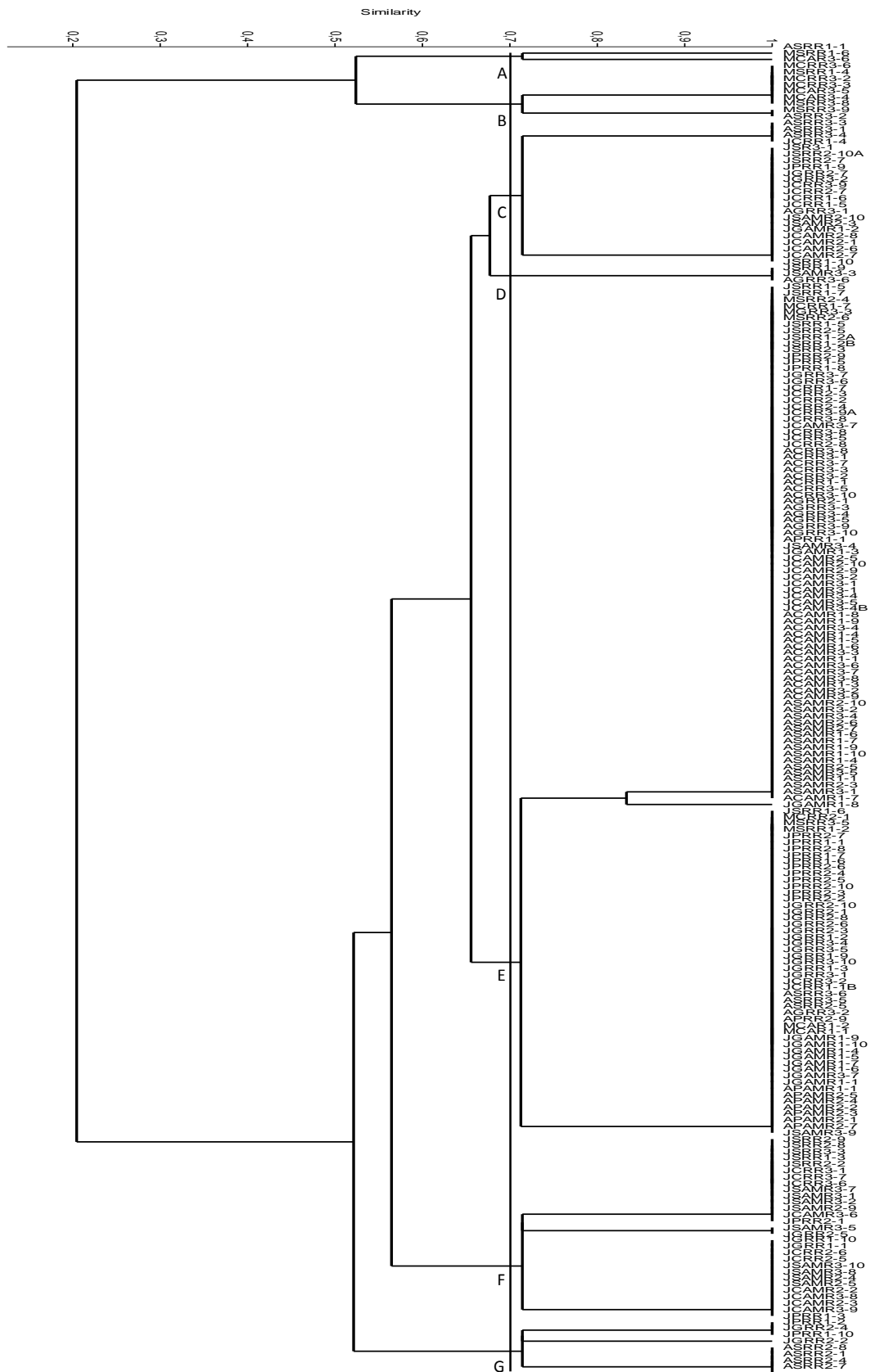


Figura 17: Dendrograma de similaridade com base nas características fenotípicas de todos os isolados de nódulos de jurema preta, mulungu e angico que foram autenticados (áreas de caatinga em regeneração e madura).

Índices de diversidade foram calculados para cada fragmento de caatinga (Tabela 10). O índice de Shannon (H'), que estima a diversidade de espécies em uma comunidade foi maior nas áreas de caatinga em regeneração em todos os municípios. Da mesma forma, os valores de equitabilidade destas áreas também foram superiores aos valores obtidos para as áreas de caatinga madura, sugerindo que nestas áreas há uma maior uniformidade na distribuição dos grupos bacterianos, ou seja, sem a dominância forte de quaisquer grupo. A área com maior diversidade foi a caatinga em regeneração de Serra Talhada, que apresentou maior uniformidade na distribuição da população bacteriana. A área de caatinga madura de Petrolina foi a que apresentou as menores diversidade e equitabilidade.

Tabela 10: Índice de diversidade de Shannon (H') e equitabilidade de Pielou (J') de comunidades bacterianas nativas de solos de caatinga em regeneração (R) e madura (M) localizados em diferentes municípios do semiárido de Pernambuco.

Índice	Petrolina		São João		Caruaru		Serra talhada	
	R	M	R	M	R	M	R	M
H' (nats ind ⁻¹)	1,30	0,41	1,40	0,60	1,42	1,30	2,17	1,32
J'	0,72	0,51	0,78	0,54	0,79	0,66	0,90	0,73

5 CONCLUSÕES

Apesar de apresentar precipitação média anual inferior, a caatinga madura de Petrolina apresentou maior diversidade de espécies e maior produção de biomassa foliar que a de São João, mas com menor proporção de leguminosas nodulantes.

O fragmento maduro de São João apresentou maior diversidade de espécies, densidade de indivíduos e área basal total que o fragmento em regeneração, mas não houve diferença na produção de biomassa de folhas entre os dois fragmentos.

A contribuição da FBN para a jurema preta, única leguminosa nodulante em São João, foi alta na caatinga madura, com um aporte anual maior que 18 kg ha^{-1} .

Os sinais de $\delta^{15}\text{N}$ de jurema preta foram muito variáveis no fragmento em regeneração, não possibilitando uma estimativa precisa da FBN. Entretanto, é provável que alguns indivíduos de jurema preta estejam fixando na área em regeneração, garantindo um aporte que pode variar entre 5 a $13 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$.

Em todas as áreas estudadas existem populações de bactérias capazes de nodular as leguminosas arbóreas.

Independentemente do tempo de regeneração da vegetação, a maioria dos isolados de rizóbios nativos de solos sob caatinga são bactérias de crescimento rápido e com reação ácida em meio de cultura.

A ausência de FBN em indivíduos da área em regeneração não pode ser explicada pela ausência de rizóbios compatíveis.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, A.W.; LOMBARDI NETO, F. & SRINIVASAN, V.S. Efeito do desmatamento da caatinga sobre as perdas de solo e água de um Luvissole em Sumé (PB). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.25, n.1, p.121-128, 2001.
- ALCOFORADO FILHO, F.G.; SAMPAIO, E.V.S.B. & RODAL, M.J.N. Florística e fitossociologia de um remanescente de vegetação caducifolia espinhosa arbórea em Caruaru, Pernambuco. **Acta botânica brasílica**, v.17, p.287-303, 2003.
- ALLEN, O.N. & ALLEN, E.K. **The Leguminosae: a source book of characteristics use and nodulation**. University of Wisconsin Press, Wisconsin, 1981. 812p.
- ALVES, J.J.A. Geoecologia da caatinga no semiárido do Nordeste brasileiro. **CLIMEP: Climatologia e Estudos da Paisagem**, Rio Claro, v.2, n.1, p. 58-71, 2007.
- ALVES, J.J.A.; ARAÚJO, M.A. & NASCIMENTO, S.S. Degradação da caatinga: uma investigação ecogeográfica. **Revista Caatinga**, v.22, n.3, p. 126-135, 2009.
- AMORIM, I.L.; SAMPAIO, E.V.S.B. & ARAÚJO, E.L. Flora e estrutura da vegetação arbustivo-arbórea de uma área de caatinga do Seridó, RN, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, v.19, n.3, p.615-623, 2005.
- ANDRADE-LIMA, D. The caatingas dominium. **Revista Brasileira de Botânica**, v.4, p.149-153, 1981.
- ANDREOLA, F. & FERNANDES, S.A.P. A microbiota do solo na agricultura orgânica e no manejo das culturas. In: SILVEIRA, A.P.D. & FREITAS, S.S. (eds.). **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agrônômico, p.21-38, 2007.
- ANDREWS, M.; JAMES, E.K.; SPRENT, J.I.; BODDEY, R.M.; GROSS, E. & REIS JÚNIOR, F.B. Nitrogen fixation in legumes and actinorhizal plants in natural

- ecosystems: values obtained using ^{15}N natural abundance. **Plant Ecology & Diversity**, v.4, p.131-140, 2011.
- APNE/CNIP - Associação Plantas do Nordeste/Centro Nordestino de Informações sobre Plantas. **Banco de dados LPN**. Disponível em: <www.cnip.org.br>. Acesso em: 02 dez. 2014.
- ARAÚJO FILHO, J.A. **Manejo pastoril sustentável da caatinga**. Recife, PE: Projeto Dom Helder Câmara, 2013. 200p.
- 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.
- ARAÚJO, L.V.C.; LEITE, J.A.N. & PAES, J.B. Estimativa da produção de biomassa de um povoamento de jurema- preta (*Mimosa tenuiflora* (Willd.) com cinco anos de idade. **Biomassa & Energia**, v.1, n.4, p.347-352, 2004.
- AUGUSTO, R.M.N. Turnover isotópico do carbono em tecidos corporais de suínos: músculos, fígado, gordura abdominal, plasma, casco e costela. Botucatu: UNESP, 2012. 98p. **Tese** (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, 2012.
- BARBOSA, J.Z.; CONSALTER, R. & MOTTA, A.C.V. Fixação biológica de nitrogênio em poaceae. **Evidência**, v.12, n.1, p.7-18, 2012.
- BARBOSA, M.R.V.; LIMA, I.B.; LIMA, J.R.; CUNHA, J.P.; AGRA, M.F. & THOMAS, W.W. Vegetação e flora no Cariri paraibano. **Oecologia Brasiliensis**, v.11, n.3, p.313-322, 2007.
- 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.
- BASUKI, T.M.; VAN LAAKE, P.E.; SKIDMORE, A.K. & HUSSIN, Y.A. Allometric equations for estimating the above-ground biomass in tropical lowland Dipterocarp forests. **Forest Ecology and Management**, v.257, p.1684–1694, 2009.
- BOARETTO, A.E.; TRIVELIN, P.C.O & MURAOKA, T. Uso de isótopos como traçadores em fertilidade do solo e nutrição de plantas. In: Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, 26.; Reunião Brasileira sobre Micorrizas, 10.; Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo, 5., Lages. **Anais...** Lages: SBCS, 2004.
- BODDEY, R.M.; PEOPLES, M.B.; PALMER, B. & DART, P. Use of the ¹⁵N natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v.57, p.235–270, 2000.
- BONTEMPS, C., ELLIOTT, G., SIMON, M.F., REIS JUNIOR, F.B., GROSS, E., LAWTON, R.C.; ELIAS NETO, N.; LOUREIRO, M.F.; FARIA, S.M.; SPRENT, J. I. & YOUNG, J.P.W. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. **Molecular Ecology**, v.19, p.44–52, 2010.
- BROWN, S.; GILLESPIE, A.J.R. & LUGO, A.E. Biomass estimation methods for tropical forests with applications to forest inventory data. **Forest Science**, v.35, n.4, p.881-902, 1989.
- CABRAL, G.A.L.; SAMPAIO, E.V.S.B. & ALMEIDA CORTEZ, J.S. Estrutura espacial e biomassa da parte aérea em diferentes estádios sucessionais de caatinga, em Santa Terezinha, Paraíba. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v.6, n.3, p.566-574, 2013.
- CALDEIRA, M.V.W. Determinação de biomassa e nutrientes em uma floresta ombrófila mista montana em General Carneiro. Curitiba: UFP, 2003. 176p. **Tese** (Doutorado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Paraná, 2003.

- CALIXTO JÚNIOR, J.T. & DRUMOND, M.A. Estrutura fitossociológica de um fragmento de Caatinga sensu stricto 30 anos após corte raso, Petrolina-PE, Brasil. **Revista Caatinga**, v.24, n.2, p.67-74, 2011.
- CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R.F.; VENEGAS, V.H.A.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B. & NEVES, J.C.L. (eds.). **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.375-470, 2007.
- CARNEIRO, M.A.C.; SOUZA, E.D.; REIS, E.F.; PEREIRA, H.S. & AZEVEDO, W.R. Atributos físicos, químicos e biológicos de solo de Cerrado sob diferentes sistemas de uso e manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.33, p.147-157, 2009.
- CARVALHO, M.C. Uso dos isótopos estáveis de carbono, nitrogênio e enxofre em estudos de ecologia costeira, **Oecologia Brasiliensis**, v.12, n.4, p.694-705, 2008.
- 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.
- CHAVE, J.; ANDALO, C.; BROWN, S.; CAIRNS, M.A.; CHAMBERS, J.Q.; EAMUS, D.; FÖLSTER, H.; FROMARD, F.; HIGUCHI, N.; KIRA, T.; LESCURE, J.P.; NELSON, B.W.; OGAWA, H.; PUIG, H.; RIÉRA, B. & YAMAKURA, T. Tree allometry and improved estimation of carbon stocks and balance in tropical forests. **Oecologia**, v.145, p.87-99, 2005.
- CHEN, W.M.; FARIA, S.M.; CHOU, J.H.; JAMES, E.K.; ELLIOTT, G.N.; SPRENT, J.I.; BONTEMPS, C.; YOUNG, J.P.W. & VANDAMME, P. *Burkholderia sabiae* sp nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpiniiifolia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.58, p.2174-2179, 2008.

- CHEN, W.M.; FARIA, S.M.; JAMES, E.K.B.; ELLIOTT, G.N.; SPRENT, J. L. & VANDAMME, P. *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p.1055-1059, 2007.
- CLEVELAND, C.C.; HOULTON, B.Z.; NEILL, C.; REED, S.C.; TOWNSEND, A.R. & WANG, Y.P. Using indirect methods to constrain symbiotic nitrogen fixation rates: a case study from an Amazonian rain forest. **Biogeochemistry**, v.99, p.1-13, 2010.
- CLEVELAND, C.C.; TOWNSEND, A.R.; SCHIMEL, D.S.; FISHER, H. & HOWARTH, R.W. Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N₂) fixation in natural ecosystems. **Global Biogeochemical Cycles**, v.13, p.623-645, 1999.
- COLE, T.G. & EWEL, J.J. Allometric equations for four valuable tropical tree species. **Forest Ecology and Management**, v.229, p.351-360, 2006.
- CUSACK, D.F.; SILVER, W. & MCDOWELL, W.H. Biological nitrogen fixation in two tropical forests: ecosystem-level patterns and effects of nitrogen fertilization. **Ecosystems**, v.12, p.1299–1315, 2009.
- DRUMOND, M.A. Potencialidades de algumas espécies arbóreas madeireiras do Bioma Caatinga. In: SILVA, M.V.; MACEDO, A.J.; PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B. & BAUMVOL, I.J.R. **A Caatinga e seu potencial biotecnológico**. Recife: Editora da UFPE, p.1-20, 2013.
- DRUMOND, M.A.; PIRES, I.E.; OLIVEIRA, V.R.; OLIVEIRA, A.R. & ALVAREZ, I.A. Produção e distribuição de biomassa de espécies arbóreas no semiárido brasileiro. **Revista Árvore**, v.32, n.4, p.665-669, 2008.
- DUCATTI, C.; MARTINS, C.L.; ARRIGONI, M.B.; MARTINS, M.B.; VIEIRA JÚNIOR, L.C. & DENADAI, J.C. Utilização de isótopos estáveis em ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.68-75, 2011.

- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Dados Mensais** – Bebedouro. Embrapa Semiárido, Petrolina. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/servicos/dadosmet/ceb-mes.html>. Acesso em: 15/01/2015.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de métodos de análises de solo**. 2.ed. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997. 212p.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Brasília, DF: Embrapa Solos, 2009. 627p.
- FABRICANTE, J.R. & ANDRADE, L.A. Análise estrutural de um remanescente de caatinga no Seridó Paraibano. **Oecologia Brasiliensis**, v.11, n.3, p.341-349, 2007.
- FARIA, S.M.; LEWIS, G.P.; SPRENT, J.I. & SUTHERLAND, J.M. Occurrence of nodulation in the leguminosae. **New Phytologist**, v.111, p.607-619, 1989.
- 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.
- FERNADES JÚNIOR, P.I.; MORGANTE, C.V.; GAVA, C.A.T.; SANTOS, C.A.F.; CUNHA, J.B.A.; MARTINS, L.M.V. Duplex PCR para a amplificação simultânea de fragmentos dos genes nifH e nodC em bactérias isoladas de nódulos de leguminosas. Petrolina: Embrapa Semiárido. **Comunicado Técnico**, 2013. 6p.
- FERRAZ, A.S.; SOARES, V.P.; SOARES, C.P.B.; RIBEIRO, C.A.A.S.; BINOTI, D.H.B. & LEITE, H.G. Estimativa do estoque de biomassa em um fragmento florestal usando imagens orbitais. **Floresta e Ambiente**, v.21, n.3, p.286-296, 2014.

- FILOSO, S.; MARTINELLI, L.A.; HOWARTH, R.W.; BOYER, E.W. & DENTENER, F. Human activities changing the nitrogen cycle in Brazil. **Biogeochemistry**, v.79, p.61-89, 2006.
- FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SILVA, B. L. R.; ALMEIDA CORTEZ, J. S. & MENEZES, R. S. C. How much nitrogen is fixed by biological symbiosis in tropical dry forests? 2. Herbs. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v.94, p.181-192, 2012a.
- 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**, v.8, n.8, p.788-796, 2014.
- FREITAS, A.D.S.; SAMPAIO, E.V.S.B.; MENEZES, R.S.C. & TIESSEN, H. ¹⁵N natural abundance of non fixing woody species in the Brazilian dry forest (caatinga). **Isotopes in Environmental and Health Studies**, v.46, p.210-218, 2010a.
- 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**, v.74, n.3, p.344-349, 2010b.
- 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**, v.45, p.109-114, 2012b.
- FTERICH, A.; MAHDHI, M.; CAVIEDES, M.A.; PAJUELO, E.; RIVAS, R.; RODRIGUEZ-LLORENTE, I.D. & MARS, M. Characterization of root-nodulating bacteria associated to *Prosopis farcta* growing in the arid regions of Tunisia. **Arch Microbiol**, v.93, p.385-397, 2011.
- GRUBER, N. & GALLOWAY, J.N. An earth-system perspective of the global nitrogen cycle. **Nature**, v.451, p.293–296, 2008.

- GUEDES, R.S.; ZANELLA, F.C.V.; COSTA-JUNIOR, J.E.V.; SANTANA, G.M. & SILVA, J.A. Caracterização florístico-fitossociológica do componente lenhoso de um trecho da caatinga no semiárido paraibano. **Revista Caatinga**, v.25, n.2, p.99-108, 2012.
- HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. **PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis**. Palaeontologia Electronica, 2001.
- HOFFMANN, L.V. Biologia molecular da fixação biológica do nitrogênio. In: SILVEIRA & FREITAS. (eds.). **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**. Campinas: Instituto Agrônomo, p.153-164, 2007.
- HÖGBERG, P. ^{15}N natural abundance in soil-plant systems. **New Phytologist**, v.137, p.179-203, 1997.
- HOUNGNANDAN, P.; YEMADJE, R.G.H.; OIKEH, S.O.; DJIDOHOKPIN, C.F.; BOECKX, P. & VAN CLEEMPUT, O. Improved estimation of biological nitrogen fixation of soybean cultivars (*Glycine max* L. Merrill) using ^{15}N natural abundance technique. **Biology and Fertility of Soils**, v.45, p.175-183, 2008.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R. & PERES, J.R.R. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAÚJO, R.S. & HUNGRIA, M. (eds.). **Microorganismos de importância agrícola**. Brasília: Embrapa/SPI, p.9-89, 1994.
- INMET – Instituto Nacional de Meteorologia. **Dados históricos**. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep>. Acesso em: 17/01/2015.
- IPCC - Intergovernmental Panel on Climate Change. **Climate Change: The Physical Science Basis**. Contribution of the Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, USA, 2007. 996p.
- JOHNSON, D.W. & TURNER, J. Nitrogen budgets of forest ecosystems: A review. **Forest Ecology and Management**, v.318, p.370–379, 2013.

- 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.
- KETTERINGS, Q.M.; COE, R.; VAN NOORDWIJK, M.; AMBAGAU, Y. & PALM, C.A. Reducing uncertainty in the use of allometric biomass equations for predicting above-ground tree biomass in mixed secondary forests. **Forest Ecology and Management**, v.146, p.199-209, 2001.
- KILL, L.H.P.; TERAPO, D. & ALVAREZ, I.A. **Plantas ornamentais da caatinga**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 139p.
- KIRKBRIDE JÚNIOR, J.H. Nodulation and Nitrogen Fixation (Legume Nodulation Reports not in Allen and Allen 1981). The Bean Bag Number 45. 1997.
- KIRKBRIDE JÚNIOR, J.H. Nodulation and Nitrogen Fixation (Legume Nodulation Reports not in Allen and Allen 1981). The Bean Bag Number 49. p.9-32, 2002.
- LAGUERRE, G.; NOUR, S.M.; MACHERET, V.; SANJUAN, J.; DROUIN, P.; AMARGER, N. Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among Phaseolus vulgaris symbionts. **Microbiology**, v.147, n.4, p.981-993, 2001.
- 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. **Cientia Forestalis**, v.42, n.102, p.289-298, 2014.
- LIMA, B.G. **Caatinga: espécies lenhosas e herbáceas**. Mossoró – RN: Editora da UFERSA, 2012. 316p.
- LIMA, H.C.; QUEIROZ, L.P.; MORIM, M.P.; DUTRA, V.F.; BORTOLUZZI, R.L.C.; IGANCI, J.R.V.; FORTUNATO, R.H.; VAZ, A.M.S.F.; SOUZA, E.R.; FILARDI, F.L.R.; GARCIA, F.C.P.; FERNANDES, J.M.; SILVA, R.C.V.M.; PEREZ, A.P.F.; MANSANO, V.F.; MIOTTO, S.T.S.; LIMA, L.C.P. ; OLIVEIRA, M.L.A.A.; FLORES, A.S.; TORKE, B.M.; PINTO, R.B.; LEWIS, G.P.; BARROS, M.J.F.; SCHÜTZ, R.; PENNINGTON, T.; KLITGAARD, B.B.; RANDO, J.G.;

- SCALON, V.R.; COSTA, L.C.; SILVA, M.J.; MOURA, T.M.; BARROS, L.A.V.; SILVA, M.C.R.; QUEIROZ, R.T.; SARTORI, A.L.B.; CAMARGO, R.A.; LIMA, I.B.; COSTA, J.; SOARES, M.V.B.; SNAK, C.; VALLS, J.F.M.; SÃO-MATEUS, W.; FALCÃO, M.J.; CARDOSO, D.B.O.S.; TOZZI, A.M.G.A.; MARTINS, M.V.; SOUZA, V.C.; MEIRELES, J.E. & REIS, I.P. **Fabaceae**. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB115>>. Acesso em: 24 Dez. 2014.
- LINDSTRÖM, K.; MURWIRA, M.; WILLEMS, A. & ALTIER, N. The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. **Research in Microbiology**, v.161, p.453-463, 2010.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 384p.
- MACHADO, M.C. Cactaceae. In: GIULIETTI, A.M.; RAPINI, A.; ANDRADE, M.J.G.; QUEIROZ, L.P. & SILVA, J.M.C. (orgs.). **Plantas Raras do Brasil**. Conservação Internacional, Belo Horizonte, p.118–126, 2009.
- MAIA, G.N. **Caatinga**: árvores e arbustos e suas utilidades. 2.ed. Fortaleza: Printcola Gráfica e Editora, 2012. 413p.
- MANI, S. & PARTHASARATHY, N. Above-ground biomass estimation in ten tropical dry evergreen forest sites of peninsular India. **Biomass and Bioenergy**, v.31, p.284–290, 2007.
- 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, n.1, p.21-32, 2010.
- MARDEGAN, S.F. Abundância natural de ¹⁵N em solos e folhas de áreas de campina e campinarana da Reserva Biológica da Campina – INPA, região de Manaus, Amazonas. Manaus: UFAM, 2007. 89p. **Dissertação** (Mestrado em Ecologia) – Universidade Federal do Amazonas, 2007.

- MARTINELLI, L.A.; OMETTO, J.P.H.B.; FERRAZ, E.S.; VICTORIA, R.L.; CAMARGO, P.B. & MOREIRA, M.Z. **Desvendando questões ambientais com isótopos estáveis**. São Paulo: Ed. Oficina de textos, 2009. 144p.
- MARTINELLI, L.A.; PICCOLO, M.C.; TOWNSEND, A.R.; VITOUSEK, P.M.; CUEVAS, E.; MCDOWELL, W.; ROBERTSON, G.P.; SANTOS, O.C. & TRESEDER, K. Nitrogen isotopic composition of leaves and soil: Tropical versus temperate forests. **Biogeochemistry**, v.46, p.45-65, 1999.
- MENDES, I.C.; REIS JÚNIOR, F.B.; HUNGRIA, M.; FERNANDES, M.F.; CHAER, G.M.; MERCANTE, F.M. & ZILLI, J.E. Microbiologia do solo e sustentabilidade de sistemas agrícolas. In: FALEIRO, A.; ANDRADE, S.R M. & REIS JUNIOR, F.B. (eds.). **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p.219-244, 2011.
- 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.
- MENEZES, R.S.C.; SAMPAIO, E.V.S.B.; GIONGO, V. & PÉREZ-MARIN, A.M. Biogeochemical cycling in terrestrial ecosystems of the Caatinga Biome. **Brazilian Journal of Biology**, v.72, p.643-653, 2012.
- 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, n.3, p.269-290, 2008.
- MMA - Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>>. Acesso em: 09 dez. 2014.
- MORAIS, V.A.; SCOLFORO, J.R.S.; SILVA, C.A.; MELLO, J.M.; GOMIDE, L.R. & OLIVEIRA, A.D. Carbon and biomass stocks in a fragment of cerradão. **Cerne**, v.19, n.2, p.237-245, 2013.

- MOREIRA, F.M.S. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam Leguminosae. In: MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. & BRUSSARD, L. **Biodiversidade do Solo em Ecossistemas Brasileiros**, Lavras, 2008. 768p.
- MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2.ed. Lavras: UFLA, 2006. 729p.
- MOREIRA, F.M.S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R.S.A. & CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, n.2, p.74-99, 2010.
- MOROTE, F.A.G.; SERRANO, F.R.L.; ANDRÉS, M.; RUBIO, E.; JIMÉNEZ, J.L.G. & HERAS, J. Allometries, biomass stocks and biomass allocation in the thermophilic Spanish juniper woodlands of Southern Spain. **Forest Ecology and Management**, v.270, p.85–93, 2012.
- NARDOTO, G.B.; QUESADA, C.A.; PATIÑO, S.; SAIZ, G.; BAKER, T.R.; SCHWARZ, M.; SCHRODT, F.; FELDPAUSCH, T.R.; DOMINGUES, T.F.; MARIMON, B.S.; MARIMON JUNIOR, B.H.; VIEIRA, I.C.G.; SILVEIRA, M.; BIRD, M.I.; PHILLIPS, O.L.; LLOYD, J. & MARTINELLI, L.A. Basin-wide variations in Amazon forest nitrogen-cycling characteristics as inferred from plant and soil ¹⁵N:¹⁴N measurements. **Plant Ecology & Diversity**, v.7, p.173-187, 2014.
- NÁVAR, J. Allometric equations for tree species and carbon stocks for forests of northwestern Mexico. **Forest Ecology and Management**, v.257, p.427-434, 2009.
- NDIAYE, M. & GANRY, F. Variation in the biological N₂ fixation by tree legumes in three ecological zones from the North to the south of Senegal. **Arid Soil Research and Rehabilitation**, v.11, p.245-254, 1997.
- 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.

- NUNES, L.A.P.L.; ARAÚJO FILHO, J.A.; HOLANDA JÚNIOR, E.V. & MENEZES, R.I.Q. Impacto da queimada e de enleiramento de resíduos orgânicos em atributos biológicos de solo sob caatinga no semiárido nordestino. **Revista Caatinga**, v.22, p.131-140, 2009.
- OLIVEIRA, C.A. Estimativas de fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar por $\delta^{15}\text{N}$. Campinas: IAC, 2012. 80p. **Dissertação** (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agronômico de Campinas, 2012.
- OLIVEIRA, M.V.N.; REUTEBUCH, S.E.; McGAUGHEY, R.J. & ANDERSEN, H.E. Estimating forest biomass and identifying low-intensity logging areas using airborne scanning lidar in Antimary State Forest, Acre State, Western Brazilian Amazon. **Remote Sensing of Environment**, v.124, p.479-491, 2012.
- OLIVEIRA, P.T.B.; TROVAO, D.M.B.M.; CARVALHO, E.C.D.; SOUZA, B.C. & FERREIRA, L.M.R. Florística e fitossociologia de quatro remanescentes vegetacionais em áreas de serra no cariri paraibano. **Revista Caatinga**, v.22, n. 4, p.169-178, 2009.
- 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.
- PEREIRA JÚNIOR, L.R.; ANDRADE, A.P. & ARAÚJO, K.D. Composição florística e fitossociológica de um fragmento de caatinga em Monteiro, PB. **Holos**, v.28, n.6, p.73-87, 2012.
- PEREIRA, A.L. & BENEDITO, E. Isótopos estáveis em estudos ambientais: métodos, aplicações e perspectivas. **Revista de Biociências**, v.13, n.1-2, p.16-27, 2007.

- 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, p.154-165, 2003.
- PONS, T.L.; PERREJIN, K.; VAN KESSEL, C. & WERGER, M.J.A. Symbiotic nitrogen fixation in a tropical rainforest: ¹⁵N natural abundance measurements supported by experimental isotopic enrichment. **New Phytologist**, v.173, p.154-167, 2007.
- PRADO, D.E. As caatingas da América do Sul. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M. & SILVA, J.M.C. **Ecologia e conservação da Caatinga**. Recife: Editora da UFPE, p.3-74, 2003.
- QUEIROZ, L.P. Flowering plants of the Brazilian semi-arid. In: QUEIROZ, L.P.; RAPINI, A. & GIULIETTI, A.M. (eds.). **Towards greater knowledge of the Brazilian semi-arid biodiversity**. Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasília. p.49-53, 2006.
- QUEIROZ, L.P. **Leguminosas da Caatinga**. Feira de Santana, UEFS, 2009. 914p.
- RAMOS, A.S.; SANTOS, T.M.C.; SANTANA, T.M.; GUEDES, E.L.F & MONTALDO, Y.C. Ação do *Azospirillum lipoferum* no desenvolvimento de plantas de milho. **Revista Verde**, Mossoró, RN, v.5, n.4, p.113-117, 2010.
- RATUCHNE, L.C. Equações alométricas para a estimativa de biomassa, carbono e nutrientes em uma floresta ombrófila mista. Guarapuava: UNICENTRO, 2010. 98p. **Dissertação** (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, 2010.
- REIS JÚNIOR, F.B.; SIMON, M.F.; GROSS, E.; BODDEY, R.M.; ELLIOTT, G.N.; NETO, N.E.; LOUREIRO, M.F.; QUEIROZ, L.P.; SCOTTI, M.R.; CHEN, W.M.; NORÉN, A.; RUBIO, M.C.; FARIA, S.M.; 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 Phytol**, v.186, p.934-946, 2010.

- REIS, V.M.; OLIVEIRA, A.L.M.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L. & BALDANI, J.I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M.S. (ed.) **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.153-174, 2006.
- RISIO, L.; HERRERO, C.; BOGINO, S.M. & BRAVO, F. Aboveground and belowground biomass allocation in native *Prosopis caldenia* Burkart secondaries woodlands in the semi-arid Argentinean pampas. **Biomass and Bioenergy**, v.66, p.249-260, 2014.
- RODAL, M.J.N.; MARTINS, F.R. & SAMPAIO, E.V.S.B. Levantamento quantitativo das plantas lenhosas em trechos de vegetação de caatinga em Pernambuco. **Revista Caatinga**, v. 21, n.3, p.192-205, 2008.
- ROGGY, J.C.; PRÉVOST, M.; GARBAYE, J. & DOMENACH, A.M. Nitrogen cycling in the tropical rain forest of French Guiana: comparison of two sites with contrasting soil types using $\delta^{15}\text{N}$. **Journal of Tropical Ecology**, v.15, p.1-22, 1999.
- RONDON, M.A.; LEHMANN, J.; RAMIREZ, J. & HURTADO, M. Biological nitrogen fixation by common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) increases with bio-char additions. **Biology and Fertility of Soils**, v.43, p.699-708, 2007.
- SAMPAIO, E.V.S.B. & SILVA, G.C. Biomass equations for Brazilian semiarid caatinga plants. **Acta Botanica Brasilica**, v.19, n.4, p.935-943, 2005.
- SAMPAIO, E.V.S.B. Características e potencialidades. 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.29-42, 2010.
- SAMPAIO, E.V.S.B. Fitossociologia. In: SAMPAIO, E.V.S.B.; MAYO, S.J. & BARBOSA, M.R.V. (eds). Pesquisa botânica nordestina: progresso e perspectivas. **Sociedade Botânica do Brasil**, p.203-224, 1996.

- SAMPAIO, E.V.S.B. Overview of the Brazilian caatinga. In: BULLOCK, S.H.; MOONEY, H.A. & MEDINA, E. (eds.). **Seasonally dry tropical forests**. Cambridge: Cambridge University Press, p.35-63, 1995.
- SAMPAIO, E.V.S.B.; ARAÚJO, E.L.; SALCEDO, I.H. & TIESSEN, H. Regeneração da vegetação de caatinga após corte e queima, em Serra Talhada, PE. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, p.621-632, 1998.
- SAMPAIO, E.V.S.B.; GASSON, P.; BARACAT, A.; CUTLER, D.; PAREYN, F. & LIMA, K.C. Tree biomass estimation in regenerating areas of tropical dry vegetation in northeast Brazil. **Forest Ecology and Management**, v.259, p.1135-1140, 2010.
- SAMPAIO, E.V.S.B.; PAREYN, F.G.C.; FIGUEIRÔA, J.M. & SANTOS JÚNIOR, A.G. **Espécies da flora nordestina de importância econômica potencial**. Recife: Associação Plantas do Nordeste, 2005. 331p.
- SANTOS, C.E.R.S.; FREITAS, A.D.S.; VIEIRA, I.M.M.B. & COLAÇO, W. Fixação biológica do N₂ em leguminosas tropicais. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P. & SANTOS, C.E.R.S. (eds.). **Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: Agrolivros, p.17-41, 2008.
- SANTOS, E.M.; ALMEIDA, G.V.L.; OLIVEIRA, L.L.D.S.S.; MENESES, E.R.A.; GUEDES, M.V.; SACRAMENTO, A.C.; BEZERRA, G.S.C.L.; BRITO, J.V.A. & SANTOS, J.C. O Parque Estadual Mata da Pimenteira - Primeira Unidade de Conservação Estadual na Caatinga de Pernambuco. In: SANTOS, E.M.; MELO JÚNIOR, M.; CAVALCANTI, J.S.S. & ALMEIDA, G.V.L. (orgs.). **Parque estadual mata da pimenteira: riqueza natural e conservação da caatinga**. Recife: Editora da UFRPE, 2013. 268p.
- SANTOS, J.C.B.; SOUZA JÚNIOR, V.S.; CORRÊA, M.M.; RIBEIRO, M.R.; ALMEIDA, M.C. & BORGES, L.E.P. Caracterização de Neossolos Regolíticos da região semiárida do Estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.36, p.683-696, 2012.

- SHEARER, G. & KOHL, D.H. N₂ fixation in field settings: estimations based on natural ¹⁵N abundance. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.13, p.699-756, 1986.
- SHETTA, N.D.; AL-SHAHARANI, T.S. & ABDEL-AAL, M. Identification and characterization of *Rhizobium* associated with woody legume trees grown under Saudi Arabia condition. **American-Eurasian journal of agricultural & environmental sciences**, v.10, n.3, p.410-418, 2011.
- SILVA JÚNIOR, E.B.; FERREIRA, A.; BODDEY, M.R.; ZILLI, J.E. & XAVIER, G.R. Ontogenia da nodulação de feijão-caupi em vaso com solo da área de produção do Centro-Oeste. In: III Congresso Nacional de feijão-caupi. Recife. **Anais...** Recife: IPA, 2013.
- SILVA, F.H.B.B.; SILVA, M.S.L.; CAVALCANTI, A.C. & CUNHA, T.J.F. **Principais solos do semiárido do nordeste do brasil**. EMBRAPA, 35p, 2005.
- 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.
- SILVA, I.R. & MENDONÇA, E.S. Matéria orgânica do solo. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V., V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B. & NEVES, J.C.L. (eds.). **Fertilidade do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.275-374, 2007.
- SILVA, S.O.; FERREIRA, R.L.C.; SILVA, J.A.A.; LIRA, M.A.; ALVES JÚNIOR, F.T.; CANO, M.O.O. & TORRES, J.E.L. Regeneração natural em um remanescente de caatinga com diferentes históricos de uso no agreste pernambucano. **Revista Árvore**, v.36, n.3, p.441-450, 2012.
- SILVA, V.N.; SILVA, L.E.S.F.; FIGUEIREDO, M.V. B.; CARVALHO, F.G.; SILVA, M.L.R.B. & SILVA, A.J.N. Caracterização e seleção de populações nativas de rizóbios de solo da região semiárida de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.37, n.1, 2007.

- SILVEIRA, P., KOEHLER, H.S.; SANQUETTA, C.R. & ARCE, J.E.; O estado da arte na estimativa de biomassa e carbono em formações florestais. **Floresta**, v.38, n.1, p.185-206, 2008.
- SIQUEIRA FILHO, J.A. **Flora das caatingas do rio São Francisco**: história natural e conservação. 1.ed. Rio de Janeiro, 2012. 552p.
- SLEIMAN, M.; VENTURINI FILHO, W.G.; DUCATTI, C. & NOJIMOTO, T. Utilização de isótopos estáveis do carbono e do nitrogênio para determinar o percentual de malte em cervejas tipo Pilsen. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.11, n.2, p.95-102, 2008.
- SOUZA, J.A.N. & RODAL, M.J.N. Levantamento florístico em trecho de vegetação ripária de caatinga no rio Pajeú, floresta, Pernambuco-Brasil. **Revista Caatinga**, v.23, n.4, p.54-62, 2010.
- 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, L.S.B.; MENEZES, K.A.S.; NUNES, I.A.; SOUZA, C.C.B.; SEIDO, S.L.; GAVA, 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.
- 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.
- SPRENT, J.I. Evolution and diversity in the legume-rhizobium symbiosis: chaos-theory? **Plant Soil**, v.161, p.1-10, 1994.
- SPRENT, J.I. Nodulation in a taxonomic context. In: **Legume Nodulation**. Edited by Anonymous. Wiley-Blackwell, p.1-33, 2009.

- SYLLA, S.N.; NDOYE, I.; GUEYE, M.; BA, A.T. & DREYFUS, B. Estimates of biological nitrogen fixation by *Pterocarpus lucens* in a semi-arid natural forest park in Senegal using ^{15}N natural abundance method. **African Journal of Biotechnology**, v.1, n.2, p.50–56, 2002.
- 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.
- 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, p.201-208, 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 ^{15}N natural abundance technique in the semi-arid Caatinga region of Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, v.38, p.1989-1993, 2006.
- TORRES, C.M.M.E.; JACOVINE, L.A.G.; SOARES, C.P.B.; OLIVEIRA NETO, S.N.; SANTOS, R.D. & CASTRO NETO, F. Quantificação de biomassa e estocagem de carbono em uma floresta estacional semidecidual, no parque tecnológico de Viçosa, MG. **Revista Árvore**, v.37, n.4, p.647-655, 2013.
- TROVÃO, M.B.M.; FREIRE, A.M. & MELO, J.I.M. Florística e fitossociologia do componente lenhoso da mata ciliar do riacho que Bodocongó, Semiárido Paraibano. **Revista Caatinga**, v.23, n.2, p.778-86, 2010.
- VIEIRA, S.A.; ALVES, L.F.; AIDAR, M.; ARAÚJO, L.S.; BAKER, T.; BATISTA, J.L.F.; CAMPOS, M.C.; CAMARGO, P.B.; CHAVE, J.; DELITTI, W.B.C.; HIGUCHI, N.; HONORIO, E.; JOLY, C.A.; KELLER, M., MARTINELLI, L.A.; DE MATTOS, E.A.; METZKER, T.; PHILLIPS, O.; MAES DOS SANTOS, F.A.; SHIMABUKURO, M.T.; SILVEIRA, M. & TRUMBORE, S.E. Estimation of biomass and carbon stocks: the case of the Atlantic Forest. **Biota Neotropica**, v.8, n.2, p.21-29, 2008.

- VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1970.
- VISMARA, E.S. Mensuração da biomassa e construção de modelos para construção de equações de biomassa. São Paulo: USP, 2009. 102p. **Dissertação** (Mestrado em Recursos Florestais) – Universidade de São Paulo, 2009.
- WALKER, W.; BACCINI, A.; NEPSTAD, M.; HORNING, N.; KNIGHT, D.; BRAUN, E. & BAUSCH, A. **Guia de Campo para Estimativa de Biomassa Florestal e Estoque de Carbono**. Versão 1.0. Centro de Pesquisas Woods Hole, Falmouth, Massachusetts, USA, 2011.
- WATZLAWICK, L.F.; KIRCHNER, F.F. & SANGUETTA, C.R. Estimativa de biomassa e carbono em floresta com araucária utilizando imagens do satélite IKONOS II. **Ciência Florestal**, v.19, n.2, p.169-181, 2009.
- 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, 2011.