

**VANESSA DINA CAVALCANTE BARROS**

**DIVERSIDADE RIZOBIANA DE CAUPI EM SOLOS DE DIFERENTES  
CLASSES E ORIGENS**

**RECIFE**

**2012**

**VANESSA DINA CAVALCANTE BARROS**

**DIVERSIDADE RIZOBIANA DE CAUPI EM SOLOS DE DIFERENTES  
CLASSES E ORIGENS**

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

**RECIFE**

**2012**

**VANESSA DINA CAVALCANTE BARROS**

**DIVERSIDADE RIZOBIANA DE CAUPI EM SOLOS DE DIFERENTES  
CLASSES E ORIGENS**

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

Dissertação aprovada em 28 de Fevereiro de 2012 pela banca examinadora:

Orientador:

---

Mario de Andrade Lira Junior

Examinadores:

---

Ana Dolores Santiago de Freitas

---

Carolina Etienne Rosália e Silva Santos

---

Gláucia Alves e Silva

### Ficha Catalográfica

B277d Barros, Vanessa Dina Cavalcante  
Diversidade rizobiana de caupi em solos de diferentes  
classes e origens / Vanessa Dina Cavalcante Barros. -- Recife,  
2012.

54 f. : il.

Orientador (a): Mario de Andrade Lira Junior.  
Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade  
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia,  
Recife, 2012.

Referências.

1. Química do solo 2. Fertilidade do solo 3. Microbiologia do  
solo 4. Semiárido 5. Argissolo Vermelho Amarelo 6. Luvisso  
7. Neossolo Litólico 8. *Vigna unguiculata* 9. FBN  
I. Lira Junior, Mario de Andrade, Orientador II. Título

CDD 631.4

*Aos meus amigos Francisca Cíntia Aguiar Eufrásio,  
Jackson Rafael de Oliveira Peixoto, Mércia Maria  
Bôto Ponte e Paulo Victor de Oliveira, pela nossa  
irmandade, fonte de inspiração e constante apoio  
nos diferentes desafios ao longo da minha vida.*

**DEDICO**

*Aos meus alunos, pelo carinho demonstrado e  
principalmente, pela confiança depositada em mim.*

**OFEREÇO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo, pelo apoio institucional e financeiro.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro e concessão de bolsa de estudo.

A todos os funcionários do PPGCS em especial a Maria do Socorro por todo apoio e compreensão em momentos de dificuldade. Deus te abençoe!

Aos grandes mestres da minha vida, meus professores: Elnatan Bezerra de Souza, Ivanilza Moreira de Andrade, Maria Helena Alves, João Ambrósio de Araújo Filho, Clístenes Williams Araújo do Nascimento, Valdomiro Severino de Souza Júnior e especialmente Brivaldo Gomes de Almeida por todos os conselhos e atenção durante o mestrado. A todos agradeço pela sabedoria compartilhada durante minha formação.

Ao Dr. Antonio Félix da Costa pelo fornecimento e concessão de sementes e pela atenção disponibilizada a cerca deste trabalho.

Ao professor Mario de Andrade Lira Junior, pela orientação e auxílio durante todo este trabalho. Agradeço pelo amparo em momentos difíceis.

A toda a minha família, em especial minha maravilhosa tia Genelda Leilan C. F. Steinauer e minha querida vovó Dona Nelta, por compartilhar vidas e experiências. E as minhas queridas irmãs: Sheyla Mara por todo o apoio profissional e Jéssica Amélia por ser minha razão de viver.

Aos meus pais, Anizia Leilene C. Barros e Felipe Augusto do S. Coqueiro, por me fornecer bons exemplos do poder da fé em Deus e em si mesmo. Obrigado por todo o amor, cuidado e carinho.

Aos meus fiéis irmãos de coração: Paulo Victor de Oliveira, Jackson Rafael de O. Peixoto, Francisca Cíntia A. Eufrásio, Valdívvia Maria A. Silva,

Ingrid H'Oara C. Vaz da Silva, Mércia Maria Bôto Ponte, Ricardo Basto Souza, Isaura Cristine A. Camelo, Cristiane C. Timbó e Maria Gleiciane de Q. Martins, agradeço a fraternidade pura, bondosa e sincera ao longo de tantos anos.

A minha família pernambucana Girleide Menezes, Ariane Xavier, Priscila Araújo, Edna Araújo e Welligton Araújo por toda a amizade e confiança.

A Rafael Domingos Vasconcelos pelo seu entusiasmo, por ser fonte de ânimo e alegria. Obrigada por seu encorajamento, amor e apoio nas minhas decisões durante a conclusão deste trabalho.

Aos amigos da UFRPE: Raiana Lira Cabral, Rosângela S. de Santana, Monaliza A. dos Santos, Emmanuella Vila N. da Silva, Edivan Uchôa C. da Costa, Sebastião da S. Junior, Renato L. dos Santos, Victor C. Piscoya, especialmente, Danúbia R. M. de Lima e Marilúcia de J. Santos pelas horas de estudo, dedicação e compromisso com a ciência e valores de amizade que tanto preservou. Todos vocês são bênçãos de Deus em minha vida.

Aos amigos de laboratório Rayssa P. Vicentin, Cybelle S. de Oliveira, Clayton A. de Souza, Érika S. A. Graciano e Thiago P. Fernandes por todas as trocas de informações. Agradeço especialmente Manoela, Lais, Janaina, Italo, Débora e Aline pela essencial colaboração em momentos críticos do trabalho.

Assim, muito obrigada pelo apoio, carinho e atenção de todos que de alguma forma desejaram meu êxito. Também agradeço àqueles que não acreditaram em mim, pois em momentos de indignação e decepção do sistema foram uma forte motivação para eu continuar almejando fazer a diferença.

Antes de encerrar, gostaria de me desculpar com aqueles que esperavam mais de mim, tenham certeza que este trabalho foi uma fonte de aprimoramento pessoal e que me doe o máximo que poderia, mesmo que não tenha sido o suficiente. Por último, preciso me desculpar pelo distanciamento de minha irmã Jéssica, mesmo ausente busquei a Deus em minhas orações para orientá-la.

Muito Obrigada!

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

VANESSA DINA CAVALCANTE BARROS, natural de Itapajé-CE, graduou-se em Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Vale do Acaraú em dezembro de 2008. Em 2009 ingressou no curso de mestrado do programa de pós-graduação em Agronomia- Ciência do Solo, pela Universidade Federal Rural de Pernambuco.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
1. INTRODUÇÃO .....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	16
2.1. SEMI-ÁRIDO NO NORDESTE BRASILEIRO .....	16
2.2. LEGUMINOSAS .....	19
2.3. FATORES QUE AFETAM A FBN .....	20
2.4. DIVERSIDADE RIZOBIANA .....	21
2.5. FORMAS DE MEDIR E ESTUDAR A DIVERSIDADE BACTERIANA .....	21
2.5.1. RIQUEZA DAS ESPÉCIES .....	22
2.5.2. EQUITABILIDADE DAS ESPÉCIES .....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	24
3.1. AMOSTRAGEM .....	24
3.2. ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS DOS SOLOS ESTUDADOS .....	25
3.3. OBTENÇÃO DOS NÓDULOS .....	26
3.4. ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS PRESENTES NOS NÓDULOS .....	27
3.5. CARACTERIZAÇÃO CULTURAL DOS ISOLADOS ADQUIRIDOS .....	28
3.6. AUTENTICAÇÃO .....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	30
4.1. RESULTADOS DAS ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS DOS SOLOS ESTUDADOS .....	30
4.2. OBTENÇÃO DOS NÓDULOS .....	33

4.3. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS .....	33
4.4. AGRUPAMENTO DOS ISOLADOS BACTERIANOS .....	36
4.5. ANÁLISE DA DIVERSIDADE BACTERIANA .....	37
4.6. AUTENTICAÇÃO DE RIZOBIOS NATIVOS ENCONTRADOS EM DIFERENTES SOLOS DE DOIS MUNICÍPIOS DE PERNAMBUCO. ....	39
5. CONCLUSÕES .....	42
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	43

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mesorregiões do estado de Pernambuco .....	18
Figura 2. Delimitação do Argissolo Vermelho Amarelo, Luvisolo e Neossolo Litólico nos dois municípios em estudo.....	25

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Análise granulométrica dos solos dos municípios de Bom Jardim e Serra Talhada com intervalos de confiança.....	30
<b>Tabela 2.</b> Análise de fertilidade dos solos dos municípios de Bom Jardim e Serra Talhada com intervalos de confiança de 95%.....	32
<b>Tabela 3.</b> Biomassa de caupi após inoculação por três solos de dois municípios de Pernambuco.....	33
<b>Tabela 4.</b> Características morfofisiológicas dos isolados encontrados nos solos provenientes de Bom Jardim e Serra Talhada.....	34
<b>Tabela 5.</b> Agrupamento conforme as semelhanças morfológicas dos rizobios de diferentes solos e municípios do semi-árido pernambucano. ....	36
<b>Tabela 6.</b> Avaliação da diversidade rizobiana simbiótica de caupi em diferentes solos e municípios do semi-árido pernambucano. ....	38
<b>Tabela 7.</b> Eficiência simbiótica de plantas de feijão-caupi inoculadas com três solos do município de Bom Jardim, no Estado de Pernambuco. ....	39
<b>Tabela 8.</b> Eficiência simbiótica de plantas de feijão-caupi inoculadas com três solos do município de Serra Talhada, no Estado de Pernambuco. ....	40
<b>Tabela 9.</b> Eficiência simbiótica da população rizobiana de três solos do semi-árido Pernambucano no caupi. ....	41
<b>Tabela 10.</b> Eficiência simbiótica da população rizobiana em plantas de feijão caupi inoculadas com solos dos municípios de Serra Talhada e Bom Jardim. .	42

BARROS, Vanessa Dina Cavalcante. Universidade Federal Rural de Pernambuco, abril de 2012. Diversidade rizobiana de caupi em solos de diferentes classes e origens. Mario de Andrade Lira Junior; Mércia Virginia Ferreira dos Santos; Márcia do Vale Barreto Figueiredo.

## RESUMO

A Caatinga apresenta alta diversidade vegetal, incluindo leguminosas, que formam nódulos em simbiose com uma ampla faixa de rizóbios. Este trabalho visou estudar a diversidade rizobiana em três diferentes classes de solo presentes em dois municípios de Pernambuco. A amostragem do solo foi realizada em cada combinação solo-município e posteriormente foram utilizadas para inoculação em vasos Leonard usando o feijão caupi como planta-isca. A coleta se deu aos 45 dias de cultivo e os nódulos foram usados para isolamento e caracterização morfológica dos isolados rizobianos. A caracterização baseou-se na velocidade de aparecimento de colônias, diâmetro, cor, forma, elevação, borda, transparência e superfície da colônia, modificação do pH do meio de cultura e produção, consistência e elasticidade do muco, seguido por agrupamento a 100 % de similaridade e autenticação de isolados representantes de cada grupo. Foram obtidos 479 isolados, que formaram 100 e 175 grupos a 100% de similaridade em Bom Jardim e Serra Talhada. Os índices de diversidade de Shannon e Weaver revelaram, para uma mesma classe de solo nos diferentes municípios. Além das classes de solo, os municípios de coleta também influenciaram na diversidade da população rizobiana.

**Palavras-chave:** Semiárido, Argissolo Vermelho Amarelo, Luvissole, Neossolo Litólico, *Vigna unguiculata*, FBN.

BARROS, Vanessa Dina Cavalcante. Universidade Federal Rural de Pernambuco, abril de 2012. Rizobiana diversity of *Vigna unguiculata* in different classes and backgrounds soils. Mario de Andrade Lira Junior; Mércia Virginia Ferreira dos Santos; Márcia do Vale Barreto Figueiredo.

## ABSTRACT

Caatinga has high plant diversity, including legumes which nodulate a large range of rhizobia. This work studied rhizobial diversity in three different classes of soil present in two municipalities of Pernambuco. Soil sampling was conducted in each soil class-municipality combination and the samples were used for inoculation in Leonard jars, with cowpea as bait crop. Harvest was 45 days later, and the nodules were used for rhizobial isolation and characterization. Morphological characterization was based on colony appearance speed, colony diameter, color, shape, elevation, border, transparency and surface, culture medium pH change, and mucus production, consistency and elasticity, followed by grouping at 100% similarity and authentication of group representative isolates. 479 isolates were obtained, and formed 100 and 175 100% similarity groups in Bom Jardim and Serra Talhada. Shannon and Weaver diversity indexes presented differences in the same soil class from the different municipalities. Besides soil classes, sampling municipalities also affected rhizobial population diversity.

Keywords: Semi-arid, Ultisol, Entisol, Luvisol, *Vigna unguiculata*, FBN.

## 1. INTRODUÇÃO

O Nordeste brasileiro é marcado pela aridez do clima que apresenta forte insolação e conseqüentemente altas taxas de evapotranspiração. Na maior parte do ano possui deficiência hídrica com presença de chuvas erráticas. Tais condições climáticas secas e quentes caracterizam um clima semi-árido. Este exerce influência de diferentes formas nos diversos municípios nordestinos, principalmente com relação a aspectos da flora e fauna local, sendo observada grande heterogeneidade fitofisionômica (SILVA *et al.*, 2010) bem como uma diversidade de solos.

Observam-se desde classes de solos mais rasos e pouco profundos, tais como os Neossolos e Luvisolos, até solos mais evoluídos como os Argissolos (EMBRAPA, 2007) e cada um destes possuem propriedades físicas e químicas diferentes, portanto influenciam de diversas formas o crescimento vegetativo. De um modo geral, os solos do semi-árido são encontrados sob uma vegetação predominantemente xerófita, típicas da Caatinga (TABARELLI e SANTOS, 2004).

A Caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro (TABARELLI e SILVA, 2003) que apresenta elevada diversidade em sua flora e fauna. Tal diversidade vem sendo ameaçada por algumas atividades comuns na região, como a pecuária extensiva, que pode provocar o desaparecimento de espécies vegetais nativas de suma importância para o bioma, como por exemplo, as leguminosas.

Muitos gêneros da família Leguminosae são encontrados nas regiões tropicais e merecem destaque por promover, através da simbiose com rizóbios (ANDREOTE *et al.*, 2009), a fixação biológica do nitrogênio (FBN). Quando presente no solo, este mineral auxilia no crescimento das plantas e na ciclagem de outros elementos essenciais, por isso é importante manter um ciclo de reposição de nitrogênio no solo e na planta.

Algumas espécies da família Leguminosae, como *Vigna unguiculata* (L.) Walp, podem estabelecer simbiose com uma ampla faixa de bactérias

(ROCHON *et al.*, 2004), o que pode ser uma vantagem em estudos que almejam evidenciar a diversidade rizobiana pois seu uso como planta-isca aumenta as chances da simbiose ser estabelecida com uma maior faixa de isolados rizobianos (LIMA *et al.*, 2009).

A biodiversidade rizobiana pode ser medida de diferentes formas e freqüentemente tem se utilizado os índices de diversidade tais como: índice de dominância de Berger-Parker (ZAR, 1999); índice de riqueza de MARGALEF (1983); índice de riqueza de Shannon e Weaver (H) (SHANNON e WEAVER, 1949); índice de dominância de SIMPSON (1949), de uniformidade (J') de PIELOU (1977) e de riqueza pelo método "Jackknife" (HELTSHE e FORRESTER, 1983).

Observa-se uma variação da biodiversidade segundo os tipos de solos e as regiões geográficas, sendo que quanto mais heterogêneo apresentar-se o meio maior diversidade provavelmente será encontrada. Assim, considerando a variedade de condições edafoclimáticas presentes no semi-árido, precisa-se de mais estudos que caracterizem o potencial adaptativo das bactérias e das plantas bem como os efeitos dos diferentes tipos de solo na microbiota do nordeste brasileiro.

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos edafoclimáticos sobre a diversidade das populações de rizóbios nativos, considerando três classes de solo (Neossolo Litólico, Luvisolo, Argissolo Vermelho Amarelo) em dois municípios diferentes do estado de Pernambuco.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1.SEMI-ÁRIDO NO NORDESTE BRASILEIRO**

O semi-árido brasileiro apresenta-se em 1133 municípios, com uma área de aproximadamente 970 mil km<sup>2</sup>, ocupando oito estados da região Nordeste, merecendo destaque em Pernambuco onde abrange 122 municípios e representa 88% do território estadual (IBGE, 2012).

Segundo o Ministério da Integração (2005) os municípios incluídos no semi-árido apresentam pelo menos risco de seca maior que 60%, baseado no período entre as décadas de 70 e 90; um elevado índice de aridez com taxas de balanço hídrico de precipitação e evapotranspiração potencial entre 0,21-0,50 (THORNTHWAITE, 1941) ou ainda, precipitação pluviométrica média inferior a 800 milímetros por ano.

A deficiência hídrica na maior parte do ano e a presença de chuvas erráticas com grande heterogeneidade espacial e temporal demonstra um regime de chuvas escasso, seguindo uma alternância entre dois períodos distintos: um chuvoso de três meses entre fevereiro e abril e um seco em geral entre julho e novembro (AB' SABER, 1970; BARBOSA, 2000).

Além da baixa pluviosidade e forte sazonalidade, o clima semi-árido apresenta altas temperaturas decorrentes de fortes insolações. Estas proporcionam altas taxas de transpiração e evaporação (MENEZES e SAMPAIO, 2000) que freqüentemente apresentam-se acima de 2000 mm por ano (COLLARD *et al.*, 2010) e possuem taxas maiores do que as taxas de precipitação ao longo de 12 meses (CASTELETTI *et al.*, 2000).

Mesmo com a predominância do clima semi-árido observa-se uma heterogeneidade fitofisionômica (SILVA *et al.*, 2010) e diversidade de solos nos diferentes estados do Nordeste, como por exemplo em Pernambuco. Este estado Nordestino apresenta uma diversidade ímpar de ecossistemas com áreas litorâneas de maior pluviosidade e presença de florestas úmidas (Zona da Mata e Metropolitana), com áreas de transição (Agreste) (Figura 1) e com áreas mais quentes e secas (Sertão e São Francisco) que comumente demonstram arbustos espinhosos e florestas sazonalmente secas (LEAL *et al.*, 2005) sob diferentes solos.



**Figura 1.** Mesorregiões do estado de Pernambuco  
Fonte: IBGE (2012)

Segundo SANTOS *et al.* (2008) no estado de Pernambuco observam-se os principais solos encontrados no nordeste (Neossolos, Luvissolos, Planossolos, Vertissolos, Gleissolos, Latossolos e Argissolos). Os Argissolos encontram-se amplamente dispersos no território nacional (IBGE, 2007) e em Pernambuco podem ser encontrados em pequenas proporções no Agreste (SANTOS *et al.*, 2008). Este solo apresenta baixa fertilidade e variam de pouco profundos a profundos (IBGE, 2007).

Já os Neossolos apresentam-se rasos a pouco profundos e são mais comuns em regiões de clima semi-árido (EMBRAPA, 2007) onde geralmente ocorrem de forma dispersa em ambientes específicos, como exemplo os Neossolos Litólicos nos relevos muito acidentados de serras (IBGE, 2007).

Os Neossolos Litólicos em Pernambuco ocupam áreas significativas por todo o Agreste e Sertão (SANTOS *et al.*, 2008), sendo sua principal limitação a pequena profundidade, com horizonte superficial apresentando espessura menor que 20 cm (EMBRAPA, 2007). Comumente são caracterizados por afloramentos rochosos e possuem pouca capacidade de retenção de umidade (EMBRAPA, 2006).

O Luvissolo é outro solo comum do clima semi-árido que normalmente apresenta-se pouco profundo, entre 60 e 120 cm (EMBRAPA, 2007), apresentam argila de atividade alta e elevada saturação por bases e (IBGE,

2007). Tais características conjuntamente com sua alta susceptibilidade à erosão são suas maiores desvantagens (SANTOS *et al.*, 2008) principalmente em condições ambientais desfavoráveis e baixa proteção da cobertura vegetal típicas da caatinga.

A Caatinga é o bioma típico do clima semi-árido e ocupa 74% do território nordestino, com aproximadamente 845 mil km<sup>2</sup> de área (MMA, 2012). Ocupa 83% do estado de Pernambuco (IBGE, 2012) e em boa parte desse território observam-se aspectos secos e esbranquiçados característicos da região semi-árida, com ocorrência da vegetação savana estépica.

Observam-se fisionomias e florísticas com alta diversidade de espécies, algumas exclusivas da região. Tais características tornam o bioma semi-árido de maior biodiversidade do planeta, com cerca de 930 espécies de plantas (MMA, 2012) com grande quantidade de espécies pertencem à família Leguminosae (QUEIROZ, 2009).

## **2.2. LEGUMINOSAS**

Leguminosae é a terceira maior família de angiosperma (SOARES *et al.*, 2002) representada em sua maior parte por árvores tropicais (DÖBEREINER, 1984) com 19.400 espécies em 740 gêneros constituindo quase um duodécimo de plantas do mundo (KEW, 2012) com distribuição cosmopolita (BARELLA e KARSBURG, 2007).

Destaca-se por estabelecer simbiose com grupos de procaríotos que expressam a enzima nitrogenase, estes são capazes de reduzir o N<sub>2</sub> a amônia (NH<sub>3</sub>) (KIM e REES, 1994; LIMA *et al.*, 2009) e assim fixar nitrogênio e evitar a imobilização deste mineral e perdas por lixiviação (FRANCO e BALIEIRO, 2000) em diferentes solos.

Esta família, dentre seus muitos gêneros e espécies possui 41 gêneros com mais de 100 espécies cada (LEWIS, 2005), o que evidencia sua alta diversidade. Devido sua capacidade em beneficiar em uma ampla gama de situações (ROCHON *et al.*, 2004) diversos gêneros vêm sendo estudados, tais

como: *Stylosanthes*, *Macroptilium*, *Vicia*, *Arachis*, *Lens*, *Phaseolus*, *Glycine*, *Medicago*, *Trifolium*, *Pisum* e *Vigna*.

Algumas leguminosas são importantes fontes de alimento humano (SIMON, 2002) tais como o feijão-caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp, também chamado de feijão-de-corda ou feijão-macassar (EMBRAPA MEIO-NORTE, 2003) é uma cultura de subsistência que movimenta o emprego e a renda em regiões tropicais e subtropicais (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2007).

O caupi é tolerante às variações edafoclimáticas de diferentes regiões (BARRETO *et al.*, 2001) e possui resistência até à baixa fertilidade de alguns solos de regiões secas e quentes (MARTINS *et al.*, 2003; ZILLI *et al.*, 2006), devido sua baixa exigência hídrica. Outra característica importante dessa espécie é a promiscuidade, que lhe permite estabelecer simbiose com uma ampla gama de bactérias (RUMJANEK *et al.*, 2005) o que pode ser útil em estudos de diversidade por possibilitar uma maior amostragem de isolados capazes de promover a FBN (RICKLEFS, 2003).

### **2.3. FATORES QUE AFETAM A FBN**

Uma das vantagens na FBN é que ao fornecer nitrogênio biologicamente às culturas reduz os custos com fertilização nitrogenada (ASSMANN *et al.*, 2004), permitindo redução no uso de recursos não renováveis para a fabricação dos adubos químicos (RUSSELLE *et al.*, 2001).

A capacidade de fixação de nitrogênio por rizóbios depende de vários fatores relacionados com a população bacteriana presente nos solos e de acordo com as estirpes presentes no solo pode-se obter maior ou menor eficiência na nodulação afetando a simbiose (KAHINDI *et al.*, 1997; LIMA *et al.*, 2009). Outro fator agravante é competitividade da microbiota (SOARES *et al.*, 2006) onde há competição pelos sítios de infecção entre a população bacteriana nativa daquele solo e as estirpes de rizóbios inoculadas (SANTOS *et al.*, 2007).

Os solos influenciam o desenvolvimento bacteriano e podem provocar mudanças fenotípicas através do equilíbrio do pH e do suprimento de

nutrientes, portanto avaliar a distribuição espacial dos rizóbios em diferentes condições edafoclimáticas fornece informações a cerca da eficiência na nodulação (SOUZA *et al.*, 2008). Além das capacidades provenientes das diferentes estirpes inoculadas, a FBN depende de vários fatores ambientais, tais como a disponibilidade hídrica (OBATON, 1999; CAMPO e WOOD, 2001).

#### **2.4. DIVERSIDADE RIZOBIANA**

As diversas espécies do grupo rizóbio, tais como as dos gêneros *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Cupriavidus*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (NEVES e RUMJANEK, 1997; ZHANG *et al.*, 2003; WILLEMS, 2006; MOREIRA, 2008) apresentam grande diversidade genética, tornando difícil a descrição completa de todas as espécies (PROSSER *et al.*, 2007; ANDREOTE, 2009).

As informações a cerca da diversidade da população bacteriana do solo e competitividade entre as espécies de rizóbio, bem como a eficiência da FBN no campo contribuem para a eficiência dos sistemas agrícolas (NYFELER *et al.*, 2011). Porém para a utilização destas na agricultura se faz necessário uma prévia seleção de bactérias com melhores potenciais na FBN (PELCZAR *et al.*, 1997)

A identificação e o agrupamento de bactérias em condições edafoclimáticas diversificadas auxiliam na identificação de mais gêneros nativos de rizóbios e aumenta a probabilidade de encontrar espécies altamente tolerantes a desfavoráveis condições ambientais, com maior capacidade de fixar nitrogênio no solo e que possam apresentar melhores respostas em simbiose com uma determinada espécie de leguminosa (ZHANG *et al.*, 2003).

#### **2.5. FORMAS DE MEDIR E ESTUDAR A DIVERSIDADE BACTERIANA**

Observa-se na literatura o emprego de diversos índices tais como: índice de dominância de Berger-Parker (ZAR, 1999); índice de riqueza de MARGALEF (1983); índice de riqueza de Shannon e Weaver (H) (SHANNON e WEAVER, 1949); índice de dominância de SIMPSON (1949), de uniformidade

de PIELOU (J') (1977) e ainda, estimativa de riqueza pelo método "Jackknife" (HELTSHE e FORRESTER, 1983).

### 2.5.1. RIQUEZA DAS ESPÉCIES

A riqueza das espécies está relacionada ao número total de espécies presentes no solo e refere-se à abundância numérica de uma determinada área geográfica, região ou comunidade. Seu estudo é importante porque reflete as características a cerca das especificidades genéticas dos indivíduos e do habitat.

Neste aspecto, o índice de Shannon e Weaver (H') é uma medida utilizada para amostras aleatórias de espécies de uma comunidade que determina a quantidade de ordem existente num sistema (KREBS, 1999). Este índice valoriza mais as espécies comuns do que as espécies raras (RICKLEFS, 2003) e é calculado a partir de proporções de cada espécie (p) na amostra total de indivíduos.

Quanto maior for o valor de Shannon e Weaver (H) maior será a diversidade como é expresso pela fórmula:

$$H = -\sum_{i=1}^{S_{obs}} p_i \log_e p_i$$

Onde:

$P_i$  é a proporção de isolados de cada grupo e o número total de isolados, ou seja, é a abundância relativa de cada isolado;

$S$  é o número total de isolados representativos de cada grupo, ou seja, número total de grupos encontrados;

$H'$  é a medida logarítmica da diversidade que varia entre 0 e um  $H'$  máximo.

Ainda,  $p_i$  é calculada por  $n_i/N$ :

$$H = \log_e N - \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{\infty} (p_i \log_e p_i) n_i$$

Onde:

$N$  é numero total de exemplares coletados, ou seja, o número de total de isolados;

$n_i$ : é a abundancia de isolados do tipo  $i$ , ou seja, número de isolados de cada grupo.

Os valores de  $H'$  podem variar entre 0 e um  $H'$  máximo (BUSH *et al.*, 1997), sendo nulo quando a amostra contém apenas uma única espécie, e atingindo seu valor máximo correspondente a  $S$  espécies se todas as espécies tem a mesma abundância, sendo  $S$  o numero de espécies, ou seja, o valor de  $H'$  máximo será igual a  $\log_2 S$  (DAJOZ, 2005).

Índices de riqueza das espécies podem ser considerados como medidas imprecisas da diversidade, pois não levam em consideração a importância numérica das espécies (DAJOZ, 2005) nem a abundância da espécie dominante. Assim índices de diversidade podem ser mais sensíveis à equitabilidade das espécies dominantes.

### **2.5.2. EQUITABILIDADE DAS ESPÉCIES**

Os índices de equitabilidade, também chamados de uniformidade, equidistribuição ou equabilidade, se baseiam na abundância relativa das espécies e no grau de dominância. Em geral, são calculados quando se deseja comparar a diversidade de duas comunidades que contém número de espécies diferentes.

Neste contexto o índice de PIELOU (J) (1977) é uma medida de uniformidade da comunidade que considera a distribuição do número de indivíduos entre as espécies (WALKER, 1989). Ou seja, compara a diversidade

de Shannon e Weaver (H) (SHANNON e WEAVER, 1949) com a distribuição das espécies e expressa a relação entre a diversidade real e a diversidade máxima teórica (DAGET, 1976; BRUNEL e FONSECA, 1979) e é calculado pela fórmula:

$$J = \frac{H'}{H_{\max}'}$$

Onde:

$H'$  é o valor obtido para o índice de Shannon-Weaver

$H'_{\max}$  é o valor máximo teórico de Shannon-Weaver ou  $\log_2 S$

$J$  varia entre 0 e 1

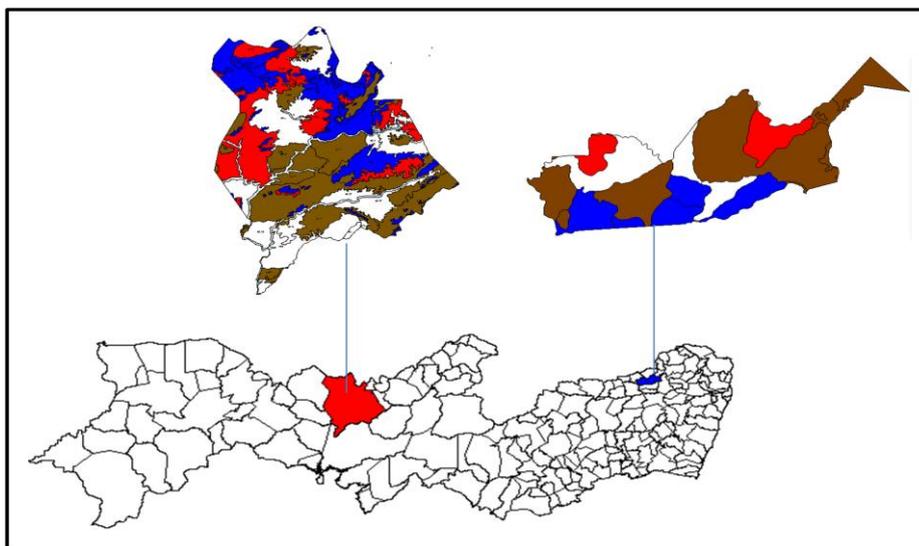
A equitabilidade varia entre 0 e 1, sendo seu valor nulo quando uma espécie domina amplamente a comunidade e máximo quando todas as espécies estão representadas pelo mesmo número de indivíduos, ou seja, todas as espécies tem a mesma abundancia. (DAGET, 1976; BRUNEL e FONSECA, 1979).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. AMOSTRAGEM**

As coletas foram realizadas no Agreste no município de Bom Jardim, microrregião do Médio Capibaribe, e no Sertão no município de Serra Talhada, microrregião do Sertão do Pajeú.

Para a realização do estudo foram selecionadas três classes de solos que ocorrem simultaneamente nos dois municípios: Argissolo Vermelho Amarelo; Luvisolo e Neossolo Litólico, conforme SILVA *et al.*, (2001) e reclassificados de acordo com EMBRAPA (2007) (Figura 2).



**Figura 2.** Delimitação do Argissolo Vermelho Amarelo, Luvissole e Neossolo Litólico nos dois municípios em estudo.

Fonte: Adaptado do ZAPE (SILVA *et al.*, 2001)

Legenda: Argissolo Vermelho Amarelo (vermelho), Luvissole (branca) e Neossolo Litólico (azul). Demais solos (marrom).

Delimitou-se a amostragem nos municípios segundo o Zoneamento Agroecológico de Pernambuco - ZAPE (SILVA *et al.*, 2001). As amostras simples foram coletadas em três a cinco pontos fisicamente distintos em cada combinação solo x município. Durante a coleta observou-se presença de leguminosas das espécies de *Desmanthus*, *Macroptilium* e *Stylosanthes*.

Foram selecionadas 15 amostras do horizonte superficial de cada combinação solo x município, totalizando 45 amostras de Bom Jardim e 45 amostras de Serra Talhada para posterior estudo de diversidade bacteriana local. Foram preparadas amostras compostas em cada ponto de coleta, em cada combinação solo x município, para realização de análises granulométricas e de fertilidade do solo.

### 3.2. ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS DOS SOLOS ESTUDADOS

As análises das características físicas do solo foram realizadas no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), onde as amostras coletadas foram secas ao ar, destorroadas e

peneiradas em malha de 2mm para realização de análise granulométrica, realizada pelo método da pipeta, de acordo com EMBRAPA (1997).

As análises químicas foram determinadas no Laboratório de Fertilidade do Solo da mesma instituição, segundo métodos recomendados pela EMBRAPA (1999). As determinações químicas incluíram: pH em água (1: 2,5); complexo sortivo com determinações de  $K^+$  e  $Na^+$  trocáveis extraídos com solução de Mehlich-1 e determinados por espectrofotometria de chama,  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  trocáveis extraídos com  $KCl$   $1\text{ mol L}^{-1}$  e dosados por espectrofotometria de absorção atômica; o Al trocável (extraído com solução de  $KCl$   $1\text{ mol L}^{-1}$  e determinado por titulação); H + Al extraídos com solução acetato de cálcio  $0,5\text{ mol L}^{-1}$  e titulados com  $NaOH$   $0,060\text{ mol L}^{-1}$  e C orgânico total (oxidação pelo dicromato de potássio em meio sulfúrico). Ainda, foram determinados os valores da soma de bases trocáveis (SB), capacidade de troca de cátions (CTC) e a CTC da argila, sem a contribuição da matéria orgânica ( $T = CTC \times 100/\text{argila}\%$ ) para todos os solos estudados.

As demais amostras de solo foram mantidas com a umidade do momento da coleta e posteriormente foram colocadas sob refrigeração ( $\pm 4^\circ C$ ) no laboratório de microbiologia do Departamento de Agronomia da UFRPE, para posterior isolamento das estirpes rizobianas.

### **3.3. OBTENÇÃO DOS NÓDULOS**

O experimento foi conduzido em casa de vegetação da UFRPE em delineamento em blocos sendo 15 vasos de cada solo, com um total de 45 vasos por município. Para a obtenção de nódulos, sementes de feijão-caupí variedade BRS Pujante foram desinfestadas por imersão em hipoclorito de sódio 5% por um minuto, em seguida para foram imersas em álcool 70% por 30 segundos, seguido de oito lavagens em água destilada e esterilizada.

Os 90 vasos de Leonard foram montados com garrafas tipo long neck contendo na parte superior areia e vermiculita (proporção 2:1) esterilizados em autoclave a  $120^\circ C$  por 60min, adicionando-se, na parte inferior, solução nutritiva de HOAGLAND e ARNON (1950) sem nitrogênio. A seguir as

sementes foram colocadas para germinar diretamente na parte superior dos vasos de Leonard. Após sete dias da germinação as plantas foram inoculadas com 2g de solo das amostras conduzidos separadamente para cada combinação solo x município.

As plantas foram colhidas 45 dias após a inoculação, separadas em parte aérea e raiz e colocadas em sacos de papel. Os nódulos foram retirados das raízes e contados para a determinação do número de nódulos (NN), e posteriormente foram limpos e conservados em tubos de ensaio contendo sílica-gel, e após sua secagem e estabilização da umidade remanescente foram pesados para determinação da massa seca de nódulos (MSN).

A parte aérea e a raiz foram secas em estufa de ventilação forçada de ar a 65°C até atingirem massa constante. A seguir, foram obtidas as massas secas da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR) de cada planta-isca.

### **3.4. ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS PRESENTES NOS NÓDULOS**

O isolamento seguiu o procedimento padrão, como sintetizado em HUNGRIA (1994), e foi realizado no laboratório de Diversidade Microbiana da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Foram utilizados de quatro a cinco nódulos escolhidos aleatoriamente em cada planta. Estes nódulos foram reidratados, e em seguida imersos em álcool 70% por 30 segundos, para quebra da tensão capilar superficial e, posteriormente, desinfestados por imersão em hipoclorito de sódio 5% por um minuto, seguido de oito lavagens em água destilada e esterilizada.

Os nódulos foram macerados com o auxílio de pinça esterilizada sobre placas de Petri e repicados com uma alça de platina sobre placas de Petri contendo meio YMA (levedura-manitol-ágar) neutro (pH 6,8) contendo azul de bromotimol (VINCENT, 1970).

As placas foram envolvidas com filme plástico PVC e incubadas em estufa a 28° C por sete dias, sendo visualmente analisadas a cada 3 dias. Após os

sete dias da extração de isolamento das bactérias dos nódulos as placas foram purificadas e novamente foram incubadas a 28° C por sete dias para posteriormente ser realizada a caracterização morfológica dos isolados purificados.

### **3.5. CARACTERIZAÇÃO CULTURAL DOS ISOLADOS ADQUIRIDOS**

A caracterização morfológica foi baseada na velocidade de aparecimento de colônias isoladas (< 3 dias; > 3 dias), diâmetro (< 2 mm; > 2 mm), cor (incolor; branca; creme; amarela; rosa, verde, lilás e vermelha), forma (circular; irregular; puntiforme), elevação (plana; lente; convexa; drop-like; umbilicada; umbanada), borda (inteira; ondulada; filamentosa; lobada; denteada; nenhuma), transparência (transparente; opaca) e superfície da colônia (rugosa; lisa; papilosa), produção de muco (escasso; pouco; moderado; abundante), consistência do muco (seca; aquosa; gomosa; viscosa; butírica) e elasticidade do muco (sem; com) e modificação do pH do meio de cultura (ácido; neutro; alcalino) (SEBBANE *et al.*, 2006)

Após a caracterização, todos os isolados bacterianos foram cultivados em meio YM e posteriormente armazenados em tubos de eppendorf sob refrigeração.

O agrupamento dos isolados encontrados foi realizado com base no índice de Jaccard, pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Analysis) utilizando o Past 2.09 (HAMMER *et al.*, 2001). Foram construídos 11 dendrogramas de agrupamento de todos os isolados encontrados para cada localidade, para cada solo e para cada combinação solo-cidade com o propósito de diagnosticar as semelhanças fenotípicas entre os isolados encontrados nesse experimento.

Para estimativa da diversidade utilizando o PAST 2.09 (HAMMER *et al.*, 2001) após o agrupamento foi calculado o índice de Diversidade de Shannon e Weaver (H) (SHANNON e WEAVER, 1949) e índice de equitabilidade (J) de PIELOU (1977).

### 3.6. AUTENTICAÇÃO

Um novo experimento foi montado na mesma casa de vegetação em delineamento em blocos com duas repetições. Foi semeada a variedade IPE Miranda 207 em vasos de Leonard. Desta vez na parte superior dos vasos de Leonard foram utilizados sacos plásticos de muda na cor preta, devidamente preenchidos com areia e vermiculita na proporção 2:1. A base dos vasos de Leonard era constituída de poliestireno expandido contendo a mesma solução nutritiva anteriormente descrita.

Para proceder com a inoculação os isolados foram aleatoriamente selecionados dentro dos grupos com 100% de similaridade em cada cidade, compondo 100 e 175 tratamentos para Bom Jardim e Serra Talhada respectivamente, conduzidos separadamente para cada cidade.

Além dos tratamentos com plantas inoculadas com os 275 isolados anteriormente descritos, foram incluídos no experimento tratamentos controle não inoculados sem e com fornecimento de N. Este fornecimento de N se deu através da solução completa de Hoagland. Em cada bloco foram estabelecidos dois controles sem N e dois controles com N.

Após 45 dias da inoculação, as plantas da casa de vegetação foram coletadas. A parte aérea, raízes e nódulos foram separados e colocados em sacos de papel, e os nódulos foram contados. Posteriormente houve a secagem em estufa a 65 °C, com aeração forçada, até atingir peso constante.

Foram calculados a eficiência relativa (ER) (BROCKWELL *et al.*, 1966) e ganho relativo (GR) conforme as equações abaixo:

$$\frac{\text{ER}}{\text{GR}}$$

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se GLM do SAS (SAS Inst. Inc., 1999), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 10% de probabilidade para comparação entre as estirpes em cada experimento. Para cada experimento também foi realizada análise de variância usando os isolados provenientes de cada origem como indicadores do potencial da população daquela origem.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 4.1. RESULTADOS DAS ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS DOS SOLOS ESTUDADOS

A análise granulométrica demonstra que os solos coletados possuem mais de 700 g kg<sup>-1</sup> de areia sendo franco-arenosos, exceto o Neossolo Litólico de Bom Jardim (Tabela 1). Isso pode ocorrer devido às condições ambientais da região semiárida, pois o regime climático e a baixa proteção da vegetação durante boa parte do ano podem favorecer a remoção de argilas dos horizontes superficiais (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Ainda, na maioria dos solos foi verificada grande variabilidade dos dados, com intervalos de confiança próximos à média para Silte e Argila.

**Tabela 1.** Análise granulométrica dos solos dos municípios de Bom Jardim e Serra Talhada com intervalos de confiança.

Solos	Areia ----- g kg <sup>-1</sup> -----	Silte	Argila	Classe Textural
Bom Jardim				
NL	780±160	170±150	50±40	Areia franca
L	750±270	160±320	90±80	Franco arenoso
AVA	730±90	180±40	90±70	Franco arenoso
Serra Talhada				
NL	700±90	220±90	80±40	Franco arenoso
L	530±570	320±510	150±80	Franco arenoso
AVA	760±40	140±40	100±50	Franco arenoso

Fonte: Departamento de Zootecnia-UFRPE

Legenda: NL: Neossolo Litólico; L: Luvisolo; AVA: Argissolo Vermelho Amarelo

Conforme Tabela 2, observa-se o menor valor de CTC potencial no Argissolo Vermelho Amarelo ( $8 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ) e o maior no Neossolo Litólico ( $15 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ) de Serra Talhada. O cálculo da capacidade de troca de cátions (CTC) da argila (T) demonstrou valores superiores a  $27 \text{ cmol kg}^{-1}$  de argila (Tabela 2), portanto todos os solos estudados possuem alta atividade coloidal (EMBRAPA, 2006). Já o maior valor de acidez potencial encontra-se no Argissolo Vermelho Amarelo de Bom Jardim. Os resultados do pH (6,3 a 8) demonstraram solos de alcalinos a ácidos.

Foram observados baixos teores de Ca ( $3,3$  a  $8,2 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ), Na e C.O. ( $6,3$  a  $8,5 \text{ g kg}^{-1}$ ) em todos os solos com exceção dos Neossolos Litólicos, que apresentaram os maiores valores de C.O., K e Ca (Tabela 2). Já os maiores valores de Na ( $0,52 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ) e fósforo disponível ( $182 \text{ mg dm}^{-3}$ ) foram observados no Luvisolo de Serra Talhada. Vale ressaltar, que fatores como a salinidade, escassez de nutrientes e excesso de resíduos orgânicos podem interferir na diversidade rizobiana presente no solo (ZILLI, 2001; MENDONÇA e SCHIAVINATO, 2005).

**Tabela 2.** Análise de fertilidade dos solos dos municípios de Bom Jardim e Serra Talhada com intervalos de confiança de 95%.

	pH (H <sub>2</sub> O)	Complexo Sortivo (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )							CTC	T (cmol kg <sup>-1</sup> )	P (mg dm <sup>-3</sup> )	C.O. (g kg <sup>-1</sup> )
		Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>+2</sup> +Mg <sup>+2</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Al <sup>+3</sup>	SB	H + Al				
Bom Jardim												
NL	8,0±1,6	0,09 ±0,3	0,2±0,1	8,5±1,6	6,3±3,0	0	9	2,3±1,4	11	258	97±14	14,8±6
L	6,3±0,9	0,11 ±0,3	0,1±0,1	7,9±3,2	4,5±1,7	0	8	3±3	11	140	29±43	6,3±6
AVA	6,5±0,6	0,4 ±1,6	0,1±0,1	7,8±2,6	4,4±0,3	0	8	3,3±1,4	11	122	39±40	8,5±14
Serra Talhada												
NL	7,2±0,5	0,05 ±0,1	1,3±0,8	11,6±8	8,2±5,6	0	11	2,6±0,3	15	198	38±40	12,2±8
L	7,0±0,6	0,52 ±0,2	0,8±0,4	9,3±4,6	6,2±3,5	0	7	2,8±0,5	10	67	182±35	10,9±4
AVA	6,7±0,5	0,003 ±0,1	0,1±0,1	4,9±3	3,3±0,9	0	5	2,9±0,9	8	84	7,5±9,8	4,0±2

Fonte: Laboratório de Fertilidade do Solo (PGCS/UFRPE)

Legenda: NL: Neossolo Litólico; L: Luvisolo; AVA: Argissolo Vermelho Amarelo

## 4.2. OBTENÇÃO DOS NÓDULOS

A inoculação com os solos de Serra Talhada resultou nos maiores valores de MSPA, MSR, MSN e NN em todos os solos estudados, exceto para o Luvissole nas variáveis MSPA, MSN e NN (Tabela 3).

**Tabela 3.** Biomassa de caupi após inoculação por três solos de dois municípios de Pernambuco.

LOCAL	SOLOS	MSPA	MSR	MSN	NN
		----- mg -----			
Bom Jardim	NL	518±131	238±48	50±20	9±4
	L	713±205	224±42	50±20	12±6
	AVA	521±113	254±47	40±10	7±4
Serra Talhada	NL	1732±549	363±55	170±40	70±28
	L	344±135	287±44	30±10	4±3
	AVA	611±326	267±31	50±30	9±6

Legenda: NL: Neossolo Litólico; L: Luvissole; AVA: Argissolo Vermelho Amarelo, MSPA: Massa seca da parte aérea, MSR: massa seca da raiz, NN: número de nódulos e MSN: massa seca dos nódulos em caupi.

Dentre os solos de Serra Talhada, a inoculação com Neossolo Litólico apresentou os maiores valores para todas as variáveis, proporcionando maior número de nódulos nas raízes de caupi, uma média de 70 nódulos por planta (Tabela 3). Conforme ALMEIDA *et al.*, (2010) o NN é consequência da densidade de bactérias presentes nas amostras representando uma medida semiquantitativa do número de células presentes, portanto neste trabalho o Neossolo Litólico de Serra Talhada pode ter uma maior quantidade de células bacterianas do que os demais solos estudados.

## 4.3. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS

Observam-se colônias com diâmetro maior que 2 mm em 191 (78%) dos 244 isolados de Bom Jardim e em 198 (84%) dos 235 isolados de Serra Talhada (Tabela 4). A maioria das colônias apresentou translucidez para ambos os municípios. Resultados semelhantes, a partir de 304 isolados de nódulos de caupi, foram encontrados por MEDEIROS *et al.*, (2009) com a maioria das colônias apresentando-se translúcidas.

**Tabela 4.** Características morfofisiológicas dos isolados encontrados nos solos provenientes de Bom Jardim e Serra Talhada.

MUNICÍPIOS		BOM JARDIM			SERRA TALHADA		
SOLOS		NL	L	AVA	NL	L	AVA
TOTAL DE ISOLADOS		55	115	74	76	74	85
Tempo de crescimento	Rápido	41	52	55	60	59	67
	Lento	14	63	19	16	15	18
Diâmetro	<2 mm	4	39	10	17	3	17
	>2 mm	51	76	64	59	71	68
Coloração	Incolor	4	19	11	8	14	9
	Branca	3	1	3	1	0	2
	Creme	29	37	27	48	40	49
	Amarela	14	46	24	17	15	25
	Lilás	1	0	0	0	0	0
	Vermelha	1	0	1	0	0	0
	Verde	1	2	0	0	0	0
Forma	Rosa	2	10	8	1	5	0
	Puntiforme	0	12	4	14	8	15
	Circular	32	36	35	29	23	13
Elevação da colônia	Irregular	23	67	35	33	43	57
	Plana	34	86	51	35	56	47
	Lente	2	0	0	6	2	10
	Convexa	16	29	21	30	15	24
Borda	Drop-like	3	0	2	5	1	4
	Inteira	28	78	50	40	34	30
	Ondulada	8	10	5	8	3	10
	Filamentosa	2	11	3	19	24	24
	Lobada	11	16	11	6	6	12
	Denteada	6	0	5	2	7	6
Brilho	Nenhuma	0	0	0	1	0	3
	Translúcida	52	115	73	57	66	73
Aspecto da superfície	Opaca	3	0	1	19	8	12
	Lisa	24	71	31	44	23	30
Produção de muco	Papilosa	31	44	43	32	50	55
	Escasso	0	0	0	4	1	2
	Pouco	21	68	42	37	43	45
	Moderado	31	21	20	24	18	29
	Abundante	3	26	12	11	12	10
Consistência do muco	Seca	0	0	0	3	2	1
	Aquosa	4	14	6	10	14	7
	Gomosa	17	16	16	23	9	16
	Viscosa	9	16	14	17	8	23
Elasticidade	Butírica	25	69	38	23	41	38
	Ausente	24	72	42	43	43	55
pH do meio de cultura	Presente	31	43	32	33	31	30
	Ácido	32	70	33	41	51	54
	Alcalino	3	14	8	2	14	6
	Neutro	20	31	33	33	9	25

Legenda: NL: Neossolo Litólico; L: Luvisolo; AVA: Argissolo Vermelho Amarelo

A maioria dos isolados de ambas as regiões apresentou baixa produção de muco, porém, conforme Tabela 4 o Luvissole e o Neossolo Litólico do município de Bom Jardim apresentam mais da metade de seus isolados com alta produção de muco, podendo ser os isolados destes solos os mais resistentes a fatores bióticos pela relação entre produção de muco e resistência (COUTINHO *et al.*, 1999) (MARTINS *et al.*, 1997).

Ainda quanto ao muco, a maioria dos isolados de Bom Jardim apresentou consistência butírica (Tabela 4). Este tipo de muco pode evidenciar pouca tolerância a altas temperaturas, já que XAVIER *et al.*, (2007), ao estudar 76 estirpes de bactérias isoladas de caupi, observaram que os rizóbios com consistência butírica não foram tolerantes às altas temperaturas, configurando tal característica como uma desvantagem competitiva em solos do semiárido.

No semi-árido, o curto período chuvoso pode favorecer uma predominância de isolados com crescimento rápido (MEDEIROS *et al.*, 2009), devido à necessidade de propagação desses isolados as diferentes condições físicas e químicas dos solos. Observa-se na Tabela 4 que 61% e 79% dos isolados de Bom Jardim e de Serra Talhada, respectivamente, apresentaram crescimento rápido. Além da influência das condições edafoclimáticas, algumas culturas como o caupi tendem a estabelecer simbiose com estirpes que apresentam crescimento em menos de três dias (ZHANG *et al.*, 2007).

A maioria dos isolados acidificou o meio de cultura tanto em Bom Jardim (55%) quanto em Serra Talhada (62%) (Tabela 4), esta mudança de pH em meio YMA é bem comum dos gêneros *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (LIMA, 2009).

Dentre os isolados que acidificaram o meio de cultura, 81 isolados de Bom Jardim e 117 de Serra Talhada cresceram em menos de três dias. Isolados que apresentam essas duas características associadas são comumente observados, CHAGAS JUNIOR *et al.*, (2009), ao caracterizar fenotipicamente 200 isolados de rizóbio em feijão-caupi na Amazônia observaram que todos os isolados de crescimento rápido acidificaram o meio de cultura.

#### 4.4. AGRUPAMENTO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Os resultados demonstram que há maior diversidade no estudo dos isolados de Serra Talhada, evidente quando surgem em Bom Jardim 100 grupos dos 244 isolados e em Serra Talhada 175 grupos dos 235 isolados (Tabela 5). De acordo com LIMA *et al.*, (2009) a caracterização cultural pode ser uma maneira prática e economicamente viável de avaliar a diversidade quando há um grande número de isolados, podendo até subestimar a diversidade genotípica encontrada.

**Tabela 5.** Agrupamento conforme as semelhanças morfológicas dos rizóbios de diferentes solos e municípios do semi-árido pernambucano.

Classes de Solos	Bom jardim			Serra talhada					
	I	G	I/G	I	G	I/G	I	G	I/G
				244	100	14	235	175	14
NL	131	96	6	55	36	4	76	61	5
L	189	88	14	115	44	14	74	47	14
AVA	159	110	8	74	36	6	85	77	2

Legenda: NL: Neossolo Litólico; L: Luvisolo; AVA: Argissolo Vermelho Amarelo; I: quantidade de isolados rizobianos encontrados; G: grupos formado a partir dos isolados semelhantes; I/G: quantidade de isolados encontrados no maior grupo.

A precipitação pluviométrica apresenta uma média histórica anual de 766,38 mm em Bom Jardim e 484,06 mm em Serra Talhada (LAMEPE, 2012), portanto a maior diversidade apresentada em Serra Talhada pode estar relacionada à adaptação rizobiana às influências da temperatura e pluviosidade local, pois apesar da baixa umidade e as elevadas temperaturas afetarem o crescimento dos rizóbios, das leguminosas e a relação simbiótica entre estes (HUNGRIA e VARGAS, 2000) existem microrganismos tolerantes a diferentes fatores adversos (KAWAI *et al.*, 2000).

O maior grupo com 14 isolados de Serra Talhada apresentou colônias com crescimento rápido, enquanto o maior grupo de Bom Jardim, também contendo 14 isolados, apresentou colônias com crescimento lento. Resultados semelhantes associam a capacidade de nodular caupi por isolados rizobianos

de crescimento lento, como *Bradyrhizobium spp.* (SALEENA *et al.*, 2001; ZILLI *et al.*, 2004; 2006), dentre outros grupos de rizóbio ( SANTOS *et al.*, 2007).

Em Bom Jardim, o Luvisolo apresentou maior diversidade com 44 grupos dos 115 isolados, onde a maioria apresentou pequenos grupos de um ou dois isolados em grande quantidade o que evidencia a diversidade de isolados neste solo. Diferentemente de Bom Jardim a maior diversidade em Serra Talhada foi encontrada no Argissolo Vermelho Amarelo com 77 grupos dos 85 isolados.

Os Luvisolos demonstraram a maior relação isolados/grupo (14) sendo 85 dos 88 grupos formados com isolados de um mesmo município. Esta maior diversidade dentre todos os solos estudados pode ser atribuída a fatores intrínsecos deste solo, tais como a quantidade de argila expressa e a retenção de umidade, já esse foi o solo que apresentou maior quantidade de argila.

Concordando com essa suposição os Argissolos Vermelho-Amarelos quando comparado aos demais solos utilizados neste estudo apresentou-se o segundo mais argiloso e também o segundo a apresentar maior diversidade com a segunda maior relação isolados/grupo (8) sendo 110 grupos dentre 159 isolados. Assim o solo que apresentou a menor diversidade foram os Neossolos Litólicos que obteve a menor relação isolados/grupo (6) sendo 96 grupos dos 131 isolados.

#### **4.5. ANÁLISE DA DIVERSIDADE BACTERIANA**

O índice de diversidade de Shannon-Weaver (H) demonstrou alta diversidade para ambos os municípios, porém observa-se maior diversidade no município de Serra Talhada (H= 5,31) e menor no município de Bom Jardim (H= 5,21). Tal fato, possivelmente, ocorre devido às influências das diferentes temperaturas e umidades sobre a diversidade da população rizobiana local.

**Tabela 6.** Avaliação da diversidade rizobiana simbiótica de caupi em diferentes solos e municípios do semi-árido pernambucano.

	I	G/I	Índice de SHANNON (H)	Índice de PIELOU (J)
Bom Jardim	81±76	0,41	5,21	0,95
Serra Talhada	78±15	0,75	5,31	0,97
NL	65±132	0,74	4,71	0,97
L	94±259	0,47	4,94	0,94
AVA	79±70	0,70	4,91	0,97

Legenda: NL: Neossolo Litólico; L: Luvisolo; AVA: Argissolo Vermelho Amarelo; I: médias do número total de isolados rizobianos encontrados; G/I: relação grupos por isolados.

O índice de equitabilidade de Pielou (J) demonstrou valores altos, pois seus resultados apresentaram valores próximos ao valor máximo possível (1) sendo o menor valor (J= 0,95) em Bom Jardim e maior valor (J= 0,97) em Serra Talhada (Tabela 6). Assim, o índice de Pielou revelou baixa uniformidade, ou seja, neste estudo não há o domínio de uma mesma estirpe de rizóbio. Tal como esperado, pois estes índices são inversamente proporcionais, ou seja, quanto maior a diversidade menor será a equitabilidade das espécies (WALKER, 1989).

Os três solos estudados apresentaram uma diferença de 0,23 entre o maior (H= 4,94) e menor (H= 4,71) valor do índice de diversidade de Shannon-Weaver, essa diferença entre os índices de diversidade conjuntamente com a baixa uniformidade relatada nos altos valores (entre 0,94 a 0,97) de Pielou (J) demonstra que nestes solos as comunidades possuem um ou mais grupos de bactérias (BEGON *et al.*, 1996) e indica a influência na diversidade rizobiana dos diferentes solos de uma mesma região.

Ainda, conforme a Tabela 6, os Luvisolos apresentaram maior diversidade rizobiana com maior índice de Shannon (H= 4,94) e os Neossolos Litólicos a menor diversidade (H= 4,71), isto pode estar relacionado com fatores ligados às diferentes concentrações de argila nos solos, pois comumente os Neossolos apresentam-se mais arenosos, bem drenados e com baixa proporção de argila natural (EMBRAPA, 2007), portanto com menor umidade, o que pode influenciar na atividade biológica dos rizóbios e seus

hospedeiros afetando a reprodução da população bacteriana no solo (SANGINGA *et al.*, 1992; LIMA, 2009).

#### 4.6. AUTENTICAÇÃO DE RIZOBIOS NATIVOS ENCONTRADOS EM DIFERENTES SOLOS DE DOIS MUNICÍPIOS DE PERNAMBUCO.

De um modo geral, os valores de MSPA variaram entre 160 e 970 mg, a MSR 60 e 260 mg e a MSN 1,8 e 373,8 mg. Ainda, o número de nódulos (NN) demonstrou uma considerável variação, entre um e 107 nódulos por planta.

Em Bom Jardim foram encontradas diferenças significativas quanto a MSPA, ER e GR (Tabela 7) entre os isolados oriundos do Luvissole e o Argissolo Vermelho Amarelo indicando que as características intrínsecas de cada classe de solo podem alterar a eficiência de sua comunidade rizobiana.

**Tabela 7.** Eficiência simbiótica de plantas de feijão-caupi inoculadas com três solos do município de Bom Jardim, no Estado de Pernambuco.

Solos	MSPA (mg)	MSR (mg)	MSN (mg)	NN	ER (%)	GR (%)
AVA	490 b	5750 a	80 a	33a	0,43 b	1,51 b
NL	560 ab	5560 a	70 a	39a	0,48 ab	1,70 ab
L	590 a	5360 a	80 a	38a	0,51 a	1,81 a
CV (%)	55	19	34	31	45	63

Legenda: NL: Neossolo Litólico; L: Luvissole; AVA: Argissolo Vermelho Amarelo

Dados de MSPA, MSR, ER e GR transformados por log<sub>10</sub>; MSN transformados por  $x^{-9,2}+1$  e NN transformados por  $\sqrt{x}+1$ .

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

Ainda conforme Tabela 7, verifica-se que para os três solos de Bom Jardim, não há diferença significativa, em média, quanto ao número de nódulos, porém obteve-se maior resposta quanto a MSPA em caupi inoculado por amostras de Luvissole de Bom Jardim, indicando possível diferença na eficiência simbiótica das diferentes comunidades rizobianas.

Em Serra Talhada observam-se diferenças na MSN e NN no Luvissole e Argissolo Vermelho Amarelo (Tabela 8). O Luvissole além de ter apresentado

maior número de nódulos por planta possui o maior MSN, o que deveria estar relacionado com a eficiência simbiótica (HUNGRIA e BOHRER, 2000), porém o Argissolo Vermelho Amarelo apresentou maior MSPA indicando possíveis estirpes mais eficientes oriundas deste solo.

**Tabela 8.** Eficiência simbiótica de plantas de feijão-caupi inoculadas com três solos do município de Serra Talhada, no Estado de Pernambuco.

SOLOS	MSPA (mg)	MSR (mg)	MSN (mg)	NN	ER (%)	GR (%)
AVA	419 a	149 a	37 b	16 b	0,539 a	0,869 a
NL	404 a	147 a	42 ab	21 ab	0,537 a	0,866 a
L	403 a	147 a	45 a	26 a	0,559 a	0,901 a
CV (%)	21	17	23	22	21	21

Legenda: NL: Neossolo Litólico; L: Luvisolo; AVA: Argissolo Vermelho Amarelo.

Dados de MSPA, MSR, ER e GR transformados por raiz; MSN transformados por  $x^{-10,1}+1$  e NN transformados por  $x^{0,2}+1$ .

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

Ainda conforme Tabela 8, verifica-se variação nos valores de MSN indicando que existem diferenças entre os rizóbios encontrados nos solos do município de Serra Talhada quanto à capacidade de formar nódulos no feijão-caupi. Essa diferença quanto a capacidade de formar nódulos por rizóbios nativos também foi observada em estudos, comparando estirpes rizobianas entre si, da eficiência simbiótica utilizando feijão-fava (ANTUNES *et al.*, 2011) e em estudos com feijão-comum (NOGUEIRA, 2005).

A influência das classes de solos quanto à população rizobiana fica evidente quando analisamos os solos entre si sem considerar os municípios. As três classes de solos estudados apresentaram respostas diferentes com relação às variáveis MSPA, NN e GR e houve maior nodulação com, conseqüentemente, maior ganho relativo no Luvisolo (Tabela 9).

**Tabela 9.** Eficiência simbiótica da população rizobiana de três solos do semi-árido Pernambucano no caupi.

Solos	MSPA (mg)	MSR (mg)	MSN (mg)	NN	ER (%)	GR (%)
AVA	450 b	160 a	60 a	26 b	0,48 a	1,17 b
NL	480 ab	170 a	60 a	31 ab	0,51 a	1,25 ab
L	510 a	170 a	60 a	34 a	0,53 a	1,32 a
CV (%)	20	19	27	43	13	16

Legenda: NL: Neossolo Litólico; L: Luvisolo; AVA: Argissolo Vermelho Amarelo

Dados de MSPA transformados por  $\sqrt{x}$ ; NN transformados por  $\sqrt{x} + 1$ ; GR transformados por  $x^{0,4}$ . Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Os Luvisolos, independentemente da localidade, foram os que mais favoreceram a nodulação (Tabela 9), apresentando maiores valores para todas as variáveis. Este solo proporcionou um maior desenvolvimento no caupi e possivelmente as maiores concentrações de argila encontradas nas amostras estudadas desse Luvisolo podem ter exercido influência na população rizobiana.

Ainda conforme Tabela 9, de um modo geral não foram observadas diferenças significativas quanto a MSR entre os três solos demonstrando que os rizóbios envolvidos não exerceram influência sobre o crescimento radicular do feijão-caupi. ANTUNES *et al.*, (2011) ao estudar a eficiência simbiótica em *Phaseolus lunatus* de 17 isolados de rizóbios nativos e duas estirpes referência também não encontrou diferença significativa entre os tratamentos, para a matéria seca das raízes (MSR).

Bom Jardim proporcionou um maior desenvolvimento da MSPA (Tabela 10), destacando-se, também, nas demais variáveis estudadas, indicando a importância da MSN e NN na MSPA em caupi.

**Tabela 10.** Eficiência simbiótica da população rizobiana em plantas de feijão caupi inoculadas com solos dos municípios de Serra Talhada e Bom Jardim.

Municípios	MSPA (mg)	MSR (mg)	MSN (mg)	NN	ER (%)	GR (%)
Serra Talhada	410 b	150 b	42 b	25 b	0,53 a	0,87 b
Bom Jardim	560 a	190 a	78 a	36 a	0,48 b	1,70 a
CV (%)	20	19	27	43	13	16

Dados de MSPA, MSR transformados por  $\sqrt{x}$ ; MSN transformados por  $x^{-9}+1$ ; NN transformados por  $\sqrt{x} +1$ ; ER transformados por  $x^{0,3}$ ; GR transformados por  $x^{0,4}$ . Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Ainda, os menores valores de MSN foram encontrados em Serra Talhada (Tabela 10) isto pode estar relacionado com as diferentes condições ambientais dos municípios estudados e sua influência na população rizobiana pois a nodulação sofre alterações conforme as espécies de rizóbios e plantas e do ambiente (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

## 5. CONCLUSÕES

O feijão-caupi foi eficiente na avaliação da diversidade rizobiana em amostras de diferentes solos de Pernambuco podendo ser utilizado para estudos da biodiversidade em outros solos desta região.

Houve diferença na população rizobiana quanto aos municípios de origem, onde em Bom Jardim o Luvissole apresentou maior diversidade e em Serra Talhada o Argissolo Vermelho Amarelo apresentou maior diversidade.

Os Luvissoles dentre os demais solos se destacaram com maior diversidade e maior MSPA e NN no caupi.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AB'SABER, A. N. (1970). Províncias geológicas e domínios morfoclimáticos no Brasil. **Geomorfologia** 20:1-25.
- ALMEIDA, A. L. G.; ALCÂNTARA, R. M. C. M.; NÓBREGA, R. S. A.; LEITE, L. F. C.; SILVA, J. A. L.; NÓBREGA, J. C. A. (2010). Produtividade do feijão-caupi cv BR 17 Gurguéia inoculado com bactérias diazotróficas simbióticas no Piauí. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias** 5(3):364-366.
- ANDRADE JÚNIOR, A. S.; BARROS, A. H.C.; SILVA, C. O.; FILHO, F. R. F. (2007) Zoneamento de risco climático para a cultura do feijão-caupi no Estado do Ceará. **Revista Ciência Agronômica** 38(1):109-117.
- ANDREOTE, F. D.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. (2009) Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**. 40:417-432.
- ANTUNES, J.E.L.; GOMES, R.L.F.; LOPES, A.C.A ; ARAÚJO, A.S.F.; LYRA, M.C.C.P.; FIGUEIREDO, M.V.B. (2011) Eficiência simbiótica de isolados de rizóbio noduladores de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). **R. Bras. Ci. Solo**, 35:751-757,
- ASSMANN, A.L., PELISSARI, A.; MORAES, A.D.; ASSMANN, T. S.; OLIVEIRA, E.B.D.; SANDINI, I. (2004). Produção de gado de corte e acúmulo de matéria seca em sistema de integração lavoura-pecuária em presença e ausência de trevo-branco e nitrogênio. **Rev. Bras. Zoot.** 33:37-44.
- BARBOSA, D.V.N.; (2000). Os impactos da seca de 1993 no Semi-Árido Baiano: caso de Irecê. Salvador: SEI. Série estudos e pesquisas.
- BARELLA, A. P. W.; KARSBURG, I. V. (2007). Caracterização morfológica dos cromossomos mitóticos de *Parkia pendula* (Willd.) Benth ex Walp. e *Dinizia excelsa* Ducke( Fabaceae, Mimosoideae). **Revista de Ciências Agro-Ambientais** 5(1):85-93, .

- BARRETO, G.P.; LIRA, M.A.; SANTOS, M.V.F.; DUBEUX JÚNIOR, J.C.B. (2001). Avaliação de clones de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) e de um híbrido com o milheto (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) submetidos a estresse hídrico. 1. Parâmetros morfológicos. **Revista Brasileira de Zootecnia** 30(1):1-6,.
- BEGON, M.; HARPER, J. L.; TOWNSEND, C. R. (1996). Ecology: individuals, populations and communities. Oxford: Blackwell Science,
- BROCKWELL, J.; HELY, F. W.; NEAL-SMITH, C. A. (1966). Some symbiotic characteristics of rhizobia responsible for spontaneous, effective field nodulation of *Lotus hispidus*. **Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry** 6:365-370.
- BRUNEL, E.; CANCELA DA FONSECA, J. P. (1979). Vie de la société. Concept de La diversité dans les écosystemes complexes. (Table ronde tenue à l'ocasion Du colloque sur les écosystemse bocagers à Rennes en 1976). **Bull. Ecol.** 10(2): 147-163.
- BUSH, A O.; LAFFERTY, K. D.; LOTZ, J. M.; SHOSTAK, A W. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. **Journal of Parasitology** 84: 575-583.
- CAMPO, R. J.; WOOD, M. (2001). Residual effects of successive exposure of soybean Bradyrhizobium strains to aluminum on solid defined medium. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 36(11)1399-1407.
- CASTELETI, C.H., SILVA, J.M.C.; TABARELLI, M.; SANTOS, A.M.M. (2000). Quanto ainda resta da Caatinga? Uma estimativa preliminar. Disponível em: [www.biodiversitas.org.br/caatinga/relatorios/quanto\\_resta.pdf](http://www.biodiversitas.org.br/caatinga/relatorios/quanto_resta.pdf). Acesso em: janeiro 2012.
- CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N.; WILLERDING, A. L. (2009) Efetividade de rizóbios e caracterização fenotípica dos isolados

que nodulam feijão-caupi em solos da Amazônia Central. **Acta Amaz.** 39(3):489-494.

COLLARD, A. L.; BURTE, J.; JACOBI, P. (2010) Os modos de gestão da água no semiárido cearense: a relação dos pequenos produtores com a técnica agrícola e doméstica. In: V encontro da ANPPAS - Associação Nacional de Pós-Graduação e Pesquisa em Ambiente e Sociedade, 2010, Florianópolis. Anais do V encontro da ANPPAS .

COUTINHO, H. L. C.; OLIVEIRA, V. M.; LOVATO, A.; MAIA, A. H. N.; MANFIO, G. P. (1999). Evaluation of the diversity of rhizobia in Brazilian agricultural soils cultivated with soybeans. **Applied soil Ecology** [S.I.] 13(2): 159-167.

DAGET, J. (1976). Les modèles mathématiques en écologie. **Masson, Paris.** 172 p.

DAJOZ, R. (2005) Princípios de ecologia. Porto Alegre: **Ed. Artmed**

DOBEREINER, J. (1984). Nodulação e fixação de nitrogênio em leguminosas florestais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 19:83-90.

EMBRAPA MEIO-NORTE. Cultivo de feijão caupi. Teresina, Julho 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoCaupi/importancia.htm>>. Acesso em: janeiro 2012.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA (2007). Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Sistema Brasileiro de classificação de solos. Brasília: EMBRAPA. 412 p.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA (2006). Sistema brasileiro de classificação de solos. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 2ed. 306p.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA (1999). Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Brasília: EMBRAPA. 370p

- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA (1997). Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Manual de métodos de análise de solo. Rio de Janeiro: EMBRAPA. 212p.
- FRANCO, A. A.; BALIEIRO, F. C. (2000). The role of biological nitrogen fixation in land reclamation. Agroecology and Sustainability of Tropical Agriculture., Seropédica: EMBRAPA – CNPDS. 223p.
- HAMMER , HARPER D. A. T.; RYAN P. D. (2001). PAST: Palaeontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontological Electron** 4: 9p.
- HELTSHE, J. F.; FORRESTER, N. E. (1983). Estimating species richness using the jackknife procedure. **Biometrics**, 39:1-11.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. Berkeley: **California Agricultural Experiment Station**.
- HUNGRIA, M. Coleta de nódulos e isolamento de rizóbios (1994). In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. (Ed.). Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Brasília: EMBRAPA. p 45-62.
- HUNGRIA, M.; BOHRER, T.R.J. Variability of nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean cultivars. **Biology and Fertility of Soils** 31, p.45-52, 2000.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. (2000) Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research*, 65(2-3) p. 151-164.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. (2004). Mapa de Vegetação do Brasil. Disponível em: [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Acesso 26 março 2012.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Manual técnico em pedologia (2007). Manuais técnicos em geociências. Rio de Janeiro: IBGE. 2ªed. nº 4.

- KAHINDI, J.H.P.; WOOMER, P.; GEORGE, T.; MOREIRA, F.M.S.; KARANJA, N.K.; GILLER, K.E. (1997). Agricultural intensification, soil biodiversity and ecosystem function in the tropics: the role of nitrogen-fixing bacteria. **Applied Soil Ecology**, 6(1):55-76.
- KAWAI, F.; ZHANG, D.; SUGIMOTO, M. (2000). Isolation and characterization of acid and Altolerant microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, 189: 143-147.
- KIM, J.; REES, D.C. (1994). Nitrogenase and Biological Nitrogen Fixation. *Biochemistry*, New York, 33:389-397.
- KREBS, C.J. (1989) *Ecological Methodology*. Harper e Row, New York.
- INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE PERNAMBUCO. **LAMEPE**: banco de dados pluviométricos dos municípios Bom Jardim e Serra Talhadas. Disponível em: <<http://www.itep.br>>. Acesso em: maio 2012.
- LEAL, I.R.S.; TABARELLI, M.; LACHER JR., T.E. (2005) Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. *Megadiversidade*, 1(1)139-146.
- LEWIS G, SCHRIRE B, MACKINDER B, LOCK M, eds. 2005. Legumes of the world. London: **Royal Botanic Gardens** Kew.
- LIMA, A. S.; (2009) Caracterização e seleção de rizóbios de mucuna.Seropédica. Universidade Federal Ruaral do Rio de Janeiro. 79f. (dissertação de mestrado).
- LIMA, A. S.; NÓBREGA, R. S. A.; BARBERI, A.; SILVA, K.; FERREIRA, D. F.; MOREIRA, F. M. S. (2009). Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum* ). **Plant and Soil** [S.I.]. 319(1)127-145.
- MARGALEF, R. (1983). *Limnologia*. Barcelona: Omega.

- MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; RANGEL, F. W.; RIBEIRO, J. R. A.; NEVES, M. C. P.; MORGADO, L. B.; RUMJANEK, N. G. (2003). Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, 38:333–339.
- MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. (1997). Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry** [S.l.]. 29(5/6):1005-1010,
- MEDEIROS, E. V.; MARTINS, C. M.; LIMA, J. A. M.; FERNANDES, Y. T. D.; OLIVEIRA, V. R.; BORGES, W. L. (2009). Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do Estado do Rio Grande do Norte. **Acta Scientiarum. Agronomy**, 31(3):529-535,
- MENDONÇA, E. H. M.; SCHIAVINATO, M. A. (2005). Growth of *Crotalaria juncea* L. supplied with mineral nitrogen. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 48(2):181-185.
- MENEZES, R.S.C.; SAMPAIO, E.V.S.B. (2000) Agricultura sustentável no Semi-Árido nordestino. In: OLIVEIRA, T.S.; ROMERO, R.E.; ASSIS JÚNIOR, R.N.; SILVA, J.R.C.S. (Ed.). Agricultura, sustentabilidade e o Semi-Árido. Fortaleza: **SBCS**: UFC-DCS, p. 20-46.
- MMA (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE). SBF (Secretaria de biodiversidade e Florestas). **DCBio** (DEPARTAMENTO DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE). 2012. MMA, SBF, DCBio, Brasília. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/sitio/index.php?ido=conteudo.monta&idEstrutura=203&idConteudo=8990&idMenu=12114>>. Acesso em: março 2012.
- MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL – MI. (2005). Brasília: Secretaria de Políticas de Desenvolvimento Regional.

- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. (2006). Microbiologia e Bioquímica do solo. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 1:729.
- MOREIRA, F. M. S. Bacterias fixadoras de nitrogênio que nodulam Leguminosae (2008). In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (Ed.). Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros. Lavras: UFLA. p621-680.
- NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. (1997). Diversity and adaptability of soybean and cowpea rhizobia in tropical soils. *Soil Biology and Biochemistry*.29:889-895.
- NOGUEIRA, C.O.N. (2005). Eficiência agrônômica de Rizóbios selecionados e diversidade das populações nativas que Nodulam o feijoeiro-comum em Formiga- MG. Lavras: Universidade Federal de Lavras (Tese de Mestrado)
- NYFELER, D. (2011) Grass-legume mixtures can yield more nitrogen than legume pure stands due to mutual stimulation of nitrogen uptake from symbiotic and non-symbiotic sources. *Agriculture, Ecosystems and Environment*.140: 155-163.
- OBATON M. (1999). Facteurs pédoclimatiques limitant la fixation biologique de l'azote chez les légumineuses. In: Mulongoy K., Gueye M. and Spencer DSC (eds) Biological nitrogen fixation and sustainability of tropical agriculture. IITA. p 57-66.
- OLIVEIRA, L.B.; FONTES, M.P.F.; RIBEIRO, M.R.; KER, J.C. (2008). Micromorfologia e gênese de luvisolos e planossolos desenvolvidos de rochas metamórficas no semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. 32(6)2407-2423.
- PELCZAR, J. R.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N.R. (1997). Microbiologia do Solo e do Ar. In: Pelczar, J. R.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Microbiologia: Conceitos e aplicações. Makron Books do Brasil Ed.LTDA. 2:306-336.

- PIELOU, E. C. (1977). *Mathematical ecology*. Wiley, New York. 385p.
- PROSSER, J.I.; BOHANNAN, B.J.M.; CURTIS, T.P.; ELLIS, R.J.; FIRESTONE, M.K.; FRECKLETON, R.P.; GREEN, J.L.; GREEN, L.E.; KILLHAM, K.; LENNON, J.J.; OSBORN, A.M.; SOLAN, M.; VAN DER GAST, C.J.; YOUNG, J.P.W. (2007). Essay - The role of ecological theory in microbial ecology. **Nat.Rev. Microbiol.** 5 (5), p 384-392.
- QUEIROZ, L.P. (2009). *Leguminosas da caatinga*. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana; Kew, **Royal Botanic Gardens**; Associação Plantas do Nordeste, 467p.
- RICKLEFS, R. E. (2003). *A economia da natureza*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 2003.
- ROCHON J. J.; DOYLE, C. J.; GREEF, J. M.; HOPKINS, A.; MOLLE, G.; SITZIA, M.; SCHOLEFIELD, D.; SMITH, C. J. (2004). Grazing legumes in Europe: a review of their status management, benefits, research needs and future prospects. **Grass Forage Science**. 59:197-214,
- Royal Botanic Gardens, Kew. Scientific Reserch & data, Science Directory. Teams. Leguminosae. Disponível em: <<http://www.kew.org/science-research-data/directory/teams/leguminosae/>> Acesso em : 26 março 2012. 14:42horas.
- RUSSELLE M.P (2001). Alfalfa rapidly remediates excess inorganic nitrogen at a fertilizer spill site. **Journal of Environmental Quality**. 30:30-36.
- RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P. (2005) Fixação biológica de nitrogênio. In: Freire Filho, F. R.; Lima, J. A. A.; Ribeiro, V. Q. (ed.). *Feijão-caupi: Avanços tecnológicos*. Brasília: Embrapa, 8:279-335.
- SALEENA, L. M.; LOGANATHAN, P.; RANGARAJAN, S; NAIR, S. (2001) Genetic diversity and relationship between Bradyrhizobium strains

- isolated from blackgram and cowpea. **Biology and Fertility of Soils**. 34(4) 276-281.
- SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C. P.; RUNJANEK, N. G.; BORGES, W. L.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. S. (2007). Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias** [S.I.]. 2(4): 249-256,
- SANGINGA, N.; MULONGOY. K.; SWIFT, M.J. (1992). Contribution of soil organisms to the sustainability and productive systems in the tropics. *Agriculture, Ecosystem and Environment*. 41:135-152.
- SANTOS, T. E. M.; MONTENEGRO, A. A. A.; SILVA JUNIOR, V. P. (2008) Erosão hídrica e perda de carbono orgânico em diferentes tipos de cobertura do solo no semiárido, em condições de chuva simulada. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**.13:113-125.
- SANTOS, C.E.R.S.; STAMFORD, N.P.; BORGES, W.L.; NEVES, M.C.P.; RUNJANEK, N.G.; NASCIMENTO, L.R.S.; FREITAS, A.D.S.; VIEIRA, I.M.M.B.; BEZERRA, R.V. (2007). Faixa hospedeira de rizóbios isolados das espécies *Arachis hypogaea*, *Stylosanthes guyanensis* e *Aeschynomene americana*. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*. 2(1) 20-27.
- SAS INSTITUTE INC. (1999). The SAS System for Windows. Cary: SAS Institute Inc,1999.
- SIMON, M.V. (2002). Uso de Marcadores Moleculares em *Phaseolus vulgaris*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- SOARES, A.L.L.; FERREIRA, P.A.A.; PEREIRA, J.P.A.R.; VALE, H.M.M.; LIMA, A.S.; ANDRADE, M.J.B. & MOREIRA, F.M.S. (2006) Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). II – Feijoeiro. **R. Bras. Ci. Solo**, 30:803-811.

- SOUZA, R.A.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; MACIEL, C.D.; CAMPO, R.J. & ZAIA, D.A.M. (2008). Conjunto mínimo de parâmetros para avaliação da microbiota do solo e da fixação biológica do nitrogênio pela soja. **Pesq. Agropec. Bras.**, 43:83-91
- SEBBANE, N.; SAHNOUNE, M.; ZAKHIA, F.; WILLEMS, A.; BENALLAOUA, S.; LAJUDIE, P. (2006). Phenotypical and genotypical characteristics of root-nodulating bacteria isolated from annual *Medicago* spp. in Soummam Valley (Algeria). **Letters in Applied Microbiology** [S.I.]. 42(3):235-241.
- SHANNON, C.E.; WEAVER, W. (1949). The mathematical theory of communication. Urbana: **University of Illinois Press**, 1949.
- SILVA, F.B.R.; SANTOS, J.C.P.; SILVA, A.B.; CAVALCANTI, A.C.V.; SILVA, F.H.B.B.; BURGOS, N.; PARAHYBA, R.B.V.; OLIVEIRA NETO, M.B.; SOUZA NETO, N.C.; ARAÚJO FILHO, J.C.; LOPES, O.F.; LUZ, L.R.Q.P.; LEITE, A.P.; SOUZA, L.G. M.C.; SILVA, C.P.; VAREJÃO SILVA, M.A. & BARROS, A.H.C. (2001). Zoneamento Agroecológico do Estado de Pernambuco - ZAPE. Recife, Embrapa Solos/Governo do Estado de Pernambuco - Secretaria de Produção Rural e Reforma Agrária. CD-ROM.
- SILVA, J. S.; SALES, M. F.; GOMES, A. P. S. CARNEIRO TORRES, D. S. (2010). Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta bot. bras.** 24(2): 441-453.
- SIMPSON, E.H. (1949). **Measurement of diversity**. *Nature* 163: 688.
- SOARES, G. L. G.; SCALON, V. R.; PEREIRA, T. O.; VIEIRA, D. A. (2002). Potencial alelopático do extrato aquoso de folhas de algumas leguminosas arbóreas brasileiras. **Floresta e Ambiente** [S.I.] 9:119-126.
- TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. (2003). Áreas e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da caatinga. In: LEAL, I.R.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C.(Eds) **Ecologia e Conservação da caatinga**. Recife, Editora Universitária. 777-796 p.

- TABARELLI, M.; SANTOS, A.M.M. Uma breve descrição sobre a história natural dos brejos nordestinos (2004). In: PORTO, K.C.; CABRAL, J.J.P. & TABARELLI, M., orgs. Brejos de altitude em Pernambuco e Paraíba; História natural, ecologia e conservação. Brasília, **Ministério do Meio Ambiente**, p.227-284.
- THORNTHWAITE, C.W.; HOLZMAN, B. (1941). Evaporation and transpiration. In: *Climate and Man: Yearbook of Agriculture*. Washington: U.S. Department of Agriculture, 545-550 p.
- VINCENT, J. M. A.; (1970). *Manual for the practical study of root-nodule bacteria*. Oxford: Blackwell.
- ZAR J.H.(1999). *Biostatistical Analysis*. 4th edition. Prentice Hill. 1999.
- ZHANG, F., JENKINS, D., SHORT, S.M., AND STEWART, G.F. (2003). Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology** 5: 539-554.
- ZHANG, W. T.; YANG, J. K.; YUAN, T. Y.; ZHOU, J. C. (2007). Genetic diversity and phylogeny of indigenous rhizobia from cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Biology and Fertility of Soils**. 44(1):201-210,
- ZILLI, J. E.; VALICHESKI, R. R.; RUMJANEK, N. G.; SIMOES-ARAÚJO, J. L.; FREIRE, F. R.; NEVES, M. C. P. (2006). Symbiotic efficiency of cowpea Bradyrhizobium strains in Cerrado soils. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 41(5)811-818,
- ZILLI, J. E.; VALISHESKI, R. R.; FREIRE, F. R.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. (2004). Assessment of cowpea rhizobium diversity in Cerrado areas of Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**35(4) p. 281-287
- ZILLI, J.E. (2001). Caracterização e seleção de estirpes de rizóbio para a inoculação de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) em áreas de Cerrado.

Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 112p.  
(Dissertação de Mestrado)

XAVIER, G.R.; MARTINS, L.M.; RUNJANEK, N.G. & NEVES, M.C.P. (2007).  
Tolerância de rizóbio de feijão-caupi à salinidade e à temperatura em  
condição in vitro. **Caatinga**. 20:1-9.

WALKER, D. (1989). Diversity and stability. In: EDWARDS, C.A., ed. Ecological  
concepts. Oxford, **Blackwell Scientific Public**, p.115-146.

WILLEMS, A. (2006). The taxonomy of rhizobia: an overview. **Plant and Soil**.  
287:3-14.