

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical

**EFEITO DA INOCULAÇÃO COM RIZÓBIO E DE
SUBSTRATOS NO CRESCIMENTO E NO TEOR DE
PROTEÍNA BRUTA EM *Discolobium* sp.**

FRANK EDUARDO FERREIRA DE SOUZA

Biólogo

Orientador: Prof.^o Dr. FRANCISCO DE ALMEIDA LOBO

Co-Orientadora: Prof.^a Dra. MARIA DE FÁTIMA LOUREIRO

Dissertação apresentada à Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária da
Universidade Federal de Mato Grosso,
para obtenção do título de Mestre em
Agricultura Tropical.

Cuiabá – Mato Grosso

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte

S729i. Souza, Frank Eduardo Ferreira de
Efeito da inoculação com rizóbio e de substratos no crescimento e no teor de proteína bruta em *Discolobium* sp. / por Frank Eduardo Ferreira de Souza. – Cuiabá, 2007.
63 p. ; il. color.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Pós-Graduação em Agricultura Tropical, 2007.
1. *Discolobium* sp. – Fixação biológica de nitrogênio 2. Leguminosa - Pantanal mato-grossense I. Título
CDU 631.52

Permitida a reprodução total ou parcial desde que citada a fonte

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: EFEITO DA INOCULAÇÃO COM RIZÓBIO E DE SUBSTRATOS NO
TEOR DE PROTEÍNA BRUTA EM *Discolobium* sp.

Autor: FRANK EDUARDO FERREIRA DE SOUZA

Orientador: Dr. FRANCISCO DE ALMEIDA LOBO

Co-Orientadora: Dra. MARIA DE FÁTIMA LOUREIRO

Aprovada em 13 de dezembro de 2007.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Francisco de Almeida Lobo
(FAMEV/UFMT, Orientador)

Prof^a. Dra. Maria de Fátima Loureiro
(FAMEV/UFMT, Co-Orientadora)

Prof. Dr. Alúcio Brígido Borba Filho
(FAMEV/UFMT, Membro Interno)

Prof^a. Dra. Carmen Eugenia
Rodríguez Ortíz
(IB/UFMT, Membro Externo)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe Alaurides Ferreira por sempre incentivar tudo que faço.

À minha esposa Elizangela, pelo carinho e dedicação.

À minha filha Ana Clara, um presente divino.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical, pela oportunidade a mim concedida para realizar o curso de mestrado.

À Secretaria de Estado de Educação de Mato Grosso (SEDUC), pela licença concedida para a minha qualificação profissional.

Ao Assessor Pedagógico de Várzea Grande José Gonçalo Filho, por sempre atender as minhas solicitações referentes a qualificação profissional.

À Direção, Coordenação, Professores e Funcionários da Escola Estadual do Ensino Fundamental e Médio Deputado Ubaldo Monteiro da Silva.

Ao Prof^o Dr. Francisco de Almeida Lobo, pela orientação.

À Prof^a Dra. Maria de Fátima Loureiro, pela orientação e compressão durante os trabalhos de Laboratório.

Ao Eng. Agrônomo e aluno do Doutorado em Agricultura Tropical Nicolau Elias Neto pela sugestões, crítica e colaboração na condução dos trabalhos de campo e laboratório.

Aos professores Dr. Aluísio Brígido Borba Filho e Dra. Carmen Eugenia Rodríguez Ortíz pelas críticas e sugestões na elaboração dessa dissertação.

Aos colegas do Programa de Pós Graduação em Agricultura Tropical Osvaldo, Paulino, Lízia, Gisele, Tatiane, Léo, Janaina, Roseyane, Renata, Josias, James, Sandra e Marcelo.

Aos amigos (as) de trabalho Athair Tavares, Alzira, Miriam, Adjanira, Izabel Vitalino, Marlene Padilha, Gerson, Gonçalina Vitalino, Gonçalina Rondon, Reginaldo Medeiros, Ronaldo Medeiros e Wériston Dutra pelo apoio dado antes e durante o curso.

Aos Técnicos (as) dos Laboratórios e do viveiro da FAMEV, por sempre me atenderem quando precisei.

Às estagiárias do Laboratórios de Microbiologia do solo pela ajuda recebida durante a execução dos trabalhos.

Às secretárias Denise e Maria que sempre fizeram um atendimento de amizade.

Ao meu irmão Paulo Roberto pela ajuda e sugestão e a todos da minha família, que sempre me incentivaram.

EFEITO DA INOCULAÇÃO COM RIZÓBIO E DE SUBSTRATOS NO CRESCIMENTO E NO TEOR DE PROTEÍNA BRUTA EM *Discolobium* sp.

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi o de avaliar o efeito de diferentes substratos e da relação simbiótica de *Rhizobium* sp. com o *Discolobium* sp. sobre o crescimento e a produção de proteína nessa planta. O experimento foi desenvolvido em condições semi-controladas em um viveiro da Universidade Federal de Mato Grosso. As hipóteses testadas foram: (a) o efeito da inoculação das plantas de *Discolobium* com estirpes de *Rhizobium* sobre a nodulação é dependente do tipo de solo empregado como substrato de cultivo, (b) as plantas inoculadas apresentam maior crescimento (altura e acúmulo de matéria seca) que as plantas não inoculadas e (c) as plantas inoculadas apresentam maior teor de proteína bruta em seus órgãos que as não inoculadas. De uma maneira geral, os resultados deste trabalho não permitiram identificar qualquer efeito positivo da inoculação, do substrato de cultivo e da interação entre esses dois fatores sobre o crescimento e o teor protéico das plantas. Somente para o teor de proteína bruta nas folhas verificou-se o efeito significativo da interação entre a inoculação e o substrato de cultivo, contudo, o teste de médias não discriminou os diferentes tratamentos para essa variável. Em geral os isolados dos nódulos das plantas apresentaram reação ácida mais expressiva do que básica ou neutra.

Palavras-chave: Pantanal Mato-Grossense, fixação biológica do nitrogênio, leguminosa.

EFFECT OF *RIZHOBIIUM* INOCULATION AND SUBSTRATE ON GROWTH AND GROSS PROTEIN CONTENT IN *Discolobium* sp.

ABSTRACT – The aim of this experiment was to evaluate the effect of different substrates and the symbiotic relationship between *Rhizobium* sp. and *Discolobium* sp. on growth and gross protein content in that plant. The experiment was carried out in a greenhouse with semi-controlled conditions at the Universidade Federal de Mato Grosso. The tested hypotheses were: (a) the effect of plant inoculation with *Rhizobium* strains on the nodulation is dependent on the substrate, (b) inoculated plants present higher growth (height and dry matter) than non-inoculated plants, and (c) inoculated plants present higher gross protein content in their organs than non-inoculated ones. In a general way, the results of this work didn't allow to identify any positive effect of inoculation, substrate or the interaction between those two factors on the growth and gross protein content of the plants. Only for leaves gross protein content it was found a significant effect of the interaction between inoculation and substrate, however, the means test didn't discriminate among treatments. In general the plant nodule isolated presented a more expressive acid reaction than a basic or a neutral reaction.

Keywords: Pantanal Mato-Grossense, nitrogen biological fixation, legumes.

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1- Sub-Regiões do Pantanal Mato-Grossense (segundo Adámolli, 2000).....18

Figura 2- Modelos de regressão linear para a dinâmica do crescimento em altura de plantas de *Discolobium* sp. cultivadas em solo do Pantanal e inoculadas (A), em solo do Pantanal e não inoculadas (B), em terra preta e inoculadas (C) e em terra preta e não inoculadas (D).....36

Figura 3- Produção de matéria seca da raiz (A), do caule (B), da folha (C) e total (D) em plantas de *Discolobium* sp. cultivadas em solo do Pantanal e inoculadas (SP-I), em solo do Pantanal e não inoculadas (SP-NI), em terra preta e inoculadas (STP-I) e em terra preta e não inoculadas (STP-NI).....40

Figura 4- Teor de proteína bruta na raiz (A), no caule (B) e na folha (C) em plantas de *Discolobium* sp. cultivadas em solo do Pantanal e inoculadas (SP-I), em solo do Pantanal e não inoculadas (SP-NI), em terra preta e inoculadas (STP-I) e em terra preta e não inoculadas (STP-NI).....42

Figura A1- Modelos de regressão linear para as variações diárias do pH da água de inundação em plantas de *Discolobium* sp. cultivadas em solo do Pantanal e inoculadas (A), em solo do Pantanal e não inoculadas (B), em terra preta e inoculadas (C) e em terra preta e não inoculadas (D).....59

Figura A2- Modelos de regressão linear para as variações diárias da condutividade elétrica da água de inundação em plantas de *Discolobium* sp. cultivadas em solo do Pantanal e inoculadas (A), em solo do Pantanal e não inoculadas (B), em terra preta e inoculadas (C) e em terra preta e não inoculadas (D).....61

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1- Equivalência entre o sistema fisionômico-ecológico do IBGE (1992) e as denominações regionais.....21

Tabela 2- Resultados das análises físico-químicas dos solos utilizados como substrato.....37

Tabela 3- Número de nódulos, número de isolados de rizóbio e alteração do pH do meio YMA por isolados de nódulos de raiz e caule de *Discolobium* sp. cultivado em vaso com dois tipos de substratos (solo do Pantanal e terra preta).....45

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Bioma Pantanal.....	17
2.1.1 Localização.....	17
2.1.2 Fisiografia.....	19
2.1.3 Solos.....	19
2.1.4 Clima.....	19
2.1.5 Geomorfologia e Hidrografia.....	20
2.1.6 Vegetação.....	20
2.2 Caracterização do gênero <i>Discolobium</i>.....	21
2.2.1 Importância econômica e ecológica.....	22
2.2.2 Etapas do desenvolvimento da planta e hábitos de crescimento.....	22
2.3 O nitrogênio nas plantas.....	23
2.4 Fixação biológica do nitrogênio (FBN) por leguminosas.....	24
2.4.1 Caracterização do grupo rizóbio.....	26
2.4.2 Formação de nódulos em leguminosas.....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Coleta de plantas e de solo para substrato.....	31

3.2 Local do experimento, condições de cultivo e delineamento experimental.....	31
3.3 Inoculação do rizóbio em <i>Discolobium</i> sp.....	32
3.4 Análise de crescimento das plantas.....	33
3.4.1 Altura das plantas.....	33
3.4.2 Matéria seca das plantas.....	33
3.5 Teor de proteína bruta das plantas.....	34
3.6 Isolamento das bactérias dos nódulos das plantas.....	35
3.7 Análise físico-química da água de inundação.....	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1 Análise de crescimento das plantas.....	36
4.1.1 Altura das plantas.....	36
4.1.2 Matéria seca das plantas.....	39
4.2 Teores de proteína bruta das plantas.....	41
4.3 Número de nódulos encontrados nas plantas.....	43
4.4 Números de isolados obtidos dos nódulos das plantas.....	45
5 CONCLUSÕES.....	47

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
APÊNDICE A- Características dos parâmetros físico-químicos da água.....	58
APÊNDICE B- Equipamentos.....	62
APÊNDICE C- Reagentes e soluções.....	63

1 INTRODUÇÃO

Dentre aproximadamente 19.000 espécies da família Leguminosae, ainda existe carência de informações sobre a capacidade de espécies dessa família em nodular, ou seja, de estabelecer simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico (N₂), sobretudo as espécies florestais tropicais (Allen e Allen, 1981).

As leguminosas que fixam nitrogênio através da simbiose com bactérias conhecidas por "rizóbio" (gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium*), são importantes dos pontos de vista econômico e ecológico, pois podem dispensar total ou parcialmente os fertilizantes nitrogenados, contribuindo assim para viabilizar reflorestamentos e minimizar possíveis impactos ambientais decorrentes da utilização destes insumos (Barbieri et al., 1998; Ferreira, 2000; Barrientos et al. 2002; Okito et al., 2002; Scivittaroi et al., 2004).

No Pantanal os recursos forrageiros constituem a principal fonte de alimentos para os grandes herbívoros silvestres e domésticos. E pouco se sabe como esses recursos são usados ao longo dos meses e dos anos (Scheffer-Basso et al., 2001; Santos et al., 2002).

As espécies de leguminosas forrageiras fixadoras de nitrogênio se apresentam como uma alternativa para os solos pobres e sujeitos a inundação no Pantanal, porém estresses ocasionados por altas temperaturas e salinidade podem interferir no processo de nodulação (Martins et al., 2001).

Além disso, o enriquecimento das pastagens com estas espécies leguminosas, associadas à estirpe de *Rhizobium* comprovadamente

eficientes, poderá beneficiar o crescimento das gramíneas, sendo mais apropriado ao Pantanal do que a simples aplicação de adubos nitrogenados, já que o regime hídrico da região compromete a eficácia do emprego de fertilizantes minerais, devido à facilidade de sua diluição, carreamento e lixiviação (Martins et al., 2001).

Desta forma é necessário gerar conhecimentos através de pesquisas com plantas nativas como é o caso da *Discolobium* sp. que é uma importante fonte de alimento, tanto para os animais silvestres como bovinos. A espécie apresenta um real potencial econômico que precisa ser pesquisado, de forma a compreender os aspectos da simbiose com bactérias na fixação de nitrogênio atmosférico (N₂). Tudo isso incrementaria sua utilização como forrageira na criação de bovinos, aproveitando ainda mais seu alto teor de proteína bruta. Assim, o objetivo desse trabalho foi verificar o efeito da inoculação com rizóbios em *Discolobium* sp. avaliando o sucesso da simbiose no aumento de proteína bruta e de matéria seca e verificando se há algum efeito do tipo de solo no processo de nodulação.

As hipóteses elaboradas foram: (a) o efeito da inoculação das plantas de *Discolobium* com estirpes de *Rhizobium* sobre a nodulação é dependente do tipo de solo empregado como substrato de cultivo, (b) as plantas inoculadas apresentam maior crescimento (altura e acúmulo de matéria seca) que as plantas não inoculadas, (c) as plantas inoculadas apresentam maior teor de proteína bruta em seus órgãos que as não inoculadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bioma Pantanal

2.1.1 Localização

O Pantanal é uma planície sedimentar (138.000 km²), formada no período quaternário, preenchida com depósitos aluviais dos rios da Bacia do Alto Paraguai (BAP). A baixa declividade dificulta o escoamento das águas e, em combinação com mesorelevo, determina o aparecimento de ambientes característicos associados à vegetação em mosaico, como as “cordilheiras” (antigos diques fluviais), com vegetação arbórea mais densa. A vegetação incorpora também elementos das províncias fitogeográficas adjacentes (Adámoli, 1982; Brasil, 1997; Silva e Abdon, 1998). Os rios tributários correm de Leste a Oeste. Estende-se desde os 16°S até os 21°S, o equivalente a pouco menos que 600 km em linha reta (Figura 1).

Possui uma largura máxima de 380 km sobre o paralelo de 17°S, entre os meridianos de 55°W e 58°30'W. Apresenta unidades distintas em sua paisagem: áreas permanentemente alagadas, áreas eventualmente alagáveis e áreas periodicamente alagáveis (Nogueira et al., 2002).

Segundo Junk e Silva (1999) a fonte de inundação é muito importante para muitos aspectos ecológicos nas áreas sob alagamento, tais como diversidade de organismos e estado nutricional do solo. Uma das características que definem a composição das comunidades de organismos que colonizam áreas inundadas e os processos biológicos no solo seria o estresse causado ora pela falta de água (seca), ora pela enchente devido à cheia dos rios.

O conhecimento dos campos inundáveis do Pantanal de Mato Grosso é um dado fundamental no sentido da exploração sócio – econômica, visando o desenvolvimento sustentável e a conservação do Pantanal.

Entre os recursos naturais existentes no Pantanal e em toda a Bacia do Alto Paraguai (BAP) está a vegetação, tornando essa região importante fonte de germoplasma de plantas de interesse econômico e de grande diversidade florística, com endemismos, logo, de grande interesse para conservação. Estudos mais recentes têm descoberto novas plantas ainda não citadas para a região e até algumas novas para a ciência (Brasil, 1997; Schwenk e Silva, 2000).

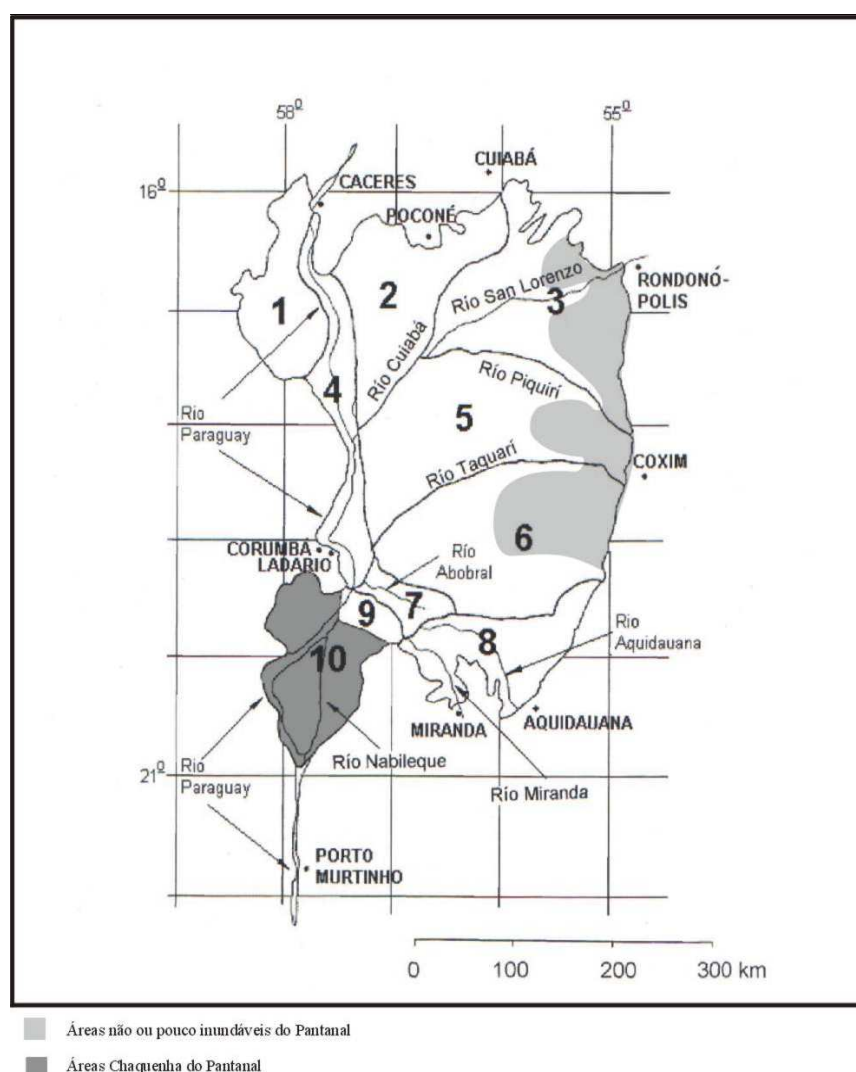


Figura 1- Sub-regiões do Pantanal Mato-Grossense (segundo Adámolli, 2000).

- | | |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| 1. Pantanal de Cáceres | 6. Pantanal da Nhecolândia |
| 2. Pantanal de Poconé | 7. Pantanal do Abobral |
| 3. Pantanal de Barão de Melgaço | 8. Pantanal do Aquidauana - Negro |
| 4. Pantanal do Paraguai | 9. Pantanal do Miranda |
| 5. Pantanal dos Paiguás | 10. Pantanal do Nabileque |

2.1.2 Fisiografia

O Pantanal é composto pela interseção de quatro grandes Regiões Fitoecológicas, que regionalmente podem ser conhecidas como Mata Decídua, Mata Semidecídua, Cerrado e Chaco. Além dessas quatro Regiões, em várias porções do Pantanal observa-se a ocorrência de contatos florísticos entre as Regiões Fitoecológicas (Pott e Pott, 1997; Silva e Abdon, 1998).

O relevo do Pantanal é praticamente plano, com declividade quase nula, de apenas citados gradiente topográfico varia de 0,3 a 0,5m/km no sentido leste-oeste e 0,03 a 0,15m/km no sentido norte-sul (Soares et al. , 2006). A menor declividade no sentido norte-sul provoca, a princípio, um barramento no escoamento do rio Paraguai e o conseqüentemente alagamento da área (EMBRAPA, CPAP, 1996).

2.1.3 Solos

Os solos são de origem sedimentar, ocorrendo em fases argilosa e arenosa de forma alternada e descontínua, com a dominância de solos hidromórficos compondo 92,5% do total (Amaral Filho, 1984). Os tipos predominantes são: latossólicos, Latossolo Vermelho-Escuro eutrófico, eutrófico, distrófico; Latossolo Vermelho-Amarelo, eutrófico, álico e endopetroplíntico; Plintossolos endoeutrófico, epiálico, álico; Hidromórficos, Glei Pouco Húmico eutrófico, endopetroplíntico endoálico, álico e Litólicos distrófico, endoálico e álico (Gonzaga et al., 2000).

2.1.4 Clima

O clima é do tipo quente, com o semestre de inverno seco, apresentando um regime de precipitação marcadamente estival, que define o caráter estacional Aw segundo Köppen (David-Garcia,1984). A

pluviosidade oscila entre 800 e 1400 mm/ano, sendo que 80% ocorrem entre os meses de novembro e março.

2.1.5 Geomorfologia e hidrografia

O Pantanal Mato-Grossense é uma planície sedimentar aluvial quaternária (holocênica), parcial e periodicamente alagável em função da sua baixíssima declividade (David-Garcia, 1984), idem onde o sistema de drenagem denso, freqüentemente obstruído por sedimentos aluviais transportados pelas águas, condiciona o aparecimento de ambientes com características próprias, conhecidas popularmente como baías (leitos fósseis segmentados), vazantes (leitos fosseis com escoamento d' água temporário), corixos (leito fósseis com água permanentes) e cordilheira (diques marginais antigos) que favorecem ao desenvolvimento da fauna e flora onde se encontra espécies raras ou em extinção, vegetais e/ou animais (Amaral Filho, 1984).

2.1.6 Vegetação

Há diversas comunidades vegetais com domínio nítido de uma espécie, a qual dá o nome regional. O sistema de classificação da vegetação fundamenta-se em aspectos fisionômicos, florísticos, ecológicos e na combinação destes, utilizando-se denominações regionais. Em estudos anteriores já foram utilizados critérios fitofisionômicos, devido à facilidade para a pronta identificação da vegetação a partir de um avião, associado a uma denominação regional das classes, estabelecendo um paralelo para a classificação da vegetação entre o sistema fisionômico-ecológico (IBGE, 1992), e as denominações regionais utilizadas (Tabela 1).

Tabela 1- Equivalência entre o sistema fisionômico-ecológico do IBGE (1992) e as denominações regionais.

<i>Sistema fisionômico-ecológico</i>	<i>Denominação regional</i>
Floresta semidecídua Aluvial	mata de galeria
Florestal Estacional Semidecidual/ Terras Baixas	mata semidecídua
Savana Florestada	cerradão, babaçual
Savana Arborizada	cerrado
Savana Parque	paratudal, canjiqueiral
Savana gramíneo- lenhosa	campo inundado, campo seco
Savana estépica Florestada	chaco
Savana Estépica Parque	carandazal
Sistema Edáfico de Primeira	buritizal, cambarazal
Ocupação, formações pioneiras- vegetação com influência fluvial e/ou lacustre	Piriza, caetezal, baceiro ou batume, brejo

2.2 Caracterização do gênero *Discolobium*

Segundo Pott e Pott (2004), o gênero possui oito espécies, todas hidrófitas, pertencente à família Leguminosae (Fabaceae), sub-família *Papilionidade*. Os autores ainda descrevem o gênero como sendo plantas de hábito arbustivo ou subarbustivo aquática emergente, perene, geralmente em grupamentos interligados por rizoma, a parte aérea podendo ser renovada na estação chuvosa, de 1,0 a 4,5 m de altura; tem parte basal do caule engrossada (aerênquima) com raízes adventícias na água; as folhas são acinentadas no lado inferior; inflorescência pegajosa; floresce quase o ano todo, mas em geral apresenta poucos frutos (setembro a fevereiro) , logo caem quando maduros.

2.2.1 Importância econômica e ecológica

Loureiro et al. (1994), em trabalhos com *Discolobium* sp. destacam a potencialidade forrageira da leguminosa na dupla fixação de nitrogênio, em nódulos do caule e raiz.

Segundo Pott e Pott (1987), o gênero *Discolobium* é uma excelente forrageira, com cheiro e um teor de proteína bruta de 28%, semelhante ao teor encontrado na alfafa, que é apreciado por cervos, peixes, bovinos e bubalinos. Pacu e capivara roem também o caule (Allem e Valls, 1987). A flor é comida pelos peixes ao cair na água ou pelos que pulam para alcançá-las, (Pott e Pott, 2004).

Outra utilização da planta é seu uso medicinal na região em forma de chá contra hemorragia de útero. E também se apresenta com potencial ornamental (Pott e Pott, 2004).

2.2.2 Etapas do desenvolvimento da planta e hábitos de crescimento

São escassas informações na literatura em relação ao ciclo de desenvolvimento de *Discolobium* sp. Alguns trabalhos em microbiologia do solo com espécies desse gênero, como os de Loureiro (1994), já foram realizados na caracterização dos rizóbios que nodulam o caule e raiz.

Pott e Pott (2004) observaram que a planta tolera de 1 a 4 m de lâmina de inundação e até a submersão por vários meses. É flexível, tolerando as ondas das margens dos grandes alagados, ficando quase sem folhas na cheia.

Elias Neto (2004), caracterizando a fenologia do *Discolobium* sp., verificou que a floração foi um evento marcante e ocorreu na estação chuvosa (fevereiro a abril).

Ainda segundo o autor, a frutificação seguiu-se até abril com fortes declínios de frutos persistentes na planta no início de maio. Ainda segundo o autor, as brotações do ramo principal e secundário não tiveram um desenvolvimento acentuado na seca, ocorrendo uma abscisão parcial das

folhas (julho-agosto), possivelmente a restrição hídrica do período, ocasionando uma redução no crescimento da planta.

2.3 O nitrogênio nas plantas

Cerca de 78% da constituição gasosa da atmosfera é formada por nitrogênio molecular ou dinitrogênio (N_2), sendo também um importante elemento como componente quantitativo da fitomassa, ocupando a quarta posição, após o carbono, o oxigênio e o hidrogênio (Lacher, 2004).

Com a exceção da água, o nitrogênio é geralmente considerado o nutriente mais limitante para o crescimento de plantas no seu ambiente natural (Franco e Döbereiner, 1994).

É constituinte essencial de aminoácidos, proteínas, bases nitrogenadas, ácidos nucleicos, hormônios e clorofila, entre outras moléculas. A maioria das plantas obtém o nitrogênio do solo sob a forma de íon nitrato (NO_3^-), havendo algumas que o absorve sob a forma de íon amônio (NH_4^+) (Power e Peterson, 1998).

O nitrogênio pode ser um nutriente crítico para as plantas porque seu suprimento no solo é limitado e, além disso, ele também é utilizado pelos microrganismos que habitam esse solo. Os organismos eucariontes são incapazes de absorver o N_2 e convertê-lo a uma forma assimilável. Assim, o N_2 move-se para dentro da planta através dos estômatos, saindo logo em seguida, sem que possa ser utilizado (Hungria e Vargas, 2000).

Os átomos encontram-se unidos de uma maneira muito estável na molécula de nitrogênio e por esse motivo para que o N_2 possa ser convertido a uma forma assimilável é necessário o fornecimento de temperatura e pressão muito elevadas (fixação industrial) ou a presença de um sistema enzimático apropriado (fixação biológica).

Em 1913, Haber e Bosch implantaram um processo industrial capaz de converter o N_2 gasoso em amônia. Este processo de fixação química de nitrogênio emprega ferro metálico como catalisador e depende de altas

temperaturas (400-600°C) e pressões (200-600 atm) para combinar N_2 e H_2 produzindo amônia em grande escala (Nunes et al., 2003; Chagas, 2007).

A fixação biológica do N_2 ocorre graças um complexo de duas enzimas, denominado nitrogenase, presente apenas em alguns organismos procariontes. Do ponto de vista energético, ela também é dispendiosa para o organismo que a realiza. No entanto, devido à presença desse sistema enzimático, a reação pode ocorrer à temperatura ambiente e à pressão atmosférica (Kent e Triplett, 2002; Goormachtig et al., 2004).

A literatura existente sobre o assunto aponta com sendo três as principais frações de nitrogênio na planta: N orgânico (amônio e nitrato), N em aminoácidos (aminoácidos, amins e amidas) e N protéico. Entretanto, a maioria dos trabalhos relativos à descrição dessas frações relaciona exclusivamente as proteínas e amins.

E, a justificativa para isso, é de que a planta prioriza o uso de esqueletos ou compostos orgânicos aminoácidos e proteínas, previamente sintetizados para a formação de novos tecido, ao invés de utilizar formas inorgânicas que necessitariam ser incorporadas a essas moléculas; uma vez que a planta busca minimizar gastos energéticos durante a fase de recuperação após desfolha.

2.4 Fixação biológica do nitrogênio (FBN) por leguminosas

A fixação biológica de nitrogênio é caracterizada pela utilização do nitrogênio gasoso da atmosfera (N_2) no metabolismo de um grupo seletivo de seres vivos, que inclui algumas espécies de microrganismos procarióticos. Estes microrganismos possuem o complexo enzimático chamado nitrogenase, necessário para transformar o N_2 em amônia, subseqüentemente assimilada em aminoácidos e proteínas. Alguns desses microrganismos se associam a algumas espécies de plantas criando um sistema mutualista no qual o N_2 fixado pelos microrganismos é trocado com as plantas por fotoassimilados (Neves e Rumjanek, 1998).

As leguminosas herbáceas constituem algumas das plantas mais utilizadas como adubos verdes, embora espécies de outras famílias botânicas também sejam frequentemente utilizadas.

Devido a essa capacidade das leguminosas de fixarem nitrogênio atmosférico em associação com bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, essas plantas podem substituir os adubos minerais no fornecimento de N para várias culturas de interesse comercial (Döbereiner, 1997).

Os efeitos benéficos promovidos pelo crescimento de plantas leguminosas no solo têm sido observados por séculos. Teofrasto, que viveu no terceiro século a.C., escreveu que os gregos usavam a fava (*Vicia faba*) para enriquecer os solos. Já no século passado, em 1818, Sir Humphrey Davy escreveu no "Agricultural Chemistry" que ervilhas e feijões pareciam preparar a terra para o plantio do trigo e que o nitrogênio (chamado azoto) existente na matéria das duas leguminosas parecia derivar da atmosfera. De fato, em locais no quais plantas leguminosas crescem, algum nitrogênio extra pode ser liberado no solo, tornando-se disponível para outros vegetais (Raven et al., 1996).

Na agricultura moderna, é prática comum fazer a rotação de uma planta cultivada não leguminosa, como o milho, com uma leguminosa, como a alfafa. Por vezes utiliza-se a rotação milho, soja, então trigo. Quando as leguminosas são colhidas, suas raízes ricas em nitrogênio permanecem no solo, enriquecendo-o.

O papel dos microrganismos na fixação biológica do nitrogênio atmosférico, responsável por essas antigas e freqüentes observações, foi descoberto por H. Helbuegel e H. Wilfarth em 1888. Alguns exemplos conhecidos de associações entre bactérias Rhizobiaceae e plantas leguminosas são: o gênero *Azorhizobium* com o gênero *Sesbania*, *Bradyrhizobium japonicum* com), *Glycine max* (soja *Rhizobium meliloti* com *Medicago sativa* (alfafa), *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* com *Vicia faba* e com *Pisum sativum* (ervilha) e, *Rhizobium leguminosarum* biovar

phaseoli com *Phaseolus vulgaris* (feijão) (Herrera-Cervera et al., 1999; Hungria et al., 1998; 2001; Silveira e Freitas 2007)

No Brasil, os estudos estão concentrados nas espécies exóticas, cultivadas comercialmente, para as quais existem estirpes de rizóbio selecionadas à disposição dos produtores (Scheffer-Basso et al., 2001).

Infelizmente, apesar da justificativa do uso e da manutenção de leguminosas em pastagens repousarem em grande parte na sua capacidade de obter nitrogênio via fixação simbiótica, muito pouca atenção foi dedicada a este assunto para as espécies nativas, demonstrando falta de interdisciplinaridade nos trabalhos de pesquisa (Scheffer-Basso et al., 2001).

A associação entre leguminosas e bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* apresenta-se como uma das formas mais eficientes de acrescentar nitrogênio ao solo. A quantidade de nitrogênio fixado por leguminosas varia em função das espécies utilizadas e das condições de clima e de solo. Em alguns casos, essa quantidade pode chegar a mais de 100 kg de N/ha (Derpsch et al., 1991).

Nos países de clima tropical, onde predominam tecnologias de baixo insumo, as pesquisas têm sido conduzidas visando manter os ecossistemas sustentáveis do ponto de vista ambiental e econômico (Toledo, 1985). Nessas condições, a conservação, a reutilização e, principalmente, a fixação biológica do nitrogênio são fundamentais para obtenção de maior produtividade (Toledo, 1985; Döbereiner, 1997). Isso vem sendo relatado em vários estudos sobre leguminosas associadas a bactérias que evidenciam que tal associação simbiótica reduz ou dispensa a adubação nitrogenada (Vargas e Hungria, 1997).

2.4.1 Caracterização do grupo rizóbio

Estes microrganismos são bactérias Gram negativas, aeróbicas não esporulantes, pertencentes ao filo alpha-Proteobacteria, os quais são genericamente identificados como rizóbio (Zakhia e Lajudie, 2001).

São bactérias simbióticas que, de modo geral, revelam sua capacidade de fixar N₂ somente quando em simbiose com plantas leguminosas e algumas não leguminosas. No entanto, os rizóbios são bactérias telúricas de vida livre e sobrevivem *in situ* à custa de compostos nitrogenados do solo; nele continuam a carregar seu equipamento genético, permitindo-lhes fixar o N₂ quando encontram sua planta hospedeira específica (Vargas e Hungria, 1997).

A classificação destes microrganismos, nos últimos vinte anos, esteve em constante alteração, sendo descobertos novos gêneros e sendo alterada a taxonomia (Wang et al., 2007).

No estudo taxonômico inicial de rizóbio, todas as bactérias formadoras de nódulos em leguminosas eram classificadas no gênero *Rhizobium* (Frank, 1889; Wang et al., 2007), apresentando seis espécies: *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. lupini* e *R. japonicum*.

Em seu trabalho, Jordan (1982) modificou a taxonomia de rizóbio, dividindo-os em dois gêneros: *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*. O primeiro gênero correspondia às cepas de crescimento lento, de reação básica em meio de cultura LMA (Levedura Manitol Ágar) (Vincent, 1970), com diâmetro menor ou igual a 1 mm e crescimento em 5 a 7 dias, designando somente uma espécie *Bradyrhizobium japonicum*, que incluiu também a espécie *R. lupini* por apresentar características semelhantes. No gênero *Rhizobium* alocaram-se três espécies: *R. leguminosarum*, *R. meliloti* e *R. loti*. Na primeira espécie foram considerados três biovares: *R. leguminosarum* bv. *viciae*, bv. *trifolii* e bv. *phaseoli*. Os três biovares constituíram o mesmo grupo na taxonomia numérica e na hibridização DNA-DNA, mas corresponderam a diferentes grupos de nodulação cruzada (Wang et al., 2007).

Em estudos posteriores, outro grupo de bactérias de crescimento rápido foi coletado em solos na China e identificado, tanto a partir do solo como de nódulos de soja, cujas características fisiológicas e bioquímicas indicavam uma posição taxonômica intermediária entre *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (Keyser et al., 1982, Xu e Ge, 1984). Desta maneira, se

propôs a criação de uma nova espécie, *Rhizobium fredii*, baseados principalmente em experimentos de hibridização de DNA (Scholla e Elkan, 1984).

Atualmente, a taxonomia do grupo rizóbio vem sendo modificada. A principal alteração ocorreu no gênero *Rhizobium*, ao qual foram incluídas todas as espécies de *Agrobacterium* (Conn, 1942) e *Allorhizobium undicola* (Lajudie et al., 1998), combinando as novas espécies: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* e *R. vitis* (Young et al., 2003). Outra mudança aconteceu ao gênero *Sinorhizobium*, de acordo com Young (2003), os gêneros *Sinorhizobium* e *Ensifer* são similares e segundo o “*Bacteriological Code*” o gênero *Sinorhizobium* deve ser transferido para *Ensifer* por ter sido descrito posteriormente. Assim, hoje são consideradas quatro famílias (Rhizobiaceae, Bradyrhizobiaceae, Phyllobacteraceae e Xanthobacteraceae), cinco gêneros (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium/ Ensifer* e *Azorhizobium*) e 46 espécies.

2.4.2 Formação de nódulos em leguminosas

Grande parte das leguminosas forrageiras tropicais é classificada como promíscua em relação à especificidade hospedeira de seu microsimbionte. Isto significa que as espécies podem nodular com estirpes de *Rhizobium* ou *Bradyrhizobium*, mas em geral, apenas uma parcela dessas estirpes são capazes de fixar N₂ (Allen e Allen, 1981; Vargas e Hungria, 1997).

No caso de leguminosas com dupla nodulação (raiz e caule), talvez ocorra uma competição, em nível energético, entre a nodulação da raiz e a do caule, que é controlada pela nodulação do caule.

Isto é sugerido pela seguinte observação: quando *Sesbania rostrata* com nódulos radiculares desenvolve, através de inoculação, nódulos no caule, não ocorre aumento no peso dos nódulos radiculares e na atividade da nitrogenase. Porém, os nódulos radiculares e atividade da nitrogenase são recuperados quando os nódulos do caule são removidos. É possível que

o mecanismo responsável pelo controle seja a proximidade dos nódulos do caule do mecanismo fotossintético, o que permite aos nódulos do caule controlar o fornecimento de fotossintatos para os nódulos radiculares e determinar sua longevidade e atividade (Ladha et al., 1992).

As leguminosas que crescem em condições de inundação podem ter um fornecimento limitado de O₂ para os nódulos radiculares. Portanto, nesses ambientes, a característica de nodular o caule seria uma vantagem, visto que a nodulação no caule reduz a demanda da planta por O₂ (Ladha et al., 1992).

Os nódulos também apresentam aerênquima e o córtex menos compacto, que proporciona um aumento na permeabilidade de gases. A mesma adaptação foi observada em *S. cannabina* e *S. speciosa*, sugerindo que espécies de *Sesbania* desenvolvem esse tecido especial para a adaptação ao alagamento, permitindo a troca de gases através do caule para as raízes (Saraswati et al., 1992; Evans e Rotar, 1987). Yoshida (1981) relatou que nódulos radiculares de *Aeschynomene indica* utilizaram N₂ que foi fornecido através do caule alagado.

As espécies que possuem nódulos caulinares apresentam um elevado potencial de fixação de N₂. Esta alta performance pode ser atribuída à presença de tecido fotossintético próximo aos nódulos, o que torna possível a fosforilação cíclica, assim como a síntese de carboidratos, possibilitando o fornecimento de energia para a fixação de N₂ (Boivin, et al., 1997).

Entre as leguminosas com tais características, *Aeschynomene* e *Sesbania* foram as primeiras a serem relatadas (Dreyfus et. Al., 1984; Alazard, 1985;1987; Ladha et al., 1990). Loureiro et al. (1994) observaram um novo gênero com capacidade de produzir nódulos no caule, *Discolobium*. Em duas espécies (*D. pulchellum* e *D. psoraleaefolium*); James et al. (2001) observaram a presença de nódulos caulinares em mais uma espécie *D. leptophyllum*. Foram encontrados nódulos de raiz e caule em áreas alagadas do Pantanal Mato-Grossense. As observações indicam, ainda, que

a nodulação somente ocorreu após a formação do tecido parenquimatoso, sendo, portanto, diretamente influenciada pelo alagamento. Os nódulos do caule recebem o oxigênio via aerênquima formado na parte inferior do caule, permitindo a difusão dos gases (Loureiro, 1994).

Diversos fatores envolvem a nodulação no caule: presença de sítios de nodulação pré-determinados no caule, presença de células fotossintetizantes ao redor dos nódulos, maior tolerância ao N combinado e, em algumas espécies, a natureza fotossintetizante do rizóbio (Ladha et al., 1990; James e Sprent, 1999).

No sistema vascular, apresenta cordão de infecção similar ao de *Aeschynomene fluminensis* (Loureiro et al., 1995). Os nódulos de caule e raiz de *Discolobium pulchellum* apresentam tecido infectado do tipo aesquinomenóide desmodióide (Corby, 1988), isto é, sem células não infectadas. As células infectadas nos nódulos de caule são vacuoladas, com cordões de infecção visíveis (Loureiro, 1994).

Ao contrário de outras leguminosas nodulantes, os nódulos de caule de *Discolobium* sp., têm uma necessidade obrigatória de estarem submersos e senescem muito rapidamente quando expostos ao ar (Loureiro, 1994).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta de plantas e de solo para substrato

As plantas do gênero *Discolobium* empregadas como fonte de estacas para propagação vegetativa foram coletadas no Município de Poconé, Pantanal de Mato Grosso, em três pontos às margens da rodovia Transpantaneira. Os três pontos de coletas foram os seguintes: (a) Posto fiscal (16° 27' 85,3" de latitude Sul e 56° 40' 47,5" de longitude Oeste), (b) Estátua de São Francisco de Assis (16° 27' 0,69" de latitude Sul e 56° 40' 37,3" de longitude Oeste), (c) Bar Barara (16° 31' 15,8" de latitude Sul e 56° 42',44.6" de longitude Oeste).

Foram empregados dois tipos de solo como substrato para o cultivo de *Discolobium* sp. O primeiro tipo foi terra preta, proveniente do viveiro da FAMEV/UFMT. O segundo substrato foi uma amostra composta de mistura solos, obtida em três pontos na região do Pantanal de Poconé situados próximos ao local de coleta do material vegetal. Ambos os tipos de substratos empregados foram posteriormente analisados física e quimicamente.

3.2 Local do experimento, condições de cultivo e delineamento experimental

O experimento foi instalado no Viveiro da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMEV) da Universidade Federal de Mato Grosso,

campus de Cuiabá, com o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) no esquema fatorial 2x2 com 4 repetições com uma estaca/balde com os seguintes tratamentos (T): T1 (solo Pantanal com plantas inoculadas); T2 (solo Pantanal com plantas não inoculadas); T3 (terra preta com plantas inoculadas); T4 (terra preta com plantas não inoculadas).

As plantas coletadas foram cortadas com 30 cm de comprimento, retirando-se todas suas folhas para preparo das estacas e propagação vegetativa. Posteriormente as estacas preparadas foram acondicionadas em baldes de sete litros completados até o meio com os substratos: solos do Pantanal e terra preta e submetido a condições de inundação com renovação constante de água, procurando, assim, similaridade com as condições originais.

A temperatura e a umidade do ar foram tomadas diariamente no horário das 9:00 h de um psicrômetro instalado no viveiro a partir do mês de outubro de 2006, após o procedimento de inoculação das plantas com o rizóbio.

3.3 Inoculação do rizóbio em *Discolobium* sp.

As plantas foram inoculadas com *Rizhobium* sp. isolados de nódulos de caule e raiz de *Discolobium* sp. da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia do Solo da FAMEV/UFMT. O procedimento foi realizado em três seções, sendo a primeira aos 120 dias logo após o plantio e as duas subseqüentes, aos 130 e aos 140 dias após o plantio, respectivamente.

Inicialmente os isolados foram multiplicados e crescidos em meio líquido de levedura e manitol (YM), (Vincent, 1970) a 28°C durante três dias. A inoculação das estacas das plantas foi feita utilizando-se 1,0 mL do meio líquido, aplicado com uma seringa diretamente no caule, próximo à superfície do solo.

3.4 Análise de crescimento das plantas

3.4.1 Altura das plantas

A altura das plantas foi obtida medindo a primeira brotação a partir da extremidade da estaca próxima a lâmina d' água até o último par de folhas expandidas. As medições foram efetuadas quinzenalmente, com 11 tempos datas de amostragem.

Os dados originais foram submetidos à análise de variância considerando além dos fatores originais, ou seja, o substrato e a inoculação, um novo fator, o tempo de amostragem, seguindo-se o mesmo delineamento experimental inteiramente casualizado. Além dessa análise, como o interesse residiu na observação da dinâmica do crescimento de cada um dos grupos de plantas submetidos aos diferentes tratamentos, foi ajustada uma curva de regressão para os dados originais de altura. O ajuste e a comparação dessas curvas foram feitos com o auxílio do programa NCSS (Hintze, 2004).

3.4.2 Matéria seca das plantas

No final do experimento, 10 meses após o plantio (302 dias), as plantas foram coletadas para determinação da matéria seca da parte aérea (caule e folhas) e raiz por meio de secagem em estufa de circulação de ar forçada por 72 horas a 65°C. Após, a secagem, as amostras foram pesadas, moídas e armazenadas para as análises posteriores do teor de nitrogênio.

Os dados originais da massa seca do material vegetal analisado foram submetidos à análise de variância e prova de médias por Tukey a 5% de probabilidade.

3.5 Teor de proteína bruta das plantas

Do material vegetal oriundo da determinação da massa seca e reservado para as análises laboratoriais, determinou-se as concentrações de nitrogênio dos diferentes órgãos pelo método Kjeldahl (Vogel, 1992; Yasuhara e Nokihara, 2001; Nogueira e Souza, 2005) que é baseado na decomposição da matéria orgânica através da digestão da amostra a 400°C com ácido sulfúrico concentrado, em presença de sulfato de cobre como catalisador que acelera a oxidação da matéria orgânica e decompõe a proteína e aminoácidos do tecido vegetal em NH_4 . O nitrogênio presente na solução ácida resultante foi determinado por destilação por arraste de vapor, seguida de titulação com ácido clorídrico (Equação 1). Na determinação da proteína bruta, multiplicou-se o valor do nitrogênio total encontrado pelo fator 6,25 para converter o teor de nitrogênio em teor de proteína bruta (Equação 2).

O nitrogênio total (NT) foi determinado pela seguinte equação:

$$\text{NT} = (\text{Va} - \text{Vb}) \times \text{F} \times 0,1 \times 0,014 \times 100 / \text{P1} \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que:

NT – teor de nitrogênio total na amostra, em percentagem;

Va – volume da solução de ácido clorídrico gasto na titulação da amostra, em mililitros;

Vb – volume da solução de ácido clorídrico gasto na titulação do branco, em mililitros;

F – fator de correção para o ácido clorídrico 0,01 mol/L;

P1 – massa da amostra, em gramas.

A expressão a seguir foi utilizada para determinar a proteína bruta:

$$PB = NT \times FN \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que:

PB – teor de proteína bruta na amostra, em percentagem;

FN – 6,25 (fator de correção);

NT = $(V_a - V_b) \times F \times 0,1 \times 0,014 \times 100 / P1$

3.6 Isolamento das bactérias dos nódulos das plantas

Ao final do experimento, no momento da amostragem para avaliação da matéria seca e do teor de nitrogênio nos diferentes órgãos, também foi efetuada a contagem do número de nódulos na raiz, os quais foram em seguida retirados e armazenados em sílica.

Posteriormente, foi realizada a limpeza superficial dos nódulos de acordo com as seguintes etapas: 1 minuto imerso em álcool (96%); 1 minuto imerso em hipoclorito 10-12% seguido de lavagem em água estéril para retirada do excesso de hipoclorito. Em seguida foram esmagados e riscados em placas de Petri contendo meio YMA. As placas foram incubadas para avaliação do crescimento dos isolados e observados quanto à reação de pH. A coloração de GRAM foi realizada para verificação da pureza dos isolados.

3.7 Análise físico-química da água de inundação

Em cada uma das unidades experimentais foram realizadas medições do pH e da condutividade elétrica (cE) da água de inundação presente nos vasos. O pH foi determinado com o auxílio de um sistema portátil de medidas de pH (pHmetro, modelo HI 8314, SCHOTT GLAS, Maiz, Alemanha), que sempre foi ligado 30 minutos antes do início de cada medição. A cE foi medida utilizando-se um condutímetro (modelo OXI/SET, SCHOTT GLAS, Maiz, Alemanha) ajustado à temperatura do ambiente, sendo a medida utilizada como indicador da quantidade de íons presentes em solução. As medidas de pH foram obtidas semanalmente e as de cE quinzenalmente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise de crescimento das plantas

4.1.1 Altura das plantas

Dos fatores que afetaram a altura, houve significância estatística apenas para o tempo de amostragem ($p < 0,01$), não sendo verificado qualquer efeito significativo do substrato, da inoculação ou das interações.

Nota-se que houve uma maior variabilidade interna da altura daqueles grupos crescidos em solo de terra preta, em comparação com os crescidos em solo do Pantanal (Figura 2).

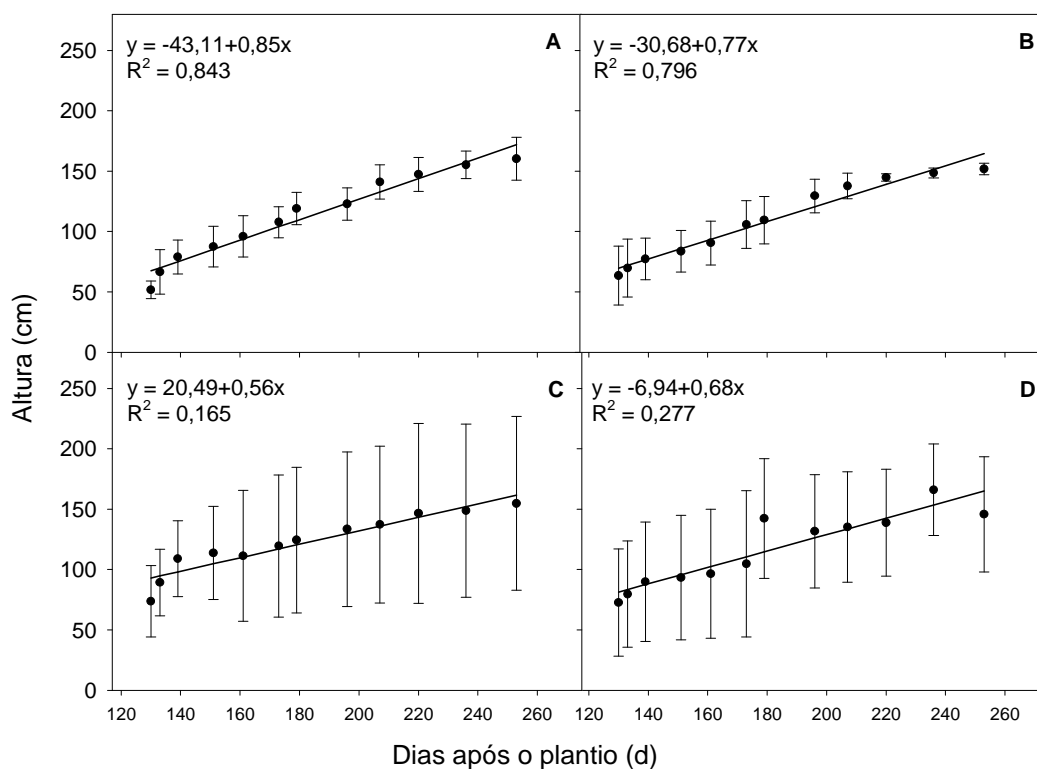


Figura 2- Modelos de regressão linear para a dinâmica do crescimento em altura de plantas de *Discolobium* sp. cultivadas em solo do Pantanal e inoculadas (A), em

solo do Pantanal e não inoculadas (B), em terra preta e inoculadas (C) e em terra preta e não inoculadas (D).

A comparação das curvas de regressão obtidas para a dinâmica da altura das plantas revelou não haver diferença significativa entre elas.

É necessário destacar que alguns fatores físicos como a densidade do solo, o tamanho dos agregados e dos poros, a presença de camada compactada superficial, a aeração, a temperatura, a qualidade da luz, as limitações de nutrientes, o tamanho e forma do recipiente onde a planta se desenvolve, restringem o crescimento radicular e afetam o desenvolvimento e a produtividade de diferentes espécies (Peterson et al., 1991; Izaguirre-Mayoral e Mallorca, 1999; Aphalo e Rikala, 2003; Ronchi et al., 2006).

A comparação entre o valor médio das variáveis físico-químicas dos solos do Pantanal e da terra preta, cujos valores originais podem ser observados na Tabela 2, mostrou uma diferença significativa (por t a $p < 0,05$) para o pH, para o P, para o Ca, para o Mg e para o Al. Nenhuma outra variável diferiu significativamente entre si nesse nível de significância. Entretanto, considerando o nível de significância de 10%, observou-se que os teores de hidrogênio ativo e da matéria orgânica também diferiram entre os solos provenientes do Pantanal e a terra preta.

Tabela 2- Resultados das análises físico-químicas dos solos utilizados como substrato.

Resultado Analítico das Amostras de Solo													
Amostra	pH		P	K	Ca+Mg	Ca	Mg	Al	H	Mat. Org.	Areia	Silte	Argila
	Água	CaCl ₂	mg/dm ³			cmolc/dcm ³				g/dm ³	g/kg		
SP(1)	4,9	4,3	13,0	31	1,7	1,2	0,5	0,6	2,5	16,1	753	66	181
SP(2)	5,3	4,6	8,9	28	1,1	0,8	0,3	0,4	2,0	11,4	819	34	147
SP(3)	5,2	4,5	9,7	16	0,8	0,6	0,2	0,3	1,5	8,6	836	33	131
STP	5,8	5,1	21,9	35	2,8	1,8	1,0	0,0	3,0	20,1	786	50	164

Nota: a sigla SP se refere ao solo do Pantanal e o número entre parênteses, aos respectivos pontos de coleta, a sigla STP se refere à terra preta.

O substrato com a mistura dos três tipos de solo do Pantanal apresentou pH (pH = 5,1 em água e pH = 4,5 em CaCl₂) inferior ao da terra preta (pH = 5,8 em água e pH = 5,1 em CaCl₂), teor de fósforo (P = 10,5 mg/dm³) inferior ao da terra preta (P = 21,9 mg/dm³), teor de cálcio inferior (Ca = 0,9 cmolc/dm³) ao da terra preta (Ca = 1,8 cmolc/dm³), teor de magnésio (Mg = 0,3 cmolc/dm³) inferior ao da terra preta (Mg = 1,0 cmolc/dm³) e teor de alumínio superior (Al = 0,4 cmolc/dm³) ao da terra preta (Al = 0,0 cmolc/dm³).

No que se refere ao hidrogênio ativo e à matéria orgânica, a mistura dos três tipos de solo do Pantanal apresentou valores inferiores de ambas as variáveis (H = 2,0 cmolc/dm³ e M.O. = 12,0 g/dm³) em relação à terra preta (H = 3,0 cmolc/dm³ e M.O. = 20,1 mg/dm³).

Neste trabalho, o volume dos recipientes empregados foi de sete litros, partindo-se da suposição de que fosse suficiente para a condução a bom termo do experimento. Entretanto, ao final do experimento, quando da retirada das plantas dos vasos de cultivo, notou-se uma restrição do sistema radicular causado pelo volume do recipiente. Há trabalhos em que foi verificado o efeito negativo do volume do recipiente sobre o crescimento e desenvolvimento das raízes e da parte aérea das plantas, devido à restrição radicular (Peterson et al., 1991; Izaguirre-Mayoral e Mallorca, 1999; Aphalo e Rikala, 2003; Ronchi et al., 2006).

Há relatos de que, por efeito da presença de inóculos nativos nos solos utilizados como substrato de plantio, a inoculação com estirpes selecionadas pode não afetar significativamente alguns parâmetros de crescimento, como são a altura e o diâmetro do caule. Nesse sentido, apresenta-se o exemplo do trabalho realizado por Chaves et al. (2003) com mudas de *Sesbania* sp., em que se verificou que a inoculação das sementes com o rizóbio específico não possibilitou incremento em altura e diâmetro das mudas, sendo que os autores atribuem esse ocorrido à possibilidade de uma nodulação natural eficiente apresentada pela espécie nas condições do experimento.

Neste experimento, esse problema também ocorreu, pois, houve presença de nódulos nos tratamentos que não foram inoculados, tanto para o substrato com solo do Pantanal quanto para aquele com terra preta.

4.1.2 Matéria seca das plantas

As análises de variância da matéria seca da raiz, do caule e da folha de *Discolobium* sp. revelaram não haver efeito significativo dos tratamentos ao final de 253 dias após o plantio das estacas quando essas variáveis foram analisadas. Fundamentalmente, o fator que contribuiu para esse resultado foi o da variabilidade dos dados originais obtidos, o que pode ser observado pelas barras de erro ($\bar{X} \pm 1 s$) das variáveis apresentadas na Figura 3 e talvez o tempo de permanência em viveiro tenha sido insuficiente para possibilitar a discriminação entre os tratamentos. Assim da maneira que ocorreu com a dinâmica de crescimento da altura, também o acúmulo da biomassa pode ter sido comprometido devido ao tamanho do vaso.

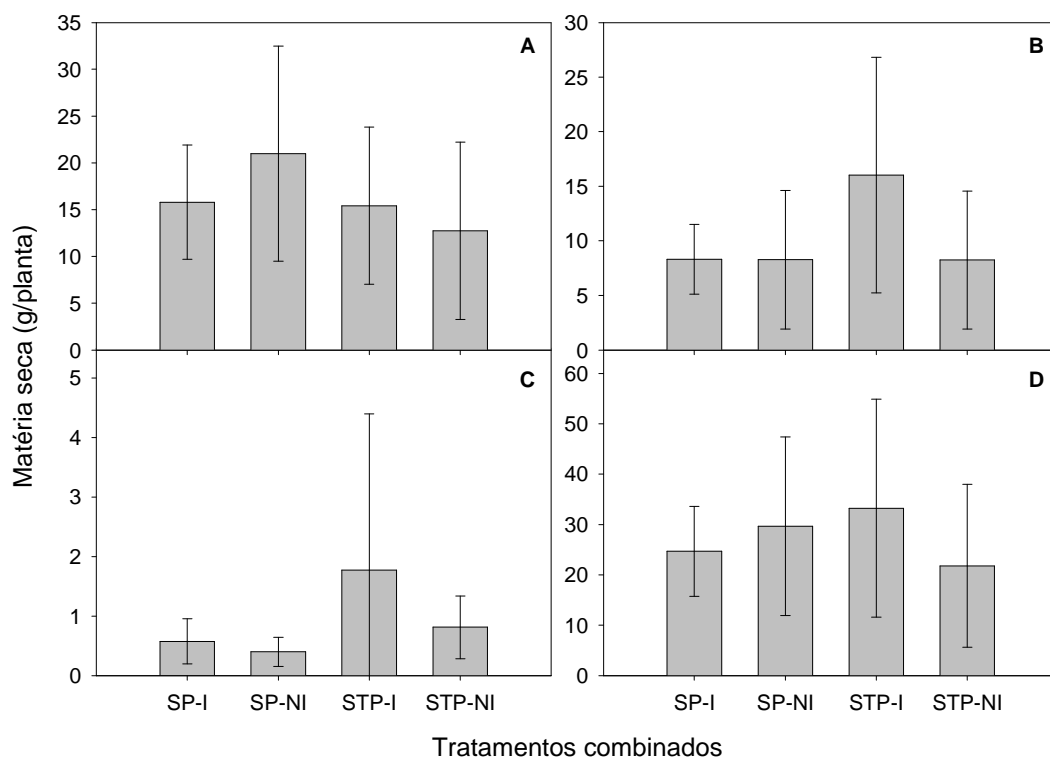


Figura 3- Produção de matéria seca da raiz (A), do caule (B), da folha (C) e total (D) em plantas de *Discolobium* sp. cultivadas em solo do Pantanal e inoculadas (SP-I), em solo do Pantanal e não inoculadas (SP-NI), em terra preta e inoculadas (STP-I) e em terra preta e não inoculadas (STP-NI).

Há trabalhos que evidenciam o efeito da associação simbiótica no sentido de aumentar os teores de nitrogênio dos diferentes órgãos das plantas noduladas sem, contudo, verificar-se qualquer efeito sobre o crescimento e o acúmulo de matéria seca das mesmas. Esse foi o caso do experimento realizado por Valarini e Godoy (1994) em casa de vegetação, com cultivo de guandu (*Cajanus cajan*) em vasos de três litros, em que se verificou um incremento nos teores de nitrogênio total sem qualquer alteração na matéria seca da parte aérea nas plantas inoculadas com estirpes selecionadas de *Bradirhizobium* sp.

Em um trabalho realizado com amendoim (*Arachis hypogaea* L.), Borges et al. (2007) verificaram que para as estirpes de rizóbios nativas do nordeste o cultivo dessa espécie em dois tipos de solo contrastantes em

fertilidade natural não mostrou qualquer efeito da interação entre rizóbio e solo, reforçando a teoria da especificidade das bactérias com relação ao hospedeiro, independentemente das condições edafoclimáticas, para esse caso.

4.2 Teores de proteína bruta das plantas

O efeito dos tratamentos sobre o teor de proteína bruta foi variável de acordo com o órgão analisado. Para o caso da raiz e do caule não foi verificado qualquer efeito significativo dos tratamentos. Para a folha, o efeito do substrato sobre essa variável dependeu se a planta foi inoculada ou não ($p < 0,05$), contudo, após a realização do teste de médias, verificou-se que não houve diferença significativa entre os teores protéicos das folhas das plantas sob os diferentes tratamentos. Assim sendo, os teores médios de proteína bruta dos diferentes órgãos das plantas sob os diferentes tratamentos foram iguais a $1,14 \pm 0,26\%$ para a raiz, a $1,17 \pm 0,16\%$ para o caule e a $15,38 \pm 1,70\%$ para as folhas.

Do ponto de vista teórico, esperava-se que para as plantas que foram inoculadas e crescidas em solo do Pantanal apresentassem valores de teor protéico superiores àquelas não inoculadas crescidas nesse mesmo substrato. Isto porque, em princípio, sabe-se que a simbiose ocorre naquelas situações de solo pobre em nitrogênio (Martins et al., 2001). E nessas condições, o rizóbio provê à planta desse elemento. Porém, nas condições experimentais deste trabalho não foi possível evidenciar qualquer efeito significativo da inoculação no tocante ao teor protéico da raiz, caule e folhas (Figura 4).

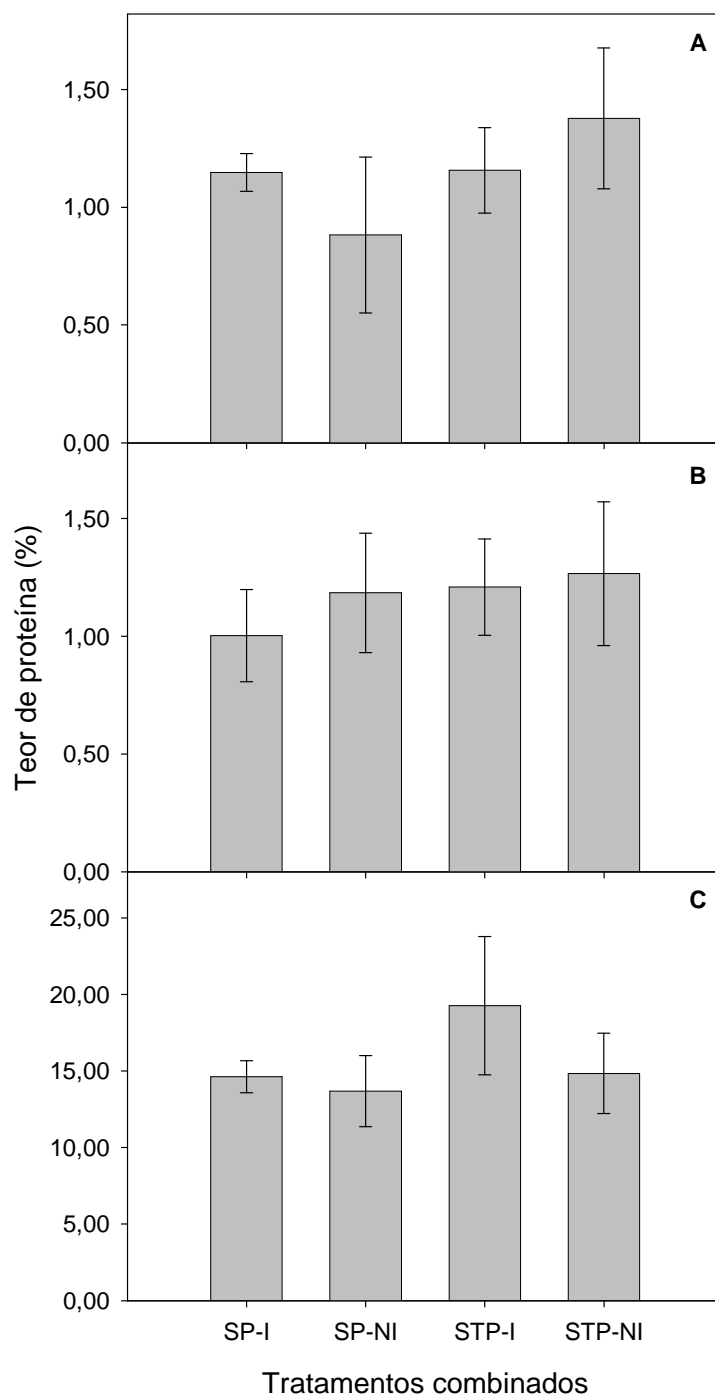


Figura 4- Teor de proteína bruta na raiz (A), no caule (B) e na folha (C) em plantas de *Discolobium* sp. cultivadas em solo do Pantanal e inoculadas (SP-I), em solo do Pantanal e não inoculadas (SP-NI), em terra preta e inoculadas (STP-I) e em terra preta e não inoculadas (STP-NI).

Existem evidências de que, dependendo do hospedeiro e da estirpe de rizóbio, a atividade dos nódulos pode ser inibida ou promovida pela disponibilidade de nitrogênio mineral no solo. Assim, para associações simbióticas que se estabelecem mais lentamente, maiores teores de nitrogênio disponíveis no solo promovem a nodulação e a fixação de N₂, ao passo que associações com alto potencial de fixação que se estabelecem em menor intervalo de tempo são inibidas pela maior disponibilidade de nitrogênio disponível no solo, com redução da nodulação e da fixação de N₂ (Seguin et al., 2001). Há um consenso geral de que as estirpes do gênero *Bradirhizobium* são consideradas crescimento lento que as do gênero *Rizhobium*, de crescimento rápido (Gibson, 1990).

O teor protéico encontrado neste trabalho difere em magnitude daqueles obtidos por Pott (1988) para *Discolobium* sp. (de 28% de proteína bruta na planta), contudo, mesmo esses valores são elevados quando comparados com outras espécies que se prestam como banco de proteína para consumo animal. Por exemplo, a leucena (*Leucena leucocephala*), espécie mais utilizada como banco de proteína na região nordeste do Brasil, apresenta um valor médio de proteína bruta da ordem de 19,5% (Souza e Espíndola) e valores semelhantes também foram encontrados na jurema preta (*Mimosa tenuiflora*) que apresenta valores ao redor de 14,6% de proteína bruta (Lima, 1996).

Isso reforça a sugestão do emprego de espécies nativas como fonte de proteína animal ecologicamente adaptada às condições naturais do Pantanal e, particularmente em relação ao gênero *Discolobium*, que se desenvolvam estudos para avaliar a presença de fatores antinutricionais como compostos fenólicos, principalmente os taninos.

4.3 Número de nódulos encontrados nas plantas

Os resultados obtidos para a nodulação na análise de variância demonstraram que houve somente o efeito significativo da inoculação sobre essa variável ($p < 0,05$). Cabe ressaltar que a contagem do número de

nódulos presentes no sistema radicular das plantas foi realizada somente ao final do experimento (aos 253 dias após o plantio das estacas) e somente foram contabilizados aqueles nódulos considerados ativos.

As plantas inoculadas, independentemente do tipo de solo, apresentaram uma média de 16 ± 13 nódulos, ao passo que as não inoculadas, de 3 ± 3 nódulos.

A verificação de nodulação em plantas que não receberam o inoculante pode indicar que o rizóbio poderia estar no substrato do solo do Pantanal e até mesmo na planta, provavelmente por uma ineficiente esterilização do solo ou contaminação durante a realização do experimento. Isto porque na execução deste experimento, as estacas retiradas das plantas que foram trazidas do campo para sua multiplicação e obtenção das unidades experimentais não foram submetidas a qualquer tratamento inicial de desinfestação. Dessa maneira, é possível que tenha havido contaminação com as estirpes de rizóbio do local de origem do material vegetal.

Apesar de não ter sido verificado qualquer efeito da interação entre a inoculação e o tipo de substrato utilizado sobre o número de nódulos neste experimento há estudos que indicam a ocorrência desse fenômeno, como, por exemplo, no trabalho de Faria et al. (1995) com *Albizia* sp., inoculada com *Glomus etunicatum* e *Rhizobium* na presença de adubação fosfatada e nitrogenada. Esses autores observaram que houve crescimento das plantas e aumento na nodulação quando inoculadas com *Glomus etunicatum* e adubadas com P.

Neste experimento não foi evidenciada a presença de nódulos no caule. Porém, as plantas de *Discolobium* sp., apresentam nodulação caulinar que ocorre após a formação de um tecido parenquimatoso, sendo, portanto, diretamente influenciado pelo alagamento: os nódulos do caule recebem via aerêquima formado na parte inferior do caule, permitindo a difusão dos gases (Loureiro, 1994).

4.4 Número de isolados obtidos dos nódulos das plantas

De todas as plantas inoculadas, independentemente do tipo de solo utilizado como substrato, foram obtidos 150 isolados a partir de 142 nódulos do sistema radicular. Verificou-se uma grande variabilidade no tipo de resposta à reação ácida ou básica dos isolados, contudo, nota-se um padrão de resposta no qual a reação ácida nas plantas inoculadas é preponderante (Tabela 3).

Tabela 3- Número de nódulos, número de isolados de rizóbio e alteração do pH do meio YMA por isolados de nódulos de raiz e caule de *Discolobium* sp. cultivado em vaso com dois tipos de substratos (solo do Pantanal e terra preta).

Substrato	Número de Nódulos	Número de Isolados	Reação Apresentada pelos Isolados					
			Ácida		Neutra		Alcalina	
			Número	%	Número	%	Número	%
SSP	61	63	48	76,2	8	12,7	7	11,1
STP	82	87	46	52,9	31	35,6	10	11,5
Total	143	150	94	62,7	39	26,0	17	11,3

Nota: A sigla SSP significa solo do Pantanal e a sigla STP significa terra preta.

Todos os isolados apresentaram as características de cor, elevação, transparência e formação de ácido e alcalina compatíveis com as características descritas por Hungria (1994). Essa diversidade morfológica também foi verificada por Martins et al. (1997), estudando as características de 27 isolados de rizóbios de raiz e caule de *Discolobium* sp., nativas do Pantanal Mato-Grossense. Martins et al. (2001) observaram uma distinção dos isolados quanto às características de crescimento e reação de pH, ou seja, os isolados de rizóbios que apresentaram crescimento rápido acidificaram e alcalinizaram o meio YMA, bem como os de crescimento lento.

Segundo Martins (1996), é possível que a habilidade dos rizóbios de alcalinizar o meio represente uma vantagem seletiva. Temperatura e pH do solo são fatores determinantes para o sucesso da estirpe de rizóbio em

promover uma nodulação eficiente nas leguminosas associadas (Neves e Rumjanek, 1998).

Barbieri et al. (1998) avaliou trinta e sete espécies de leguminosas florestais nativas do sul de Minas Gerais, sendo 18 da família Caesalpinioideae, 13 da Papilionoideae e 6 da Mimosoideae, não encontrando nodulação nas Caesalpinioideae, justificando o fato pela razão desta família se encontrar menos evoluídas na escala evolutiva. Entretanto, verificou 83% de espécies de Mimosoideae noduladas e 85% de espécies de Papilionoideae noduladas. O autor fez o isolamento de 39 estirpes, classificando-as em 5 grupos em função de sua taxa de crescimento (lento, intermediário e rápido), do pH do meio (ácido e alcalino), da cor da colônia (branca e creme) e da quantidade de muco produzido (pouco, médio ou pouco, muito a médio e muito). Essa classificação possibilitou identificar 28 *Bradyrhizobium*, 5 *Azorhizobium*, 4 *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* ou *Rhizobium*. Três estirpes não puderam ser identificadas.

Os resultados revelaram que os isolados usados foram bastante competitivos e capazes de se estabelecer em diferentes solos. O estabelecimento dos isolados inoculados deve ter sido facilitado pelo baixo número de rizóbio nativo nas amostras de solo, o que pode ser observado pela baixa nodulação das plantas controle.

Segundo Martins (1996), é possível que a habilidade dos rizóbios de alcalinizar o meio represente uma vantagem seletiva. Temperatura e pH do solo são fatores determinantes para o sucesso da estirpe de rizóbio em promover uma nodulação eficiente nas leguminosas associadas (Neves e Rumjanek, 1998).

5 CONCLUSÕES

Não se verificou qualquer efeito da inoculação com as estirpes de *Rhizobium* sp. da coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal de Mato Grosso no crescimento em altura e matéria seca e no teor protéico da raiz, do caule e das folhas de plantas de *Discolobium* sp.

Foram obtidos 150 isolados a partir de 142 nódulos obtidos de todas as plantas inoculadas, sendo que estes apresentaram maior tendência à reação ácida.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As plantas de *Discolobium* sp. apresentam um elevado teor de proteína bruta, podendo ser uma alternativa aos pecuaristas do Pantanal em se utilizar dessa espécie para suplementar a alimentação dos bovinos. Estudos sobre o seu comportamento em seu hábitat natural devem ser conduzidos para possibilitar a maximização dessa planta que nodula caule e raiz para entender seu processo de dispersão e propagação no bioma Pantanal.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADÂMOLI, J. O Pantanal e suas relações fitogeográficas com os cerrados: discussão sobre o conceito de complexo do Pantanal. In: **Anais...do 32º Congresso nacional da Sociedade Botânica do Brasil**, Teresina, Universidade Federal do Piauí, p.109-119, 1982.

ALAZARD, D. Stem and root nodulation in *Aeschynomene* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, p. 732-734, 1985.

ALLEM, A. C. ; VALLS, V.F. M. **Recursos forrageiros nativos do Pantanal Mato-grossense**. Brasília: Embrapa- Cenargem, 1987. 339 p. il. (Embrapa-Cenargem. Documentos,8).

ALLEN, O. N.; ALLEN, E. K. **The leguminosae: a source book of characteristics, uses and nodulation**. Madison: University of Wisconsin, p. 604-607, 1981.

AMARAL FILHO, Z.P. Solos do Pantanal Mato-Grossense. In:Anais do X Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal. EMBRAPA-CPAP-UFMS, 265p. (EMBRAPA-CPAP, Documentos, 5). 1984.

APHALO, P.; RIKALA, R. Field performance of silver-birch planting-stock grown at different spacing and in containers of different volume. **New Forests**, Netherlands, v. 25, n.2, p.93– 108, 2003.

BARBIERI, A.; CARNEIRO, M. A.C.; MOREIRA, F.M.S. ; SIQUEIRA, J.O. Nodulação em leguminosas florestais em viveiros no sul de Minas Gerais. **CERNE**, Lavras/UFLA, v.4, n.1, p.145-153, 1998.

BARRIENTOS, M.; HIGUERA, H.; ACUÑA, J.; GUERRERO, F. Efectividad simbiótica de cepas naturalizadas de *Mesorhizobium loti* y *Bradyrhizobium sp.* (*Lotus*) en plantas de tres especies del genero *Lotus*. **Agricultura Tecnica**, Chillan, v.62, no.2, p.226-236. abr. 2002.

BOIVIN, C.; N'DOYE, I.; MOLOUBA, F.; de LAJUDIE, P.; DUPUY, N.; DREYFUS, B. Stem nodulation in legumes: diversity, mechanism, and unusual characteristics. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 16, p. 1-30, 1997.

BORGES, W.L.; SILVA, C.E. de R. e, XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G. Nodulação e fixação simbiótica de nitrogênio de acessos de amendoim com estirpes nativas de rizóbios. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.2 n.1 p.32-37, 2007.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. Plano de Conservação da Bacia do Alto Paraguai – PCBAP, v.III. Análise integrada e prognóstico da Bacia do Alto Paraguai. Brasília: MMA/PNMA, 1997.369p.

CHAGAS, A. P. The ammonia synthesis: some historical aspects. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 1, 2007 .

CHAVES, L.de E.L.B.; CARNEIRO, D.G.B.; LELES, P.S. dos S. Efeitos da inoculação com rizóbio e da adubação nitrogenada na produção e mudas de sesbânia em substrato constituído de resíduos agroindustriais. **Revista Árvore**, Viçosa , v.27, n.4, p. 443-449, 2003.

CONN, H.J. Validity of the genus *Alcaligenes*. **Journal of Bacteriology**, n.44, p. 353-360. 1942.

Corby, H.D.L. Types of rhizobial nodules and their distribution among the leguminosae. **Kirkia** , v.13, n.1, p. 53-123, 1988.

DAVID-GARCIA, E.A. O clima no Pantanal Mato-Grossense. Corumbá, EMBRAPA/UEPAE de Corumbá. (EMBRAPA. UEPAE de Corumbá. Circular Técnica, 14). 1984. 42p.

DERPSCH, R.; ROTH, C.H.; SIDIRAS, N.; KOPKE, U. **Controle da erosão no Paraná, Brasil: sistemas de cobertura do solo, plantio direto e preparo conservacionista do solo**. Eschborn: GTZ, 1991. 268p.

DREYFUS, B. L.; ALAZARD, D.; DOMMERGUES, Y. R. Stem-nodulating rhizobia. In: KLUG, M. G.; REDDY, C. E.; ed. *Current Perspectives of Microbial Ecology*, Washington: **American Society of Microbiology**, p. 161-169, 1984.

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. **Soil Biology Biochemistry**, v.29, n.6, p.771-774, 1997.

ELIAS NETO, N. **Estudo da Reprodução vegetativa, Aspectos Fenológicos e marcadores moleculares para a Leguminosa *Discolobium BENTH*, Nativa do Pantanal Mato Grossense**. 2004. 93 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2004.

EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal. Corumbá, CPAP/SEBRAE, 1996. CD-ROM.

EVANS, D. O.; ROTAR, P. P. *Sesbania* in agriculture. **Westview Tropical Agriculture**, Boulder, v.8, 1987.

FARIA, M.P.; SIQUEIRA, J.O.; VALEE, F.R.; CURI, N. Crescimento de leguminosas arbóreas em resposta a fósforo, nitrogênio, fungo micorrízico e rizóbio. I. *Albizzia lebbbeck* (L.) Benth. **Revista Árvore**, Viçosa, v.19, n.3, p.293-307, 1995.

FERREIRA, A. N.; ARF, O.; CARVALHO, M.A.C. de; ARAÚJO, R.S.; SÁ, M.E. da; BUZETTI, S. Estirpes de *Rhizobium tropici* na inoculação do feijoeiro. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.57, n.3, p.507-512, 2000.

FRANCO, A. A. ; DÖBEREINER, J. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopathológica**, São Paulo, v.20, n.1, p.68-74, 1994.

FRANK, B. Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, v.7, p. 332-346, 1889.

GIBSON, A.H. The genetics of nitrogen-fixing symbiotic associations. In: ABROL, Y.P. (Ed.). **Nitrogen in Higher Plants**. New York: John Wiley & Sons, 1990. Chapter 16, p.461-481.

GOORMACHTIG, S.; CAPOEN, W.; JAMES, E. K.; HOLSTERS, M. Switch from intracellular to intercellular invasion during water stress-tolerant legume. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, Washington, n. 101, p. 6303-6308, 2004.

GONZAGA, L.N.; PAES DE BARROS, L.T.L.; ALMEIDA, N.N.; SILVEIRA, E.A. Mapa de Solos da Região de Poconé/MT: I – Descrição das Unidades. In: simpósio sobre recursos naturais sócio – econômico do Pantanal, 3., 2000, Corumbá. Os desafios do novo milênio. **Resumos...**Corumbá: Embrapa Pantanal, 2000.

HERRERA-CERVERA, J.A.; CABALLERO-MELLADO, J.; LAGUERRE, G.; TICHY, H.V.; REQUENA, N.; AMARGER, N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; OLIVARES, J.; SANJUAN, J. At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Delft, the Netherlands, v. 30, p. 87-97, 1999.

HINTZE, J. NCSS and PASS. Number Cruncher Statistical Systems. Kaysville, UT, USA. (www.ncss.com). 2004.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L.M. DE O.; COCA, R.G.; MEGÍAS, M. Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soyabean nodules in Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.33, p. 1349-1361, 2001.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. M. O.; PROBENZA, A.; GUTTIERREZ-MAÑERO, F. J.; MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 32, n. 11/12, p. 1515-1528, 2000.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; CAMPO, R.J.; CHUEIRE, L.M.O.; ANDRADE, D. de S. The Brazilian experience with the soybean (*Glycine max*) and common bean (*Phaseolus vulgaris*) symbioses. In PEDROSA, F.O; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NEWTON, W.E. (Ed). **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Kluwer: Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, 2000. 515 p.

HUNGRIA, M.; BODDEY, L. H.; SANTOS, M. A.; VARGAS, M. A. T. Nitrogen fixation capacity and nodule occupancy by *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 27, p. 393-399, 1998.

HUNGRIA, M. Coleta de nódulos e isolamento de rizóbio. In: Hungria M.; ARAÚJO, R.S. (Ed.). **Manual e Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola**. Brasília: Embrapa-CNPAP. 1994. p. 45-61.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, n. 2/3, p. 151-164, 2000.

IBGE. Manual técnico da vegetação brasileira (IBGE, ed.), Rio de Janeiro. 1992. 92p.

IZAGUIRRE-MAYORAL, M. ; MALLORCA, M. S . Responses of *Rhizobium*-inoculated and nitrogen-supplied *Phaseolus vulgaris* and *Vigna unguiculata* plants to root volume restriction. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 26, n. 6, p. 613-623, 1999.

JAMES, E. K. ; LOUREIRO, M. F. ; POTT, A.; POTT, V. J. ; MARTINS, C. M.; FRANCO, A. A. ; SPRENT, J. I. Flooding-tolerant legume symbioses from the Brazilian Pantanal. **New Phytologist**, Oxford, v.150, n.3, p. 723–738, 2001.

JAMES, E. K; JANET I. SPRENT, J. I. Development of N-fixing nodules on the wetland legume *Lotus uliginosus* exposed to conditions of flooding. **New Phytologist**, Oxford, v.142 p.219-231, 1999.

JORDAN, D. C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing root nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 32, p. 136–139, 1982.

JUNK, W.J.; SILVA, C. O conceito do pulso de inundação e suas implicações para o Pantanal de Mato Grosso. In: **II Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal: Manejo e Conservação**. Manejo e Conservação. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Pantanal), Corumbá/MS- Brasil, p.17-28,1999.

KENT, A. D.; TRIPLETT, E. W. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. **Annual Review Microbiology**, Madrid, v.56, n., p. 211–236, 2002.

KEYSER, H. H.; van BERKUM, P.; WEBER, D. F. A comparative study of the physiology of symbiosis formed by *Rhizobium japonicum* with *Glycine max*, *Vigna unguiculata*, and *Macroptilium atropurpureum*. **Plant Physiology**, Oxford, v. 70, n. 1, p. 1626-1630, 1982.

LAJUDIE, P. de; WILLEMS, A.; NICK, G.; MOREIRA, F.; MOLOUBA, F.; HOSTE, B.; TORCK, U.; NEYRA, M.; COLLINS, M.D.; LINDSTRÖM, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.48, p.369-382, 1998.

LACHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Paulo: RiMa,2004. 533 p.

LADHA, J. K.; GARCIA, M.; PAREK, R. P.; RARIVOSON, G. Relative contributions to nitrogenase (acetylene reducing) activity of stem and root nodules in *Sesbania rostrata*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, p. 577-583, 1992.

LADHA, J. K.; PAREEK, R. P.; SO, R.; BECKER, M. Stem nodule symbiosis and its unusual properties. In: GRESSHOFF, P.M.; ROTH, L. E.; STACEY, C.; NEWTON, W. L. N_2 fixation: **Achievements and Objectives**, New York: Chapman, p. 633-640,1990.

LIMA, J. L. S. de. **Plantas forrageiras das caatingas-usos e potencialidades**. Petrolina: EMBRAPA-CPATSA/PNE/RBG-KEW, 1996.44p.

LOUREIRO, M. de F.; FARIA, S. M. de; BALDANI, J. .; FRANCO, A. A. Nitrogen-fixing stem nodules of the legume *Discolobium pulchellum* Benth. **New Phytologist**, Oxford, v. 128, n.2, p. 283-295, 1994.

LOUREIRO, M. de F.; FARIA, S. M.; JAMES, E. K.; POTT, A.; FRANCO, A. A. Stem and root nodules on the tropical wetland legume *Aeschynomene fluminensis*. **New Phytologist**, Oxford, v. 130, n.4, p. 283-295, 1995.

LOUREIRO, M. de F. **Caracterização das estirpes de rizóbio e morfologia dos nódulos de raiz e caule de *Aeschynomene* spp. e *Discolobium* spp. nativas do Pantanal Mato-Grossense**. 1994. 205 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.1994.

MARTINS, C.M.; LOUREIRO, M.DE F. ; SOUTO, S. M.; FRANCO, A. A. F. Eficiência da fixação biológica de nitrogênio de isolados de nódulos de caule e raiz de *Discolobium* spp. **Revista Agricultura Tropical**, Cuiabá, v.3, n.1, 2001.

MARTINS, C.M.; LOUREIRO, M.DE F. ; SOUTO, S. M.; FRANCO, A. A. F. Caracterização morfológica e avaliação da tolerância em níveis crescente de NaCl e altas temperaturas de e isolados de nódulos de caule e raiz de *Discolobium* spp. Nativas do Pantanal Mato-Grossense. **Revista Agricultura Tropical**, Cuiabá, v.5, n.1, dez. 2001.

MARTINS, L.M.V. **Características ecológicas e fisiológicas de rizóbio de caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp) isolados a partir de solos da região nordeste do Brasil**. 1996. 213f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 1996.

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

NEVES, M.C.P. ; RUMJANEK, N.G. Ecologia das bactérias diazotróficas nos solos tropicais. p. 15-60. In I. S. Melo; J. L. Azevedo (Ed.). **Ecologia microbiana**. Embrapa-CNPMA, Jaguariúna. 1998. 486 p.1

NOGUEIRA, F.; COUTO, E.G. ; BERNARDI,C.J. Geostatistics as a tool to improve sampling and statistical analysis in Wetlands: A Case Study on Dynamics of Organic Matter Distribution in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**. São Carlos, v. 62, n.4b, p. 861-870, 2002.

NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B. **Manual de Laboratórios: Solo, Água, Nutrição Vegetal**, Nutrição Animal e Alimentos. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005. 313p.

NUNES, F. S.; RAIMONDI, A. C.; NIEDWIESKI, A. C. Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. São Paulo. **Química Nova**, v. 26, n. 6, . p.872-879, 2003.

OKITO, A. et al. Nitrogen fixation by groundnut and velvet bean and residual benefit to a subsequent maize crop. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.12, 2004.

PEREIRA FILHO, J. M. ; AMORIM, O. S. ; Silva, A. M. A. Produção de matéria seca e de proteína bruta da jurema preta (*Mimosa tenuiflora* Wild). In: XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Porto Alegre-RS. **Anais...** Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre p.230-232. 1999.

PETERSON, T. A.; REINSEL, M. D.; KRIZEK, D. T. Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill., cv. 'Better Bush') plant response to root restriction. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 42, n. 243, p. 1233-1240, 1991.

POTT, A.; POTT, V.J. Plantas do Pantanal. Brasília: EMBRAPA, 2004. 320p.il.

POTT, V. J. ; POTT, A. Checklist das macrófitas aquáticas do Pantanal, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v.11,n.2, p. 215-227, 1997.

POTT, A. Pastagens no Pantanal. Corumbá, EMBRAPA/CPAP de Corumbá. 58p. (EMBRAPA-CPAP. Documentos, 7). 1988.

POTT, E. B.; POTT, A. Níveis de nutrientes em plantas não-gramíneas pastejadas por bovinos na sub região dos Paiaguás do Pantanal Mato grossense. **Revista Brasileira de Agricultura Tropical**, Brasília, v. 22, n.11/12, p.1293-1299, 1987.

POWER, J. F.; PETERSON, G. A. Nitrogen transformations, utilization, and conservation as affected by fallow tillage method. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 49, n. 1/2, p. 37-47, 1998.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F. ; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 728 p.

RONCHI, C.P.; DAMATTA, F.M.; BATISTA, K.D.; MORAES, G.A.B.K.; LOUREIRO, M.E.; DUCATTI, C. Growth and photosynthetic down-regulation in *Coffea arabica* in response to restricted root volume. **Functional Plant Biology**. Collingwood, v.33, n.11, p.1013–1023, 2006.

SANTOS, S. A. ; COSTA, C.; SOUZA, G. S. ; POTT, A. ; ALVAREZ, J. M.; MACHADO, S. R. Composição Botânica da Dieta de Bovinos em Pastagem Nativa na Sub-Região da Nhecolândia, Pantanal. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.31, n.4, p.1648-1662, 2002.

SARASWATI, R.; MATOH, T.; SEKIYA, J. Nitrogen-fixation of *Sesbania rostrata* contribution of stem nodules to nitrogen acquisition. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokio, v. 38, p. 775-780, 1992.

SCHEFFER-BASSO, S. M. et al. Nodulação e fixação biológica de nitrogênio de *Adesmia latifolia* e *Lotus corniculatus* em vasos de Leonard. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.3, p.687-693, 2001.

SCHOLLA, M. H.; ELKAN, G. H. *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencer Woods, v. 34, n. 3, p. 484-486, 1984.

SCHWENK, L. M. e SILVA, C. J. da. A etnobotânica da morraria mimoso no Pantanal de Mato Grosso. In. **III simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal: os desafios do novo milênio de 27 a 30 de nov. de 2000-Corumbá/MS.**

SCIVITTAROI W. B. et al .Soils and plant nutrition:fate of nitrogen (¹⁵N) from velvet bean in the soil-plant system. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.61 n.2, 2004.

SEGUIN, P.; SHEAFFER, C.C.; EHLK, N.J.; RUSSELLE, M.P.; GRAHAM, P.H. Nitrogen fertilization and rhizobial inoculation effects on kura clover growth. **Agronomy Journal**, v. 93, n.6, p.1262-1268, 2001.

SILVA, J.S.V. ; ABDON, M.M. Delimitação do Pantanal Brasileiro e suas sub-regiões. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, p. 1703-1711, 1998.

SILVEIRA, A. P.; FREITAS, S. S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental. Campinas.** Instituto Agrônomo, 2007. 312 p.

SOARES, A. F.; SILVA; J. dos S. da; FERRARI, D.L.; Solos da paisagem do Pantanal brasileiro adequação para o atual sistema de classificação. In. **1º Simpósio de Geotecnologias no Pantanal.** Campo Grande, Brasil, 11-15 novembro, Embrapa Informática Agropecuária/INPE, p.275-284,2006.

SOUZA, A. A de. ; ESPÍNDOLA, G. B. Bancos de Proteína de Leucena e de Guandu para Suplementação de Ovinos Mantidos em Pastagens de Capim-Buffel. **Revista brasileira zootecnia**, L v.29, n2, p.365-372, 2000.

TOLEDO, J.M. Pasture development for cattle production in the major ecosystems of the tropical American lowlands. In: International grasslands congress, 15., 1985, Kyoto, Japan. **Proceedings...** Kyoto, Japan: The Science Council of Japan, p.74-81, 1985.

VALARINI, M. J. ; GODOY, R. Contribuição da fixação simbiótica de nitrogênio na produção do Guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.51, n.3, 1994.

VARGAS, M.A.T. ; HUNGRIA, M. Fixação biológica do N₂ na cultura da soja. In: VARGAS, M.A.T. ; HUNGRIA, M., eds. **Biologia dos Solos de Cerrados**. Planaltina, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, p.297-360, 1997.

VINCENT, J. M. **Manual for the Pratical Study of Root Nodule Bacteria**. Oxford: Blacwell, 1970. 164 p.

VOGEL, A. I. **Análise Química Quantitativa**. Tradução: Horácio Macedo. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1992. 712p.

WANG, E. T.; MARTÍNEZ-ROMERO, J.; LÓPEZ, I. Rhizobium y su destacada simbiosis con plantas. **Microbios en linea**. Disponível em: <www.biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap8/>. Acesso em : 10 de out. de 2007.

XU, L. M.; GE, C. Physiological-biochemical characteristics and symbiotic response of the fast growing Rhizobium japonicum. **Soybean Science**, v. 3, p. 102-109, 1984.

YASUHARA, T.; NOKIHARA, K. High-throughput analysis of total nitrogen content that replaces the classic Kjeldahl method. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, p. 4581-4583, 2001.

YOSHIDA, S. Fundamentals of crop science. Manila: **International Rice Research Institute**, 170 p, 1981.

YOUNG, J. M. The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination '*Sinorhizobium adhaerens*' (Casida 1982) Willems et al. 2003 legitimate? Request for an Opinion. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Spencer Woods, v.53, n.6, p.2107-2110, 2003.

ZAKHIA, F.; LAJUDIE, P. Taxonomy of Rhizobia. **Agronomie**, v. 21. n. 6, p. 569-576. 2001.

APÊNDICE A- Características dos parâmetros físico-químicos da água

O pH da água de inundação das plantas apresentou um efeito significativo do tempo de amostragem ($p < 0,01$) e do tipo de substrato empregado ($p < 0,01$).

Em média, os grupos de plantas sob solo do Pantanal apresentaram valores de pH da água de inundação iguais a $8,02 \pm 0,05$, superiores aos daquelas cultivadas em terra preta, pH igual a $7,92 \pm 0,06$, independentemente do tempo e se as plantas foram, ou não, inoculadas.

Os valores máximo e mínimo do pH da água de inundação apresentado ao longo do experimento nas plantas cultivadas em solo do Pantanal foram iguais a 8,5 e 7,3, respectivamente; ao passo que em substrato com terra preta, esses mesmos valores foram iguais a 8,4 e 7,0, respectivamente (Figura A1).

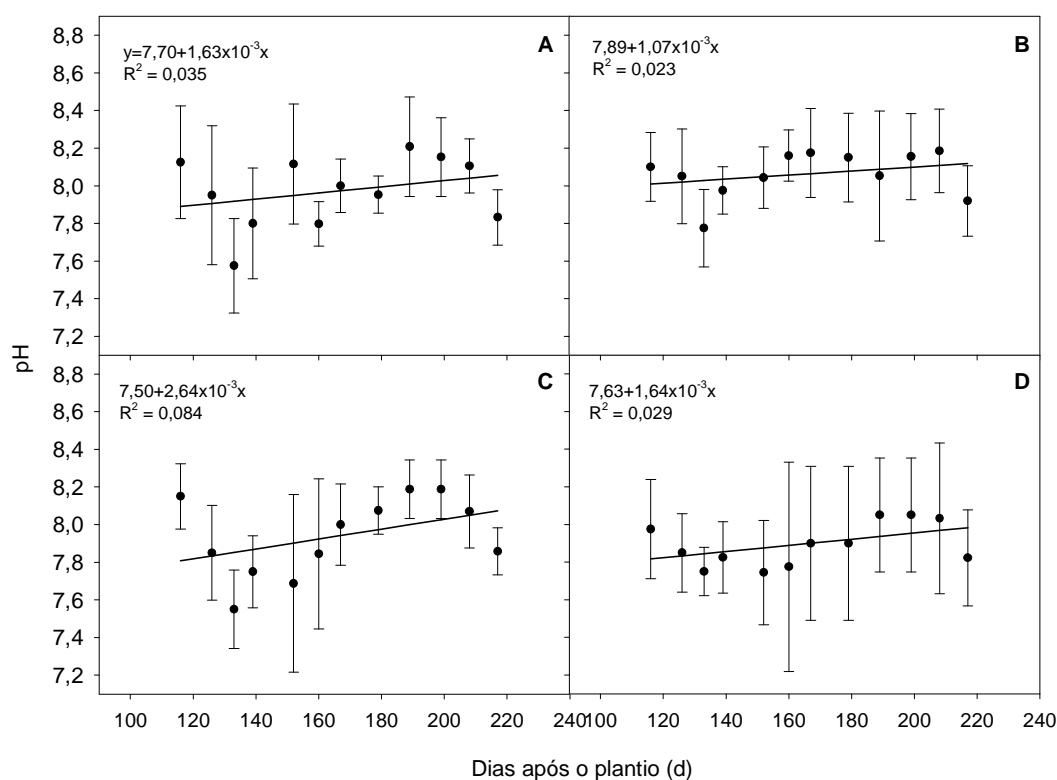


Figura A1- Modelos de regressão linear para as variações diárias do pH da água de inundação em plantas de *Discolobium* sp. cultivadas em solo do Pantanal e inoculadas (A), em solo do Pantanal e não inoculadas (B), em terra preta e inoculadas (C) e em terra preta e não inoculadas (D).

Pela análise dos modelos de regressão linear da dinâmica do pH, verifica-se que somente a equação apresentada para o tratamento referente ao cultivo com terra preta com plantas não inoculadas é significativa. Todas as demais equações apresentam um coeficiente angular que não difere estatisticamente de zero.

Considerando que as bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium* crescem em pH na faixa ótima de 6 a 7, podendo algumas estirpes crescerem em pH na faixa de 4,5 a 9,5, considera-se que o pH da água de inundação esteve dentro da faixa permissível ao desenvolvimento, não se constituindo em um fator restritivo.

Com relação à condutividade elétrica da água de inundação, essa variável também foi afetada pelos tratamentos da mesma maneira que o seu pH, sendo afetada significativamente pelo tempo de amostragem ($p < 0,01$) e pelo substrato utilizado ($p < 0,01$).

Em média, a água de inundação das plantas crescidas em solo do Pantanal apresentou valor de condutividade elétrica igual a $-61 \pm 3 \mu\text{S cm}^{-1}$, significativamente inferior àquele observado para plantas crescidas em terra preta, com valor de $-56 \pm 3 \mu\text{S cm}^{-1}$, independentemente do tempo e se as plantas foram, ou não, inoculadas.

Os valores máximo e mínimo da condutividade elétrica da água de inundação verificado ao longo do experimento nas plantas cultivadas em solo do Pantanal foram iguais a -20 e $-94 \mu\text{S cm}^{-1}$, respectivamente; ao passo que em substrato com terra preta, esses mesmos valores foram iguais a -15 e a $-86 \mu\text{S cm}^{-1}$, respectivamente (Figura A2).

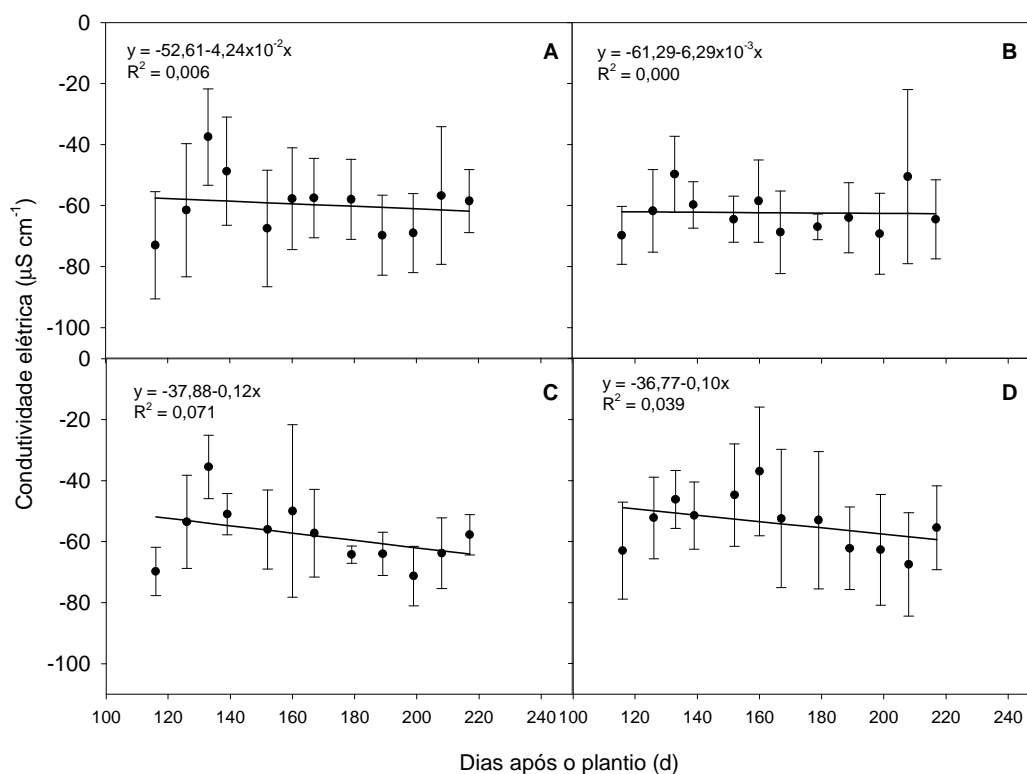


Figura A2- Modelos de regressão linear para as variações diárias da condutividade elétrica da água de inundação em plantas de *Discolobium* sp. cultivadas em solo do Pantanal e inoculadas (A), em solo do Pantanal e não inoculadas (B), em terra preta e inoculadas (C) e em terra preta e não inoculadas (D).

Neste caso, analisando-se os modelos de regressão linear da dinâmica da condutividade elétrica, verificou-se que todas as equações não foram significativas.

APÊNDICE B- Equipamentos

- Bloco digestor;
- Capela para exaustão de gases;
- Destilador de nitrogênio;
- Bureta automática;
- Erlenmeyer de 50 mL;
- Balança analítica - precisão ($\pm 0,0001\text{g}$);
- Tubo de ensaio com borda reforçada (25x250 mm);
- Frascos dosadores de reagente;
- Espátula;
- Papel impermeável.

APÊNDICE C- Reagentes e soluções

- Ácido sulfúrico (H_2SO_4), p.a., concentrado;
- Hidróxido de sódio (NaOH) a 40% (m/v);
- Sulfato de sódio (Na_2SO_4);
- Sulfato de cobre pentaidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$);
- Ácido clorídrico (HCl) 0,01 mol/L;
- Solução alcoólica de verde de bromocresol, a 0,1% (m/v);
- Solução alcoólica de vermelho de metila a 0,1% (m/v);
- Solução alcoólica de vermelho de metila a 0,04% (m/v);
- Solução de ácido bórico, a 2% (m/v).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)