

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

SELEÇÃO DE RIZÓBIOS PARA TREVO BRANCO

Jonatas Bredow Alves
(Dissertação)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

SELEÇÃO DE RIZÓBIOS PARA TREVO BRANCO

JONATAS BREDOW ALVES
Engenheiro Agrônomo (UFSM)

Dissertação apresentada como
um dos requisitos para obtenção do
grau de Mestre em Ciência do Solo

Porto Alegre (RS) Brasil

Julho de 2005

AGRADECIMENTOS

Ao professor Enilson Luiz Saccol de Sá, pela orientação, confiança, amizade e apoio recebido durante a realização deste trabalho.

Ao professor Pedro Alberto Selbach, pela oportunidade de orientação no início do curso.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo pela oportunidade de realização do curso.

A UNESCO pelo financiamento do projeto.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia do Solo da UFRGS: Carlos, Mariel, Márcia, Márcio, Cássia, Adriana, Rodrigo, Rafael, Andréia, Antônia.

Aos professores do curso, dos quais recebi imensa contribuição para minha formação e realização deste trabalho.

Aos colegas de curso Leandro, Márcio Wally, Márcio Lauschner, Fabiano e Elisandra pelo convívio, ensinamentos e troca de idéias.

Ao funcionário José (Zé), pelo auxílio na condução dos experimentos em casa-de-vegetação.

À minha mãe Marilene, pelo constante incentivo e de alguma forma pela possibilidade de realização do curso.

A pessoa mais importante da minha vida, minha filha Elisa, simplesmente por existir e fazer com que eu tenha cada vez mais razões para viver.

SELEÇÃO DE RIZÓBIOS PARA TREVO BRANCO ⁽¹⁾

Autor: Jonatas Bredow Alves

Orientador: Enilson Luiz Saccol de Sá

RESUMO

Devido à grande extensão das áreas de várzea no estado Rio Grande do Sul, a implantação de leguminosas forrageiras de inverno que possuam a capacidade de fixação simbiótica de nitrogênio (FBN), como o trevo branco, constitui-se em uma ótima alternativa para aumentar os índices de produtividade destas áreas. Porém, esse benefício só pode ser obtido se a leguminosa estiver associada a estirpes de rizóbio que fixem nitrogênio nessas condições. O objetivo do trabalho foi isolar, caracterizar e selecionar, de solos do estado, rizóbios nativos eficientes na FBN em simbiose com trevo branco, bem como avaliar a tolerância dessa simbiose às condições de alagamento do solo. Foram isolados 126 rizóbios nativos de amostras de solos de 14 municípios do estado, e todos foram avaliados quanto a capacidade de solubilização de fosfato tricálcico, utilização de carboidratos e produção de melanina. A capacidade para fixar nitrogênio de 43 destes isolados foi avaliada em um experimento em casa de vegetação utilizando-se vasos Leonard. Os isolados de cada região considerados mais eficientes foram selecionados para a avaliação da capacidade de fixar nitrogênio em condições de alagamento do solo. Nesse experimento, cada tratamento foi mantido sob duas condições de umidade do solo, com alagamento e próximo à capacidade de campo (C.C.). Entre os isolados avaliados, apenas o N2 foi capaz de produzir melanina. Observou-se muita variação quanto a capacidade para utilizar carboidratos e solubilização de fosfato. O alagamento do solo reduziu significativamente o número e a massa de nódulos, assim como a produção de matéria seca e o acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas inoculadas com rizóbio. Observou-se a existência de variabilidade na sensibilidade da simbiose rizóbio/trevo branco ao alagamento do solo em função do rizóbio inoculado. Os isolados avaliados em condições de umidade do solo próxima à capacidade de campo, com exceção do EA20 e BG3, apresentaram eficiência semelhante a estirpe SEMIA 222 na fixação simbiótica de nitrogênio. Os isolados CVII, P₃₄, T4 e VP16 foram os mais eficientes na fixação de nitrogênio em condições de alagamento do solo, superando o tratamento controle com adição de nitrogênio no acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas. Os resultados deste trabalho mostram que a fixação de nitrogênio pela simbiose rizóbio/trevo branco pode ocorrer em condições de alagamento do solo como as que ocorrem em áreas de várzeas.

(1) Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. (68p.) julho, 2005.

SELECTION OF RHIZOBIA FOR WHITE CLOVER ⁽¹⁾

Author: Jonatas Bredow Alves

Adviser: Enilson Luiz Saccol de Sá

ABSTRACT

Due to the great extension of lowland areas in Rio Grande do Sul state, the implantation of winter legume forages with capacity of biological nitrogen fixation (BNF), as white clover, consists in an excellent alternative to increase the productivity of these areas. However, this benefit can only be obtained if the legume was associated with rhizobia strains that fix nitrogen in these conditions. The objective of this work was to isolate, to characterize and to select, from soils of the state, efficient rhizobia on BNF in symbiosis with white clover, and also to evaluate the symbiosis tolerance to the soil waterlogging conditions. From soil samples of 14 municipalities of the state, 126 rhizobia isolates were obtained and evaluated on the capacity of phosphate solubilization, carbohydrate utilization and melanin production. The capacity of symbiotic nitrogen fixation of 43 isolates was evaluated in greenhouse experiment using Leonard jars. The rhizobia isolates of each region considered more efficient were selected for the evaluation of the nitrogen fixation capacity under soil waterlogging conditions. In this experiment, each treatment was kept under two soil humidity conditions, under flooding and around the field capacity. Among the evaluated isolates, only N2 was capable to produce melanin. Variation was observed on carbohydrate utilization and phosphate solubilization capacity. The soil waterlogging significantly reduced the number and the mass of nodules, the production of dry matter and the accumulation of nitrogen in the aerial part of plants inoculated with rhizobia. The existence of variability on the symbiosis rhizobia/white clover sensitivity to the waterlogging was observed depending of the rhizobia isolate inoculated. All rhizobia isolates, except the isolates EA20 and BG3, evaluated on field capacity soil moisture showed symbiotic nitrogen fixation efficiency similar to the strain SEMIA 222. Isolates CVII, P34, T4 and VP16 were the most efficient in the nitrogen fixation in soil waterlogging conditions, surpassing the control with nitrogen on the nitrogen accumulation in the aerial part of plants. The results from this work shows that the nitrogen fixation by the symbiosis rhizobia/white clover can occur in soil waterlogged conditions of lowland areas.

⁽¹⁾ M. Sc. Dissertation in Soil Science, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. (68p.) July, 2005.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2.1 Alterações no solo provocadas pelo alagamento	03
2.2 Trevo branco (<i>Trifolium repens</i> L.)	04
2.3 Fixação simbiótica de nitrogênio em trevo branco	05
2.4 Respostas das plantas às condições de alagamento do solo	08
2.5 Fixação simbiótica de nitrogênio em condições de alagamento do solo	12
2.6 Solubilização de fosfato	15
2.7 Utilização de carboidratos	16
2.8 Produção de melanina	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Obtenção dos nódulos	20
3.2 Isolamento dos rizóbios	21
3.3 Autenticação dos isolados	21
3.4 Solubilização de fosfato.....	22
3.5 Utilização de carboidratos.....	22
3.6 Produção de melanina	23
3.7 Avaliação da eficiência dos isolados na fixação simbiótica de nitrogênio.....	23
3.8 Fixação simbiótica de nitrogênio em condições de alagamento do solo	25
3.9 Análise estatística	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 Isolamento e autenticação dos rizóbios	28
4.2 Solubilização de fosfato	28
4.3 Utilização de carboidratos	31
4.4 Produção de melanina	32
4.5 Eficiência na fixação simbiótica de nitrogênio em plantas de trevo branco inoculadas com isolados de rizóbio e cultivadas em solução nutritiva	36
4.5.1 Produção de matéria seca e nitrogênio total da parte aérea das plantas de trevo branco	36
4.5.2 Número e massa de nódulos secos nas raízes das plantas de trevo branco	39
4.5.3 Eficiência relativa	41

4.6	Fixação simbiótica de nitrogênio em condições de alagamento do solo	41
4.6.1	Produção de matéria seca da parte aérea das plantas	41
4.6.2	Acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas	45
4.6.3	Número e massa de nódulos secos	50
4.6.4	Eficiência relativa	52
5.	CONCLUSÕES	55
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Identificação e origem dos 126 rizóbios isolados e autenticados nesse trabalho	29
2. Diâmetros dos halos, colônias e índices de solubilização de fosfato pelos isolados de rizóbio em placas contendo o meio de cultura suplementado com 0,1% de fosfato tricálcico	30
3. Produção de melanina e utilização dos diferentes carboidratos pelos isolados de rizóbio	33
4. Produção de matéria seca (MSPA), nitrogênio total na parte aérea (NF), número (NN) e massa de nódulos (MNS) nos diferentes tratamentos	38
5. Produção de matéria seca da parte aérea das plantas de trevo branco, nos tratamentos inoculados e controle, cultivadas em diferentes condições de umidade do solo. (médias de 4 repetições)	43
6. Nitrogênio acumulado na parte aérea das plantas nos tratamentos em diferentes condições de umidade do solo. (médias de 4 repetições)	46
7. Número e massa de nódulos secos das plantas nos tratamentos em diferentes condições de umidade do solo. (médias de 4 repetições)	51

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Eficiência relativa no acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas inoculadas com isolados e estirpes, no experimento em vasos “Leonard” com solução nutritiva	42
2. Relação entre a produção relativa de matéria seca da parte aérea e acúmulo relativo de nitrogênio na parte aérea das plantas inoculadas ou adubadas ou não com nitrogênio	48
3. Aproveitamento relativo da fixação simbiótica de nitrogênio nas condições de alagamento do solo em relação à fixação nas condições de umidade do solo próximas à capacidade de campo	49
4. Eficiência relativa no acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas inoculadas com isolados e estirpes, em diferentes condições de umidade do solo	53

1. INTRODUÇÃO

No estado do Rio Grande do Sul, existem cerca de 5,4 milhões de hectares de áreas de várzea, caracterizadas pelo relevo plano e pela presença de solos hidromórficos com drenagem natural deficiente, o que resulta em períodos de alagamento do solo nas épocas de maior precipitação pluviométrica. Estas áreas apresentam limitações ao uso agrícola, sendo utilizadas principalmente para o cultivo do arroz irrigado e pela pecuária extensiva ou mantida em pousio, resultando assim em uma baixa exploração econômica, principalmente pelos baixos índices de produtividade animal da pecuária extensiva.

A implantação de leguminosas forrageiras de inverno que possuam a capacidade de fixação simbiótica de nitrogênio como o trevo branco (*Trifolium repens* L.) constitui-se em uma ótima alternativa para aumentar os índices de produtividade destas áreas, pois são forrageiras com alto valor nutritivo por apresentarem um teor elevado de proteína bruta com alta digestibilidade. Porém, os benefícios da fixação simbiótica de nitrogênio só podem ser obtidos se a leguminosa estiver associada a estirpes de rizóbio eficientes na fixação de nitrogênio, mesmo em condições de alagamento do solo, comum em áreas de várzea.

O trevo branco (*Trifolium repens* L.) é uma das leguminosas forrageiras que apresenta maior adaptação às condições de alagamento do solo, pois tem a capacidade de formação de aerênquima, o que permite o suprimento de oxigênio para as raízes e nódulos radiculares.

Desta forma, plantas de trevo branco inoculadas com estirpes eficientes de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*, podem ser capazes de fixar nitrogênio em solos sob alagamento. Além disso, é possível que nessas

condições exista variabilidade na eficiência de fixação de nitrogênio por diferentes isolados de rizóbio.

Os objetivos desse trabalho foram os seguintes:

- a) Isolamento e seleção de rizóbios eficientes na fixação de nitrogênio em simbiose com trevo branco, de solos do Rio Grande do Sul;
- b) Avaliação da tolerância da simbiose entre trevo branco e rizóbios nativos selecionados às condições de alagamento do solo;
- c) Seleção de isolados de rizóbio nativos eficientes na fixação simbiótica de nitrogênio em trevo branco sob condições de alagamento do solo;
- d) Caracterização dos isolados de rizóbio nativos quanto a capacidade de solubilizar fosfato inorgânico, utilização de carboidratos e produção de melanina.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Alterações no solo provocadas pelo alagamento

Nos solos hidromórficos, freqüentemente ocorrem alagamentos temporários ou contínuos, ocasionados principalmente pelo excesso de precipitação pluviométrica e pela drenagem natural deficiente desses solos. Esta drenagem deficiente é decorrente da presença de uma camada subsuperficial compactada caracterizada pelo acúmulo de argila, proporcionando assim, uma baixa condutividade hidráulica ao solo.

A primeira alteração provocada pelo alagamento é a redução dos níveis de oxigênio, pois a água que infiltra no perfil ocupa os espaços porosos, eliminando assim a quase totalidade do oxigênio do solo. A pequena quantidade de oxigênio que permanece é rapidamente consumida pela respiração das raízes e pela atividade dos microrganismos do solo (Setter & Belford, 1990; Ernst, 1990). Nessas condições, a renovação do oxigênio pelo fluxo do ar atmosférico é prejudicada pela sua baixa taxa de difusão em solos saturados, cerca de 10.000 vezes mais lenta do que em solos bem drenados (Grable, 1966; Patrick & Mahapatra, 1968; Sanchez, 1976).

Mudanças na estrutura do solo em decorrência do alagamento tipicamente incluem quebra de agregados, dispersão de argilas e destruição de agentes cimentantes, o que acarreta em um aumento na densidade do solo após o fim do alagamento (Ponnamperuma, 1972; 1984).

Os valores de pH do solo tendem a neutralidade após algumas semanas de alagamento. Em solos ácidos, esse aumento nos valores de pH está associado ao consumo de H^+ ocasionado pela redução dos compostos oxidados como nitratos, sulfatos, óxidos de ferro e manganês (Ponnamperuma, 1977). Esta redução é mediada por microrganismos anaeróbios que utilizam

esses compostos como aceptores de elétrons na falta de oxigênio para o seu metabolismo.

O alagamento altera a concentração e a mobilidade dos nutrientes na solução do solo. Desta forma, os nutrientes que chegam até as raízes por difusão, principalmente fósforo e potássio, são favorecidos pela condição de abundância de água (Vahl e Lopes, 1998).

O comportamento do nitrogênio também é bastante afetado após o alagamento do solo. Nessas condições, o processo de nitrificação, que consiste na transformação do íon amônio (NH_4^+) a nitrato (NO_3^-), não ocorre, pois os microrganismos que o realizam são estritamente aeróbios. Desta forma, a decomposição da matéria orgânica resulta na acumulação do íon amônio que, dependendo do pH do solo, poderá ser perdido por volatilização, especialmente em solos originalmente ácidos que tiveram o pH elevado após o alagamento (Mikkelsen et al., 1978). Imediatamente após o alagamento, a principal forma do nitrogênio em solo aerado, o nitrato, é rapidamente transformado em N_2O e N_2 e perdido para a atmosfera através do processo de desnitrificação (Mascagni & Sabbe, 1991; Humphrey et al., 1991).

Portanto, o uso da adubação nitrogenada em solos susceptíveis ao alagamento requer muita atenção devido ao grande risco de perdas do nutriente, seja na forma amoniacal (uréia, sulfato de amônio) ou na forma nítrica (nitrato de potássio, nitrato de amônio).

2.2 Trevo branco (*Trifolium repens* L.)

O trevo branco é uma espécie forrageira perene originária da região do Mediterrâneo e cultivada em várias regiões temperadas e subtropicais do mundo (Frame & Newbould, 1986). Essa leguminosa tende a se naturalizar em regiões em que o volume de precipitação pluviométrica anual ultrapasse 750mm (Jahufer et al., 2002). Além disso, apresenta grande importância na formação de pastagens por apresentar excelentes qualidades como produção de forragem de alta qualidade, habilidade para competir com gramíneas perenes e apresentar alta capacidade de fixação simbiótica de nitrogênio (Carlsson & Huss-Danell, 2003).

As estruturas básicas de crescimento do trevo branco são os estolões, que consistem em um tipo de caule horizontal com uma série de

internós separados por nós. De cada nó nasce uma folha trifoliolada e raízes adventícias são emitidas quando ocorre o contato dos estolões com o solo úmido. Essas características permitem que a plantas sejam sustentadas pelas novas raízes em caso de morte da raiz principal por algum estresse abiótico como o alagamento do solo, tornando-se assim, plantas independentes (Thomas, 1987). Além disso, a característica de crescimento prostrado com grande quantidade de estolões lhe permite grande resistência ao pastejo (Monteiro et al., 1996).

Geralmente, o cultivo do trevo branco como pastagem se dá em associação com gramíneas, especialmente com azévem (*Lolium perenne*) (Vinther, 1998; Hogh-Jensen & Schjorring, 1997; Vinther & Jensen, 2000). Essa associação ocorre principalmente devido ao risco de ocorrência de timpanismo em animais que se alimentam estritamente com a leguminosa (Davies, 1992).

2.3 Fixação simbiótica de nitrogênio em trevo branco

A utilização do trevo branco (*Trifolium repens* L.) na formação de pastagens apresenta como principal vantagem a alta capacidade de fixação biológica de nitrogênio (Carlsson & Huss-Danell, 2003). Devido à simbiose com os rizóbios, o trevo branco tem um grande potencial de aumentar a sustentabilidade da atividade pecuária principalmente por proporcionar quantidades substanciais de nitrogênio para as plantas e também para o solo, reduzindo a necessidade de fertilizantes nitrogenados.

A fixação simbiótica de nitrogênio em trevo branco pode ser limitada por qualquer fator que limite o crescimento da planta, pois neste caso a demanda por nitrogênio é reduzida (Crush, 1987). Dentre esses fatores pode-se citar a acidez e a baixa fertilidade do solo (Dunlop & Hart, 1987), a competição com pastagem em associação (Frame & Laidlaw, 2000), o pastejo (Marriot & Haystead, 1990; Eriksen & Hogh Jensen, 1998) e outros como o alagamento do solo (Mundy et al., 1988).

Por outro lado, a fixação no nitrogênio em trevo branco também pode ser limitada por fatores que afetem diretamente o microssimbionte e a sua sobrevivência, como a acidez do solo (Bordeleau & Prévost, 1994) e a competição com rizóbios nativos (Svenning et al., 1991).

As quantidades de nitrogênio fixadas em pastagens de trevo branco, associadas ou não à gramíneas, variam bastante entre os resultados obtidos. Em trevo branco cultivado como monocultura na Nova Zelândia, Kumar & Goh (2000) observaram quantidades de nitrogênio fixado de até 327 kg ha⁻¹ ano⁻¹. Campillo et al. (2003) observaram quantidades que variaram de 232-396 kg N fixado ha⁻¹ ano⁻¹ em trevo branco cultivado no Chile sob monocultura durante 4 anos.

Já Vinther & Jensen (2000) observaram quantidades que variaram de 15 até 235 kg N fixado ha⁻¹ ano⁻¹ pelo trevo branco associado a Azéven (*Lolium perenne*) na Dinamarca. Esses autores atribuíram esta grande variação nas quantidades de nitrogênio fixado via simbiose à diferença na fertilidade entre os solos das áreas cultivadas.

Carlsson & Huss-Danell (2003) revisando diversos estudos sobre a fixação simbiótica de nitrogênio em leguminosas forrageiras, encontraram valores de até 545 kg N fixado ha⁻¹ ano⁻¹ em pastagens de trevo branco, associada ou não à gramíneas, de diversos locais de clima temperado e subtropical.

É importante ressaltar que o uso apenas da parte aérea das plantas para se determinar as quantidades de nitrogênio fixadas em pastagens com leguminosas, subestimam a total contribuição do processo de fixação simbiótica de nitrogênio para o aporte desse elemento no sistema solo-planta (Riffkin et al., 1999).

Alguns autores indicam que os órgãos das plantas situados abaixo da superfície do solo podem contribuir com até 40% do nitrogênio total contido na planta (MacNeill et al., 1997; Peoples et al., 1998). Do mesmo modo, Jorgensen & Ledgard (1997) observaram que a quantidade de nitrogênio em órgãos subterrâneos de trevo branco (raízes e nódulos) pode representar até 60% do nitrogênio total fixado pela mesma, contribuindo assim para aumentar os teores de nitrogênio do solo.

Geralmente, o cultivo do trevo branco se dá em associação com gramíneas. Com essa associação, além do benefício direto, boa parte do nitrogênio fixado pela leguminosa pode ser transferido para a gramínea em associação. Esta transferência ocorre pela deterioração de partes subterrâneas

da planta, pela decomposição de tecidos ricos em nitrogênio e também pelo aporte de dejetos dos animais em pastejo.

Além do sistema radicular, a liberação de nitrogênio dos nódulos da planta é considerada uma importante fonte de transferência desse elemento para a gramínea em associação (Russelle et al., 1994), pois de acordo com Whitehead (1995), o teor de nitrogênio nos nódulos de trevo branco pode chegar a 9% enquanto nas folhas, esse teor dificilmente chega a 5%. Além disso, segundo Whitehead, (1995), os nódulos representam de 20-35% da massa total da planta em ativo processo de fixação.

Em geral, espécies perenes de hábito estolonífero como o trevo branco, proporcionam maior transferência do nitrogênio fixado em comparação às leguminosas de hábito ereto (Laidlaw et al., 1996). A decomposição de tecidos ricos em nitrogênio como folhas e estolões representa boa parte do nitrogênio transferido, principalmente por ocasião de algum estresse que leve a morte da leguminosa (Woledge et al., 1990).

O nitrogênio fixado pelo trevo branco também pode ser transferido para a gramínea em associação de uma forma indireta, através do aporte de dejetos dos animais em pastejo pois segundo Ledgard & Steele (1992), cerca de 75-85% do nitrogênio consumido pelo animal é excretado via dejetos, principalmente pela urina.

Os valores de nitrogênio transferido para as gramíneas associadas apresentam grande variação. Whitehead (1995) cita valores entre 0-75% do nitrogênio fixado pela planta. Avaliando a transferência de nitrogênio do trevo branco para o azevém, sob baixos níveis de adubação nitrogenada, Boller & Nösberger (1987) observaram que cerca de 80% do nitrogênio absorvido pela gramínea era proveniente do fixado pela leguminosa.

Geralmente as quantidades de nitrogênio transferido são baixas no primeiro ano de produção. Em parcelas experimentais na Dinamarca, os valores de nitrogênio transferido do trevo branco para azevém foram de apenas 3% no primeiro ano, enquanto que no terceiro ano os valores chegaram a 22% (Hogh-Jensen & Schjorring, 1997).

A aplicação de nitrogênio em pastagens de trevo branco, além de constituir um alto custo relativo, pode diminuir a fixação simbiótica de nitrogênio por atrasar a nodulação (Crush, 1987), reduzir o número e o tamanho de

nódulos (Cowling, 1961), reduzir a atividade da enzima nitrogenase (Etilib & Ledgard, 1988) e indiretamente, por diminuir a proporção do trevo branco na pastagem quando associado à gramíneas.

2.4 Respostas das plantas às condições de alagamento do solo

O primeiro fator que influencia o crescimento de plantas após o alagamento do solo é a disponibilidade de oxigênio, pois em questão de horas os níveis do elemento chegam a menos de 2%, o que é insuficiente para manter a capacidade respiratória normal das raízes e sustentar o máximo potencial produtivo das plantas (Liao & Lin, 2001; Vartapetian & Jackson, 2001).

A exclusão do oxigênio altera o metabolismo das plantas que passam a realizar a respiração anaeróbia. Segundo Crawford (1992), a troca da respiração aeróbia (fosforilação oxidativa) pela anaeróbia (fermentação) afeta severamente a disponibilidade de energia, requerendo grandes quantidades de reserva de carboidratos existentes na planta. Para cada mol de glicose metabolizado, a respiração aeróbia produz 32 mol de ATP, enquanto que a respiração anaeróbia produz apenas 2 mol de ATP (Vartapetian & Jackson, 2001).

Além da menor eficiência energética, a translocação de carboidratos também é sensível às condições de anaerobiose e, dependendo da planta, não consegue sustentar a alta demanda exigida pelas raízes durante o alagamento (Drew, 1997). Por este motivo, a capacidade de armazenar grandes quantidades de carboidratos em raízes, rizomas ou estolões pode conferir tolerância a períodos de alagamento às espécies (Haldemann & Brandle, 1988; Bertrand et al., 2003).

As plantas susceptíveis a excesso hídrico exibem mudanças nos processos metabólicos e fisiológicos como a redução na condutância radicular ocasionando murchamento vegetal, fechamento estomático, redução da absorção de água e redução da taxa de fotossíntese (Baruch, 1994).

As células do sistema radicular ao se tornarem anaeróbias estimulam as vias glicolíticas e fermentativas, produzindo grandes quantidades de gases como dióxido de carbono, etanol e metanol (Drew, 1997). Devido a

baixa difusão de gases na água, o acúmulo desses gases pode ser altamente fitotóxico para as raízes das plantas (Dat et al., 2004).

Além das modificações metabólicas e fisiológicas, as condições impostas às plantas pelo alagamento do solo, provocam alterações tanto no balanço quanto na quantidade de hormônios produzidos. Em geral, essas alterações acarretam em uma diminuição no crescimento das plantas, pois em alagamento, os níveis do hormônio ABA (ácido abscísico) diminuem quando comparado à raízes em condições aeradas (Huang & Van Toai, 1991; Else et al., 1995). A redução dos níveis de ABA pode comprometer o desenvolvimento das plantas sob alagamento pois segundo Huang & Van Toai (1991), a aplicação de ácido abscísico aumenta a tolerância das plantas às condições de anaerobiose.

Dentre os vários hormônios afetados pelo alagamento, o etileno é o que mais se destaca, devido ao aumento na sua concentração. Esse aumento é atribuído ao aumento da síntese associada a redução do movimento para fora das raízes, ocasionando a retenção de etileno no tecido radicular pelo fato do hormônio ser menos solúvel em água do que em ar (Musgrave et al., 1972; Voesenek et al., 1993).

A importância do etileno na anatomia de muitas plantas sob condições de alagamento está relacionada à formação de aerênquima nas raízes (Armstrong, 1979; Drew et al., 1979; Baluska et al., 1993; Drew et al., 1994). Aerênquima são espaços corticais que permitem o transporte de oxigênio da parte aérea das plantas para as raízes, re-oxidando assim as raízes nessas condições. Esse transporte do oxigênio permite que a planta mantenha o processo de respiração aeróbia, aumentando assim a tolerância ao alagamento (Justin & Armstrong, 1987).

A função do etileno na formação de aerênquima está relacionada ao aumento da atividade da celulase que degrada a parede celular formando os espaços responsáveis pelo transporte do oxigênio até o sistema radicular (Jackson et al., 1993; Drew et al., 1994). Porém, alguns autores ressaltam que o mecanismo de formação de aerênquima varia entre plantas, mas que em geral, está associado à ação do etileno (Webb & Jackson, 1986; Baluska et al., 1993).

A arranjo das células provocado pela formação de aerênquima leva a um aumento na porosidade radicular para permitir o fluxo de oxigênio da parte aérea para as raízes das plantas (Justin & Armstrong, 1987). Consequentemente, espécies tolerantes tendem a apresentar maior porosidade radicular do que as espécies sensíveis ao alagamento do solo (Laan et al., 1989).

Além da formação de aerênquima, as plantas podem desenvolver um outro mecanismo de tolerância ao alagamento do solo, a formação de raízes adventícias (Drew et al., 1979; Kawase, 1981; Gibberd et al., 2001). Esta formação é um mecanismo utilizado pelas plantas para repor as raízes mortas ou que perderam suas funções pelas condições de baixos níveis de oxigênio impostas pelo alagamento (Vartapetian & Jackson, 2001).

As raízes adventícias usualmente emergem da base do caule crescendo tanto no solo como na água. O crescimento horizontal dessas raízes próximo à superfície da água, associado a sua localização, próxima aos locais de formação de aerênquima, proporcionam uma maior quantidade de oxigênio em relação ao antigo sistema radicular danificado (Jackson & Drew, 1984).

Assim como a formação de aerênquima, a emissão de raízes adventícias também está relacionada com a ação do etileno. O alagamento do solo proporciona o acúmulo de etileno e também de auxina em raízes e caules de plantas. Este aumento associado a diminuição nos níveis de giberelinas e citocininas nessas condições, favorecem a emissão de raízes adventícias (McNamara & Mitchell, 1991; Visser et al., 1995).

Regehr et al. (1975), reportam que o transporte de água, assim como o de oxigênio, também é melhorado pelas raízes adventícias em comparação às raízes originais sob anaerobiose, promovendo a reabertura estomática durante períodos prolongados de alagamento. Outra função do etileno em plantas sob condições de alagamento, está relacionada com o aumento do comprimento das plantas quando em completa submersão (Voesenek et al., 2003; Vriezen et al., 2003), especialmente em períodos de maior precipitação pluviométrica.

Em um estudo que avaliou o comportamento de 20 espécies do gênero *Trifolium* em condições de alagamento do solo, Gibberd et al. (2001) observaram que todas as espécies tiveram o crescimento da raiz principal

severamente reduzido após o alagamento do solo e, posteriormente, na maioria das espécies ocorreu o desenvolvimento de raízes laterais, que cresceram próximas à superfície do solo e no sentido horizontal. Dentre as espécies avaliadas, nove foram consideradas tolerantes por não sofrerem redução no crescimento vegetativo após o alagamento do solo, sendo que nestas espécies foram observados aumentos consideráveis nos valores de porosidade radicular, o que esteve diretamente associado à formação de aerênquima.

Aschi-Smiti et al. (2003a), estudaram o efeito de diferentes períodos de alagamento do solo no crescimento de quatro variedades de *Trifolium subterraneum* L. e observaram que a variedade Park foi a única que não teve o crescimento reduzido após o alagamento do solo. Além disso, quando expostas a 10 dias de alagamento, as plantas dessa variedade alcançaram uma produção de matéria seca 26% superior ao tratamento que não recebeu alagamento. Esse comportamento levou Aschi-Smiti et al. (2003b), a avaliarem a tolerância dessa variedade à baixas concentrações de oxigênio em solução nutritiva. Os autores concluíram que a emissão de raízes adventícias, associada à formação de aerênquima, foram os principais mecanismos de resistência da planta à essas condições. Além disso, foi observado que a emissão de raízes adventícias ocorreu imediatamente após a morte da raiz principal, que por sua vez, foi ocasionada pela falta de oxigênio.

Gibberd et al. (1999), avaliaram as diferenças no comportamento de duas espécies do gênero *Trifolium* em condições de anaerobiose radicular, sendo uma espécie previamente considerada resistente (*T. tomentosum* L.) e outra sensível ao alagamento do solo (*T. glomeratum* L.). Ambas as espécies apresentaram um aumento na porosidade radicular quando expostas à condição de anaerobiose, porém em ambas as condições, a espécie resistente apresentou porosidade radicular cerca de 80% maior que a espécie sensível ao alagamento do solo. Em um estudo prévio, Gibberd & Cocks (1997) já haviam demonstrado a presença de *T. tomentosum* L. em solos hidromórficos enquanto que *T. glomeratum* L. não foi encontrado nessas áreas.

Dentre as espécies do gênero *Trifolium* com potencial para o uso como pastagem, o trevo branco (*T. repens* L.) é considerado uma das mais resistentes ao alagamento do solo (Hoveland & Webster, 1965; Hoveland &

Mikkelsen, 1967) tolerando alagamento do solo durante até 20 dias sem redução do crescimento vegetal (Heinrichs, 1970).

Avaliando o efeito do alagamento sobre o desenvolvimento de algumas espécies desse gênero, Rogers & West (1993) observaram que após submeterem as plantas a 15 dias de alagamento, a produção de matéria seca de raízes em *T. repens* L. aumentou significativamente enquanto que em *T. subterraneum* L. essa produção foi drasticamente reduzida. Uma significativa proporção desse aumento no crescimento radicular ocorreu em função da emissão de raízes adventícias, que apresentaram uma porosidade três vezes maior do que as raízes produzidas em condições aeradas. Esse aumento na porosidade radicular foi ocasionado pela formação de aerênquima que pôde ser visualizada através de microscopia da seção transversal dessas raízes após 15 dias de alagamento.

2.5 Fixação simbiótica de nitrogênio em condições de alagamento do solo

Além de prejudicar o crescimento vegetativo de plantas, o alagamento do solo pode também reduzir a nodulação e conseqüentemente a fixação simbiótica de nitrogênio (Witty et al., 1986; Bishnoi & Krishnamoorthy, 1992; Sung, 1993; Zhang & Smith, 2002). Essa redução têm sido atribuída principalmente à redução no suprimento de oxigênio e N_2 para os nódulos radiculares (Shiferaw et al., 1992; Arrese-Igor et al., 1993).

Em condição de alagamento do solo, a fixação simbiótica de nitrogênio pode ser ainda mais prejudicada do que o crescimento vegetativo da planta, pois de acordo com Minchin & Summerfield (1976), a diminuição da fixação do nitrogênio foi o fator responsável pela redução no crescimento vegetativo do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L.) após o alagamento do solo.

Buttery (1987) ao avaliar o efeito do alagamento do solo no crescimento vegetativo de plantas de soja, observou que as plantas supridas com nitrato foram menos sensíveis ao alagamento do que as plantas que dependiam da fixação simbiótica de nitrogênio.

Em um estudo semelhante, Bacanamwo & Purcell (1999) também observaram que as plantas de soja dependentes da fixação simbiótica de nitrogênio, foram mais sensíveis ao alagamento do solo em relação às plantas

supridas com nitrato, sendo que a redução significativa do crescimento das plantas dependentes da fixação ocorreu logo aos 7 dias após o alagamento, enquanto que nas plantas supridas com nitrato, essa redução ocorreu apenas aos 14 dias após o alagamento. Segundo esses autores, uma possível explicação para esse comportamento seria que após a diminuição da concentração de oxigênio na rizosfera, o nitrato poderia ser utilizado como um substituto do oxigênio para o metabolismo radicular, possibilitando assim um aumento no crescimento pela maior eficiência energética (Reggiani et al. 1985). Além disso, a demanda energética da planta para a fixação do nitrogênio é maior do que a necessária para a absorção do nitrato (Ryle et al., 1978).

Sung (1993), ao avaliar o efeito do alagamento do solo em plantas de soja, observou uma redução significativa na atividade da enzima nitrogenase, tanto no estágio vegetativo como no reprodutivo, ocasionando uma significativa redução do crescimento das plantas. Do mesmo modo, Mundy et al. (1988), após submeterem plantas de trevo branco a diferentes períodos de alagamento, mostraram que a fixação simbiótica de nitrogênio foi significativamente reduzida, voltando a aumentar após a drenagem do solo.

Porém, as condições impostas pelo alagamento do solo nem sempre afetam negativamente o processo de fixação simbiótica de nitrogênio. Pugh et al. (1995) observaram um aumento no crescimento de trevo branco após longos períodos de alagamento do solo, sugerindo que mesmo em regiões temperadas, existem leguminosas de interesse econômico que possuem a capacidade de crescer, nodular e fixar grandes quantidades de nitrogênio em solos hidromórficos. Esses autores sugerem que a formação de aerênquima verificada nas raízes de trevo branco, tenha suprido a demanda de oxigênio e N_2 para o processo de fixação simbiótica de nitrogênio.

Do mesmo modo, James & Crawford (1998) e James & Sprent (1999), observaram que a nodulação e a fixação simbiótica de nitrogênio em *Lotus uliginosus*, não foi negativamente afetada após 60 dias de completa submersão do sistema radicular. Nessas condições, a porosidade radicular aumentou significativamente pela formação de aerênquima, aumentando assim o suprimento de oxigênio e N_2 para os nódulos e conseqüentemente, a nodulação e a fixação simbiótica de nitrogênio.

Em condições aeradas, o principal mecanismo de infecção das raízes pelo rizóbio é o encurvamento dos pêlos radiculares. Nesse mecanismo, após o encurvamento dos pêlos, proporcionado pela troca de sinais moleculares entre os simbiossitos, ocorre a entrada do rizóbio pelo cordão de infecção no pêlo radicular (Gage & Margolin, 2000). Porém, as condições impostas pelo alagamento do solo, geralmente impedem a formação dos pêlos radiculares assim como deformam os já existentes, reduzindo drasticamente as zonas de infecção para o rizóbio (Zhang & Smith, 2002; Goormachtig et al., 2004a). Além disso, o etileno produzido nas raízes das plantas durante o alagamento do solo, dificulta a emissão desses pêlos radiculares, inibindo e atrasando a nodulação e a fixação simbiótica de nitrogênio (Goormachtig et al., 2004b).

Por esse motivo, em condições de alagamento do solo, a infecção das raízes pelo rizóbio pode ocorrer exclusivamente através da entrada pelas quebras na base das raízes laterais e adventícias, proporcionadas pela falta de oxigênio no solo (Goormachtig et al., 2004b). Nesse mecanismo, o rizóbio coloniza os espaços intercelulares das células corticais induzindo a formação de um tipo de bolsa de infecção, da qual, cordões de infecção intra e intercelulares levam as bactérias para os locais de formação dos nódulos. Além disso, o etileno é essencial para a ocorrência do mecanismo pois é necessário para a formação da bolsa de infecção (D'Haese et al., 2003).

James & Sprent (1999) avaliando a nodulação em *Lotus uliginosus*, observaram que, além da infecção pelo mecanismo do encurvamento do pêlo radicular, as plantas também foram infectadas através do mecanismo de quebra na base das raízes, quando mantidas durante 60 dias em condições de alagamento.

Se por um lado, o acúmulo de etileno nas raízes das plantas durante o alagamento do solo pode ser benéfico à fixação simbiótica de nitrogênio, principalmente por permitir a formação de aerênquima e, conseqüentemente, proporcionar o suprimento de oxigênio e N_2 aos nódulos, por outro, esse hormônio pode ter uma influência negativa sobre a nodulação (Goodlass & Smith, 1979; Jackson, 1985; Hirsch, 1992; Oldroyd et al., 2001). Segundo Goodlass & Smith (1979), altos níveis de etileno inibem a divisão celular vegetal, o que poderia limitar a formação de nódulos radiculares.

Porém, algumas espécies de rizóbio podem apresentar a capacidade de reduzir as quantidades de etileno produzidas pelo macrosimbionte, reduzindo assim o efeito negativo desse hormônio sobre a nodulação. Ma et al. (2002), detectaram a produção de rizobiotoxina por uma estirpe de rizóbio, um inibidor da síntese de etileno que amenizou o efeito negativo do etileno sobre a nodulação.

2.6 Solubilização de fosfato

Vários trabalhos têm sido realizados com o objetivo de avaliar a habilidade de diferentes bactérias em solubilizar fosfatos inorgânicos de baixa solubilidade como o fosfato tricálcico, fosfato bicálcico, hidroxapatita e fosfatos de rocha (Rodríguez & Fraga, 1999).

A grande maioria das bactérias solubilizadoras de fosfato estão associadas à rizosfera de plantas (Sperberg, 1958) sendo que a população destas no solo rizosférico é consideravelmente maior do que no solo não rizosférico (Katznelson et al., 1962; Raghu & MacRae, 1966).

Segundo Rodríguez & Fraga (1999), algumas estirpes do gênero *Rhizobium* estão entre as bactérias que possuem o maior potencial de solubilização de fosfatos inorgânicos em testes realizados in vitro.

A detecção visual da capacidade de solubilização de fosfatos inorgânicos por microrganismos é possível utilizando-se métodos que empreguem o crescimento em placas de petri. A adição de fosfato inorgânico (geralmente fosfato tricálcico) ao meio de cultura torna o meio turvo, permitindo assim, a visualização de um halo transparente em torno da colônia microbiana indicando a capacidade de solubilização do fosfato (Rodríguez & Fraga, 1999).

Seshadri et al. (2000) sugeriram um índice para avaliar a capacidade de solubilização de fosfato em testes com placas de petri. O índice de solubilização de fosfato (I.S.F) é obtido dividindo-se o diâmetro do halo (quando formado) pelo diâmetro da colônia e só pode ser aplicado em microrganismos que promovam a formação de halo no meio de cultura.

A produção de ácidos orgânicos pelas bactérias é citado como o principal mecanismo de solubilização de fosfatos inorgânicos (Duff & Webley, 1959; Banik & Dey, 1982; Halder et al., 1990). Segundo Goldstein (1994), essa produção de ácidos orgânicos resulta na acidificação do meio e,

conseqüentemente, o fósforo pode ser liberado do fosfato inorgânico por troca aniônica do PO_4^{2-} . Halder & Chakrabarty (1993), avaliando estirpes de *Rhizobium leguminosarum*, identificaram o ácido 2-cetoglucônico como responsável pela capacidade de solubilização de fosfatos inorgânicos, pois a solubilização foi totalmente inibida com a adição de NaOH ao meio.

Porém, a acidificação do meio não parece ser o único mecanismo de solubilização de fosfatos por microrganismos, visto que em alguns casos a redução do pH do meio não apresentou correlação com a capacidade de solubilização de fosfato pelos microrganismos (Subba Rao, 1982).

Os trabalhos de Antoun et al. (1998), Chabot et al. (1998) e Peix et al. (2001) mostraram que além da capacidade de solubilizar fosfatos em testes in vitro, algumas estirpes de rizóbio podem, através da solubilização de fosfatos, aumentar a disponibilidade de P para as plantas.

Alves et al. (2004) também relataram que além da solubilização de fosfato tricálcico in vitro, algumas estirpes de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* foram capazes de solubilizar fosfato de rocha (fluorapatita), quando inoculadas em trevo branco, aumentando assim o acúmulo de fósforo e conseqüentemente a produção de matéria seca da parte aérea das plantas. Por outro lado, os autores não observaram relação entre a solubilização de fosfato tricálcico in vitro e a solubilização do fosfato de rocha pelas estirpes, indicando que a capacidade de solubilização depende também do tipo de fosfato utilizado.

2.7 Utilização de carboidratos

Os rizóbios são capazes de utilizar uma ampla variedade de carboidratos como glicose, galactose (hexoses), sacarose, lactose (dissacarídeos), arabinose, frutose (pentoses), (Martinez-de-Dretz et al., 1974; Chakrabarti et al., 1987; Kishinevsky, et al., 2003).

Alguns autores reportaram que os rizóbios de crescimento rápido são menos exigentes quanto à utilização de carboidratos do que os de crescimento lento (Stowers, 1985; van Rossum et al., 1995). Tradicionalmente, tem-se dividido os rizóbios em grupos, de acordo com a velocidade de crescimento, como primeiro sugerido por Lonis & Hansen (1921), os de

crescimento rápido (*Rhizobium*, *Azorhizobium* e *Sinorhizobium*), crescimento intermediário (*Mesorhizobium*) e crescimento lento (*Bradyrhizobium*).

Os rizóbios do gênero *Bradyrhizobium*, em geral, não utilizam dissacarídeos como sacarose, lactose e maltose (Graham, 1964; Marsudi et al., 1999; Zerhari et al., 2000). Esta incapacidade de utilização de dissacarídeos foi estudada por Martinez de Dretz et al. (1974). Esses autores observaram que estirpes *Bradyrhizobium japonicum* não possuíam as enzimas invertase e sacarose fosforilase, presentes em estirpes de crescimento rápido e necessárias para a conversão da sacarose em glicose.

Por outro lado, existem trabalhos mostrando a utilização de dissacarídeos como sacarose e lactose, tanto por estirpes de crescimento lento como por estirpes de crescimento rápido (Padmanabhan et al., 1990; Maâtallah et al., 2002). Esses resultados podem ter ocorrido em virtude das diferentes metodologias adotadas para avaliar a utilização de carboidratos pelos rizóbios, já que nessas avaliações, a concentração dos carboidratos no meio de cultura apresenta grande variação (0,1% até 1%).

O uso do extrato de levedura no meio de cultura também pode gerar dificuldades para se avaliar a utilização de carboidratos por rizóbios pela presença de pequenas quantidades de carboidratos na sua composição (Maâtallah et al., 2002). Esses autores observaram que muitos isolados de rizóbio foram capazes de crescer no meio LMA (Vincent, 1970) sem a adição do carboidrato, no caso o manitol.

Diversos estudos têm mostrado grande variabilidade na utilização de carboidratos pelos rizóbios. Em um estudo com 40 rizóbios isolados de *Acacia saligna*, Marsudi et al. (1999) observaram que todos os isolados cresceram em frutose e manitol. Por outro lado, os mesmos isolados apresentaram grande variabilidade quanto a utilização de arabinose, lactose e sacarose.

Já Idrissi et al., (1996), observaram que rizóbios nativos isolados de *Ceratonia siliqua* foram capazes de metabolizar uma grande variedade de carboidratos, como arabinose, xilose, galactose, glicose, frutose, manose, inositol, sorbitol, maltose, trealose, além do manitol, atualmente o carboidrato mais utilizado para o crescimento dessas bactérias em meios de cultura (Somasegaran & Hoben, 1994).

Ronson & Primrose (1979) sugerem que a principal via de metabolização de carboidratos utilizada por estirpes de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* é a Entner-Doudorof, sendo que, dentre os carboidratos avaliados, apenas a galactose poderia ser metabolizada por uma via diferente desta.

2.8 Produção de melanina

A melanina é um pigmento de alto peso molecular formado pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos, apresentando geralmente coloração escura (Jacobson, 2000). Culturas de *Rhizobium* de várias espécies apresentam a capacidade de produção de melanina após longos períodos de incubação (10 dias) em meio TY sólido (Lamb et al., 1982; Borthakur et al., 1987; Hynes et al., 1988; Hawkins et al., 1991; Cubo et al., 1997; Sá, 2001). A produção desse pigmento é aumentada quando o meio TY é suplementado com L-tirosina (substrato para a tirosinase, uma enzima que catalisa vários passos da produção de melanina) e CuSO_4 (cofator da tirosinase).

A produção de melanina em meio de cultura ocorre quando há o rompimento de células velhas, liberando assim a tirosinase, que entra em contato com o substrato, a L-tirosina. A adição de SDS (dodecil sulfato de sódio) acelera a detecção da produção do pigmento, mesmo em colônias jovens (2-3 dias), pois a ação detergente do SDS resulta em um imediato rompimento de células (Cubo et al., 1988).

Apesar da capacidade de produção de melanina ser amplamente encontrada em estirpes de *Rhizobium*, existem diferenças fisiológicas entre espécies do gênero. Por este motivo, a capacidade de produção desse pigmento em meio de cultura, tem sido utilizada para a caracterização de isolados de rizóbios nativos de soja (Keyser et al., 1982; Hungria et al., 2001; Grange & Hungria, 2004), alfafa (del Papa et al., 1999) e feijoeiro (Sá, 2001; Andrade et al., 2002).

Pouco se sabe sobre a função da melanina em rizóbios. Alguns autores citam que talvez ela seja utilizada para polimerizar moléculas fenólicas que surjam por ocasião da senescência de nódulos, detoxificando esses compostos que normalmente são letais para a bactéria (Borthakur et al., 1987; Hawkins & Johnston., 1988). Estudos indicam que a produção de melanina não

está relacionada com a fixação biológica de nitrogênio (Lamb et al., 1982; Gao & Borthafur, 1995; Cubo et al., 1997; Rodriguez-Navarro et al., 2000), embora os genes *mel*, responsáveis pela produção de melanina, estejam no plasmídeo simbiótico *sym*.

Segundo Romero-Martinez et al. (2000), normalmente a melanina é formada durante um período de estresse biótico ou abiótico ao qual os rizóbios estão expostos, servindo como uma ferramenta de auxílio no aumento da capacidade de sobrevivência e competição em situações particulares. Isto poderia explicar a relação observada por Sá (2001), entre a capacidade de produção de melanina e as características dos solos de origem, pois a grande maioria dos isolados produtores de melanina eram originários de solos de várzea, onde os rizóbios estão sujeitos a longos períodos de alagamento do solo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de solo e de plantas de trevo branco (*Trifolium repens* L.) foram coletadas em áreas com histórico prévio de ocorrência da leguminosa, em locais de diversas regiões do estado do Rio Grande do Sul. As coletas foram realizadas tanto em áreas de várzea quanto em áreas sem essa característica.

3.1 Obtenção dos nódulos

Os nódulos foram retirados das raízes das plantas coletadas no campo e também de plantas inoculadas com uma suspensão das amostras de solo dos diferentes locais de coleta. Para o isolamento dos rizóbios a partir das amostras de solo, foram cultivadas plantas de trevo branco, variedade Yi, utilizando-se vasos “Leonard” (Vincent, 1970) contendo substrato esterilizado, composto de uma mistura de vermiculita e areia na proporção de 2:1 respectivamente, e solução nutritiva (Sarruge, 1975) isenta de nitrogênio.

Antes do preparo do substrato, a areia foi lavada com HCl 1M, água destilada e posteriormente mantida em estufa para secagem. Após a montagem dos vasos, esses foram esterilizados em autoclave durante duas horas a 120°C. A solução nutritiva era renovada semanalmente e o pH da mesma mantido em torno de 6,0.

O plantio foi realizado colocando-se seis sementes pré-germinadas de trevo branco por vaso. Após uma semana realizou-se o desbaste deixando-se apenas três plantas por vaso. As sementes foram previamente desinfestadas em álcool por 30 segundos, hipoclorito de sódio (2,0%) por 30 segundos e cinco lavagens sucessivas com água destilada esterilizada.

A inoculação dos vasos foi realizada imediatamente após o desbaste das plantas, colocando-se alíquotas de 5mL de suspensões das amostras de solo em solução salina (NaCl 0,85%) esterilizada. O experimento foi conduzido com duas repetições para cada amostra. A avaliação da nodulação foi realizada 40 dias após a inoculação e os nódulos obtidos foram levados ao laboratório para posterior isolamento dos rizóbios.

3.2 Isolamento dos rizóbios

Realizou-se o isolamento a partir dos nódulos radiculares de trevo branco coletados a campo e dos nódulos obtidos de plantas inoculadas com suspensões de solo em casa de vegetação.

Os nódulos foram previamente desinfestados em álcool por 30 segundos, hipoclorito de sódio (2,0 %) por 30 segundos e lavagens sucessivas em água destilada esterilizada. Após a desinfestação, cada nódulo foi macerado, com uma pinça esterilizada, em placas contendo meio levedura manitol (Vincent, 1970) com adição de vermelho congo (LMV).

Os isolados obtidos foram purificados por inoculações sucessivas em placas com LMV e, após a obtenção de colônias homogêneas e com características persistentes, inoculados em tubos contendo meio ágar levedura-manitol (LM) e incubados por 4 dias a 28°C e armazenados sob refrigeração.

3.3 Autenticação dos isolados

Para a autenticação dos isolados, estes foram inoculados em plantas de trevo branco crescidas em tubos de ensaio com diâmetro de 25 mm e altura de 200 mm contendo um gel composto por solução nutritiva (Sarruge, 1975) e ágar (0,6%) isenta de nitrogênio. Os tubos foram preparados anteriormente com tampão de algodão para evitar a contaminação e esterilizados em autoclave durante 20 minutos a 120°C. As sementes de trevo branco (cultivar Yi) foram desinfestadas e pré-germinadas conforme descrito anteriormente.

Em cada tubo, foram colocadas duas sementes pré-germinadas de trevo branco e inoculados dois tubos para cada isolado. Dois dias após a semeadura foi realizada a inoculação das plântulas com suspensões dos isolados em solução salina (NaCl 0,85%) esterilizada. Os tubos foram mantidos

em câmara de crescimento de plantas com 14 horas diárias de luz e regime de temperatura de 25/15°C (dia/noite). Para evitar a incidência direta de luz nas raízes das plantas, a parte do tubo que continha o gel com solução nutritiva foi coberta com papel alumínio.

A avaliação visual da formação de nódulos radiculares nas plantas foi realizada 30 dias após a inoculação, sendo descartados os isolados que não induziram a formação de nódulos radiculares. Avaliou-se também a altura das plantas aos 50 dias após a inoculação.

3.4 Solubilização de fosfato

A capacidade de solubilização de fosfato foi avaliada em placas de petri contendo o meio levedura-manitol-ágar (Vincent, 1970) sem a adição do K_2HPO_4 e suplementado com 0,1% de fosfato tricálcico [$Ca_3(PO_4)_2$]. Para a inoculação das placas, todos os isolados foram crescidos em frascos contendo 15mL de meio levedura-manitol e mantidos sob agitação constante a 120 rpm, a 28°C durante 48 horas. A inoculação nas placas foi realizada com gotas de 20 μ L com duas repetições por isolado.

As placas foram incubadas em estufa por sete dias a uma temperatura de 28°C. Após o período de incubação, a formação de um halo transparente em torno da colônia indicou a capacidade de solubilização do fosfato pelo isolado. Também foram medidos os diâmetros dos halos e das colônias de crescimento para a obtenção do índice de solubilização de fosfato (I.S.F.) pelos isolados de rizóbio.

3.5 Utilização de carboidratos

Foi avaliada a capacidade de utilização de diferentes carboidratos pelos isolados sendo estudados os seguintes carboidratos: sacarose, galactose, arabinose, lactose, frutose. Cada carboidrato foi adicionado individualmente na concentração de 0,1% ao meio de cultura definido de Wood & Cooper (1985), meio WC, utilizado por Sá (2001). As soluções contendo os carboidratos na concentração de 0,1g L⁻¹ foram esterilizadas por filtração com uma membrana filtrante de 0,22 μ m e adicionadas ao meio esterilizado.

Todos os isolados foram inoculados previamente em frascos contendo 15mL do meio TY e mantidos sob agitação constante a 120 rpm, a

28°C durante 48 horas. Os isolados foram inoculados nas placas de petri com o meio de cultura contendo os diferentes carboidratos e incubados em estufa a 28°C durante 72 horas. Também realizou-se um tratamento controle sem a adição da fonte de carbono. Para esse ensaio foram realizadas duas repetições por isolado.

A avaliação da capacidade de utilização dos carboidratos foi realizada comparando-se o crescimento dos isolados nas placas contendo as diferentes fontes de carbono com o crescimento, quando ocorrido, nas placas sem a adição dos carboidratos.

3.6 Produção de melanina

A capacidade de produção de melanina foi avaliada conforme metodologia de Cubo et al. (1988). Todos os isolados foram inoculados em frascos contendo 15mL meio TY (Somasegaran & Hoben, 1994) e mantidos sob agitação constante a 120 rpm, a 28°C durante 48 horas. Foi realizada a inoculação das culturas em placas de petri contendo o meio TY sólido, suplementado com L-tirosina (600 µg/mL) e sulfato de cobre (40 µg/mL), utilizando-se alíquotas de 20 µL do caldo e, após, as placas foram incubadas durante quatro dias a 28°C.

Após esse período, as colônias foram tratadas com 50 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% (peso/volume) para facilitar a detecção da produção de melanina. Como controle negativo foi utilizada a estirpe SEMIA 4077 (CIAT 899) de *Rhizobium tropici*, conhecida como não produtora de melanina (Cubo et al., 1988; Gao & Borthakur, 1995) e obtida da coleção de culturas da FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária). Como controle positivo foi utilizado o isolado 5AD, rizóbio nativo isolado de solos de São Paulo (Sá, 2001). Para esse ensaio foram realizadas duas repetições por isolado.

3.7 Avaliação da eficiência dos isolados na fixação simbiótica de nitrogênio

Neste experimento foram estudados os 43 melhores isolados de rizóbio, selecionados com base nos resultados do ensaio de autenticação e comparados com tratamentos inoculados com as estirpes SEMIA 222 e SEMIA

235, recomendadas para a produção de inoculantes para trevo branco, obtidas da coleção de culturas da FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária). A seleção dos melhores isolados foi realizada com base na altura das plantas inoculadas com os isolados no ensaio de autenticação, aos 50 dias após a inoculação.

O experimento foi realizado em vasos “Leonard” (Vincent, 1970) contendo uma mistura composta por vermiculita e areia na proporção de 2:1, respectivamente, no compartimento superior e solução nutritiva (Sarruge, 1975) isenta de nitrogênio no compartimento inferior. Os vasos foram previamente esterilizados em autoclave durante duas horas a 120°C. Em cada vaso foram semeadas 10 sementes de trevo branco previamente desinfestadas, conforme descrito anteriormente.

Após uma semana foi realizado o desbaste deixando-se apenas três plântulas por vaso e logo em seguida realizou-se a inoculação com os isolados e estirpes, individualmente, utilizando-se uma alíquota de 2mL do inóculo por vaso. O inóculo constituiu-se do caldo levedura-manitol inoculado e incubado durante 48 horas a 28°C sob agitação constante a 120 rpm.

Além dos tratamentos inoculados, também foram conduzidos dois tratamentos controles, um sem adição de nitrogênio e outro com adição de 1450mg de nitrogênio (NH_4NO_3) via solução nutritiva na concentração de 12 mM. A solução nutritiva foi renovada semanalmente até o final do experimento.

O experimento foi conduzido por 67 dias em casa de vegetação do Departamento de Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no período de maio-julho de 2004, utilizando-se um delineamento em blocos ao acaso (DBC) com três repetições por tratamento.

Na colheita, a parte aérea da planta foi separada do sistema radicular, acondicionada em sacos de papel e secada em estufa a 65°C com ventilação forçada durante três dias. As raízes foram levadas ao laboratório onde os nódulos radiculares foram destacados, contados e colocados em estufa a 65°C durante três dias para secagem. As avaliações realizadas foram: a produção de matéria seca da parte aérea, o acúmulo de nitrogênio na parte aérea, segundo metodologia descrita em Tedesco et al. (1995), o número de nódulos e a massa de nódulos secos.

3.8 Fixação simbiótica de nitrogênio em condições de alagamento do solo

O experimento foi realizado em casa de vegetação do Departamento de Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul no período de agosto-outubro de 2004. Foram utilizados vasos plásticos contendo 2,8kg de um solo classificado como PLANOSSOLO HIDROMÓRFICO Eutrófico arênico (EMBRAPA, 1999) coletado em 16/05/2004. O solo foi peneirado em peneira de 2,0mm e, posteriormente, foi realizada a calagem e adubação com fósforo e potássio de acordo com a Comissão de Fertilidade do Solo RS/SC (1995). A área onde o solo foi coletado, apresentava um histórico de cultivo de arroz irrigado nos últimos 22 anos, em sistema de cultivo convencional.

Pelo fato do experimento ter sido realizado em vasos, optou-se pela adição do dobro da dose recomendada para fósforo e potássio, nas formas de superfosfato triplo e cloreto de potássio, respectivamente. Antes da adubação, o superfosfato triplo e o cloreto de potássio foram secos em estufa a 60°C e posteriormente moídos com auxílio de um graal. A incorporação do calcário, do superfosfato triplo e do cloreto de potássio foi realizada com o auxílio de uma betoneira nas quantidades de 500, 174 e 100 mg kg⁻¹ solo, respectivamente, e posteriormente, o solo foi acondicionado em sacos plásticos e incubado durante dois meses para a reação do fertilizante adicionado.

Em cada vaso foram semeadas 10 sementes previamente desinfestadas conforme descrito anteriormente e, após sete dias, foi realizado o desbaste deixando-se apenas 4 plântulas por vaso. Neste experimento foram estudados os isolados de cada localidade que apresentaram os melhores resultados no experimento de avaliação da eficiência na fixação simbiótica de nitrogênio em vasos "Leonard". Dessa forma, foram estudados 15 isolados de rizóbio, além das estirpes SEMIA 222 e SEMIA 235. A inoculação foi realizada aos sete dias após a semeadura conforme descrito anteriormente.

Além dos tratamentos inoculados, também foram conduzidos dois tratamentos controles, um sem adição de nitrogênio e outro com adição de nitrogênio (NH₄NO₃) na dose de 154 mg vaso⁻¹ (equivalente a 110 kg ha⁻¹). A adubação nitrogenada foi parcelada em duas aplicações, metade no momento da semeadura e a outra metade aos trinta dias após a semeadura.

Cada tratamento foi mantido sob duas condições de umidade do solo: umidade do solo próxima à capacidade de campo (C.C.) e com alagamento do solo com uma lâmina d'água de aproximadamente dois centímetros acima da superfície do solo. O alagamento do solo foi realizado dos 30 até os 60 dias após a inoculação dos isolados, momento em que foi realizada a colheita do experimento. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com 4 repetições por tratamento.

Durante a colheita, a parte aérea da planta foi separada do sistema radicular, acondicionada em sacos de papel e secada em estufa a 65°C com ventilação forçada durante três dias. Os nódulos radiculares foram destacados, contados e colocados em estufa para secagem juntamente com o sistema radicular. As avaliações realizadas foram: a produção de matéria seca da parte aérea, o acúmulo de nitrogênio na parte aérea, segundo metodologia descrita em Tedesco et al. (1995), o número de nódulos e a massa de nódulos secos.

Para a avaliação do efeito do alagamento na produção de matéria seca (MSPA) e no acúmulo de nitrogênio na parte aérea (NF) das plantas de trevo branco, foi avaliada a produção relativa de matéria seca da parte aérea $[(MSPA \text{ em alagamento}/MSPA \text{ em C.C.}) \times 100]$ e o acúmulo relativo de nitrogênio na parte aérea $[(NF \text{ em alagamento}/NF \text{ em C.C.}) \times 100]$. Essa avaliação proposta por Bacanamwo & Purcell (1999) e também utilizada por Scholles & Vargas (2004), permite avaliar se o alagamento do solo é mais prejudicial à produção de matéria seca da parte aérea ou ao acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas inoculadas e adubadas ou não com nitrogênio mineral.

Avaliou-se também o aproveitamento da fixação simbiótica de nitrogênio em alagamento do solo, em relação à fixação em condições de umidade do solo próximas à capacidade de campo (C.C.). O aproveitamento relativo é obtido dividindo-se a quantidade de nitrogênio fixada biologicamente (acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas inoculadas – acúmulo de nitrogênio na parte aérea plantas do tratamento controle sem adição de nitrogênio) em alagamento do solo, pela quantidade de nitrogênio fixada em C.C. $(N \text{ fixado em alagamento} \times 100/ N \text{ fixado em C.C.})$.

3.9 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada pela análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias pelo teste Duncan a 5% de probabilidade. Para avaliação da eficiência relativa foi utilizado um índice proposto por Brockwell et al. (1966), que compara o nitrogênio fixado nos tratamentos inoculados em relação aos tratamentos controles com e sem a aplicação de nitrogênio.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de rizóbios capazes de nodular trevo branco foi verificada em 14 (André da Rocha, Bagé, Porto Alegre, Camaquã, Eldorado do Sul, Hulha Negra, Passo Fundo, Rio Pardo, Veranópolis, Palmares do Sul, Santa Maria, Porto Alegre, São Francisco de Paula e Paraíso do Sul) das 25 amostras de solo provenientes de áreas com histórico de ocorrência de trevo branco.

4.1 Isolamento e autenticação dos rizóbios

Ao final do processo de isolamento e autenticação, foram obtidos 126 isolados de rizóbio. Na Tabela 1 são mostrados o número de isolados obtidos da amostra de solo de cada município, características de drenagem da área e a identificação dos mesmos.

4.2 Solubilização de fosfato

Dentre os 126 isolados de rizóbio avaliados quanto a capacidade de solubilização de fosfato tricálcico [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$], apenas os isolados BG18, HN21, PF3, VP5 e VP23 não promoveram a formação de um halo transparente no meio de cultura, indicando a incapacidade dos mesmos em solubilizar o fosfato (Tabela 2).

Porém, os 121 isolados restantes apresentaram capacidade de solubilização de fosfato tricálcico detectada pela formação do halo sob a colônia no meio de cultura e dentre esses, 95 formaram um halo com diâmetro maior do que o diâmetro da colônia de crescimento, ou seja, um índice de solubilização de fosfato (I.S.F.) maior do que 100% que variou de 105-170%.

TABELA 1. Identificação e origem dos 126 rizóbios isolados e autenticados nesse trabalho.

Município de coleta	Número de isolados	Solo de origem	Isolados
André da Rocha	7	Bem drenado	AR12, AR15, AR17, AR18, AR19, AR20, AR24
Bagé	9	Bem drenado	BG2, BG3, BG7, BG8, BG13, BG16, BG18, BG19, BG23
Porto Alegre	4	Várzea	CVII, N1, N2, N3
Camaquã	2	Várzea	CMQ1, CMQ2
Eldorado do Sul	14	Bem drenado	EA1, EA2, EA3, EA5, EA6, EA7, EA8, EA13, EA14, EA16, EA19, EA20, EA23, EA24
Hulha Negra	10	Bem drenado	HN3, HN7, HN10, HN11, HN15, HN18, HN20, HN21, HN22, HN24
Passo Fundo	18	Bem drenado	PF2, PF3, PF4, PF5, PF6, PF7, PF8, PF10, PF11, PF12, PF13, PF14, PF15, PF16, PF17, PF18, PF19, PF20
Rio Pardo	19	Bem drenado	RP1, RP2, RP3, RP4, RP5, RP6, RP7, RP8, RP9, RP10, RP12, RP14, RP18, RP19, RP20, RP21, RP22, RP23, RP24
Veranópolis	22	Bem drenado	VP1, VP2, VP3, VP4, VP5, VP6, VP7, VP8, VP9, VP11, VP12, VP13, VP14, VP15, VP16, VP17, VP18, VP19, VP21, VP22, VP23, VP24
Palmares do Sul	3	Várzea	PALM1, PALM2, PALM3
Santa Maria	3	Várzea	SM1, SM2, SM3
São Francisco de Paula	11	Bem drenado	P ₃ 1, P ₃ 2, P ₃ 4, P ₃ 5, P ₃ 6, P ₃ 8, P ₃ 9, P ₃ 10, P ₃ 13, P ₃ 16, P ₃ 24
Paraíso do Sul	4	Várzea	T1, T2, T3, T4

Peix et al. (2001) consideraram como bons solubilizadores os rizóbios que formaram um halo transparente em torno da colônia de crescimento, ou seja, um halo maior do que a colônia, resultando assim em um I.S.F. maior que 100%. Esses autores, ao avaliarem a capacidade de solubilização de fosfato tricálcico *in vitro* por rizóbios isolados de *Cicer arietinum*, selecionaram o isolado que apresentou o maior halo em torno da colônia para, posteriormente, avaliar a mobilização do fosfato no solo para plantas quando inoculado em *Cicer arietinum* e *Hordeum vulgare*.

TABELA 2. Diâmetros dos halos e das colônias e índices de solubilização de fosfato pelos isolados de rizóbio em placas contendo o meio de cultura suplementado com 0,1% de fosfato tricálcico.

Isolado	Halo	Colônia	I.S.F.	Isolado	Halo	Colônia	I.S.F.
	----- mm -----	----- mm -----	-- % --		----- mm -----	----- mm -----	--- % ---
AR 12	14	12	117	PF 8	12	10	120
AR 15	14	12	117	PF 10	14	11	127
AR 17	13	10	130	PF 11	12	11	109
AR 18	14	12	117	PF 12	12	12	100
AR 19	15	13	115	PF 13	13	13	100
AR 20	13	12	108	PF 14	12	11	109
AR 24	13	12	108	PF 15	12	12	100
BG 2	12	10	120	PF 16	11	11	100
BG 3	8	9	89	PF 17	12	11	109
BG 7	8	9	89	PF 18	12	11	109
BG 8	12	12	100	PF 19	12	11	109
BG 13	12	11	109	PF 20	12	11	109
BG 16	13	11	118	RP 1	18	11	164
BG 18	-	10	N.S.	RP 2	15	10	150
BG 19	12	11	109	RP 3	17	10	170
BG 23	12	11	109	RP 4	16	10	160
EA 1	10	11	91	RP 5	17	12	142
EA 2	14	12	117	RP 6	15	10	150
EA 3	15	12	125	RP 7	15	10	150
EA 5	10	12	83	RP 8	16	12	133
EA 6	13	13	100	RP 9	8	10	80
EA 7	19	18	106	RP 10	16	13	123
EA 8	17	12	142	RP 12	17	13	131
EA 13	13	12	108	RP 14	17	13	131
EA 14	13	12	108	RP 18	17	13	131
EA 16	14	13	108	RP 19	16	13	123
EA 19	13	13	100	RP 20	15	13	115
EA 20	13	13	100	RP 21	16	13	123
EA 23	13	13	100	RP 22	17	13	131
EA 24	11	11	100	RP 23	16	12	133
HN 3	17	16	106	RP 24	15	12	125
HN 7	12	12	100	VP 1	12	9	133
HN 10	12	12	100	VP 2	15	11	136
HN 11	12	12	100	VP 3	12	11	109
HN 15	12	11	109	VP 4	12	11	109
HN 18	13	12	108	VP 5	-	7	N.S.
HN 20	12	11	109	VP 6	12	11	109
HN 21	-	9	N.S.	VP 7	12	11	109
HN 22	10	12	83	VP 8	13	12	108
HN 24	17	17	100	VP 9	10	9	111
PF 2	11	10	110	VP 11	12	11	109
PF 3	-	7	N.S.	VP 12	12	11	109
PF 4	11	10	110	VP 13	12	11	109
PF 5	12	10	120	VP 14	15	13	115
PF 6	11	10	110	VP 15	14	13	108
PF 7	12	10	120	VP 16	13	11	118

TABELA 2. Continuação...

Isolado	Halo	Colônia	I.S.F.	Isolado	Halo	Colônia	I.S.F.
	----- mm	-----	-- % --		----- mm	-----	--- % ---
VP 17	13	14	108	N 3	12	12	100
VP 18	13	14	93	CV II	13	12	108
VP 19	14	13	100	P3 1	14	11	127
VP 21	13	14	100	P3 2	14	11	127
VP 22	16	9	114	P3 4	13	12	108
VP 23	-	11	N.S.	P3 5	16	14	114
VP 24	14	14	127	P3 6	14	12	117
SEMIA 222	11	12	79	P3 8	14	11	127
PALM 1	13	12	108	P3 9	14	11	127
PALM 2	13	20	108	P3 10	11	11	100
PALM 3	21	15	105	P3 13	14	11	127
CMQ 1	17	15	113	P3 16	15	11	136
CMQ 2	16	14	107	P3 24	14	11	127
SM 1	18	14	129	T 1	13	12	108
SM 2	18	14	129	T 2	13	12	108
SM 3	19	11	136	T 3	12	12	100
N 1	13	13	118	T 4	13	12	108
N 2	15	13	115				

Legenda: I.S.F.= índice de solubilização de fosfato (Seshadri et al., 2000); - = sem formação de halo; N.S. = não solubilizador.

A inoculação desse isolado de rizóbio nas plantas, crescendo em solo adubado com fosfato tricálcico promoveu um aumento significativo, tanto na produção de matéria seca, quanto na absorção dos macronutrientes por ambas as plantas, com destaque para o fósforo. Esses resultados indicam que além do benefício da fixação simbiótica de nitrogênio, a inoculação de rizóbios com capacidade de solubilização de fosfato in vitro pode proporcionar um aumento de produtividade para as plantas através de outros mecanismos como por exemplo a solubilização de fosfatos inorgânicos de baixa solubilidade.

4.3 Utilização de carboidratos

A sacarose e a frutose foram os carboidratos mais facilmente utilizados pois dentre os 126 isolados avaliados, apenas o HN15, VP5 e VP23 não utilizaram esses carboidratos como fonte de carbono para seu crescimento (Tabela 3).

Segundo Martinez-de-Dretz et al. (1974), estirpes do gênero *Rhizobium* como *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* desenvolvem-se bem em meio contendo sacarose ou outros dissacarídeos como fonte de carbono,

pela presença da enzima glicosídeo invertase, necessária para a conversão desses carboidratos em glicose.

Os carboidratos sacarose e frutose também foram utilizados como fonte de carbono por todos os 56 isolados de rizóbio avaliados por Maâtallah et al. (2002). Marsudi et al. (1999) também observaram que todos os 40 rizóbios de crescimento rápido, isolados de *Acacia saligna*, foram capazes de utilizar sacarose e frutose como única fonte de carbono.

Por outro lado, os 3 isolados (HN15, VP5 e VP23) que não utilizaram sacarose e frutose, não foram capazes de utilizar nenhum dos outros carboidratos estudados. Do mesmo modo, Giongo (2003) observou que 4 dos 86 rizóbios isolados de *Phaseolus vulgaris*, não foram capazes de utilizar nenhum dos carboidratos estudados (sacarose, arabinose, galactose, inositol) com exceção do manitol.

Em placas contendo 0,1% do dissacarídeo lactose, apenas 8 isolados não foram capazes de crescer. Dentre esses, 5 foram isolados de uma amostra de solo da estação experimental agrônômica da UFRGS.

Em placas contendo 0,1% de galactose, 16 isolados não mostraram crescimento. Dentre esses isolados, estão os três provenientes de Santa Maria (SM1, SM2, SM3).

O carboidrato mais pobremente utilizado foi arabinose, sendo que de todos os isolados avaliados, 52 não foram capazes de utilizar essa fonte de carbono. Andrade (1986) também observou que entre os vários carboidratos estudados, a arabinose foi a mais pobremente metabolizada por estirpes de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* isoladas de *Trifolium riograndense*.

Do mesmo modo, Gigova et al., (1997) avaliando a utilização de carboidratos por isolados de *Rhizobium galegae*, observaram que as bactérias utilizaram bem os carboidratos sacarose, galactose, lactose e frutose. Porém não foram capazes utilizar arabinose como única fonte de carbono.

4.4 Produção de melanina

Dentre todos os 126 isolados de rizóbio avaliados, apenas o isolado N2, e o controle positivo, 5AD (Sá, 2001) apresentaram capacidade de produzir melanina (Tabela 3).

TABELA 3. Produção de melanina e utilização dos diferentes carboidratos pelos isolados de rizóbio.

	Melanina	Sacarose	Galactose	Arabinose	Lactose	Frutose
AR 12	-	+	+	+	+	+
AR 15	-	+	+	-	+	+
AR 17	-	+	+	-	+	+
AR 18	-	+	+	-	+	+
AR 19	-	+	+	-	+	+
AR 20	-	+	+	-	+	+
AR 24	-	+	+	-	+	+
BG 2	-	+	+	-	+	+
BG 3	-	+	+	-	+	+
BG 7	-	+	+	+	+	+
BG 8	-	+	-	-	+	+
BG 13	-	+	+	+	+	+
BG 16	-	+	+	+	+	+
BG 18	-	+	+	-	+	+
BG 19	-	+	+	-	+	+
BG 23	-	+	+	+	+	+
EA 1	-	+	+	-	-	+
EA 2	-	+	+	+	+	+
EA 3	-	+	+	+	+	+
EA 5	-	+	+	-	-	+
EA 6	-	+	+	-	-	+
EA 7	-	+	+	-	+	+
EA 8	-	+	+	-	+	+
EA 13	-	+	+	+	+	+
EA 14	-	+	+	-	+	+
EA 16	-	+	+	+	+	+
EA 19	-	+	+	-	-	+
EA 20	-	+	+	-	-	+
EA 23	-	+	+	+	+	+
EA 24	-	+	+	-	+	+
HN 3	-	+	+	+	+	+
HN 7	-	+	+	+	+	+
HN 10	-	+	+	+	+	+
HN 11	-	+	+	+	+	+
HN 15	-	-	-	-	-	-
HN 18	-	+	+	+	+	+
HN 20	-	+	-	+	+	+
HN 21	-	+	+	-	+	+
HN 22	-	+	+	+	+	+
HN 24	-	+	+	+	+	+
PF 2	-	+	+	+	+	+
PF 3	-	+	+	+	+	+
PF 4	-	+	+	+	+	+
PF 5	-	+	+	+	+	+
PF 6	-	+	+	+	+	+
PF 7	-	+	+	+	+	+
PF 8	-	+	+	+	+	+
PF 10	-	+	+	-	+	+

TABELA 3. Continuação...

	Melanina	Sacarose	Galactose	Arabinose	Lactose	Frutose
PF 11	-	+	+	+	+	+
PF 12	-	+	+	+	+	+
PF 13	-	+	+	+	+	+
PF 14	-	+	+	+	+	+
PF 15	-	+	+	+	+	+
PF 16	-	+	+	+	+	+
PF 17	-	+	+	+	+	+
PF 18	-	+	+	+	+	+
PF 19	-	+	+	+	+	+
PF 20	-	+	+	+	+	+
RP 1	-	+	+	+	+	+
RP 2	-	+	+	+	+	+
RP 3	-	+	+	+	+	+
RP 4	-	+	+	+	+	+
RP 5	-	+	+	-	+	+
RP 6	-	+	-	-	+	+
RP 7	-	+	-	-	+	+
RP 8	-	+	+	-	+	+
RP 9	-	+	+	-	+	+
RP 10	-	+	-	-	+	+
RP 12	-	+	-	-	+	+
RP 14	-	+	-	-	+	+
RP 18	-	+	-	-	+	+
RP 19	-	+	-	-	+	+
RP 20	-	+	+	-	+	+
RP 21	-	+	+	-	+	+
RP 22	-	+	+	-	+	+
RP 23	-	+	+	-	+	+
RP 24	-	+	+	-	+	+
VP 1	-	+	+	+	+	+
VP 2	-	+	+	+	+	+
VP 3	-	+	+	+	+	+
VP 4	-	+	+	+	+	+
VP 5	-	-	-	-	-	-
VP 6	-	+	+	+	+	+
VP 7	-	+	+	+	+	+
VP 8	-	+	+	+	+	+
VP 9	-	+	+	+	+	+
VP 11	-	+	+	+	+	+
VP 12	-	+	+	+	+	+
VP 13	-	+	+	+	+	+
VP 14	-	+	+	+	+	+
VP 15	-	+	+	+	+	+
VP 16	-	+	+	-	+	+
VP 17	-	+	+	+	+	+
VP 18	-	+	+	-	+	+
VP 19	-	+	+	+	+	+
VP 21	-	+	+	+	+	+
VP 22	-	+	+	-	+	+

TABELA 3. Continuação...

	Melanina	Sacarose	Galactose	Arabinose	Lactose	Frutose
VP 23	-	-	-	-	-	-
VP 24	-	+	-	+	+	+
SEMIA 222	-	+	+	+	+	+
PALM 1	-	+	+	+	+	+
PALM 2	-	+	+	+	+	+
PALM 3	-	+	+	-	+	+
CMQ 1	-	+	+	+	+	+
CMQ 2	-	+	+	+	+	+
SM 1	-	+	-	-	+	+
SM 2	-	+	-	-	+	+
SM 3	-	+	-	-	+	+
N 1	-	+	+	-	+	+
N 2	+	+	+	+	+	+
N 3	-	+	+	-	+	+
CV II	-	+	+	+	+	+
P3 1	-	+	+	+	+	+
P3 2	-	+	+	+	+	+
P3 4	-	+	+	+	+	+
P3 5	-	+	+	-	+	+
P3 6	-	+	+	-	+	+
P3 8	-	+	+	+	+	+
P3 9	-	+	+	+	+	+
P3 10	-	+	+	-	+	+
P3 13	-	+	+	+	+	+
P3 16	-	+	+	+	+	+
P3 24	-	+	+	+	+	+
T 1	-	+	+	+	+	+
T 2	-	+	+	+	+	+
T 3	-	+	+	+	+	+
T 4	-	+	+	+	+	+

Produção de melanina: + = Produção; - = Sem produção.

Utilização de carboidratos: + = Utilização; - = Sem utilização.

Resultados similares foram obtidos por Wang et al. (1999) em solos do México, onde 50 rizóbios isolados de *Mimosa affinis*, selecionados aleatoriamente entre 140 isolados, não foram capazes de produzir melanina. Giongo (2003) também observou que nenhum dos 86 rizóbios isolados de *Phaseolus vulgaris*, foram capazes de produzir melanina em meio sólido.

A produção de melanina pôde ser visualizada em torno de uma hora após o tratamento das colônias com SDS 20%, tanto para o isolado N2 como para o controle positivo 5AD. Esse comportamento também foi observado por Cubo et al. (1988) avaliando a capacidade produção de melanina por diferentes espécies do gênero *Rhizobium*.

O isolado N2, que apresentou a capacidade de produção de melanina, foi isolado de uma área de várzea, sujeita à alagamentos periódicos durante o ano. Sá (2001) também observou essa relação, pois a grande maioria dos isolados que produziram melanina eram provenientes de solos de várzea. Isto poderia indicar que a capacidade de produção de melanina se constitui em uma capacidade adaptação por parte do rizóbio, à essas condições de alagamento do solo.

4.5 Eficiência na fixação simbiótica de nitrogênio em plantas de trevo branco inoculadas com isolados de rizóbio nativos e cultivadas em solução nutritiva

A eficiência dos isolados na fixação simbiótica de nitrogênio em simbiose com trevo branco, foi avaliada com base no número e massa de nódulos secos, na produção de matéria seca e nitrogênio total acumulado na parte aérea das plantas e também pela eficiência relativa dos isolados no acúmulo de nitrogênio total da parte aérea no experimento conduzido em vasos “Leonard”.

4.5.1 Produção de matéria seca e nitrogênio total da parte aérea das plantas de trevo branco

A maior produção de matéria seca na parte aérea das plantas (Tabela 4) foi obtida pelos tratamentos inoculados com os isolados CVII, VP16, AR20, HN18, com a estirpe SEMIA 222 e pelo controle com adição de nitrogênio via solução nutritiva (Tabela 4).

Por outro lado, entre os 43 tratamentos inoculados com os isolados de rizóbio, 25 apresentaram uma baixa produção de matéria seca, não diferindo do tratamento controle sem a aplicação de nitrogênio via solução nutritiva. Dentre esses 25 isolados de rizóbio que não promoveram um aumento na produção de matéria seca das plantas quando inoculadas em trevo branco, estão todos os isolados de rizóbio obtidos das amostras provenientes dos municípios Passo Fundo, Santa Maria e Camaquã (Tabela 4). Isto indica a presença de população de rizóbios ineficientes mas capazes de nodular trevo branco. Dessa forma, seria necessária a inoculação do trevo branco com

estirpes de rizóbio eficientes para se obter o benefício da fixação simbiótica de nitrogênio.

Nesse experimento, as plantas dos tratamentos inoculados com os isolados HN21, P₃4, RP5, BG3, VP8, AR24, RP8, EA20, T4, BG8, PALM3, AR12, EA6 e VP7, apresentaram produção de matéria seca inferior ao tratamento com adição de nitrogênio, porém superior ao tratamento controle sem a adição de nitrogênio via solução nutritiva (Tabela 4), formando assim, um grupo intermediário.

Os tratamentos inoculados com os isolados CVII e VP16, com a estirpe SEMIA 222 e o controle com adição de nitrogênio foram os que obtiveram o maior acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas (Tabela 2). Isto indica elevada eficiência desses isolados de rizóbio na fixação simbiótica de nitrogênio, uma vez que os tratamentos inoculados não receberam a adição de nitrogênio via solução nutritiva.

Além disso, os isolados AR20, NH18, HN21, P₃4, RP5 e BG3 também podem ser considerados eficientes pois a inoculação dos mesmos em plantas de trevo branco, promoveu um acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas semelhante ao obtido no tratamento inoculado com a estirpe SEMIA 222, a qual é utilizada na produção de inoculantes para trevo branco.

Nos tratamentos em que as plantas foram inoculadas com os isolados VP8, AR24, RP8, EA20, T4, BG8, PALM3 e AR12, o acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas foi inferior ao obtido no tratamento inoculado com a estirpe SEMIA 222, porém superior ao tratamento não inoculado e sem adição de nitrogênio. Isto indica que os isolados em questão, foram capazes de fixar nitrogênio em simbiose com trevo branco, mas com eficiência inferior a da estirpe SEMIA 222.

Nesse experimento, 63% dos isolados de rizóbio (27 isolados) não promoveram um aumento no acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas em relação ao controle negativo, quando inoculadas em plantas de trevo branco. Isto também ocorreu com o tratamento inoculado com a estirpe SEMIA 235, que assim como a SEMIA 222, também é recomendada para a produção de inoculantes para trevo branco.

TABELA 4. Produção de matéria seca (MSPA), nitrogênio total na parte aérea (NF), número (NN) e massa de nódulos (MNS) nos diferentes tratamentos.

Tratamento	MSPA (g vaso ⁻¹)	NN	MNS (mg vaso ⁻¹)	NF (mg vaso ⁻¹)
T+N	3,95 a	-	-	154,0 a
CVII	3,64 a	243 abcd	140 bcdef	137,6 ab
SEMIA 222	3,42 ab	292 abc	198 a	118,1 abcd
VP16	3,30 abc	322 a	164 abc	122,3 abc
AR20	3,20 abc	304 abc	170 abc	111,6 bcd
HN18	3,09 abc	219 abcde	188 ab	115,0 bcd
HN21	2,59 bcd	242 abcd	113 defgh	96,1 cde
P34	2,55 bcd	229 abcd	120 cdefg	84,6 cdef
RP5	2,48 cde	204 bcdefg	106 defghi	84,3 cdef
BG3	2,23 def	305 abc	146 bcde	81,6 defg
VP8	2,12 defg	321 ab	150 abcd	72,6 efg
AR24	2,04 defg	215 abcdef	95 efghij	70,8 efgh
RP8	2,02 defg	169 defghij	61 hijklmnop	67,9 efgh
EA20	1,91 defgh	204 abcdef	110 defghi	67,4 efgh
T4	1,75 defghi	287 abc	164 abc	58,2 efghi
BG8	1,71 defghij	308 ab	133 cdef	58,1 efghi
PALM3	1,64 efghijk	161 defghij	79 ghijklm	54,1 fghij
AR12	1,57 fghijkl	291 abc	126 cdefg	53,8 fghij
EA6	1,46 fghijklm	168 defghij	81 ghijkl	42,3 ghijk
VP7	1,27 ghijklm	254 abcd	92 fghijk	42,8 ghijk
N1	1,08 hijklmno	171 defghij	64 hijklmno	32,1 hijk
P310	1,06 hijklmno	161 defghij	52 jklmnopq	31,2 hijk
CMQ2	1,03 hijklmno	127 efghijk	37 lmnopq	32,0 hijk
BG18	1,02 hijklmno	158 defghij	66 hijklmn	31,5 hijk
P36	0,89 ijklmno	127 efghijk	49 jklmnopq	24,1 ijk
SM3	0,80 jklmno	199 cdefgh	59 ijklmnop	21,8 ijk
SEMIA 235	0,74 klmno	156 defghij	44 jklmnopq	20,5 ijk
PF13	0,68 lmno	105 ijk	42 jklmnopq	18,1 jk
P38	0,67 lmno	104 jkl	34 mnopq	16,7 jk
EA19	0,64 mno	147 defghij	41 klmnopq	16,5 jk
HN7	0,63 mno	219 abcde	66 hijklmn	16,5 jk
RP23	0,61 mno	109 ghijk	25 nopq	15,8 jk
BG16	0,59 mno	160 defghij	39 mnopq	15,0 jk
T3	0,58 mno	192 cdefgh	51 jklmnopq	14,4 jk
EA23	0,54 mno	167 defghij	36 mnopq	13,9 jk
N2	0,53 mno	117 fghijk	38 mnopq	11,6 k
PF12	0,50 no	59 klm	13 nopq	11,6 k
SM1	0,50 no	107 hijk	25 nopq	10,7 k
PF16	0,46 no	96 jkl	27 mnopq	9,1 k
HN22	0,43 no	118 fghijk	26 mnopq	10,0 k
CMQ1	0,40 no	44 lm	7 pq	8,1 k
PALM2	0,29 o	72 klm	10 opq	6,0 k
PF3	0,28 o	88 jkl	10 opq	5,9 k
EA8	0,24 o	68 klm	16 nopq	4,7 k
T-N	0,18 o	-	-	2,3 k
SM2	0,16 o	2 n	0 q	2,3 k
PF15	0,13 o	29 m	2 q	2,0 k

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Duncan a 5%.

Observou-se também que 32% (14 isolados) dos isolados formaram um grupo intermediário quanto a eficiência na fixação simbiótica de nitrogênio, pois proporcionaram um acúmulo de nitrogênio superior ao observado no tratamento controle sem adição de nitrogênio, porém inferior ao observado no controle com adição de nitrogênio.

4.5.2 Número e massa de nódulos secos nas raízes das plantas de trevo branco

O número e massa de nódulos secos produzidos pelas plantas inoculadas com os diferentes isolados de rizóbio são mostrados na Tabela 4. Nessa Tabela não são apresentados os dados referentes aos tratamentos controles, com e sem adição nitrogênio, por não ter sido observada a formação de nódulos radiculares.

Os tratamentos inoculados com os isolados VP16, CVII, AR20, HN18, HN21, P₃4, BG3, VP8, AR24, EA20, T4, BG8, AR12, VP7 e HN7 e com a estirpe SEMIA 222, foram os que obtiveram a maior quantidade de nódulos radiculares, todos eles com médias de número de nódulos superiores a 200 por vaso (Tabela 4).

O menor número de nódulos formados foi observado no tratamento inoculado com o isolado SM2, com média de 2 nódulos por vaso, mostrando que esse isolado foi muito ineficiente quando inoculado em trevo branco.

Nesse experimento, a maior quantidade de nódulos determinou uma maior massa de nódulos ($r=0,91$). Essa correlação ocorreu porque, em geral, os nódulos apresentavam tamanhos semelhantes. Porém, em alguns casos essa relação não foi observada. Por exemplo, os tratamentos inoculados com os isolados HN7 e com o HN18, apresentaram a mesma quantidade de nódulos (média de 219 nódulos por vaso) mas a massa de nódulos observada no tratamento inoculado com o HN18, foi quase três vezes superior a massa de nódulos observada no tratamento inoculado com o HN7. Isto indica que a massa de nódulos secos apresenta maior correlação com a eficiência na fixação simbiótica de nitrogênio do que a quantidade de nódulos, pois o tratamento inoculado com o isolado HN18 obteve um alto acúmulo de nitrogênio e produção de matéria seca da parte aérea das plantas. Já a

inoculação do isolado HN7 não promoveu aumento no acúmulo de nitrogênio nem na produção de matéria seca da parte aérea das plantas (Tabela 4).

Os valores obtidos para massa de nódulos secos apresentaram alta correlação com as variáveis produção de matéria seca ($r=0,92$) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas ($r=0,92$), mostrando assim a importância de uma boa nodulação para a fixação simbiótica de nitrogênio e conseqüentemente, um elevado crescimento vegetativo das plantas. A quantidade de nódulos também apresentou correlação positiva com essas variáveis, porém com um menor coeficiente de correlação, $r=0,78$ para produção de matéria seca e $r=0,76$ para nitrogênio total na parte aérea das plantas.

Fernandes et al. (2003), também observaram que os valores de massa de nódulos secos apresentaram maior correlação com a produção de matéria seca e com o acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas, do que o número de nódulos radiculares, apesar de ambas serem altas e positivas. Essa observação pode ser explicada pela ocorrência em alguns tratamentos inoculados, como é o caso do inoculado com o isolado HN7, de uma grande quantidade de nódulos porém de tamanho pequeno, resultando em baixa massa de nódulos secos e conseqüentemente, um baixo acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas. Correlações positivas entre massa de nódulos e quantidade de nitrogênio fixado também foram observadas anteriormente (Bohrer & Hungria, 1998; Fernandes & Fernandes, 2000).

A maior massa de nódulos foi produzida nos tratamentos em que as plantas foram inoculadas com os isolados HN18, AR20, T4, VP8, VP16 e com a estirpe SEMIA 222 (Tabela 4). O tratamento inoculado com a estirpe SEMIA 235 está entre os que produziram a menor massa de nódulos secos nas raízes das plantas. Isto indica uma possível perda de eficiência dessa estirpe, que é atualmente recomendada para a produção de inoculantes para trevo branco.

Dentre os 43 tratamentos inoculados com os isolados de rizóbio, 17 formaram um grupo intermediário quanto a massa de nódulos secos, por produzirem uma massa de nódulos inferior ao tratamento que obteve maior massa de nódulos porém superior aos tratamentos que apresentaram a menor massa de nódulos (Tabela 4).

4.5.3 Eficiência relativa

A eficiência relativa indica a contribuição, em termos percentuais, da fixação simbiótica de nitrogênio nos tratamentos inoculados à quantidade de nitrogênio total na parte aérea das plantas, em relação ao teor de nitrogênio total das plantas dos tratamentos controle, com e sem a adição de nitrogênio.

Nesse experimento em que as plantas foram cultivadas em vasos Leonard com solução nutritiva, o isolado CVII foi o que apresentou a maior eficiência na fixação simbiótica de nitrogênio quando inoculado em trevo branco, o que foi evidenciado pelo alto valor (89%) de eficiência relativa (Figura 1). Além disso, os tratamentos inoculados com os isolados AR20, HN18, VP16 e com a estirpe SEMIA 222, apresentaram valores de eficiência relativa superiores a 70%. Tais valores do índice possibilitam considerar estes isolados e a estirpe SEMIA 222 como eficientes nessas condições em que o fornecimento de nitrogênio às plantas do tratamento controle permite maior aproveitamento em relação a adubação nitrogenada a campo.

4.6 Fixação simbiótica de nitrogênio em condições de alagamento do solo

A eficiência dos isolados de rizóbio na fixação simbiótica de nitrogênio em simbiose com trevo branco em condições de alagamento do solo, foi avaliada com base nos resultados de número e massa de nódulos secos, produção de matéria seca e quantidade de nitrogênio acumulado na parte aérea das plantas.

4.6.1 Produção de matéria seca na parte aérea das plantas

Os resultados de produção de matéria seca da parte aérea das plantas em diferentes condições de umidade do solo são mostrados na Tabela 5.

O alagamento do solo durante 30 dias, de uma maneira geral, reduziu drasticamente a produção de matéria seca da parte aéreas das plantas, tanto nos tratamentos inoculados como nos tratamentos controles, quando comparado aos tratamentos mantidos em umidade do solo próxima à capacidade de campo (Tabela 5). O percentual médio dessa redução da produção de matéria seca das plantas foi de 47%.

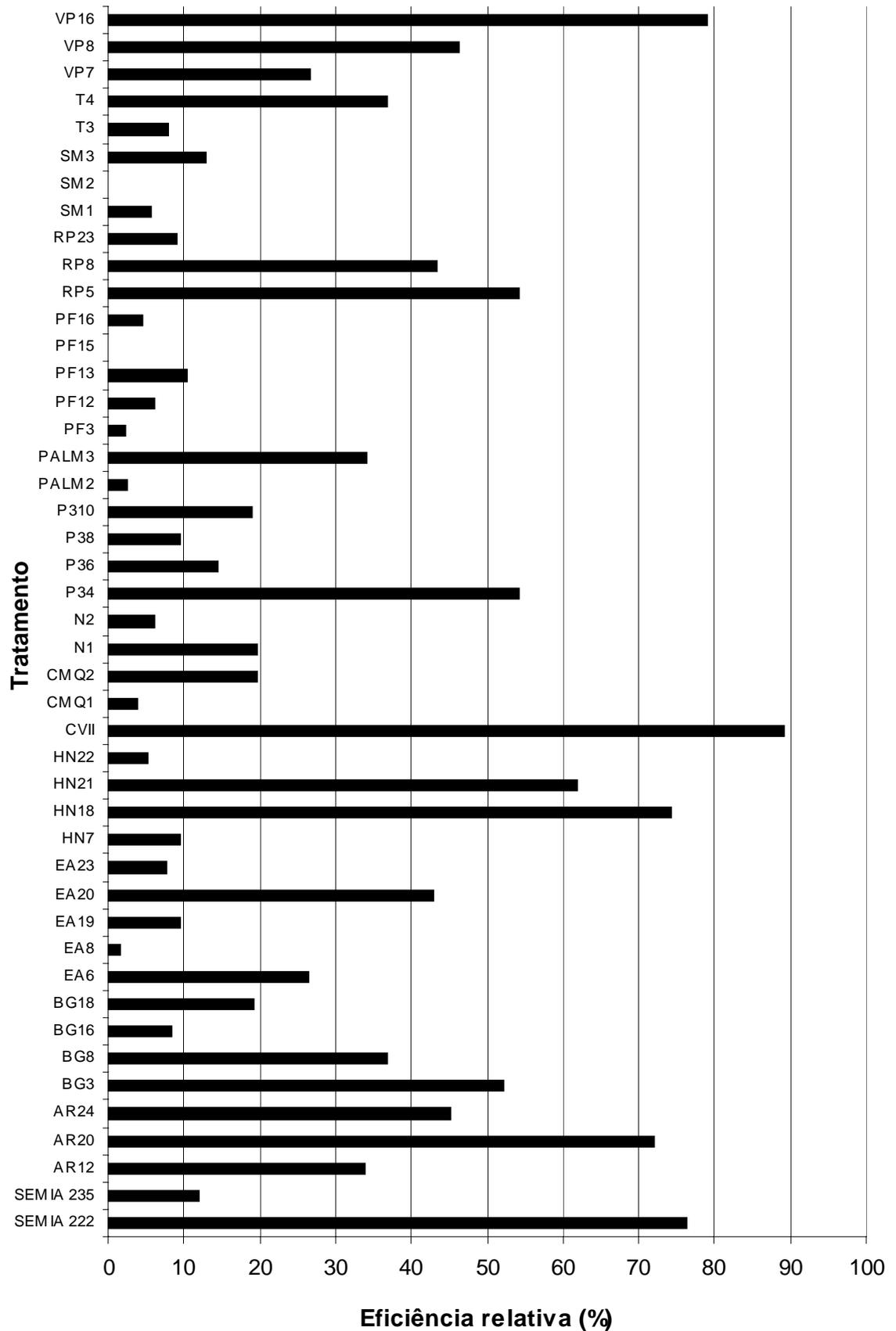


FIGURA 1. Eficiência relativa no acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas inoculadas com isolados e estirpes, no experimento em vasos "Leonard" com solução nutritiva.

Resultados semelhantes foram obtidos com plantas de *Trifolium semipilosum* inoculadas com diferentes isolados de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* em solo alagado por 30 dias, observando-se uma redução de cerca de 41% na produção de matéria seca da parte aérea em relação às plantas dos tratamentos que não foram submetidos ao alagamento do solo (Lupwayi et al., 1997).

TABELA 5. Produção de matéria seca da parte aérea das plantas de trevo branco, nos tratamentos inoculados e controle, cultivadas em diferentes condições de umidade do solo. (médias de 4 repetições).

Tratamento	Matéria seca da parte aérea	
	C.C.	Alagado
	----- g vaso ⁻¹ -----	
RP 5	3,47 a	1,68 bcd
T+N	3,37 ab	2,07 a
P ₃ 4	3,17 abc	1,84 abc
VP 16	3,17 abc	1,94 ab
PALM 3	3,05 abcd	1,48 de
AR 20	2,99 abcde	1,51 de
CV II	2,96 abcde	1,65 bcd
T 4	2,88 abcde	1,83 abc
SM 3	2,85 abcde	1,16 f
SEMIA 222	2,84 abcde	1,62 cde
CMQ 2	2,80 abcde	1,53 de
SEMIA 235	2,72 abcde	1,18 f
N 1	2,69 bcde	1,33 ef
AR 24	2,64 bcde	1,52 de
HN 18	2,62 bcde	1,55 cde
EA 20	2,50 cde	1,69 bcd
PF 13	2,49 cde	0,88 g
BG 3	2,35 de	1,09 fg
T-N	2,23 e	1,13 fg

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.
C.C. = Umidade do solo próxima à capacidade de campo.

Em condições de umidade do solo próximas à capacidade de campo, observou-se que a produção de matéria seca da parte aérea das plantas do tratamento controle com adição de nitrogênio e dos inoculados com os isolados RP5, P₃4, VP16 e PALM3 foi superior à produção de matéria seca do tratamento controle sem adição de nitrogênio (Tabela 5).

Observou-se também que as plantas dos tratamentos inoculados com os isolados AR20, CVII, T4, SM3, CMQ2, N1, AR24, HN18 e dos inoculados com as estirpes SEMIA 222 e SEMIA 235, apresentaram produção

de matéria seca semelhante ao tratamento controle com adição de nitrogênio mas também semelhante ao tratamento controle sem adição de nitrogênio (Tabela 5). Isto pode ter ocorrido pela elevada produção de matéria seca da parte aérea nas plantas do tratamento controle sem adição de nitrogênio, proporcionada pelo alto teor de nitrogênio mineral que o solo apresentava no momento da instalação do experimento, cerca de 25 mg kg^{-1} solo. Esse teor de nitrogênio no solo pode ter possibilitado o crescimento inicial das plantas, gerando assim, essa pequena diferença de produção de matéria seca da parte aérea das plantas entre os tratamentos controles com e sem adição de nitrogênio.

Resultados semelhantes foram obtidos por Brose (1994), que também observou esse comportamento em plantas de trevo branco, inclusive com ausência de diferença na produção de matéria seca da parte aérea das plantas aos 56 dias após a semeadura, atribuindo essa pequena diferença ao alto teor de nitrogênio mineral no solo proporcionado pela mineralização da matéria orgânica.

Em condições de alagamento do solo, com exceção dos tratamentos inoculados com os isolados SM3, N1, PF13, BG3 e com a estirpe SEMIA 235, todos os demais tratamentos inoculados, obtiveram uma produção de matéria seca na parte aérea das plantas superior ao tratamento controle sem adição de nitrogênio (Tabela 5). Observou-se também que as plantas dos tratamentos inoculados com os isolados VP16, P₃4 e T4, obtiveram uma elevada produção de matéria seca na parte aérea, sendo semelhante ao tratamento controle com adição de nitrogênio (Tabela 5).

Nessas condições, foi observada a presença de um grupo intermediário de tratamentos quanto a produção de matéria seca na parte aérea das plantas. Esse grupo foi formado pelos tratamentos inoculados com os isolados RP5, PALM3, AR20, CVII, CMQ2, AR24, HN18, EA20 e com a estirpe SEMIA 222, que obtiveram uma produção de matéria seca superior ao tratamento controle sem adição de nitrogênio porém inferior ao tratamento controle com adição de nitrogênio.

A menor produção de matéria seca da parte aérea foi obtida pelas plantas dos tratamentos inoculados com os isolados PF13, BG3 e do tratamento controle sem adição de nitrogênio (Tabela 5). Além disso, a

inoculação da estirpe SEMIA 235 e dos isolados N1 e SM3 não proporcionou uma maior produção de matéria seca da parte aérea das plantas em relação ao tratamento controle sem adição de nitrogênio (Tabela 5).

4.6.2 Acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas

Os valores referentes ao acúmulo de nitrogênio total na parte aérea das plantas, em diferentes condições de umidade do solo, são mostrados na Tabela 6. Da mesma forma que a produção de matéria seca, o acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas também foi drasticamente reduzido pelo alagamento do solo, com redução média de 49%. Tais resultados concordam com os observados por Lupwayi et al. (1997), que também observaram redução no acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas, tanto nos tratamentos inoculados, como nos tratamentos controles com e sem adição de nitrogênio causada pelo alagamento do solo.

Nas plantas cultivadas em solo com umidade próxima à capacidade de campo, o maior acúmulo de nitrogênio na parte aérea foi obtido pelas plantas do tratamento controle com adição de nitrogênio. Nessas condições, nenhum dos tratamentos inoculados proporcionou um acúmulo de nitrogênio na parte aérea superior a 62% do acumulado pelo tratamento controle com adição de nitrogênio.

Esse baixo acúmulo de nitrogênio nas plantas inoculadas com isolados e estirpes, quando comparado ao obtido pelo tratamento controle positivo, possivelmente deve-se ao atraso no início da nodulação e posterior fixação simbiótica do nitrogênio causado pelo alto teor de nitrogênio mineral no solo. Resultados semelhantes já foram observados em trabalhos anteriores. Avaliando a fixação simbiótica de nitrogênio por isolados de rizóbio trevo branco, Brose (1994) também observou que nenhum dos tratamentos inoculados, nem mesmo o inoculado com a estirpe SEMIA 222, proporcionou um acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas semelhante ao tratamento que recebeu a adição de nitrogênio.

Um alto teor de nitrogênio mineral no solo, pode suprir as necessidades iniciais da planta nesse nutriente, inibindo o processo de infecção e a nodulação pelo rizóbio. Após a absorção de grande parte do nitrogênio mineral do solo, a planta e o rizóbio darão início a simbiose, porém

em um momento em que a demanda da planta pelo nutriente é muito superior a demanda no início do ciclo da cultura (Streeter, 1988; Lucinski et al., 2002).

Observa-se que, em solo com umidade próxima à capacidade de campo, a inoculação com o isolado BG3 não promoveu um aumento no acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas (Tabela 6), em relação ao controle sem nitrogênio, indicando assim a ineficiência desse isolado em fixar nitrogênio em simbiose com trevo branco. Com exceção desse isolado, todos os outros promoveram um aumento no acúmulo de nitrogênio através da fixação simbiótica quando inoculados em plantas de trevo branco (Tabela 6).

TABELA 6. Nitrogênio acumulado na parte aérea das plantas nos tratamentos em diferentes condições de umidade do solo. (médias de 4 repetições).

Tratamento	Nitrogênio acumulado na parte aérea	
	C.C.	Alagado
	----- mg vaso ⁻¹ -----	
T+N	105,1 a	28,1 def
RP 5	64,9 b	32,6 cde
P ₃ 4	62,6 bc	37,5 abc
AR 20	62,4 bc	32,6 cde
VP 16	61,6 bcd	40,5 a
SEMIA 222	60,2 bcde	34,1 bcd
T 4	60,1 bcde	40,2 ab
CV II	57,9 bcdef	35,4 abc
PALM 3	57,9 bcdef	28,6 def
CMQ 2	53,6 bcdef	26,5 efg
AR 24	53,1 bcdef	31,2 cde
HN 18	50,7 cdef	32,5 cde
N 1	48,7 def	21,1 gh
SEMIA 235	48,6 def	23,9 fgh
SM 3	48,6 def	19,4 h
PF 13	47,5 ef	13,0 i
EA 20	44,8 f	32,3 cde
BG 3	27,4 g	8,8 i
T-N	25,9 g	9,2 i

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.
C.C. = Umidade do solo próxima à capacidade de campo.

Já em condições de alagamento do solo, o acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas foi bastante diferente daquele obtido em solo com umidade próxima à capacidade de campo. Nessas condições, a inoculação com os isolados VP16, T4, P₃4 e CVII, proporcionou um acúmulo de nitrogênio na parte aérea superior ao obtido nos tratamentos em que as plantas foram inoculadas com os isolados PALM3, CMQ2, N1, SM3, PF13, BG3, com a

estirpe SEMIA 235 e nos tratamentos controles, com e sem adição de nitrogênio (Tabela 6). Além disso, as plantas inoculadas com o isolado VP16 apresentaram um acúmulo de nitrogênio na parte aérea superior ao obtido pelas plantas inoculadas com a estirpe SEMIA 222, indicando um bom potencial para fixação simbiótica de nitrogênio em solos alagados.

A inoculação do isolado BG3 nas plantas submetidas ao alagamento do solo, assim como em umidade do solo próxima à capacidade de campo, não proporcionou um aumento no acúmulo de nitrogênio na parte aérea das mesmas (Tabela 6). Por outro lado, a inoculação do isolado PF13 nas plantas submetidas ao alagamento do solo, não proporcionou o aumento no acúmulo de nitrogênio observado quando o tratamento foi mantido com umidade do solo próxima à capacidade de campo (Tabela 6), indicando a sensibilidade desta simbiose à condição de alagamento do solo.

A grande redução no acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas do tratamento controle com adição de nitrogênio ocasionada pelo alagamento do solo (73%), pode ter ocorrido, além do efeito direto do alagamento do solo sobre o crescimento das plantas, pelo processo de desnitrificação. Esse processo pode ter ocorrido porque grande parte do nitrogênio mineral presente no solo, tanto o proveniente da mineralização da matéria orgânica como o proveniente da adubação, estava na forma de nitrato, podendo assim ser facilmente desnitrificado após o alagamento do solo.

Analisando-se a produção de matéria seca e o acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas dos tratamentos cultivados em condições de alagamento do solo em relação àqueles sem o alagamento, nota-se que o comportamento dessas simbioses não foi uniforme (Figura 2). Com o alagamento do solo, as plantas inoculadas com os isolados PF13, CMQ2, N1 e BG3, apresentaram uma redução mais acentuada no acúmulo de nitrogênio do que na produção de matéria seca da parte aérea das plantas.

Isso indica que as plantas submetidas ao alagamento do solo, apresentaram uma limitação maior no processo de fixação simbiótica de nitrogênio do que na produção de matéria seca da parte aérea das plantas, o que pode ser comprovado pelos valores situados abaixo da linha na Figura 2. Esse comportamento também foi observado por Bacanamwo & Purcell (1999)

em quatro genótipos de soja inoculados com a estirpe USDA 110 de *Bradyrhizobium japonicum* e submetidos a diferentes períodos de alagamento.

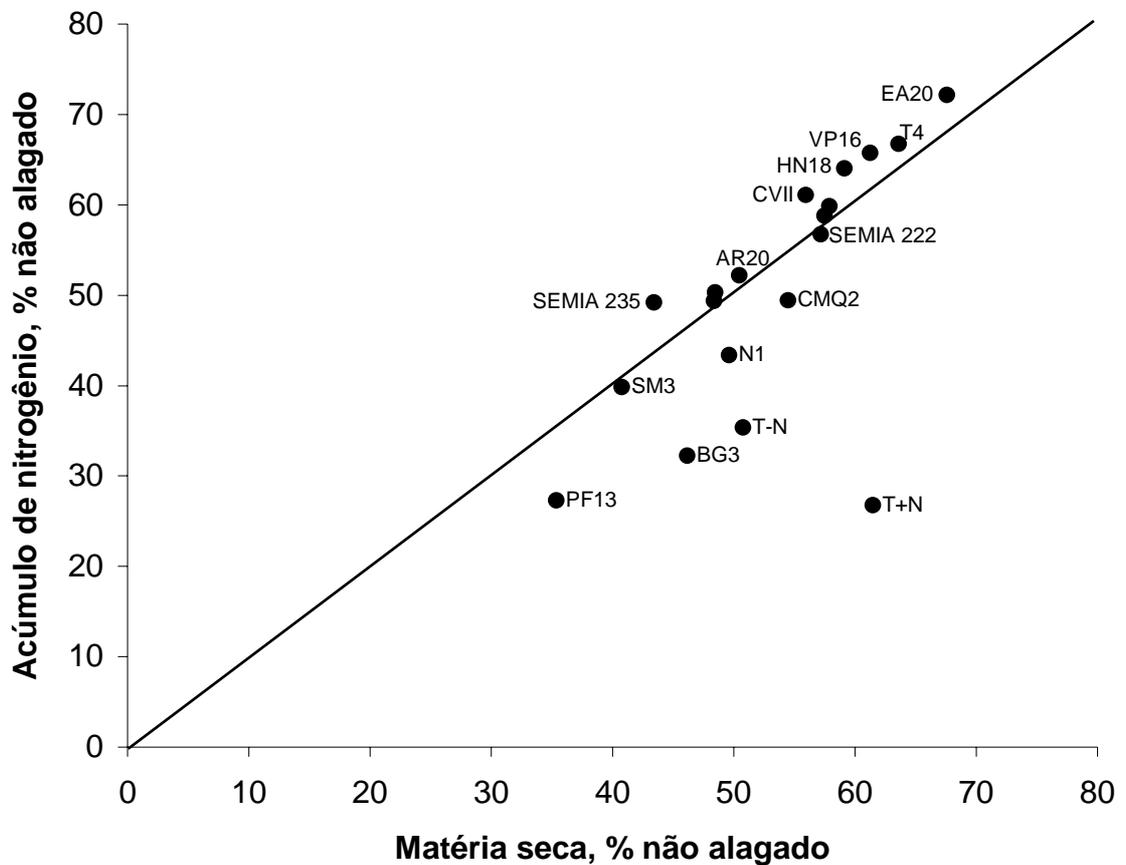


FIGURA 2. Relação entre a produção relativa de matéria seca da parte aérea e acúmulo relativo de nitrogênio na parte aérea das plantas inoculadas ou adubadas ou não com nitrogênio.

Por outro lado, nos tratamentos inoculados com os isolados VP16, T4, RP5, PALM3, P₃4, HN18, AR20, AR24, CVII, EA20 e com a estirpe SEMIA 235, a produção de matéria seca das plantas foi mais prejudicada do que o acúmulo de nitrogênio na parte aérea das mesmas, indicando assim, que o alagamento do solo foi mais prejudicial ao desenvolvimento das plantas do que ao processo de fixação simbiótica de nitrogênio. Scholles & Vargas (2004) também observaram esse comportamento em plantas de soja inoculadas com a estirpe SEMIA 5079 e submetidas a 30 dias de alagamento do solo.

No entanto, esse comportamento não indica necessariamente que um isolado ou uma estirpe seja eficiente na fixação simbiótica de nitrogênio em condições de alagamento do solo. Por exemplo, apesar do valor referente ao

isolado EA20 estar situado acima da linha na Figura 2, as plantas inoculadas com esse isolado apresentaram um acúmulo de nitrogênio inferior ao obtido pela plantas inoculadas com os isolados T4 e VP16, que também estão situadas acima dessa linha (Figura 2).

As quantidades de nitrogênio fixado na parte aérea das plantas inoculadas com os isolados e estirpes em alagamento do solo, em relação à obtida em capacidade de campo, são mostradas na Figura 3. Observa-se que a inoculação do isolado PF13 em alagamento do solo, proporcionou apenas 18% da quantidade de nitrogênio fixada em condições de umidade do solo próximas à capacidade de campo (Figura 3). Isto indica uma elevada sensibilidade da simbiose com esse isolado às condições de alagamento do solo.

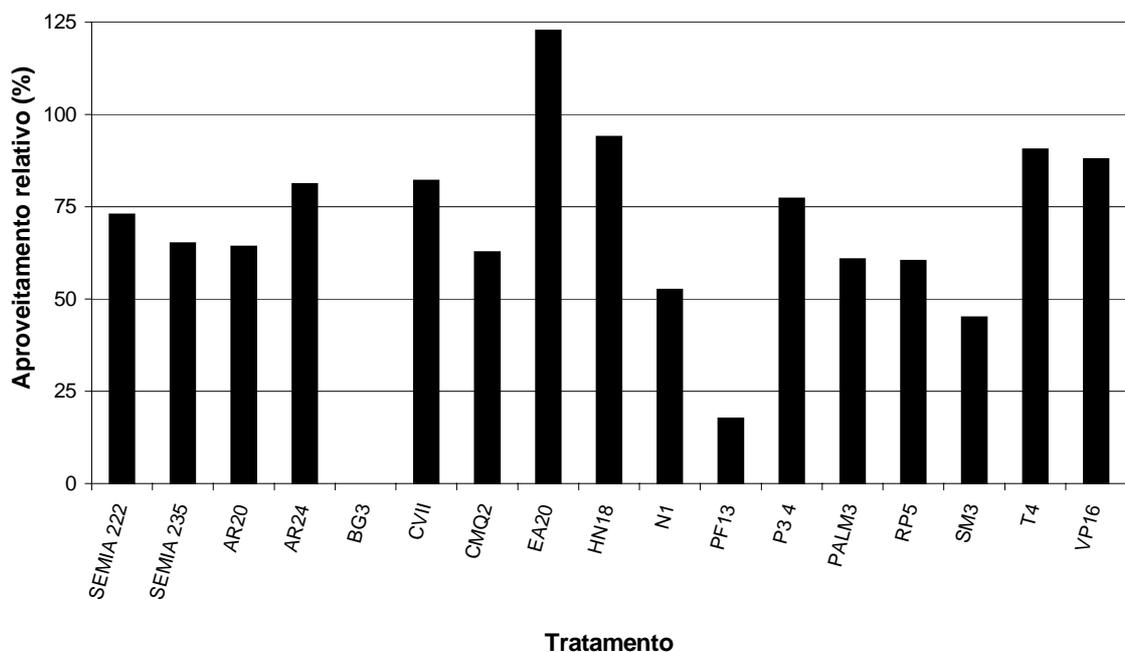


FIGURA 3. Aproveitamento relativo da fixação simbiótica de nitrogênio nas condições de alagamento do solo em relação à fixação nas condições de umidade do solo próximas à capacidade de campo.

Por outro lado, no tratamento inoculado com o isolado EA20, a quantidade de nitrogênio fixada foi maior em condições de alagamento do solo do que em condições de umidade do solo próximas à capacidade de campo (Figura 3). Nos tratamentos que não foram submetidos ao alagamento, o nitrogênio proveniente da mineralização da matéria orgânica, provavelmente, permaneceu no solo por mais tempo, tendo assim maior influência sobre a fixação simbiótica de nitrogênio do que o nitrogênio do solo que foi submetido

ao alagamento. Isto, aliado a uma maior sensibilidade dessa simbiose ao nitrogênio mineral do solo, poderia explicar a maior quantidade de nitrogênio fixada pelas plantas inoculadas com o isolado EA20 em alagamento do solo, em relação a quantidade fixada em umidade próxima à capacidade de campo. Apesar desse melhor desempenho em solo alagado, esse isolado não esteve entre os que proporcionaram uma elevada fixação simbiótica de nitrogênio quando inoculados em trevo branco nessas condições (Tabela 6).

Por outro lado, os tratamentos inoculados com os isolados VP16, T4, P₃ 4 e CVII, que obtiveram o maior acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas em condições de alagamento do solo, também apresentaram altos valores de aproveitamento relativo da fixação simbiótica de nitrogênio, todos acima de 75% (Figura 3).

4.6.3 Número e massa de nódulos secos

O número de nódulos e a massa de nódulos secos produzida nas plantas dos tratamentos em diferentes condições de umidade do solo são mostrados na Tabela 7.

Observa-se que o alagamento do solo reduziu drasticamente a quantidade de nódulos radiculares nos tratamentos inoculados, com exceção no tratamento inoculado com o isolado BG3, que não produziu boa nodulação nem mesmo em solo com umidade próxima à capacidade de campo. Essa diminuição na quantidade de nódulos radiculares ocasionada pelo alagamento do solo foi observada anteriormente em outros trabalhos (Eaglesham & Ayanaba, 1984; Shiferaw et al., 1992; James & Crawford, 1998; Vignolio et al., 1999). Isto pode ser devido à diminuição no número de sítios de infecção para o rizóbio, nas raízes das plantas em solos alagados, diminuindo assim, a quantidade de nódulos radiculares formados (Zhang & Smith, 2002).

Por outro lado, essa diminuição pode ser decorrente da redução no crescimento radicular das plantas submetidas ao alagamento do solo. Nesse experimento, as raízes das plantas que foram submetidas ao alagamento do solo, chegaram a no máximo 9cm de profundidade, enquanto que nos tratamentos mantidos sem alagamento, as raízes exploraram todos os 20cm de profundidade do vaso, sendo observada a presença de nódulos radiculares até mesmo nessa profundidade.

O único tratamento que produziu mais do que 400 nódulos por vaso sem o alagamento e mais de 200 nódulos por vaso em condições de alagamento do solo foi o inoculado com o isolado N1 (Tabela 7). Porém, essa elevada quantidade de nódulos não proporcionou uma elevada fixação simbiótica de nitrogênio, pois essas plantas apresentaram um baixo acúmulo de nitrogênio na parte aérea (Tabela 6) e, conseqüentemente, uma baixa produção de matéria seca da parte aérea (Tabela 5), semelhante à obtida pelas plantas do tratamento controle sem adição de nitrogênio.

Em condições de umidade do solo próximas à capacidade de campo, as plantas do tratamento controle sem adição de nitrogênio apresentaram uma pequena quantidade de nódulos radiculares ao final do experimento, o que indica que o solo apresentava uma população de rizóbio, mas que era pequena e ineficiente. Por outro lado, essa formação de nódulos não foi observada nas plantas do tratamento controle com adição de nitrogênio, provavelmente devido à inibição da nodulação causada pela adição de nitrogênio.

TABELA 7. Número e massa de nódulos secos das plantas nos tratamentos em diferentes condições de umidade do solo. (médias de 4 repetições).

Tratamento	Número de nódulos ¹		Massa de nódulos secos	
	C.C.	Alagado	C.C.	Alagado
	----- mg vaso ⁻¹ -----			
PALM 3	281 ab	160 b	66 a	60 a
SEMIA 235	217 b	159 b	79 a	60 a
RP 5	376 ab	200 ab	72 a	59 a
VP 16	325 ab	194 ab	76 a	59 a
N 1	479 a	271 a	93 a	57 ab
HN 18	298 ab	181 ab	85 a	53 abc
P ₃ 4	375 ab	193 ab	83 a	52 abc
T 4	301 ab	151 b	72 a	52 abc
SEMIA 222	384 ab	148 b	98 a	52 abc
EA 20	251 ab	131 b	84 a	52 abc
SM 3	328 ab	198 ab	63 a	48 abc
CMQ 2	274 ab	156 b	58 a	46 abc
CV II	334 ab	168 ab	69 a	42 bc
AR 20	359 ab	147 b	82 a	39 cd
AR 24	276 ab	138 b	52 a	38 cd
PF 13	350 ab	156 b	60 a	25 d
BG 3	16 c	26 c	4 b	7 e
T-N	20 c	-	3 b	-
T+N	-	-	-	-

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%;
¹Dados transformados por raiz de x + 1.

O alagamento do solo durante 30 dias, reduziu em 33% a massa de nódulos secos nas plantas dos tratamento inoculados, com exceção das plantas inoculadas com o isolado BG3 (Tabela 7). Tal redução média de 33% na massa de nódulos secos, ocasionada pelo alagamento do solo, também foi observada por Lupwayi et al. (1997) em plantas de *Trifolium semipilosum* inoculadas com diferentes isolados de rizóbio.

Em condições de umidade do solo próximas à capacidade de campo, todos os tratamentos inoculados produziram uma massa de nódulos secos semelhante, com exceção do tratamento inoculado com o isolado BG3.

As plantas do tratamento inoculado com o isolado PF13, que em condições próximas à capacidade de campo, estiveram entre as plantas com maior produção de massa de nódulos secos, apresentaram uma baixa massa de nódulos secos quando submetidas ao alagamento do solo, com uma redução média de 58%, quase duas vezes maior do que a média de redução entre os tratamentos inoculados. Essa elevada redução na nodulação poderia explicar a redução média de 73% no acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas desse tratamento quando submetidas ao alagamento do solo.

Ao avaliarem a viabilidade da inoculação de soja com estirpes de *Bradyrhizobium* em solo alagado, Scholles & Vargas (2004) observaram que os prejuízos à nodulação, decorrentes do alagamento do solo, foram independentes da estirpe inoculada. Os autores atribuíram esse comportamento a características da planta hospedeira ou à sensibilidade semelhante de todas as quatro estirpes testadas. No entanto, pelo presente trabalho, essa não parece ser uma regra geral, pois tanto na quantidade quanto na massa de nódulos secos, esses prejuízos foram dependentes do rizóbio inoculado (Tabela 7). A redução no número de nódulos causada pelo alagamento do solo variou de 27% a 61%, observando-se ainda maiores variações na redução da massa de nódulos secos, de 9% a 58% dentre os tratamentos inoculados.

4.6.4 Eficiência relativa

Os valores de eficiência relativa no acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas proporcionados pela inoculação dos isolados e estirpes, em diferentes condições de umidade do solo, podem ser observados na Figura 4.

Em condições de umidade do solo próximas à capacidade de campo, nenhum dos tratamentos inoculados apresentou uma eficiência relativa maior que 50% (Figura 4). Essa baixa eficiência relativa pode ter ocorrido pela influência negativa do nitrogênio mineral do solo na nodulação, retardando o processo, e também sobre a fixação simbiótica de nitrogênio. Isto pode ocorrer porque até pequenas quantidades de nitrato no solo podem prejudicar a infecção, o desenvolvimento dos nódulos e também a taxa de fixação do nitrogênio atmosférico (Ferguson & Mathesius, 2003).

Já em condições de alagamento do solo, vários tratamentos inoculados obtiveram valores de eficiência relativa superiores a 100%, com destaque para os tratamentos em que as plantas foram inoculadas com os isolados VP16 e T4, que obtiveram valores superiores a 160% de eficiência relativa (Figura 4). Os demais tratamentos que obtiveram valores de eficiência relativa superiores a 100% nessas condições, foram os inoculados com os isolados AR20, AR24, CVII, EA20, HN18, P₃4, PALM3, RP5 e com a estirpe SEMIA 222 (Figura 4).

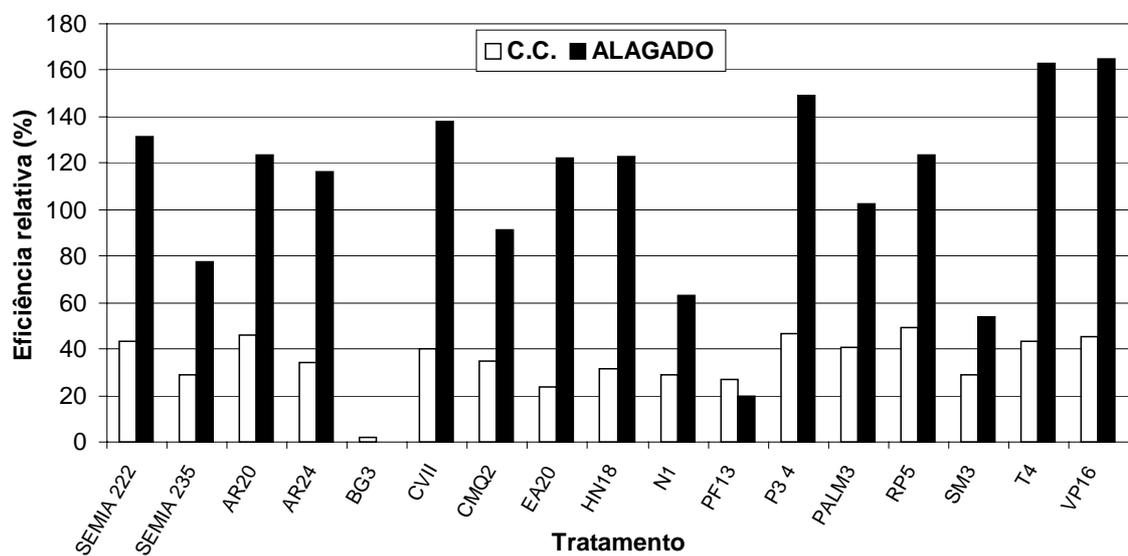


FIGURA 4. Eficiência relativa no acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas inoculadas com isolados e estirpes, em diferentes condições de umidade do solo.

Esses isolados mostraram-se eficientes no processo de fixação simbiótica de nitrogênio em trevo branco, em condições de alagamento do solo, observando-se valores de acúmulo de nitrogênio até 44% superiores ao acúmulo observado na parte aérea das plantas que receberam a adição de

uma dose de nitrogênio equivalente a 110 kg ha^{-1} , o que representa a aplicação de aproximadamente 240 kg ha^{-1} de uréia.

Lupwayi et al. (1997) também observaram altos valores de eficiência relativa em plantas de *Trifolium semipilosum* inoculadas com uma estirpe de rizóbio e cultivadas à campo. Os autores também observaram que mesmo com a aplicação de 100 kg ha^{-1} de nitrogênio, as plantas do tratamento controle com adição de nitrogênio, apresentaram um baixo acúmulo desse nutriente pelo fato do alagamento do solo ter ocasionado a perda do nitrogênio por desnitrificação.

Estes resultados demonstram a necessidade de inoculação do trevo branco quando cultivado em áreas de várzea, pois nessas áreas, é possível que nem mesmo a aplicação de fertilizantes nitrogenados garanta um adequado suprimento desse nutriente às plantas, especialmente pelo risco de perda do nitrogênio por desnitrificação em condições de alagamento do solo.

5. CONCLUSÕES

- a) Foi possível a seleção de rizóbios eficientes na fixação de nitrogênio em simbiose com trevo branco em solos do Rio Grande do Sul;
- b) O alagamento do solo afeta a simbiose rizóbio/trevo branco reduzindo o número e a massa de nódulos secos, assim como o acúmulo de nitrogênio e a produção de matéria seca da parte aérea das plantas de trevo branco;
- c) A fixação de nitrogênio pela simbiose rizóbio/trevo branco ocorre em condições de alagamento do solo;
- d) Existe variabilidade na sensibilidade da simbiose rizóbio/trevo ao alagamento do solo em função do rizóbio inoculado;
- e) Os isolados avaliados em condições de umidade do solo próxima à capacidade de campo, com exceção do EA20 e BG3, apresentam eficiência semelhante a estirpe SEMIA 222 na fixação simbiótica de nitrogênio;
- f) Os isolados VP16, T4, P₃ 4 e CVII são eficientes na fixação simbiótica de nitrogênio com trevo branco em condições de solo alagado, constituindo-se em um material promissor para programas de seleção de estirpes para trevo branco.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, J.B. et al. Solubilização de fosfato natural de araxá por estirpes de rizóbio inoculadas em trevo branco. In: FERTBIO 2004, Lages. **Resumos...** Lages: CAV-UDESC, 2004.

ANDRADE, D.S. **Seleção de estirpes nativas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* para *Trifolium riograndense* Bukart.** 1986. 93f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1986.

ANDRADE, D.S.; MURPHY, P.J.; GILLER, K.E. The diversity of *Phaseolus*-nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.8, p.4025-4034, 2002.

ANTOUN, H. et al. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v.204, n.1, p.57-67, 1998.

ARMSTRONG, W. Aeration in higher plants. **Advances in Botanical Research**, Oxford, v.7, n.1, p.225-332, 1979.

ARRESE-IGOR, C. et al. Effect of low rhizosphere oxygen on growth, nitrogen fixation and nodule morphology. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.89, p.55-63, 1993.

ASCHI-SMITI, S.; BIZID, E.; HAMZA, M. Effet de l'hydromorphie sur la croissance de quatre variétés de trèfle (*Trifolium subterraneum* L.). **Agronomie**, Les Ulis, v.23, p.97-104, 2003a.

ASCHI-SMITI, S. et al. Assessment of enzyme induction and aerenchyma formation as mechanisms for flooding tolerance in *Trifolium subterraneum* "Park". **Annals of Botany**, Oxford, v.91, p.195-204, 2003b.

BACANAMWO, M.; PURCELL, L.C. Soybean dry matter and N accumulation responses to flooding stress, N sources and hypoxia. **Journal of Experimental Botany**, London, v.50, n.334, p.689-696, 1999.

BALUSKA, F. et al. Differential morphogenesis in the maize root cortex: involvement of microtubules and phytohormones during post-mitotic cell growth in relation to aerenchyma and other responses to environmental stress. **Botanica Acta**, Leipzig, v.106, p.394-404, 1993.

BANIK, S.; DEY, B.K. Available phosphate content of an alluvial soil is influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing microorganisms. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.69, n.2, p.353-364, 1982.

BARUCH, Z. Responses to drought and flooding in tropical forage grasses. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.164, n.1, p.97-105, 1994.

BERTRAND, A. et al. Oxygen deficiency affects carbohydrate reserves in overwintering forage crops. **Journal of Experimental Botany**, London, v.54, n.388, p.1721-1730, 2003.

BISHNOI, N.R.; CHRISHNAMOORTHY, H.H. Effect of waterlogging and gibberellic acid on nodulation and nitrogen fixation in peanut. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.28, p.663-666, 1992.

BOHRER, T.R.J.; HUNGRIA, M. Avaliação de cultivares de soja quanto à fixação biológica de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.33, n.6, p.937-952, 1998.

BORDELEAU, L.M.; PRÉVOST, D. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.161, n.1, p.115-125, 1994.

BORTHAKUR, D. et al. Identification of two classes of *Rhizobium phaseoli* genes required for melanin synthesis, one of which is required for nitrogen fixation and activates the transcription of the other. **Molecular and General Genetics**, New York, v.207, p.155-160, 1987.

BROCKWELL, J.; HELY, F.W.; NEAL-SMITH, C.A. Some symbiotic characteristics of rhizobia responsible for spontaneous, effective field nodulation of *Lotus hispidus*. **Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry**, Tamworth, v.6, p.365-370, 1966.

BROSE, E. Seleção de rizóbio para trevo-branco em solo ácido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, n.2, p.281-285, 1994.

BUTTERY, B.R. Some effects of waterlogging and supply of combined nitrogen on soybean growth. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.67, p.69-77, 1987.

CAMPILLO, R. et al. Estimación de la fijación biológica de nitrógeno en leguminosas forajeras mediante la metodología del ¹⁵N. **Agricultura Técnica**, Santiago, v.63, n.2, p.169-179, 2003.

CARLSSON, G.; HUSS-DANELL, K. Nitrogen fixation in perennial forage legumes in the field. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.253, n.2, p.353-372, 2003.

CHABOT, R. et al. Effect of phosphorus on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.30, n.12, p.1615-1618, 1998.

CHAKRABARTI, S.K.; MISHRA, A.K.; CHAKRABARTTY, P.K. Metabolism of glucose and gluconate in fast- and slow- growing rhizobia. **Phytochemistry**, Oxford, v.26, n.1, p.85-87, 1987.

COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC. **Recomendações de adubação e de calagem para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 3. Ed. Passo Fundo: SBSC/NRS, 1994. 224p.

COWLING, D.W. The effect of nitrogenous fertiliser on an established white clover sward. **Journal of the British Grassland Society**, London, v.16, p.65-68, 1961.

CRAWFORD, R.M.M. Oxygen availability as an ecological limit to plant distribution. **Advances in Ecological Resourts**, [s.n.], v.23, p.93-185, 1992.

CRUSH, J.R. Nitrogen fixation. In: BAKER, M.J.; WILLIAMS, W.M. (Eds.) **White Clover**. Wallingford: CAB International, 1987. p.185-201.

CUBO, M.T.; BUENDIA-CLAVERIA, A.M.; BERINGER, J.E.; RUIZ-SAINZ, J.E. Melanin production by *Rhizobium* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, p.1812-1817, 1988.

CUBO, M.T.; ROMERO, F.; VINARDELL, J.M.; RUIZ-SAINZ, J.E. Expression of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli melA* gene in other rhizobia does not require the presence of the *nifA* gene. **Australian Journal of Plant Physiology**, Oxford, v.24, p.195-203, 1997.

DAT, J.F. et al. Sensing and signalling during plant flooding. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.42, p.273-282, 2004.

DAVIES, A. White Clover. **Biologist**, Vancouver, v.31, p.129-133, 1992.

DREW, M.C.; JACKSON, M.B.; GIFFARD, S. Ethylene promoted adventitious rooting and cortical air spaces (aerenchyma) in roots may be adaptive responses to flooding in *Zea mays* L. **Planta**, Heidelberg, v.147, n.1, p.83-88, 1979.

DREW, M.C. et al. Metabolic acclimation of root tips to oxygen deficiency. **Annals of Botany**, Oxford, v.74, p.281-286, 1994.

DREW, M.C. Oxygen deficiency and root metabolism. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Southampton, v.48, p.223-250, 1997.

DUFF, R.B.; WEBLEY, D.M. 2-Ketogluconic acid as a natural chelator produced by soil bacteria. **Chemistry and Industry**, London, p.1376-1377, 1959.

DUNLOP, J.; HART, A.L. Mineral nutrition. In: BAKER, M.J.; WILLIAMS, W.M. (Eds.) **White Clover**. Wallingford: CAB International, 1987. p.153-183.

EAGLESHAM, A.R.J.; AYANABA, A. Tropical stress ecology of rhizobia, root nodulation and legume fixation. In: SUBBA RAO, N.S. (Ed.) **Current developments in Biological Nitrogen Fixation**. New Delhi: Edward Arnold, 1984. p.1-35.

ELSE, M.A. et al. Export of abscisic acid, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, phosphate, and nitrate from roots to shoots of flooded tomato plants. **Plant Physiology**, Rockville, v,107, p.377-384, 1995.

ELTILIB, A.M.; LEDGARD, S.F. Production and N fixation by Grasslands Kopu and Grasslands Huia white clovers under different N regimes. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v.31, p.325-330, 1988.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1999. 412p.

ERIKSEN, J.; HOGH-JENSEN, H. Variations in the natural abundance of ¹⁵N in ryegrass/white clover shoot material as influenced by cattle grazing. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.205, n.1, p.67-76, 1998.

ERNST, W.H.O. Ecophysiology of plants in waterlogged and flooded environments. **Aquatica Botanica**, [s.l.], v.38, p.73-90, 1990.

FERNANDES, M.F.; FERNANDES, R.P.M. Seleção inicial e caracterização parcial de rizóbios de tabuleiros costeiros quando associados ao guandu. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.24, p.321-327, 2000.

FERNANDES, M.F.; FERNANDES, R.P.M.; HUNGRIA, M. Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.7, p.835-842, 2003.

FRAME, J.; NEWBOULD, P. Agronomy of white clover. In: BRADY, N.C. (Ed.) **Advances in Agronomy**. Orlando: Academic Press, 1986. p.1-88.

FRAME, J.; LAIDLAW, A.S. Maging white clover in mixed swards; principles and practice. **Pastos**, Madrid, v.28, p.5-13, 2000.

GAGE, D.J.; MARGOLIN, W. Hanging by a thread: invasion of legume plants by rhizobia. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v.3, p.613-617, 2000.

GAO, X.; BORTHAKUR, D. Short communication: discrete differences between strains of different *Rhizobium* spp. For competitive nodule occupancy on beans. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.11, p.681-682, 1995.

GIBBERD, M.R.; COCKS, P.S. Effect of waterlogging and soil pH on the micro-distribution of naturalised annual legumes. **Australian Journal of Agricultural Research**, East Melbourne, v.48, p.223-229, 1997.

GIBBERD, M.R.; COLMER, T.D.; COCKS, P.S. Root porosity and oxygen movement in waterlogging-tolerant *Trifolium tomentosum* and -intolerant *Trifolium glomeratum*. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.22, p.1161-1168, 1999.

GIBBERD, M.R.; GRAY, J.D.; COCKS, P.S.; COLMER, T.D. Waterlogging tolerance among a diverse range of *Trifolium* accessions is related to root porosity, lateral root formation and "aerotropic rooting". **Annals of Botany**, Oxford, v.88, p.579-589, 2001.

GIGOVA, L. et al. Free-living and symbiotic characteristics of plasmid-cured derivatives of *Rhizobium galegae*. **Plant Science**, Oxford, v.125, p.87-96, 1997.

GIONGO, A. **Diversidade de rizóbios nativos que nodulam feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em área de campo nativo, com adubação mineral e adubação orgânica**. 2003. 79f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

GOLDSTEIN, A.H. Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by gram-negative bacteria. In: TORRIANI-GORINI, A.; YAGIL, E.; SILVER, S. (Eds.) **Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology**. Washington: ASM Press, 1994. p. 197-203.

GOODLASS, G.; SMITH, K.A. Effects of ethylene on root extension and nodulation of pea (*Pisum sativum*) and white clover (*Trifolium repens* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v.51, n.2, p.387-395, 1979.

GOORMACHTIG, S. et al. Switch from intracellular to intercellular invasion during water stress-tolerant legume nodulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.101, p.6303-6308, 2004a.

GOORMACHTIG, S.; CAPOEN, W.; HOLSTERS, M. *Rhizobium* infection: lessons from the versatile nodulation behavior of water-tolerant legumes. **Trends in Plant Science**, London, v.9, n.11, p.518-522, 2004b.

GRABLE, A.R. Soil aeration and plant growth. **Advances in agronomy**, Newark, v.18, p.57-106, 1966.

GRAHAM, P.H. Studies on the utilization of carbohydrates and Krebs cycle intermediates by rhizobia using na agar plate method. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.30, p.68-72, 1964.

GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.36, p.1389-1398, 2004.

D'HAENZE, W. et al. Reactive oxygen species and ethylene play a positive role in lateral root base nodulation of a semi-aquatic legume. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.100, p.11789-11794, 2003.

HALDEMANN, C.; BRANDLE, R. Seasonal variations of reserves and of fermentation processes in wetland plants rhizomes at the natural sites. **Flora**, München, v.178, p.307-313, 1988.

HALDER, A.K. et al. Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v.36, p.81-92, 1990.

HALDER, A.K.; CHAKRABARTY, P.K. Solubilization of inorganic phosphates by *Rhizobium*. **Folia Microbiologica**, Prague, V.38, n.3, p.325-330, 1993.

HAWKINS, F.K.L.; JOHNSTON, A.W.B. Transcription of a *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* gene needed for melanin synthesis is activated by *nifA* of *Rhizobium* and *Klebsiella pneumoniae*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.2, p. 331-337, 1988.

HAWKINS, F.K.L.; KENNEDY, C.; JOHNSTON, A.W.B. A *Rhizobium leguminosarum* gene required for symbiotic nitrogen fixation, melanin synthesis and normal growth on certain growth media. **Journal of General Microbiology**, Essex, v.137, p.1721-1728, 1991.

HEINRICHS, D.H. Flooding tolerance of legumes. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.50, p.435-438, 1970.

HIRSCH, A.M. Developmental biology of legume nodulation. **New Phytologist**, Lancaster, v.122, p.211-237, 1992.

HOGH-JENSEN, H.; SCHJORRING, J.K. Interactions between white clover and ryegrass under contrasting nitrogen availability: N₂ fixation, N fertilizer recovery, N transfer and water use efficiency. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.197, n.2, p.187-199, 1997.

HOVELAND, C.S.; WEBSTER, H.L. Flooding tolerance of annual clover. **Agronomy Journal**, Madison, v.57, p.3-4, 1965.

HOVELAND, C.S.; MIKKELSEN, E.E. Flooding tolerance of Ladino white, intermediate white, persian, and strawberry clovers. **Agronomy Journal**, Madison, v.59, p.307-308, 1967.

HUANG, S.Y.H.; VAN TOAI, T.T. Abscisic acid induces anaerobiosis tolerance in corn. **Plant Physiology**, Rockville, v.97, p.593-597, 1991.

HUMPHREY, E. et al. Flood irrigation of wheat on a transitional red-brown earth. 2. Effect of duration of ponding on availability of soil and fertilizer nitrogen. **Australian Journal of Agricultural Research**, East Melbourne, v.42, n.7, p.1037-1051, 1991.

HUNGRIA, M. et al. Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soyabean nodules in Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.33, p.1349-1361, 2001.

HYNES, M.F.; BRUCKSCH, K.; PRIEFER, U. Melanin production encoded by a cryptic plasmid in a *Rhizobium leguminosarum* strain. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v.150, p.326-332, 1988.

IDRISSI, M.M.E. et al. Characterization of rhizobia isolated from Carob tree (*Ceratonia siliqua*). **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.80, p.165-173, 1996.

JACKSON, M.B.; DREW, M.C. Effect of flooding on herbaceous plants. In: KOZLOVSKI, T.T. (Ed.) **Flooding and plant growth**. London: Academic Press, 1984. p.47-128.

JACKSON, M.B. Ethylene and responses of plants to soil waterlogging and submergence. **Annual Reviews of Plant Physiology**, Palo Alto, v.36, p.145-174, 1985.

JACKSON, M.B.; BRAILSFORD, R.W.; ELSE, M.A. Hormones and plant adaptation to poor aeration: a review. In: KUO, C.G. (Ed.) **Adaptation of food crops to temperature and water stress**. Taipei: Asian Vegetable Research and Development Center, 1993. p.231-243.

JACOBSON, E.S. Pathogenic roles for fungal melanins. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.13, n.4, p.708-717, 2000.

JAHUFER, M.Z.Z. et al. Identification of research to improve the efficiency of breeding strategies for white clover in Australia – a review. **Australian Journal of Agricultural Research**, East Melbourne, v.53, p.239-257, 2002.

JAMES, E.K.; CRAWFORD, R.M.M. Effect of oxygen availability on nitrogen fixation by two *Lotus* species under flooded conditions. **Journal of Experimental Botany**, London, v.49, n.320, p.599-609, 1998.

JAMES, E.K.; SPRENT, J.I. Development of N₂-fixing nodules on the wetland legume *Lotus uliginosus* exposed to conditions of flooding. **New Phytologist**, Lancaster, v.142, p.219-231, 1999.

JUSTIN, S.H.F.W.; ARMSTRONG, W. The anatomical characteristics of roots and plant response to soil flooding. **New Phytologist**, Lancaster, v.105, p.465-495, 1987.

KATZNELSON, H.; PETERSON, E.A.; ROVATT, J.W. Phosphate dissolving microorganisms on seed and in the root zone of plants. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.40, p.1181-1186, 1962.

KAWASE, M. Anatomical and morphological adaptation of plants to waterlogging. **HortScience**, Virginia, v.16, p.30-34, 1981.

KEYSER, H.H.; BOHLOOL, B.B.; HU, T.S.; WEBER, D.F. Fast-growing rhizobia isolated from root nodules of soybean. **Science**, Washington, v.215, p.1631-1632, 1982.

KISHINEVSKY, B.D. et al. Phenotypic and genetic diversity among rhizobia isolated from three *Hedysarum* species: *H. spinosissimum*, *H. coronarium* and *H. flexuosum*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.251, n.1, p.143-153, 2003.

KUMAR, K.; GOH, K.M. Biological nitrogen fixation, accumulation of soil nitrogen and nitrogen balance for white clover (*Trifolium repens* L.) and field pea (*Pisum sativum* L.) grown for seed. **Field Crops Research**, London, v.68, p.49-59, 2000.

LAAN, P. et al. Root morphology and aerenchyma formation as indicators of the flood-tolerance of *Rumex* species. **Journal of Ecology**, London, v.77, p.693-703, 1989.

LIDLAW, A.S.; CHRISIE, P.; LEE, H.W. Effect of white clover cultivar on apparent transfer of nitrogen from clover to grass and estimation of relative turnover rates in roots. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.179, n.2, p.243-253, 1996.

LAMB, J.W.; HOMBRECHER, G.; JOHNSTON, A.W.B. Plasmid-determinant nodulation and nitrogen-fixation abilities in *Rhizobium phaseoli*. **Molecular and General Genetics**, New York, v.186, p.449-452, 1982.

LIAO, C.T.; LIN, C.H. Physiological adaptation of crop plants to flooding stress. **Proceedings of the National Science Council**, Taipei, v.25, n.3, p.148-157, 2001.

LUCINSKI, R.; POLCYN, W.; RATAJCZAK, L. Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium* – legumes. **Acta Biochimica Polonica**, Poznan, v.49, n.2, p.537-546, 2002.

LUPWAYI, N.Z.; HAQUE, I.; HOLL, F.B. Strain-specific response of *Trifolium semipilosum* to inoculation with *Rhizobium* and the significance of waterlogging in Vertisols. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.129, p.439-446, 1997.

MA, W.; PENROSE, D.M.; GLICK, B.R. Strategies used by rhizobia to lower plant ethylene levels and increase nodulation. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.48, n.11, p.947-954, 2002.

MAÂTALLAH, J. et al. Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. **Agronomie**, Les Ulis, v.22, p.321-329, 2002.

MACNAMARA, S.T.; MITCHELL, C.A. Roles of auxin and ethylene in adventitious root formation by a flood-resistant tomato genotype. **HortScience**, Virginia, v.26, p.57-58, 1991.

MARRIOT, C.A.; HAYSTEAD, A. The effect of defoliation on the nitrogen economy of white clover: regrowth and the remobilisation of plant organic nitrogen. **Annals of Botany**, Oxford, v.66, p.465-474, 1990.

MARSUDI, N.D.S.; GLENN, A.R.; DILWORTH, M.J. Identification and characterization of fast- and slow-growing root nodule bacteria from South-Western Australian soils able to nodulate *Acacia saligna*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.31, p.1229-1238, 1999.

MARTINEZ-DE-DRETZ, G.; ARIAS, A.; CUTINELLA, M.R. de. Fast- and slow-growing rhizobia: differences in sucrose utilization and invertase activity. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.20, p.605-609, 1974.

MASCAGNI, H.J.; SABBE, W.E. Late spring nitrogen applications on wheat on a poorly drained soil. **Journal of Plant Nutrition**, Athens, v.14, n.10, p.1091-1103, 1991.

MINCHIN, F.R.; SUMMERFIELD, R.J. Symbiotic nitrogen fixation and vegetative growth of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) in waterlogged conditions. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.45, n.1, p.113-127, 1976.

MONTEIRO, A.L.G.; MORAES, A. Fisiologia e morfologia de plantas forrageiras. In: MONTEIRO, A.L.G.; MORAES, A.; CORRÊA, E.A.S. (Eds.) **Forragicultura no Paraná**. Londrina: CPAF, 1996. p.75-92.

MUNDY, G.N.; JONES, H.R.; MASON, W.K. Nitrogen fixation activity by white clover pastures during flood irrigation cycles. **Australian Journal of Agricultural Research**, East Melbourne, v.39, n.3, p.409-414, 1988.

MUSGRAVE, A.; JACKSON, M.B.; LING, E. *Callitriche* stem elongation is controlled by ethylene and gibberellin. **Nature New Biology**, London, v.238, p.93-96, 1972.

OLDROYD, G.E.D.; ENGSTROM, E.M.; LONG, S.R. Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. **The Plant Cell**, Rockville, v.13, p.1835-1849, 2001.

PADMANABHAN, S.; HIRTZ, R.D.; BROUGHTON, W.J. Rhizobia in tropical legumes: cultural characteristics of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* sp. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.22, n.1, p.23-28, 1990.

DEL PAPA, M.F. et al. Isolation and characterization of alfafa-nodulating rhizobia present in acidic soils of central Argentina and Uruguay. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, p.1420-1427, 1999.

PATRICK, W.M.H.; MAHAPATRA, I.C. Transformation and availability to rice of nitrogen and phosphorus in waterlogged soils. **Advances in Agronomy**, Newark, v.20, p.323-359, 1968.

PEIX, A. et al. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.33, p.103-110, 2001.

PONNAMPERUMA, F.N. Chemistry of submerged soils. **Advances in Agronomy**, Newark, v.24, p.29-95, 1972.

PONNAMPERUMA, F.N. **Physicochemical properties of submerged soils in relation to fertility**. Manilla: IRRI, 1977. (IRRI Research Paper Series 5)

PONNAMPERUMA, F.N. Effects of flooding on soils. In: KOZLOWSKI, T.T. (Ed.) **Flooding and Plant Growth**. Orlando: Academic Press, 1984. p.9-45.

PUGH, R. et al. The effect of waterlogging on nitrogen fixation and nodule morphology in soil-grown white clover (*Trifolium repens* L.). **Journal of Experimental Botany**, London, v.46, p.285-290, 1995.

RAGHU, K.; MACRAE, I.C. Occurrence of phosphate dissolving microorganisms in the rhizosphere of rice plants and in submerged soils. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.29, p.582-586, 1966.

REGEHR, D.L.; BAZZAZ, F.A.; BOGGESS, W.R. Photosynthesis, transpirations and leaf conductance of *Populus deltoides* in relation to flooding and drought. **Photosynthetica**, Prague, v.9, p.52-61, 1975.

REGGIANI, R.; BRAMBILLA, I.; BERTANI, A. Effect of exogenous nitrate on anaerobic metabolism in excised rice roots. 1. Nitrate reduction and pyridine nucleotide pools. **Journal of Experimental Botany**, London, v.36, p.1193-1199, 1985.

RIFFKIN, P.A. et al. Factors associated with biological nitrogen fixation in dairy pastures in south-western Victoria. **Australian Journal of Agricultural Research**, East Melbourne, v.50, n.2, p.261-272, 1999.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, Oxford, V.17, p.319-339, 1999.

RODRIGUEZ-NAVARRO, D.N. et al. Characterization of *Rhizobium* spp. bean isolates from South West Spain. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.32, p.1601-1613, 2000.

ROGERS, M.E.; WEST, D.W. The effects of rootzone salinity and hypoxia on shoot and root growth in *Trifolium* species. **Annals of Botany**, Oxford, v.72, p.503-509, 1993.

ROMERO-MARTINEZ, R. et al. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infection and Immunity**, Washington, v.68, n.6, p.3696-3703, 2000.

RONSON, C.W.; PRIMROSE, S.B. Carbohydrate metabolism in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. **Journal of General Microbiology**, London, v.112, p.77-78, 1979.

RYLE, G.J.A.; POWELL, C.E.; GORDON, A.J. Effect of source of nitrogen on the growth of Fiskeby soya bean: the carbon economy of whole plants. **Annals of Botany**, Oxford, v.42, p.637-648, 1978.

SÁ, E.L.S. de. **Diversidade fenotípica e genética de rizóbios isolados de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) em solos ácidos de Cunha – SP**. 2001. 109f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1352p.

SANCHEZ, P.A. **Properties and management of soils in the tropics**. New York: John Willey, 1976. 618p.

SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. **Summa Phitopathologica**, Piracicaba, v.1, n.3, p.231-234, 1975.

SCHOLLES, D.; VARGAS, L.K. Viabilidade da inoculação de soja com estirpes de Bradyrhizobium em solo inundado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.28, n.6, p.973-979, 2004.

SESHADRI, S. et al. Solubilization of inorganic phosphates by *Azospirillum halopraeferans*. **Current Science**, Bangalore, v.79, n.5, p.565-567, 2000.

SETTER, T.; BELFORD, R. Waterlogging: How it reduces plant growth and how plants can overcome its effects. **Journal of Agriculture-Western Australia**, Perth, v.31, p.51-55, 1990.

SHIFERAW, W.; SHELTON, H.M.; SO, H.B. Tolerance of some subtropical pasture legumes to waterlogging. **Tropical Grasslands**, Brisbane, v.26, p.187-195, 1992.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, J.H. **Handbook for rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology**. New York: Springer-Verlag, 1994. 450p.

SPERBERG, J.I. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. **Australian Journal of Agricultural Research**, East Melbourne, v.9, p.778-781, 1958.

STOWERS, M.D. Carbon metabolism in *Rhizobium* species. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.39, p.89-108, 1985.

STREETER, J. Inhibition of legume nodule formation and N₂ fixation by nitrate. **CRC Critical Reviews in Plant Sciences**, Oxford, v.7, p.1-23, 1988.

SUNG, F.J.M. Waterlogging effects on nodule nitrogenase and leaf nitrate reductase activities in soybean. **Field Crops Research**, London, v.35, p.183-189, 1993.

SVENNING, M.M.; JUNTILA, O.; SOLHEIM, B. Symbiotic growth of indigenous white clover (*Trifolium repens*) with local *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.83, p.381-389, 1991.

TEDESCO, M.J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2.ed. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS, 1995. 174p. (Boletim técnico, 5.)

THOMAS, R.G. The structure of the mature plant. In: BAKER, M.J.; WILLIAMS, W.M. (Eds.) **White Clover**. Wallingford: CAB International, 1987. p.1-29.

VAHL, L.C.; LOPES, S.I. Nutrição de plantas. In: PESKE, S.T.; NEDEL, J.L.; BARROS, A.C.S.A. (Eds.) **Produção de arroz irrigado**. Pelotas: UFPEL, 1998. p.149-206.

VAN ROSSUM, D. et al. Genetic and phenotypic analysis of *Bradyrhizobium* strains nodulating Peanut (*Arachis hypogae* L.) roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.1599-1609, 1995.

VARTAPETIAN, B.B.; JACKSON, M.B. Plant adaptations to anaerobic stress. **Annals of Botany**, Oxford, v.79, p.3-20, 1997.

VIGNOLIO, O.R.; FERNÁNDEZ, O.N.; MACEIRA, N.O. Flooding tolerance in five populations of *Lotus glaber* Mill. (Syn. *Lotus tenuis* Waldst. Et. Kit.). **Australian Journal of Agricultural Research**, East Melbourne, v.50, p.555-559, 1999.

VINCENT, J.M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164p.

VINTHER, F.P. Biological nitrogen fixation in grass-clover affected by animal excreta. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.203, n.2, p.207-215, 1998.

VINTHER, F.P.; JENSEN, E.S. Estimating legume N₂ fixation in grass-clover mixtures of a grazed organic cropping system using two ¹⁵N methods. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.78, p.139-147, 2000.

VISSER, E.J.W. et al. Regulatory role of auxin in adventitious root formation in two species of *Rumex*, differing in their sensitivity to waterlogging. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.93, p.116-122, 1995.

VOESENEK, L.A.C.J. et al. Submergence-induced ethylene synthesis, entrapment and growth in two plant species with contrasting flooding resistances. **Plant Physiology**, Rockville, v.103, p.783-791, 1993.

VOESENEK, L.A.C.J. et al. Interactions between plant hormones regulate submergence-induced shoot elongation in the flooding-tolerant dicot *Rumex palustris*. **Annals of Botany**, Oxford, v.91, p.205-211, 2003.

VRIEZEN, W.H.; ZHOU, Z.; VAN DER STRAETEN, D. Regulation of submergence-induced enhanced shoot elongation in *Oryza sativa* L. **Annals of Botany**, Oxford, v.91, p.263-270, 2003.

WANG, E.T. et al. *Rhizobium etli* bv. *mimosae*, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v.49, p.1479-1491, 1999.

WEBB, J.; JACKSON, M.B. Transmission and cryo-scanning electron microscopy study of the formation of aerenchyma (cortical gas-filled space) in adventitious roots of rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, London, v.37, p.832-841, 1986.

WHITEHEAD, D.C. **Grassland nitrogen**. Wallingford: CAB International, 1995. 257p.

WITTY, J.F. et al. Nitrogen fixation and oxygen in legume root nodules. **Oxford Surveys in Plant Molecular and Cell Biology**, Oxford, v.3, p.275-314, 1986.

WOLEDGE, J.; TEWSON, V.; DAVIDSON, I.A. Growth of grass/clover mixtures during winter. **Grass and Forage Science**, Oxford, v.45, p.191-202, 1990.

WOOD, M.; COOPER, J.E. Screening clover and *Lotus* rhizobia for tolerance of acidity and aluminum. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.17, p.493-497, 1985.

ZERHARI, K. et al. Phenotypic characteristics of rhizobia isolates nodulating *Acacia* species in the arid and Saharan regions of Morocco. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.30, p.351-357, 2000.

ZHANG, F.; SMITH, D.L. Interorganismal signaling in suboptimum environments: The legume-rhizobia symbiosis. **Advances in Agronomy**, Newark, v.76, p.125-161, 2002.