

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE NÓDULOS DE CAULE E RAIZ DE
Discolobium spp. E DESCRIÇÃO DA MORFOLOGIA DOS NÓDULOS DE
CAULE DE *D. leptophyllum*.

CLAUDIA MIRANDA MARTINS

SOB A ORIENTAÇÃO DO Dr. AVÍLIO ANTÔNIO FRANCO

Tese submetida como requisito parcial
para a obtenção do grau de *Magister
Scientiae* em Agronomia. Área de
Concentração em Ciência do Solo.

Seropédica, Rio de Janeiro

Março, 1999

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE NÓDULOS DE CAULE E RAIZ DE
Discolobium spp. E DESCRIÇÃO DA MORFOLOGIA DOS NÓDULOS DE CAULE
DE *D. leptophyllum*

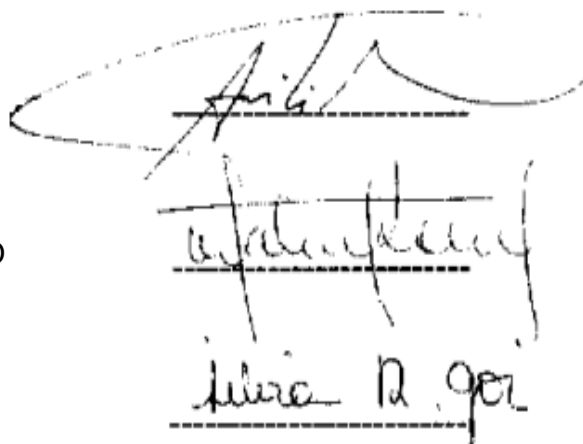
CLAUDIA MIRANDA MARTINS

Aprovado em: 23/03/1999

Dr AVÍLIO ANTÔNIO FRANCO
(EMBRAPA/AGROBIOLOGIA)

Dr^a MARIA DE FÁTIMA LOUREIRO
(UFMT)

Dr^a SÍLVIA REGINA GOI
(UFRRJ/DCA)



Dedico este trabalho à pessoa que mais torceu para que tudo desse certo, mas infelizmente não teve tempo de vê-lo concluído. A Andrey, que com certeza Deus colocou num lugar privilegiado e certeza maior, de que sua energia e amor continuam comigo, para que eu tenha forças de tocar em frente novos projetos.

AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. Sebastião Manhães Souto, pela sua total disponibilidade e apoio, pelo incentivo à livre iniciativa, pela sua grande amizade.
- Ao Dr. Avílio Antônio Franco pela orientação e apoio no decorrer do trabalho.
- À Dr^a Maria de Fátima Loureiro pela orientação e pela oportunidade de conhecer e trabalhar com espécies oriundas de um ecossistema, sem sombra de dúvida, fascinante.
- Ao Dr. Euan k. James pela imprescindível colaboração no trabalho, pelo incentivo e pela amizade.
- Ao Dr. Fábio Lopes Olivares pelo enorme apoio recebido, pelas sugestões e amizade.
- À Sílvia Regina Goi por suas sugestões e incentivo.
- À Geraldo Baeta por sua imensurável colaboração, sua disponibilidade e bom humor.
- À Beth, que proporcionou com seu carinho e sua amizade amenizar as dificuldades pessoais que ocorrem no transcorrer deste trabalho.
- À Rafael e Eni Ferreira pelo carinho, incentivo, apoio em horas difíceis.

- Aos meus pais pela importância que deram a minha formação, pelo incentivo, apoio, por estarem sempre ao meu lado nos momentos mais críticos e pelo amor recebido.
- À minha irmã Cristiane por todo seu carinho e ajuda.
- À minha avó Delosis por ser um exemplo a seguir.
- À Andrey pelo amor recebido e pelas alegrias que me proporcionou.
- À Martinha por sua ajuda e companheirismo.
- À Rojane por sua amizade e ajuda no decorrer do trabalho.
- À João Carlos por seu incentivo, compreensão, ajuda e amizade.
- À Rosa pela amizade e ajuda no decorrer do trabalho.
- À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela oportunidade de realização do curso de Mestrado em Agronomia.
- À Embrapa/Agrobiologia pelo apoio técnico financeiro.
- À CAPES pelo apoio financeiro.
- À Embrapa/CPAP pela colaboração oferecida durante a coleta de material.
- À Universidade Federal do Mato-Grosso pelo apoio recebido.
- À Fernando, Ivan, Claudinho, Naldo, Jorge Carlos, Bolão, Mazinho, Nélio, Selmo, Adilson, Altiberto, Luizinho, Teresinha pela ajuda prestada sempre que necessária.
- À Cunha, Paulo e Aurélio pela companhia e o cafezinho nas noites de trabalho.
- À Dorimar por sua colaboração e amizade.
- À Sergio e Jorge por toda ajuda na biblioteca.
- As amigas Ailena, Zezé e Fernanda por uma convivência maravilhosa.
- Aos amigos de todas as horas Fábio, Elyson e Gava pelo amor recebido.

- Ao amigo Marcelo Gomes sempre presente e disposto a ajudar.
- À Severino por seu incentivo, colaboração e grande amizade.
- À Erika por todo o carinho recebido.
- À Lúcia Helena por seu carinho, amizade e companheirismo.
- Ao amigo Luís Claudio por seu companheirismo e ajuda.
- Aos meus amigos Gustavo Duda, Jorge, Martinha, Adriana, Binho, Rita, Teresa Cristina, David, Rosângela, Rogério, por todo o incentivo e carinho recebidos.
- À Rosa Matos pelo incentivo e carinho recebido.
- Aos amigos do Laboratório de Ecologia Microbiana: Norma, Lindete, Valéria, Flávia, Zé Roberto, Jean, Gustavo, Marsílvio, por toda ajuda e amizade.
- Aos amigos Lúcia e Luizão pela amizade e companheirismo.
- Aos meus queridos amigos Nelson e Happy por todo o carinho, incentivo e amizade.
- À Grabiela Priante por toda sua ajuda e colaboração.

BIOGRAFIA DA AUTORA

Nascida a 18 de abril de 1970 na cidade do Rio de Janeiro, R.J., diplomou-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em setembro de 1993. No mesmo mês iniciou a atividade de bolsista de aperfeiçoamento científico na Embrapa/Agrobiologia sob orientação do Dr. Sebastião Manhães Souto. Em março de 1996 iniciou o curso de Mestrado em Ciência do Solo pela UFRRJ, desenvolvendo seu projeto de pesquisa na Embrapa/Agrobiologia.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	xviii
ABSTRACT.....	xx
I - INTRODUÇÃO GERAL	01
II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	07
II.1 - Caracterização do ecossistema Pantanal	07
II.2 - Nodulação em caule em leguminosas	15
II.2.1 - Mecanismo de infecção	23
II.2.2 - Classificação de rizóbios que nodulam caule	27
II.2.3 - Estrutura dos nódulos de caule	29
II.2.4 - Desenvolvimento dos nódulos em <i>Sesbania</i> , <i>Aeschynomene</i> e <i>Discolobium</i>	32
II.2.5 - Difusão de O ₂ em nódulos de caule	36
II.2.6 - Fixação biológica de nitrogênio e acumulação de nitrogênio em leguminosas noduladoras de caule	43
II.2.7 - Efeito do nitrogênio na nodulação	48
II.2.8 - Fixação biológica de nitrogênio em <i>Discolobium</i>	50

II.3 - Caracterização do gênero <i>Discolobium</i> Benth	52
II.3.1 – Características Gerais	52
II.3.2 - Importância econômica	53
III - Caracterização de estirpes de rizóbio isoladas de nódulos de caule e raiz de <i>Discolobium pulchellum</i> e <i>D. psoraleaefolium</i>	54
III.1 - Introdução	54
III.2 - Material e Métodos	56
III.3 - Resultados e Discussão.....	58
IV - Eficiência da fixação biológica de nitrogênio de isolados de nódulos de raiz e caule de <i>Discolobium</i> spp.....	66
IV.1 - Introdução	66
IV.2 - Material e Métodos	68
IV.3 - Resultados e Discussão.....	72
V - Formação de nódulos caulinares em <i>Discolobium pulchellum</i>	83
V.1 - Introdução	83
V.2 - Material e Métodos	86
V.3 - Resultados e Discussão	89
VI - Morfologia dos nódulos de caule de <i>Discolobium leptophyllum</i>	99
VI.1 - Introdução	99
VI.2 - Material e Métodos	101
VI.3 - Resultados e Discussão	104
VII – CONCLUSÕES.....	110
VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura III.1- Porcentagem de isolados de nódulos de caule e raiz de <i>Discolobium</i> spp., tolerantes aos níveis crescentes de NaCl.....	62
Figura III.2- Porcentagem de isolados de nódulos de caule e raiz de <i>Discolobium</i> spp., tolerantes aos níveis crescentes de NaCl de acordo com a velocidade de crescimento.....	62
Figura III.3- Porcentagem de isolados de nódulos de caule e raiz de <i>Discolobium</i> spp., tolerantes à temperaturas de 39°C.....	64
Figura IV.1-Massa da parte aérea seca de <i>Discolobium pulchellum</i> em resposta à inoculação com estirpes de rizóbio em condição de inundação	73
Figura IV.2- Massa de raiz seca de <i>Discolobium pulchellum</i> em resposta à inoculação com estirpes de rizóbio em condição de inundação	74
Figura IV.3- N total acumulado na parte aérea de <i>Discolobium pulchellum</i> em resposta à inoculação com estirpes de rizóbio em condição de inundação.....	75
Figura IV.4- Produção de nódulos em caule de <i>Discolobium pulchellum</i> em resposta à inoculação com estirpes de rizóbio em condição de inundação	77

Figura IV.5- Produção de nódulos em raiz de <i>Discolobium pulchellum</i> em resposta à inoculação com estirpes de rizóbio em condição de inundação	78
Figura IV.6- Atividade da nitrogenase de nódulos de caule de <i>Discolobium pulchellum</i> em resposta à inoculação com estirpes de rizóbio em condição de inundação	79
Figura IV.7- Atividade da nitrogenase de nódulos de raiz de <i>Discolobium pulchellum</i> em resposta à inoculação com estirpes de rizóbio em condição de inundação	80
Figura V.1- Parte do caule submerso de <i>D. pulchellum</i> com nódulo de caule (seta). Observa-se profuso aêrenquima revestindo o caule e nódulo (). Note as raízes adventícias (setas menores).....	90
Figura V.2- Seção longitudinal de um nódulo de caule de <i>D. pulchellum</i> em processo de mitose (seta) (barra, 20 μ m)	90
Figura V.3- Seção longitudinal de um nódulo de caule <i>D. pulchellum</i> em atividade mitótica de células já diferenciadas durante a formação do primórdio nodular (seta) (barra, 20 μ m)	90
Figura V.4- Seção longitudinal de um nódulo de caule <i>D. pulchellum</i> em processo de colonização intracelular pelas bactérias (seta) (barra, 20 μ m)	90
Figura V.5- Seção de um nódulo de caule de <i>D. pulchellum</i> , com colonização pelas bactérias (seta), observa-se feixes vasculares (). Em algumas células o núcleo é visível (seta menor) (barra, 20 μ m).....	92
Figura V.6- Seção de um nódulo de caule de <i>D. pulchellum</i> ligado ao caule, observa-se o sistema vascular do caule conectado diretamente ao nódulo (seta) e aêrenquima cobrindo o caule e adjacente ao nódulo () (barra, 100 μ m).....	92
Figura V.7 Seção de um nódulo de caule de <i>D. pulchellum</i> ligado ao caule, observa-se o sistema vascular do caule conectado diretamente ao nódulo (seta) e a natureza ramificada do sistema vascular do nódulo (seta	

grossa) (barra, 200 μm).....	92
Figura V.8 - Feixe vascular interno com células do parênquima contendo amido ao redor (seta). A maioria das células infectadas apresenta vacúolo grande (seta pequena) (barra, 10 μm).....	92
Figura V.9 - Seção longitudinal de um nódulo de caule de <i>D. pulchellum</i> , com a região infectada do nódulo com todas as células infectadas (seta) (barra, 200 μm).....	94
Figura V.10- Maior magnificação da seção anterior mostrando que não há qualquer célula intersticial não infectada (seta) (barra, 50 μm).....	94
Figura V.11- Seção longitudinal de um nódulo de caule de <i>D. pulchellum</i> , mostrando o córtex do nódulo com várias camadas de células. A primeira camada adjacente à zona infectada contém células pequenas, compactadas com poucos espaços intercelulares e com numerosos amiloplastos (seta menor). Na camada a seguir o córtex é mais frouxo, consistindo de células progressivamente maiores com alguns espaços intercelulares grandes, nesta camada os amiloplastos são pouco frequentes (seta maior) (barra, 20 μm).....	94
Figura V.12- Seção de um nódulo de caule de <i>D. pulchellum</i> mais maduro, onde observa-se o sistema vascular pronunciado, ocupando grande parte do nódulo (seta). Note o sistema vascular do córtex do nódulo (seta menor) (barra, 50 μm)	94
Figura V.13- Seção longitudinal de um nódulo de raiz de <i>D. pulchellum</i> (seta cheia), ligado a um pedaço de raiz (seta vazia) (barra, 20 μm).....	96
Figura V.14- Seção longitudinal de um nódulo de raiz de <i>D. pulchellum</i> , mostrando que não há qualquer célula intersticial não infectada (seta). Note que as células não são vacuoladas (barra, 20 μm).....	96
Figura V.15- Maior magnificação da seção anterior mostrando que o córtex interno contém células bem	

compactadas adjacentes ao tecido infectado com presença de amido (seta) (barra, 20 μ m).....	96
Figura V.16- Seção longitudinal de um nódulo de raiz de <i>D. pulchellum</i> onde pode-se observar feixes vasculares no córtex médio (seta) (barra, 20 μ m).....	96
Figura VI.1- Planta de <i>D. leptophyllum</i> , note as sementes com margens vermelhas (seta) e folhas alongadas (seta menor).....	106
Figura VI.2- Planta de <i>D. leptophyllum</i> com nódulos no caule (setas) e raízes adventícias (seta menor).....	106
Figura VI.3- Seção longitudinal de um nódulo maduro de caule de <i>D. leptophyllum</i> (seta) mostrando conexão vascular do caule com o nódulo (seta grossa) (barra, 200 μ m).....	106
Figura VI.4- Seção longitudinal de um nódulo de caule onde pode-se observar projeções alongadas do córtex no tecido infectado (setas) (barra, 50 μ m).....	108
Figura VI.5- Maior magnificação da foto anterior onde pode-se observar a presença de amido nas projeções alongadas do córtex no tecido infectado (setas) (barra, 10 μ m).....	108
Figura VI.6- Seção longitudinal de um nódulo de caule de <i>D. leptophyllum</i> , mostrando o córtex com várias camadas de células. A primeira camada adjacente à zona infectada contém células pequenas, compactadas com poucos espaços intercelulares e com numerosos amiloplastos (seta). Na camada a seguir o córtex é mais frouxo, consistindo de células progressivamente maiores (seta maior) com alguns espaços intercelulares grandes, nesta camada os amiloplastos são pouco frequentes (barra, 20 μ m).....	108
Figura VI.7- As células infectadas apresentam vacúolos grandes e centrais (seta grossa) e em algumas células o núcleo é claramente visível (seta	

pequena) (barra,10 μ m).....	108
Figura VI.8- Seção longitudinal de um nódulo de caule de <i>D. leptophyllum</i> , com a região infectada do nódulo com todas as células infectadas (seta) (barra, 50 μ m).....	109

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Leguminosas que nodulam o caule, distribuição geográfica e habitat.....	21
Tabela 2 -Teores médios de PB (%) nas principais forrageiras das sub-regiões de Miranda e Nabileque.....	53
Tabela 3 - Identificação dos isolados de rizóbio, planta hospedeira e tipo de nódulo.....	71

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 – Características morfológicas de isolados de nódulos de raiz de <i>Discolobium</i> spp., crescendo em meio de extrato de levedura com manitol à 28 ⁰ C.....	60
Quadro 2 – Características morfológicas de isolados de nódulos de caule de <i>Discolobium</i> spp., crescendo em meio de extrato de levedura com manitol à 28 ⁰ C.....	61

RESUMO

Foi realizada a caracterização morfológica de isolados de rizóbio provenientes de nódulos de caule e raiz de *Discolobium pulchellum* e *Discolobium psoraleaefolium*, leguminosas nativas de áreas alagadas do Pantanal Mato-Grossense, e a avaliação da tolerância destes isolados a níveis crescentes de NaCl e altas temperaturas.

Foram caracterizados 13 isolados de nódulos de caule e 14 isolados de nódulos de raiz. Dentre os isolados de nódulos de raiz de *Discolobium* spp., 90% apresentaram crescimento lento alcalinizando o meio, ao passo que os isolados de nódulos de caule, 46% apresentaram crescimento lento alcalinizando o meio. Os isolados de crescimento rápido mostraram-se mais tolerantes às crescentes concentrações salinas do que os de crescimento lento e também foram mais tolerantes ao estresse de temperaturas elevadas em relação aos isolados de crescimento lento.

Isolados selecionados aleatoriamente dentro de cada grupo formado a partir da caracterização morfológica, foram testados quanto à capacidade de nodulação em caule e raiz e potencial de fixação biológica de nitrogênio em *Discolobium*

pulchellum sob condições de inundação. Os resultados obtidos mostraram não haver especificidade de nodulação dos isolados testados provenientes de nódulos de caule e de raiz. Em relação ao potencial de fixação biológica de nitrogênio de *D. pulchellum*, os resultados mostraram que os isolados de crescimento lento que alcalinizam o meio YMA formaram simbiose eficiente, e que os isolados de crescimento rápido produzindo ácido no mesmo meio formaram nódulos ineficientes.

Pode-se observar a formação do nódulo em caule de *Discolobium pulchellum* 12 dias após a inoculação. Observou-se a atividade mitótica de células do parênquima cortical durante a formação do primórdio nodular com contínuo aumento do tamanho do nódulo e colonização das células da zona meristemática pela bactéria. Após 4 dias do início de formação do nódulo pode-se observar uma abundante colonização intracelular da bactéria. Nódulos funcionais de *D. pulchellum* foram observados aos 20 dias após a inoculação, onde pode-se observar que não havia células intersticiais não infectadas no tecido infectado.

Foi observada uma nova espécie dentro do gênero *Discolobium*, *Discolobium leptophyllum*, com capacidade de formar nódulos no caule em condições de inundação. Os nódulos de caule são conectados ao caule e o sistema vascular do caule penetra no nódulo. Os nódulos são do tipo aesquinomenóide desmodióide, ou seja, sem células não infectadas no tecido infectado.

ABSTRACT

Forteen root and thirteen stem nodules isolates from *Discolobium pulchellum* and *D. psoraleaefolium* were characterized in Yeast Manitol Agar (YMA) culture medium and tested for tolerance and salinity and high temperature. Ninety percent of the root nodule isolates were slow growth alkali producing and forty six percent of stem nodule isolates were slow growth alkali producing. The fast growing isolates were more tolerant to salinity and to high temperature. Representative isolates from root and stem nodules of each group were tested for cross inoculation of root and stems of *D. pulchellum* growing under flooded conditions. Both groups, root and stem isolates, nodulated root and stem. Slow growing alkali producing isolates formed efficient symbiosis with *D. pulchellum*, while fast growing acid producing, produced inefficient nodules. Stem nodules of *D. pulchellum* were formed 12 days after inoculation. Mitotic activity of the cortical parenchyma was present at nodule primordia formation with a continuous growth and meristematic cells colonization by the bacteria. After 4 days of nodule initiation it was observed a profuse intracellular colonization. Mature nodules of *D.*

pulchellum were observed 20 days after inoculation without uninfected cells infected tissue.

A new *Discolobium* species, *D. leptophyllum* was observed to nodulate root and also stems when flooded. As observed for *D. pulchellum*, the new species also presented nodules with vascular bundle directly connected to the stem vascular bundle. The nodules of *D. leptophyllum* are also aeschinomenoid desmodioid type, without uninfected cells in the infected tissue.

I-INTRODUÇÃO GERAL

O Pantanal é uma planície sedimentar com predominância de campos inundáveis, abrangendo uma área de 138.194 km², que vem sendo utilizados pela pecuária bovina extensiva há dois séculos (Pott & Comastri Filho, 1995). O rebanho bovino atual está em torno de 3,8 milhões de cabeças voltado principalmente, para cria e recria, sendo responsável pela produção de mais 30% da carne bovina dos Estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, respondendo por divisas anuais da ordem de 80 milhões de dólares (Cadavid Garcia, 1986; EMBRAPA/CPAP, 1996).

Existe estreita ligação entre o desempenho da atividade pecuária e o ambiente do Pantanal, pois as pastagens são quase totalmente nativas (99%), tendo as cultivadas surgido nas últimas duas décadas (Pott,1994). A disponibilidade de pastagem, varia de acordo com o ciclo de cheia e seca da região, havendo uma grande variabilidade de tipos de pastagens naturais, geralmente várias comunidades, dependendo do tipo de solo e inundação (Pott *et al.*, 1989; EMBRAPA/CPAP, 1996).

O gado de cria e recria permanece o ano todo, o que ocorre na maior parte do Pantanal, em áreas com até 1 metro de profundidade de alagamento. Normalmente há dois períodos críticos de alimentação, a cheia e a seca (Pott *et al.*, 1989). Paladines & Leal (1979) enfatizam que o aumento da produção animal em áreas de savana só será possível mediante a introdução de espécies de leguminosas adaptadas às condições particulares da pastagem. Esse tipo de enfoque, demonstra a necessidade da busca de espécies nativas de leguminosas que prosperam em solos ácidos e inférteis (Coradin & Valls, 1984).

Em trabalho realizado por Comastri Filho & Pott (1995), visando avaliar gramíneas e leguminosas promissoras para as condições edafoclimáticas da região, houve bastante dificuldade em encontrar espécies adaptáveis a baixos níveis de nutrientes e/ou alagamento. Os pecuaristas anseiam por alternativas para períodos críticos de oferta de forragem, principalmente na época da cheia.

Os recursos forrageiros nativos da região pantaneira tornam-se um dos fatores essenciais ao aumento da produção de carne bovina por unidade de área. A perda de peso do rebanho bovino na estação seca, pode ser recuperada através do ganho de peso compensatório conseguido na estação chuvosa que se sucede, porém isso está na dependência direta do grau de riqueza forrageira da savana (Paladines, 1974). Além disso, pela alta pluviosidade da região e processo de cheia e vazante, os solos são constantemente lavados em seus nutrientes, especialmente o nitrogênio.

A fixação biológica de nitrogênio atmosférico pela simbiose entre rizóbio e leguminosas representa uma importante alternativa ecológica para repor este

nutriente e para o aumento da produtividade agrícola na região. As espécies forrageiras auto-suficientes em nitrogênio apresentam vantagem competitiva em solos pobres e lavados que ocorrem no Pantanal. No entanto, a pressão exercida pela ação antrópica e exploração agropecuária, tem levado ao risco de desaparecimento destas espécies que pela alta qualidade nutricional são preferencialmente pastejadas pelo gado e animais silvestres (Loureiro, 1994).

A fixação biológica de nitrogênio em raízes de leguminosas em resposta à infecção com *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Sinorhizobium* já é bem conhecida, entretanto em anos recentes tem-se dado atenção a um limitado número de leguminosas que fixam nitrogênio em nódulos de caule (Boivin *et al.*, 1997). As espécies que nodulam no caule são hidrófitas tropicais ou subtropicais, de pântanos, rios ou margens de lagos (Dreyfus & Dommergues, 1981; Eaglesham & Szalay, 1983; Ladha *et al.*, 1992a; Loureiro *et al.*, 1994, 1995; Boivin *et al.*, 1997) com várias espécies ocorrendo no Pantanal Mato-Grossense. O habitat natural dessas leguminosas leva à hipótese de que a nodulação no caule pode ser uma adaptação evolucionária às condições de alagamento (Stegink & Vaughn, 1988; James *et al.*, 1992a, 1992b; Pugh *et al.*, 1995), como as observadas no Pantanal.

Inicialmente foram descritos dois gêneros de leguminosas capazes de formar nódulos no caule: *Aeschynomene* e *Sesbania*. Também foram observados nódulos no caule de *Neptunia oleracea*, mas posteriormente foi confirmado que esses nódulos, na verdade, se formam em raízes adventícias que surgem em condições de alagamento (Alazard, 1985; Dreyfus & Dommergues, 1981; Giller &

Wilson, 1991; Boivin *et al.*, 1997). Loureiro *et al.*, (1994), observaram um novo gênero com capacidade de produzir nódulos no caule, *Discolobium*. Em duas espécies (*D. pulchellum* e *D. psoraleaefolium*) foram encontrados nódulos de raiz e caule em áreas alagadas do Pantanal Mato-Grossense. Leguminosas do gênero *Aeschynomene* e *Discolobium* apresentam ampla distribuição no Pantanal Mato-Grossense e são preferencialmente comidas por animais (e.g. gado, capivara, cervo, pacu e outras espécies de peixes) devido ao seu alto teor de proteína (Pott *et al.*, 1986; Allem & Valls, 1987; Pott, 1988; EMBRAPA/CPAP, 1996).

Nódulos de caule podem ser formados na parte aérea do caule, acima do nível de água, como em *A. afraspera*, *A. indica*, *A. scabra* e *S. rostrata* (Dreyfus & Dommergues, 1981; Eaglesham & Szalay, 1983; Alazard, 1985; Ladha *et al.*, 1992a; Boivin *et al.*, 1997), ou no caule alagado, como em *A. elaphroxylon*, *A. fluminensis* e *Discolobium pulchellum* (Alazard, 1985; Loureiro *et al.*, 1994). Em *Discolobium* spp. as observações indicaram que a nodulação somente ocorreu após a formação do tecido parenquimatoso, sendo portanto diretamente influenciada pelo alagamento (Loureiro *et al.*, 1994). Os nódulos do caule recebem oxigênio via aerênquima formado na parte inferior do caule, permitindo a difusão dos gases (Loureiro, 1994).

Diversos fatos estão envolvidos na nodulação do caule, como o aumento no número de sítios de infecção, presença de células fotossintetizantes ao redor dos nódulos e a natureza fotossintetizante do rizóbio (Ladha *et al.*, 1990). As espécies que nodulam o caule possuem um elevado potencial de fixação de nitrogênio (Dreyfus *et al.*, 1987). Esta alta performance pode ser atribuída à presença de

tecido fotossintético próximo e também nos nódulos, que torna possível a fosforilação cíclica, assim como a síntese de carboidratos, possibilitando fornecimento de energia para a fixação de N_2 (Evans *et al.*, 1990; Ladha *et al.*, 1990; Hungria *et al.*, 1992; Boivin *et al.*, 1997).

Embora a pecuária tradicional do Pantanal venha sendo praticada de forma a não causar grandes mudanças no sistema, as demandas da sociedade por maior produtividade e menor degradação ambiental requerem que a pesquisa encontre alternativas economicamente viáveis e compatíveis com a conservação do ecossistema. Para que isso seja possível, a busca de conhecimentos e tecnologias para o manejo racional da pastagem nativa torna-se necessária, na medida em que a bovinocultura de corte é de grande importância para a região.

O enriquecimento do solo com nitrogênio através das leguminosas associadas a estirpes de *Rhizobium* comprovadamente eficientes, com benefício direto às gramíneas, poderá ser mais apropriado ao Pantanal do que a simples aplicação de adubos nitrogenados, já que o regime hídrico da região compromete a eficácia do emprego de fertilizantes minerais devido à facilidade de sua diluição, carreamento e lixiviação. A introdução no Pantanal de material forrageiro exótico, devido às peculiaridades ecológicas da área, onde a exploração pecuária está associada à manutenção das espécies nativas, torna-se uma alternativa difícil. Além disso, a composição forrageira do Pantanal é mais rica do que a maioria das savanas americanas. A área do Pantanal Mato-Grossense terá de ser original em termos de pesquisa, focalizando-se a conservação da pastagem natural como premissa fundamental nas investigações a serem desenvolvidas.

Devido a esses fatores e ao grande potencial que o gênero *Discolobium* spp. representa para a região durante o período alagado, busca-se através de novos estudos obter maiores informações da interação entre esta leguminosa e as bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de nódulos de raiz e caule.

II- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1- Caracterização do ecossistema

II 1.1- *Localização*

O Pantanal é a maior planície inundável do planeta, com área de 138.194 km², situada entre os paralelos 16° e 22° de latitude sul e meridianos 55° e 58° de longitude oeste. Abrange os Estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul e parte da Bolívia.

II 1.2- *Fisiografia*

A alternância de períodos de seca e de cheia anual, também chamada de pulso de inundação, é um dos fatores que regem a biodiversidade do Pantanal, pois ora favorece as espécies animais e vegetais relacionadas à fase seca, ora favorece as espécies relacionadas à fase cheia. Além disso, uma fase favorece a outra. As espécies vegetais da fase seca, mortas pela inundação, fornecem através de sua decomposição, nutrientes que contribuem para o desenvolvimento das espécies vegetais da fase de cheia e vice-versa. Por se tratar de uma zona de

transição entre sistemas terrestres e aquáticos, o Pantanal pode ser classificado como um grande ecótono, que é uma região de alta produtividade e alta diversidade ecológica (EMBRAPA/CPAP, 1996).

O Pantanal é um conjunto de grandes planícies deprimidas, situadas na bacia do Paraguai. A depressão vem sendo preenchida com depósitos aluviais, aportados pelos diversos rios que formam a bacia.

As particularidades fluviométricas dos diversos rios, bem como as características diversas dos solos e da vegetação, proporcionam a subdivisão do Pantanal em diferentes regiões como o descrito abaixo, segundo Adámoli, (1987):

1. Pantanal de Cáceres: é constituído pelo leque aluvial dos rios Paraguai, Jauru e Corixo Grande.
2. Pantanal de Poconé: o rio principal é o Cuiabá, nesta região os solos são argilosos com alto grau de fertilidade natural.
3. Pantanal de Barão de Melgaço e Paiguás: predomínio da fração arenosa na textura dos solos.
4. Pantanal de Nhecolândia: recebe influência da parte sul do rio Taquari, evidencia-se depressões subcirculares bem características, são as baías que podem ser de água doce, salgada ou salina. Está localizado nas proximidades de Corumbá e do eixo rodo-ferroviário de Campo Grande-Corumbá, o que explica ser uma região de maior intensidade de criação de gado.
5. Pantanal de Aquidauana e Miranda: os principais rios são Rio Aquidauana e Rio Miranda. A característica destes solos é a textura arenosa e argilosa.

6. Pantanal do Abobral: formado pelas planícies de inundação dos Rios Negro e Aquidauana. Apresentam solos na maioria argilosos, porém algumas zonas são arenosas.
7. Pantanal de Nabileque: é influenciado pelo regime de enchentes do Rio Paraguai. Os solos são argilosos, a salinidade é elevada, é uma região de transição entre o Pantanal e a Depressão Chaquenha.

Estas sub-regiões, possuem características similares, dentre elas:

- a- O sistema hidrográfico é muito instável devido à declividade quase nula e ao regime hidrológico dos rios;
- b- Os rios apresentam instabilidade no traçado dos seus leitos, ocorrendo mudanças de cursos dos mesmos.

II 1.3- Relevo

O relevo do Pantanal é praticamente plano, com declividade quase nula, de apenas 0,7 a 5 cm/km no sentido norte-sul e entre 7 a 50 cm/km no sentido leste-oeste, a altitude varia entre 80 e 150 metros. A menor declividade no sentido norte-sul provoca, a princípio, um barramento no escoamento do rio Paraguai e o consequente alagamento da área (EMBRAPA/CPAP, 1996).

II 1.4- Solos

Os solos do Pantanal são de maneira geral mais argilosos no norte, apresentando as seguintes variações: Plintossolo, Planossolo, Solonetz Solodizado, Vertissolo, Glei Pouco Húmico e Solos Aluviais. A área central, que

corresponde, na sua maior parte, ao leque aluvial do rio Taquari, é formada por sedimentos arenosos, trazidos por esse rio de sua alta bacia. Ali ocorrem Podzol Hidromórfico, Planossolo, Areias Quartzosas, Plintossolo e Glei Pouco Húmico. A parte sul do Pantanal também é formada por sedimentos de natureza argilosa, depositados principalmente pelos rios Aquidauana, Negro e Paraguai, dando origem a Planossolo, Solonetz Solodizado, Glei Pouco Húmico e Plintossolo. Quanto à fertilidade, os solos formados no Pantanal são relativamente pobres quando comparados aos solos de outras regiões do país (EMBRAPA/CPAP, 1996; Pott, 1988).

II 1.5- *Clima*

O clima do Pantanal é quente e úmido no verão e frio e seco no inverno, com temperatura média anual de 25° C. Anualmente a precipitação no Pantanal gira em torno de 1.100 e 1.200 mm, e 45% das chuvas concentram-se nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro. Na bacia do Alto Paraguai, onde o Pantanal encontra-se inserido, os valores médios de umidade relativa do ar oscilam entre 65 e 85%. No sudoeste do Pantanal, em Corumbá, os valores de umidade estão acima de 76% nos meses de dezembro a junho, sendo outubro o mês mais seco, com 71,8%. No norte do Pantanal, em Cáceres, os valores de umidade são superiores a 80% nos meses de novembro a junho, sendo setembro o mais seco, com 71% (EMBRAPA/CPAP, 1996).

II 1.6- Geomorfologia e hidrologia

O Pantanal é uma planície sedimentar aluvial quaternária, parcial e periodicamente alagável em função da sua baixíssima declividade. Distinguem-se dois tipos de inundação, a pluvial e a fluvial, os leitos rasos e indefinidos dos rios descarregam água como vertedouro e através de defluentes, distribuindo-a nos campos; a pluvial chamada de enchente de chuva, ocorre em áreas não diretamente afetadas pelos rios, resultante da elevação do lençol freático, causada pela falta de gradiente hidráulico e pelas chuvas concentradas.

A rede flúvio-lacustre, ramificada e anastomosada, por sua dinâmica de cheias (estacional e plurianual), influi decisivamente sobre as melhores pastagens nativas do Pantanal, de forma direta e negativa sobre a utilização destas, mas de forma indireta e positiva sobre a fertilidade do solo e a qualidade das forrageiras.

As cheias e alagamentos são responsáveis pela formação das baías, vazantes, corixos, cordilheiras. As baías são formas negativas de relevo, constituindo de uma área côncava preenchida com água; algumas apresentam altos teores de sais, formando as salinas (Mazza *et al.*, 1994). As vazantes são pequenos lagos e corixos que se formam em decorrência do escoamento da água na planície e vão se tornando confinados até seu desaparecimento devido à intensidade da seca. São portanto, áreas temporariamente alagadas (Pinto Silva, 1991).

As cordilheiras são cordões arenosos, localizados nas partes mais altas; geralmente são revestidos por vegetação arbórea (de cerrado ou cerradão), são constituídos pelos diques antigos (Mazza *et al.*, 1994). Os corixos são pequenos

cursos de água que interligam as baías aos rios (Pinto Silva, 1991). As combinações das diferentes categorias geomórficas básicas determinam variados arranjos que, por sua vez, ordenam mosaicos das formações de vegetação (Pott, 1988).

II 1.7- Vegetação

No Pantanal encontram-se fisionomias do tipo cerrado, florestas de encostas, vegetação arbustiva semidecídua, matas ciliares, campos, comunidades florestais isoladas e comunidades aquáticas. Convergem para o Pantanal quatro das mais importantes províncias fitogeográficas do continente: a Floresta Amazônica, o Cerrado, o Chaco e a Floresta Atlântica. A vegetação de cerrado é predominante nas partes mais elevadas, enquanto os campos limpos, nas áreas inundáveis, sendo o estrato herbáceo composto por gramíneas. Há diversas comunidades vegetais, com o domínio nítido de uma espécie. Neste caso, a comunidade recebe o nome da espécie dominante. As mais conhecidas comunidades vegetais são: canjiqueiral, com dominância da canjiqueira (*Byrsonima intermedia*), carandazal, com dominância de carandá (*Copernicia alba*), paratudal, com dominância de paratudo (*Tabebuia caraiba*), gravatal, com dominância de gravatá (*Bromelia balansae*), caronal, com dominância de capim-carona (*Elyonurus muticus*) e pirizal, com dominância de piri (*Cyperus giganteus* e *Scirpus validus*)

O fato de o alagamento ser temporário, determina que as características funcionais da maior parte do Pantanal não correspondem às de um verdadeiro

pântano. A vegetação ali dominante, em realidade, não é aquela característica de ambientes palustres, estes possuidores de ampla cobertura formada por detritos vegetais e com acumulação de matéria orgânica. Vegetação palustre, à semelhança daquela encontrada em massas de água estagnada, ocorre pouco no Pantanal (Allem & Valls, 1987).

As ocorrências de diversas espécies forrageiras fazem do Pantanal Mato-Grossense uma das regiões mais expressivas em criação de bovinos de corte no Brasil. Os recursos florísticos vêm sendo usados pela pecuária há dois séculos, devendo-se dar mais atenção às pastagens naturais, de forma a diversificar seu uso múltiplo (Pott & Pott, 1994). Para as pastagens naturais do Pantanal são listadas 145 espécies de gramíneas, 70 leguminosas e 60 forrageiras não convencionais, além de 21 invasoras. As pastagens cultivadas são mais recentes, sendo *Brachiaria decumbens* a principal espécie utilizada.

Entre as leguminosas do Pantanal com potencial de uso como forrageira tanto na fase alagada como na fase seca, encontram-se várias espécies do gênero *Aeschynomene*, sendo estas: *A. americana*, *A. hystrix* (Allem & Valls, 1987; Pott, 1988); *A. paniculata* (Pott, 1988); *A. rudis*, (Pott *et al.*, 1986; Pott, 1988); *A. sensitiva* (Pott *et al.*, 1986; Allem & Valls, 1987; Pott, 1988; EMBRAPA/CPAP, 1996) e *A. fluminensis* (EMBRAPA/CPAP, 1996; Loureiro *et al.*, 1996). Ocorrem em solo arenoso, siltoso e argiloso em regime hidrológico seco, pouco alagado, muito alagado e aquático (Pott, 1988).

Além destas, são encontradas espécies do gênero *Discolobium*: *D. aureum* (Pott, 1988), *D. pulchellum* (Allem & Valls, 1987; Pott, 1988; Loureiro, 1994;

Loureiro *et al.*, 1996) e *D. psoraleaefolium* (Loureiro, 1994; EMBRAPA/CPAP, 1996), com qualidade forrageira e hábitos semelhantes às espécies de *Aeschynomene*. Ocorrem em solo arenoso, siltoso e argiloso e em regime hidrológico muito alagado e aquático. Encontra-se também no Pantanal o gênero *Sesbania* com as espécies *S. virgata* e *S. exasperata*, com função similar (Franco *et al.*, 1990).

II. 2- Nodulação em caule em leguminosas

A simbiose entre plantas leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio são geralmente exclusividade das raízes. Poucas leguminosas, contudo, formam nódulos não somente nas raízes, mas também no caule (Evans *et al.*, 1990). O primeiro exemplo do fenômeno foi relatado em 1928 em *Aeschynomene aspera* L. por Hagerup, que observou nódulos de cor verde e a presença de grandes quantidades de grãos de amido e sugeriu a ocorrência de uma grande atividade fotossintética (Eaglesham *et al.*, 1990).

Apesar de nódulos no caule terem sido noticiados mais cedo, em 1884, Hagerup parece ter sido o primeiro a observar a presença de bactérias dentro do nódulo e sugerir sua contribuição na assimilação de nitrogênio, já que o alagamento das raízes pode impedir a assimilação de nitrogênio pelos nódulos radiculares (Alazard, 1985).

Em 1936 Von Suessenguth & Beyerle relataram a ocorrência de nódulos de caule em *A. paniculata*. Mais tarde foi observada a nodulação no caule de outras espécies de *Aeschynomene*, *A. indica* (Arora, 1954), *A. elaphroxylon* (Jenik & Kubikova, 1969) *A. evenia* e *A. villosa* (Barrios & Gonzales, 1971), *A. denticulata*,

A. pratensis, *A. rudis*, *A. scabra*, *A. sensitiva* (Eaglesham & Szalay, 1983). Em 1981, o interesse pela nodulação do caule foi despertado pelo relato da descoberta por Dreyfus & Dommergues de abundante nodulação em *Sesbania rostrata*, leguminosa anual que cresce em áreas alagadas no oeste da África, com grande potencial para ser utilizada como fonte de nitrogênio para a cultura de arroz. O interesse por espécies que nodulam o caule levou a identificação de ainda outra espécie, *Aeschynomene afraspera*, com potencial comparável a *Sesbania rostrata* (Ladha et al., 1990). Loureiro et al., (1994) relataram um novo gênero com capacidade de formar nódulos no caule, *Discolobium*, em duas espécies (*D. pulchellum* e *D. psoraleaefolium*) foram encontrados nódulos de raiz e caule em áreas alagadas do Pantanal Mato-Grossense. Vinte e duas espécies do gênero *Aeschynomene* (Alazard, 1985; Becker et al., 1988), cinco espécies do gênero *Sesbania* (Dreyfus & Dommergues, 1981; Dreyfus et al., 1988; Ladha et al., 1990) e duas espécies do gênero *Discolobium* (Loureiro et al., 1994) foram descritas como espécies que nodulam o caule (Tabela 1).

Diversos fatos envolvem a nodulação no caule: presença de sítios de nodulação predeterminados no caule, presença de células fotossintetizantes ao redor dos nódulos, maior tolerância ao nitrogênio combinado e em algumas espécies, a natureza fotossintetizante do rizóbio (Ladha et al., 1990). Os nódulos caulinares estão localizados próximos ao aparelho fotossintético da planta, estando idealmente posicionados para receber um constante fornecimento de substratos energéticos e fornecer o nitrogênio fixado (Ladha et al., 1992a; Parsons et al., 1992). Esta característica pode ser mais relevante nas espécies de

Aeschynomene que apresentam rizóbio fotossintetizante, aos quais tem se atribuído incremento na atividade da nitrogenase pela luz (Eaglesham *et al.*, 1990; Evans *et al.*, 1990; Lorquin *et al.*, 1993; Loureiro *et al.*, 1993; Ladha & So, 1994).

Juntamente com a formação do nódulo, algumas espécies desenvolvem um grande número de células parenquimatosas, com um tecido esponjoso que facilita a captação de oxigênio suficiente para as várias funções metabólicas em ecossistemas alagados (Ladha *et al.*, 1992a).

Ao contrário de outras hidrófitas nodulantes, os nódulos de caule de *Discolobium* têm uma necessidade obrigatória de estarem submersos e senescem muito rapidamente quando expostos ao ar (Loureiro, 1994). Eaglesham & Szalay (1983) mostraram que o alagamento não é um pré-requisito para a formação de nódulos no caule em algumas espécies de *Aeschynomene* e *Sesbania rostrata*, no entanto, resultados obtidos por Parsons *et al.*, (1993) com *S. rostrata* demonstraram que a baixa umidade tem efeito adverso no crescimento e na atividade da nitrogenase em nódulos de caule. Efeito similar foi observado para as espécies *A. americana* e *A. indica*, que em baixas condições de umidade apresentaram significativa redução na atividade da nitrogenase (Albrechet *et al.*, 1981; Sasakawa *et al.*, 1986).

Discolobium pulchellum e *Discolobium psoraleaefolium* formam verdadeiros nódulos de caule, pois os nódulos estão conectados com o sistema vascular do caule e não com o sistema de raízes adventícias originadas no caule. Os nódulos são esféricos, com ramificações no sistema vascular e apresentam cordão de infecção similar ao de *Aeschynomene fluminensis* (Loureiro *et al.*, 1995). Os

nódulos de caule e raiz de *Discolobium pulchellum* apresentam tecido infectado do tipo aesquinomenóide desmodióide (Corby, 1988), isto é, sem células não infectadas. As células infectadas nos nódulos de caule são vacuoladas, com cordões de infecção visíveis (Loureiro, 1994).

Estirpes de rizóbio isoladas de nódulos de caule dos gêneros *Aeschynomene*, *Sesbania* e *Discolobium*, mostraram ser totalmente diversas e pertencem a quatro gêneros: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* e *Azorhizobium* (Dreyfus *et al.*, 1988; de Lajudie *et al.*, 1994; Loureiro, 1994; Wong *et al.*, 1994).

Eaglesham & Szalay relataram em 1981 o isolamento de uma bactéria de nódulos de caule formados espontaneamente em *Aeschynomene indica*, BTAi1, que apresentava capacidade de desenvolver sistema fotossintético, fixar nitrogênio *ex planta* e crescer sem outra fonte de N combinado (Alazard, 1990; Hungria *et al.*, 1992). Desde então, isolados de nódulos de caule de *A. afraspera*, *A. denticulata*, *A. evenia*, *A. nilotica*, *A. pratensis* e *A. sensitiva* foram encontrados produzindo bacterioclorofila *a* (Ladha *et al.*, 1990; Ladha & So, 1994).

O isolado BTAi1 pode ser distinguido de outros membros da família *Rhodospirillaceae* por diversos critérios. O crescimento de BTAi1 foi inibido em concentrações de malato de 0,5% ou maiores, enquanto que membros de *Rhodospirillaceae* crescem sob essas condições. Em contraste com *Rhodopseudomonas rubrum*, BTAi1 não cresce em meio soja-triptona. A fotossíntese pela bactéria BTAi1 ocorre exclusivamente sob condições aeróbicas e com ciclo alternado claro-escuro (Evans *et al.*, 1990). A habilidade dos bacteróides

para utilizar a luz numa região de comprimento de onda que não pode ser absorvido pela planta pode ser de importância ecológica considerável para a eficiência da simbiose, e até certo ponto, a fixação de nitrogênio ficaria menos dependente da energia fornecida pela planta hospedeira (Eaglesham *et al.*, 1990; Ladha *et al.*, 1990).

Eaglesham *et al.*, (1990) propuseram que a estirpe BTAi1, por apresentar propriedades fotossintéticas, comporia uma nova espécie, *Photorhizobium thompsonianum*. Entretanto, estudos de Young *et al.* (1991), avaliando sequências da subunidade rRNA 16S, relataram ser a BTAi1 um constituinte de gênero *Bradyrhizobium* devendo portanto, ser denominado *Bradyrhizobium* sp. (*Aeschynomene*) estirpe BTAi1.

Em 1982 foi feito o primeiro relato do isolado de nódulos de caule de *Sesbania rostrata*, *Azorhizobium caulinodans* estirpe ORS 571, que não somente tinha a capacidade de fixar nitrogênio *ex planta*, mas também a habilidade de crescer em condições de vida livre tendo N₂ como única fonte de nitrogênio (Boivin *et al.*, 1997; Fleischman & Kramer, 1998). Dreyfus *et al.*, (1988) realizaram análises de proteína, DNA-DNA e hibridização DNA-rRNA de isolados que nodulam raiz e isolados que nodulam o caule de *S. rostrata*, foram observadas diversas diferenças das estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. O estudo concluiu que os isolados que nodulam raiz pertencem ao gênero *Rhizobium* e os isolados de nódulos de caule parecem pertencer ao ramo rRNA de *Rhodopseudomonas palustris*, mas são distintas de *R. palustris* e estão relativamente perto da bactéria *Xanthobacter autotrophicus*. Estes aspectos juntos

possibilitam o crescimento usando N_2 sob condições de vida livre, justificando a proposta de um novo gênero *Azorhizobium*, com uma espécie *Azorhizobium caulinodans* para o isolado de nódulos de caule ORS 571 de *S. rostrata* (Mergaert *et al.*, 1995). *A. caulinodans* tem uma faixa limitada e específica de hospedeiros, restrita principalmente a nodulação de espécies de *Sesbania*.

A coleção de isolados de raiz de *S. rostrata* e várias outras espécies de *Sesbania* oriundas do Senegal, foram caracterizadas taxonomicamente por De Lajudie *et al.*, (1994). Dois grupos distintos, genética e fenotipicamente foram encontrados no ramo de *R. meliloti*-*R. fredii* rRna, e reclassificados dentro do gênero *Sinorhizobium*, em duas novas espécies, *S. teranga* e *S. saheli*.

Loureiro, (1994), realizou análise morfológica, fisiológica e molecular que permitiu demonstrar a diferença entre as estirpes de rizóbio e as estirpes isoladas de nódulos de caule e raiz de *A. fluminensis* e *D. pulchellum*.

Tabela 1- Leguminosas que nodulam o caule, distribuição geográfica e habitat

Espécie	Distribuição	Habitat
<i>Aeschynomene aspera</i>	África, sul da Ásia	Aquático, Pântanos
<i>Aeschynomene afraspera</i>	África	Pântanos
<i>Aeschynomene ciliata</i>	África, A. do Sul	Pântanos
<i>Aeschynomene crassicaulis</i>	África	Aquático
<i>Aeschynomene cristata</i>	África, Madagascar	Pântanos
<i>Aeschynomene denticulata</i>	América do Sul	Pântanos
<i>Aeschynomene elaphroxylon</i>	África	Aquático, Pântanos
<i>Aeschynomene evenia</i>	América do Sul	Pântanos
<i>Aeschynomene fluminensis</i>	América do Sul	Pântanos
<i>Aeschynomene indica</i>	Pantropical	Pântanos
<i>Aeschynomene nilotica</i>	África	Aquático, Pântanos
<i>Aeschynomene paniculata</i>	América do Sul	Savana
<i>Aeschynomene pfundii</i>	África	Aquático, Pântanos
<i>Aeschynomene pratensis</i>	América do Sul	Pântanos
<i>Aeschynomene rudis</i>	América do Sul	Pântanos, Savana
<i>Aeschynomene scabra</i>	América do Sul	Pântanos
<i>Aeschynomene schimperi</i>	África	Aquático, Pântanos
<i>Aeschynomene sensitiva</i>	Pantropical	Pântanos
<i>Aeschynomene tamacoundensis</i>	Oeste da África	Pântanos
<i>Aeschynomene uniflora</i>	África	Aquático, Pântanos
<i>Aeschynomene villosa</i>	América do Sul	Pântanos, Floresta
<i>Aeschynomene virginica</i>	África	Aquático
<i>Sesbania pubescens</i>	América do Norte	Aquático
<i>Sesbania punctata</i>	Madagascar	Pântanos
<i>Sesbania rostrata</i>	Oeste da África	Aquático, Pântanos
<i>Sesbania speciosa</i>	Ásia, África	Pântanos
<i>Sesbania javanica</i>	Sudoeste da África	Pântanos
<i>Discolobium pulchellum</i>	América do Sul	Aquático
<i>Discolobium psoraleaefolium</i>	América do Sul	Aquático

Fonte: Boivin et al. (1997)

Adebayo *et al.*, (1989) relataram a presença de grande população de *A. caulinodans* sobre folhas, flores e sementes de *S. rostrata*, o que sugere a natureza cíclica e explica a nodulação espontânea no campo. Observações similares foram feitas por Ladha *et al.* (1988, 1990), onde *S. rostrata* não inoculada, exibia nodulação espontânea com *Azorhizobium* que foi carregado através da membrana da semente. Foram também encontrados rizóbios homólogos em folhas de *A. afraspera*, *A. pratensis* e *A. sensitiva*. Sendo assim, a inoculação de caule pode ter duas origens: o solo e a filosfera. Em ambos os casos, a chuva parece exercer o maior papel na inoculação do caule. A água da chuva pode lavar os rizóbios que estão localizados epifiticamente para o caule e consequentemente infectar os sítios de nodulação. Além disso, a desagregação do solo pelo impacto das gotas de chuva possibilita o rizóbio alcançar as partes inferiores do caule. Estas suposições, têm suporte devido à alta correlação encontrada entre número de nódulos no caule de *S. rostrata* e *A. afraspera* e o padrão de precipitação (Becker *et al.*, 1990). O vento pode ser outro fator importante na disseminação da bactéria, transportando partículas de solo contaminado para as partes aéreas, e favorecendo a inoculação do caule (Dreyfus & Dommergues, 1981).

Robertson & Alexander, (1994) conduziram um estudo para a determinação da forma de disseminação de *A. caulinodans*. Os resultados obtidos confirmaram os estudos anteriores, demonstrando ser o vento e a chuva importantes meios para a disseminação da bactéria. Robertson *et al.* (1995) compararam a ocorrência e distribuição de *Azorhizobium* e *Sinorhizobium* no Senegal.

Azorhizobium foi encontrado em maiores densidades do que *Sinorhizobium* tanto em caule como em folhas de *S. rostrata*, ao passo que *Sinorhizobium* foi mais abundante na rizosfera da planta hospedeira, indicando que *Azorhizobium* é mais adaptado ao ambiente epifítico do que *Sinorhizobium*, sendo esta uma bactéria mais típica do solo. A adaptação às condições epifíticas pode ser explicada pela ocorrência natural de 90% de *Azorhizobium* em nódulos de caule em *S. rostrata*, ao passo que em nódulos de raiz a ocorrência foi somente de 39 a 48%. Bactérias fotossintéticas do gênero *Bradyrhizobium* foram encontradas em grande número nas folhas de espécies de *Aeschynomene*. (Boivin *et al.*, 1997). A alta densidade de bactérias que nodulam o caule em folhas e flores de plantas hospedeiras, indica que a filosfera pode ser um nicho alternativo adaptativo para estes organismos, ao invés de uma ocorrência accidental. A filosfera, portanto, exerce um importante papel assegurando a nodulação no caule (Ladha *et al.*, 1992a).

II.2.1- Mecanismo de infecção

A característica comum às leguminosas noduladoras de caule, é a presença de sítios de nodulação predeterminados em seus caules, que são na verdade primórdios dormentes de raízes adventícias, onde os nódulos caulinares se desenvolvem (Arora, 1954; Duhoux & Dreyfus, 1982; Tsien *et al.*, 1983). A formação desses sítios é independente da infecção com rizóbio (Dreyfus *et al.*, 1984). Estudos anatômicos demonstraram que os primórdios dormentes exibem uma estrutura típica de raiz, fato confirmado pela habilidade desses primórdios

desenvolverem-se em raízes adventícias em condições de alagamento (Duhoux *et al.*, 1982; Eaglesham & Szalay, 1983). Dependendo da planta hospedeira este primórdio pode estar distribuído ao longo do caule ou restrito somente às partes baixas do caule. Estes podem permanecer ocultos sob o córtex do caule, frequentemente formando uma cúpula epidérmica, ou atravessando ligeiramente essa estrutura apresentando um ápice dormente saliente que forma uma cavidade circular na epiderme do caule. Apenas os primórdios salientes ou aqueles que ligeiramente atravessam a epiderme são acessíveis à infecção por rizóbio, de maneira que a bactéria penetra no primórdio de raiz por invasão intercelular (Boivin *et al.*, 1997). Esses primórdios, que assumem uma organização típica no caule, podem estar distribuídos em linha reta, formando fileiras verticais (*Sesbania*) ou formando fileiras espirais ao redor do caule (*Aeschynomene*) (Dreyfus *et al.*, 1985).

Raízes adventícias podem também ser formadas nos primórdios de raiz de outras leguminosas. Nódulos formados nestas raízes adventícias são encontradas em torno das partes baixas do caule de alguns cultivares de *Arachis hypogea* e *Vicia faba*, e em *Cassia tora* L. e em três espécies de *Parkinsonia aculeata* L. (Ladha *et al.*, 1992a; Boivin *et al.*, 1997).

Em *Sesbania rostrata*, o primórdio da raiz sempre atravessa a epiderme do caule, formando uma fissura que facilita a penetração da bactéria. O gênero *Aeschynomene* inclui espécies com sítios de nodulação que variam do tipo de *Sesbania* com primórdios de raízes salientes (e.g. *Aeschynomene afraspera*), que nodulam facilmente, ao tipo de primórdio menos visível (e.g. *A. crassicaulis* e *A.*

elaphoroxylon) que é definitivamente menos suscetível à infecção por rizóbio (Alazard, 1985).

A aparência dos sítios de nodulação e a expressão da nodulação possibilitaram o agrupamento em três categorias: o grupo 1 reúne leguminosas aquáticas com primórdio visível e abundante nodulação por todo o caule, entre as espécies estão: *S. rostrata* e *S. punctata*, onde sítios de nodulação estão distribuídos em três ou quatro fileiras verticais ao longo do caule (Dreyfus & Dommergues, 1981; Duhoux & Dreyfus, 1982; Dreyfus *et al*, 1988) e *A. afraspera* e *A. nilotica* com os primórdios cobrindo todo o caule. Neste grupo o primórdio de raiz sempre ressalta através do córtex, possibilitando a fácil infecção pela bactéria.

O grupo 2 apresenta leguminosas com primórdio visível, com menos primórdios desenvolvidos do que os do grupo 1, escassa nodulação na parte aérea, mas boa nodulação na parte submersa do caule. O primórdio de raiz, que com frequência está localizado próximo às lenticelas, quase penetra a epiderme. Entre as espécies típicas deste grupo estão: *A. aspera*, *A. ciliata*, *A. cristata*, *A. denticulata*, *A. evenia*, *A. fluminensis*, *A. indica*, *A. paniculata*, *A. pratensis*, *A. rudis*, *A. scabra*, *A. sensitiva*, *A. schimperi*, *A. tambacoundensis*, *A. uniflora*, *A. villosa*, *A. virginica*, *S. speciosa*, *S. pubescens*. Os primórdios de raiz ainda são acessíveis à infecção por rizóbio, e estas espécies nodulam geralmente na parte do caule submersa, mas também na parte aérea do caule, embora em menor quantidade do que *S. rostrata* e *A. afraspera*.

O grupo 3 é constituído de leguminosas com o primórdio invisível e nodulação ocorrendo somente nas porções submersas do caule, neste grupo não

há quebra de dormência do primórdio de raiz sem o alagamento. Nódulos nunca são encontrados na parte aérea do caule. Espécies típicas deste grupo são: *A. crassicaulis*, *A. elaphroxylon*, *A. pfundii*, *S. javanica*, onde a nodulação do caule é estritamente restrita as parte baixas e submersas do caule. *Discolobium pulchellum* pertence a esse grupo (Loureiro *et al.*, 1994).

O primórdio é constituído basicamente por um meristema na região distal, em feixe vascular no centro rodeado por células corticais altamente vacuoladas e uma fissura na periferia, causada pelo rompimento da epiderme durante o desenvolvimento do primórdio caulinar. As bactérias penetram nesses espaços intercelulares e multiplicam-se ativamente, formando volumosas bolsas situadas entre as camadas externas do córtex do primórdio radicular. As bolsas possuem uma parede própria e as bactérias nelas contidas são incluídas em um material fibrilar frouxo. Nesta fase de infecção, inicia-se a atividade meristemática nas camadas internas do córtex do primórdio radicular (Ferreira, 1997).

A diferenciação de meristema nodular precede a etapa seguinte, que é o aparecimento dos cordões de infecção formados a partir de dilatações das bolsas intercelulares. Esses cordões de infecção, primeiro intercelulares e, em seguida, intracelulares, se ramificam, invadindo a zona meristemática e liberando as bactérias no citoplasma das células (Alazard, 1991). A bactéria dentro da planta modifica suas características ultraestruturais passando a se chamar bacteróide. Com a formação dos canais de infecção, as bactérias se encaminham para a região de formação dos primórdios nodulares. Quando chegam na região de

células indiferenciadas, ocorre um processo de concentração bacteriana no centro do tecido meristemático, dando início à formação do nódulo.

Ladha *et al.* (1992a) sugeriram que nódulos de raiz podem ser definidos como nódulos formados acima do solo em raízes adventícias, bem como os formados no solo em raízes. O termo nódulos do caule pode ser reservado para nódulos onde a localização impede contato com o solo e a formação é iniciada no primórdio e não nas raízes adventícias. Atualmente, somente é considerada nodulação verdadeira de caule, aquela em que o nódulo apresenta conexão vascular com o caule (James *et al.*, 1992a).

II.2.2- Classificação de rizóbios que nodulam caule

Aparentemente rizóbios isolados de caule ou raiz de *Sesbania* ou *Aeschynomene* possuem a habilidade de produzir dupla nodulação (Alazard, 1985; Dreyfus *et al.*, 1988). Entretanto, *Rhizobium* específico de nodulação em raiz, incapaz de nodular caule também foi relatado (Dreyfus *et al.*, 1984).

Alazard, (1985), classificou várias espécies de *Aeschynomene*, baseado no seu comportamento de inoculação cruzada em três grupos. O grupo 1 compreende as espécies *A. crassicaulis*, *A. elaphoroxylon* e *A. pfundii* sendo estas noduladoras de caule, e *A. americana*, *A. falcata* e *A. histrix* que não nodulam caule, são próximas do grupo *Bradyrhizobium* sp., porque formam nódulos efetivos em *Macroptilium atropurpureum*, a planta teste para rizóbio de caupi. Nenhuma das estirpes apresenta capacidade fotossintética. O grupo 2 compreende *A.*

afraspera e *A. nilotica*, que são altamente hospedeiro-específico. As espécies *A. fluminensis*, *A. schimperi*, *A. uniflora* e *A. villosa* podem ser incluídas neste grupo (Boivin *et al.*, 1997). Não foi observada inoculação cruzada entre essas espécies e *S. rostrata*. No grupo 3 estão as espécies *A. ciliata*, *A. denticulata*, *A. evenia*, *A. indica*, *A. pratensis*, *A. rudis*, *A. scabra*, *A. sensitiva* e *A. tambacoundensis*, cada isolado pode nodular diversas espécies dentro deste grupo.

Dreyfus & Dommergues (1981), relataram nodulação infetiva em *S. pachycarpa* e *S. bispinosa* com a estirpe ORS 551, isoladas de nódulos de caule de *S. rostrata*. *S. rostrata*, entretanto, foi incapaz de formar nódulos com rizóbios isolados de *S. pachycarpa*, *A. afraspera* e *Vigna unguiculata*. Esses estudos concluíram que isolados de nódulos de caule de *S. rostrata* e alguns isolados de *Aeschynomene* parecem ser altamente hospedeiro-específicos, e com a exceção de isolados de *A. crassicaulis*, *A. elaphoroxylon* e *A. pfundii* eles aparentemente não podem ser incluídos dentro do grupo de inoculação cruzada (Ladha *et al.*, 1992).

S. rostrata-*Azorhizobium caulinodans* apresentam uma simbiose altamente específica. *Azorhizobium caulinodans* não formou nódulos efetivos em outras espécies de *Sesbania*, e não produziu nódulos de caule e raiz em nenhuma espécie de *Aeschynomene* que nodula caule (Ladha *et al.*, 1990). Como *A. caulinodans*, muitos *Sinorhizobium* isolados de *Sesbania* são restritos às espécies de *Sesbania* (Boivin *et al.*, 1997).

II.2.3- Estrutura dos nódulos de caule

Eardly & Eaglesham (1985), sugeriram que nódulos de caule de *Sesbania* e *Aeschynomene* podem ser estruturas autônomas, já que os cloroplastos dos nódulos fornecem todo o carbono necessário para a fixação de nitrogênio nos bacteróides. De maneira geral, os nódulos de caule possuem alta atividade enzimática e mais conteúdos metabólicos do que nódulos de raiz, sugerindo que eles fixam N_2 com grande eficiência de energia. Essa grande eficiência é correlacionada com a fotossíntese no córtex dos nódulos de caule (Stegink & Vaughn, 1988; Ladha *et al.*, 1990).

Diferenças na atividade enzimática e conteúdo metabólico entre nódulos de caule de *A. scabra* e *S. rostrata* provavelmente resultam ou da característica da espécie de leguminosa, ou da capacidade fotossintética da estirpe BTAi1 (Hungria *et al.* 1992). A estirpe BTAi1 isolada de nódulos de caule de *A. indica* é estritamente aeróbica e apresenta características incomuns semelhantes às da bactéria púrpura fotossintética, como produção de pigmento rosa sob condições de luz/escuro, síntese de bacterioclorofila a, centros de reação fotossintética, aumento da assimilação de $^{14}CO_2$ em condições de aumento de luz e absorção de O_2 com decréscimo de luz. A quantidade de bacterioclorofila sintetizada aerobicamente por BTAi1 é similar à da bactéria fotossintética *Erythrobacter* sp. e menor 10% do que a sintetizada pela bactéria anaeróbica *Rhodospirillaceae* (Eaglesham *et al.*, 1990).

O gênero *Aeschynomene* possui espécies com profusa nodulação no caule como *A. afraspera* (Alazard & Duhoux, 1990), e espécies com a nodulação esparsa como *A. indica* (Vaughn & Elmore, 1985) e em *A. fluminensis* (Loureiro *et al.*, 1995) os nódulos são formados apenas nas partes submersas. Entretanto, embora os nódulos de caule de *A. fluminensis* se formem apenas sob condições de submersão, eles são capazes uma vez formados, de funcionar sob condições de não inundação, diferentemente dos nódulos de caule de *D. pulchellum*, que obrigatoriamente requerem o processo de inundação para sua formação e funcionamento (Loureiro, 1994).

Em *A. indica* a parte central das células é cheia de bacteróides, e os nódulos são do tipo aesquinomenóide, e não há células intersticiais não infectadas no tecido infectado. Os bacteróides são separados do citoplasma por uma membrana peribacteróide, que são presumivelmente derivadas da membrana plasmática da planta. As células infectadas contém: núcleo, plastídeos e mitocôndria, mas não cloroplastos e vacúolos. As células corticais, ao redor da zona infectada contém cloroplastos ou plastídeos. Os nódulos são rodeados por uma ou duas camadas de células epidérmicas que não contém cloroplastos. O xilema esta presente dentro do tecido cortical contendo cloroplastos (Yatazawa *et al.*, 1984; Vaughn & Elmore, 1985).

Loureiro, (1994) relatou a estrutura do nódulo de caule e raiz em *A. fluminensis*. Os nódulos de caule são tipicamente aesquinomenóides, porém a maioria dos nódulos continham lenticelas. O tecido infectado é composto de células arredondadas, contendo bacteróides e grandes espaços entre as células.

O núcleo central é frequentemente proeminente nas células infectadas e sem vacúolos evidentes. Os nódulos produzidos no caule logo abaixo da superfície da água diferem dos nódulos produzidos em maior profundidade por apresentarem cloroplastos no córtex. Os nódulos de raiz não tem cloroplastos e apresentam cordão de infecção. Não foram observados cordões de infecção em nódulos de caule.

A organogênese de nódulos de caule e raiz em *Sesbania rostrata* são muito similares e são intermediárias entre o desenvolvimento dos tipos de nódulo determinado e indeterminado (N'doye *et al.*, 1994; Ferreira, 1997). Os nódulos de caule em *Sesbania*, representam provavelmente uma adaptação que permite à planta fixar nitrogênio em condições de alagamento (Parsons *et al.*, 1995). Células do córtex exterior de nódulos de caule de *Sesbania rostrata* possuem clorofila contendo cloroplastos que absorvem luz e fixam CO₂, embora esses nódulos permanecem em grande parte dependentes do suprimento externo de carbono para sustentar a atividade da nitrogenase (Parsons *et al.*, 1992).

Loureiro *et al.* (1993), avaliaram 177 isolados de nódulos de caule e 120 de nódulos de raiz de *A. fluminensis* em relação às suas características fotossintéticas. A produção de pigmento rosa indicando a presença de caroteno, e a síntese de bacterioclorofila foi encontrada em um isolado de raiz e dezessete isolados de caule. Todas as bactérias são estritamente aeróbicas, e o máximo de caroteno e síntese de bacterioclorofila foi encontrado no ciclo de crescimento claro-escuro. Lorquim *et al.* (1993) isolaram estirpes de *A. indica* e *A. sensitiva* crescendo no Senegal, sendo 95% dessas estirpes identificadas como

fotossintéticas. Entretanto, Van Berkun *et al.* (1995), avaliaram 79 isolados de nódulos de caule de *A. indica*, oriundos de 58 solos de 14 diferentes países, em relação a produção de bacterioclorofila. Somente 38 dos isolados testados produziram bacterioclorofila e carotenóides durante o crescimento heterotrófico. Loureiro, (1994) avaliou a capacidade de estirpes isoladas de nódulos de caule de *D. pulchellum* e *D. psoraleaefolium* em sintetizar bacterioclorofila a. Os resultados obtidos demonstram que nenhuma das estirpes testadas foi capaz de sintetizar bacterioclorofila.

II.2.4-Desenvolvimento dos nódulos em *Sesbania*, *Aeschynomene* e *Discolobium*

O desenvolvimento dos nódulos em *S. rostrata* já foi amplamente estudado (Dreyfus & Dommergues, 1981; Tsien *et al.*, 1983; Duhoux, 1984; Olsson & Rolfe, 1985; N'Doye *et al.*, 1994; Ferreira, 1997). O sítio de infecção é um primórdio de raiz adventícia presente no caule de *S. rostrata* que é induzido por inundação. Este surge provavelmente a partir do mesmo processo de desenvolvimento de raízes secundárias, isto é, pela divisão de células do periciclo. Após um desenvolvimento inicial do primórdio radicular causado pela atividade mitótica do meristema apical, este entra em fase de dormência. O desenvolvimento do primórdio leva à formação de um domo constituído por tecido morto, derivado do tecido epidérmico, comprimido pelo primórdio radicular emergente. Como consequência, ao redor do primórdio radicular é formada uma fissura, sendo este o sítio inicial de infecção das bactérias (Ferreira, 1997).

Antes da infecção da bactéria, o primórdio radicular apresenta um meristema apical e um feixe vascular no centro rodeado por células do córtex altamente vacuoladas, indicando um alto grau de diferenciação. Após a infecção há uma grande proliferação de bactérias na fissura e simultaneamente a diferenciação de células corticais começa a se formar no primórdio do nódulo (Boivin *et al.*, 1997). Das células basais do primórdio, é formado um cordão de infecção a partir de dilatações emitidas das bolsas intercelulares. O cordão de infecção cresce sempre se ramificando, inicialmente inter e depois intracelularmente (Tsien *et al.*, 1983; Duhoux, 1984; N'Doye *et al.*, 1994). A bactéria é liberada por processo endocitótico dos pontos do cordão de infecção, e devido a mudanças ultraestruturais e metabólicas passam a ser denominada bacteróides. As células param de se dividir e iniciam o processo de fixação de nitrogênio. O desenvolvimento do nódulo continua através da divisão celular e o aumento do tamanho do nódulo é resultado do volume celular (Ferreira, 1997).

Antes de iniciar o processo de fixação ocorre a produção de um pigmento, a leghemoglobina, que tem a importante função no transporte de oxigênio para a respiração dos bacteróides. Essa proteína mantém o oxigênio na forma associada, não permitindo a presença de oxigênio livre, que afetaria o funcionamento da nitrogenase (Stegink & Vaughn, 1988; Fleischman & Kramer, 1998).

Os nódulos de caule e raiz do gênero *Aeschynomene* são similares em morfologia e estrutura, sendo do tipo determinado, e são tipicamente aesquinomenóide, isto é, com forma circular e achatados nas extremidades e sem células intersticiais infectadas no tecido infectado. O nódulo é ligado ao caule por

um pedúnculo curto e o tecido nodular contém numerosos espaços intercelulares. O processo de infecção é intracelular sem a formação de cordão de infecção (Dreyfus *et al.*, 1984). É provável que este modo de infecção seja controlado pelo genoma da planta hospedeira, como já foi relatado para leguminosas que nodulam na raiz (Dart, 1977).

O processo de infecção e desenvolvimento do nódulo em *A. fluminensis* foi relatado por Loureiro *et al.* (1995). A bactéria penetra dentro das células corticais internas por invaginação da parede celular e multiplica-se ativamente. A infecção se processa de célula para célula por invaginação interna e dissolução da parede celular do hospedeiro e o tecido central fixando nitrogênio é caracterizado pela ausência de células não infectadas. Os nódulos de caule de *A. fluminensis* podem ser divididos em dois tipos: nódulos da parte inferior do caule, próximo ao hipocótilo, sem cloroplastos no córtex interno, e nódulos da parte superior do caule, próximo à superfície da água, com numerosos cloroplastos no córtex nodular. Os nódulos de raiz são semelhantes, tendo forma oval e sendo do tipo aesquinomenóide.

Em *A. afraspera* a invasão da bactéria é intracelularmente para o tecido cortical entre as células sem formação de cordão de infecção (Alazard & Duhoux, 1990). Os nódulos são visíveis em 5 dias e apresentam desenvolvimento total em três semanas (Dreyfus *et al.*, 1984; Alazard & Duhoux, 1988). Eaglesham & Szalay (1983) inocularam no caule de várias espécies de *Aeschynomene* a estirpe BTai1, pequenos nódulos foram visíveis em *A. scabra* 8 dias após a

inoculação; e em 12 dias eram visíveis em *A. denticulata*, *A. indica*, *A. pratensis*, *A. rudis* e *A. evenia*.

Estudos estruturais e ultraestruturais dos nódulos de caule e raízes de *A. indica* revelaram a ausência de cordões de infecção nos nódulos, levando a supor que o processo de infecção seria do tipo intercelular (“crack entry”) (Yatazawa *et al.*, 1984). Não foram observadas diferenças na estrutura de nódulos de caule e raiz (Vaughn & Elmore, 1985).

Em nódulos de caule de *Discolobium* o sistema vascular do caule ramifica-se por todo o nódulo, penetrando no tecido infectado com projeções alongadas do córtex. Tanto nos nódulos de caule como nos de raiz, o tecido infectado é do tipo desmodióide, isto é, sem células não infectadas. As células infectadas nos nódulos de caule são vacuoladas, com cordões de infecção visíveis. O córtex interno é rico em amiloplastos e contém componentes da barreira de difusão de oxigênio. O córtex médio, exterior à camada limite, consistia de células frouxas e estas são contínuas com o aerênquima do caule. Ao contrário dos nódulos de caule de algumas espécies de *Aeschynomene* e *Sesbania* (Alazard & Duhoux, 1987; Ladha *et al.*, 1990; Hungria *et al.*, 1992), não há cloroplastos aparentes no córtex dos nódulos de *Discolobium*. Os nódulos radiculares diferiram somente nas células infectadas que não eram vacuoladas, os bacteróides eram maiores e continham mais poli-B-hidroxibutirato e havia menos aerênquima/tecido lenticular (Loureiro, 1994).

Geralmente as leguminosas que formam nódulos em raiz na tribo *Aeschynomene* são infectadas via fendas naturais ou na junção da raiz adventícia,

e seus nódulos não apresentam cordão de infecção, embora Loureiro *et al.* (1995) tenham demonstrado pequenos cordões de infecção em nódulos de raiz de *A. fluminensis*, mas não foram observados em nódulos de caule (Loureiro *et al.*, 1998).

II.2.5- Difusão de O₂ em nódulos de caule

A concentração de O₂ no solo é particularmente crítica para o funcionamento da fixação de nitrogênio nos nódulos de raízes de leguminosas. Dentro da estrutura do nódulo grande quantidade de O₂ é requerida pelas células infectadas para a fosforilação oxidativa, porém a nitrogenase é desnaturada em concentrações de oxigênio maior do que 5mmol m⁻³, enquanto pouco O₂ fornecido aos bacteróides, resulta na diminuição do fornecimento de ATP para a redução do N₂ pela nitrogenase (Sheehy & Thornley, 1988).

A atividade de fixação em leguminosas divide 30 a 50% do total de fotossintatos para os nódulos de raiz, com perdas de 18 a 30% via respiração (Hungria *et al.*, 1992). Em nódulos de caule parece provável que o carbono possa ser suprido via fotossíntese das células corticais contribuindo para a fixação de N nos bacteróides e a assimilação de amônia na célula do citosol de leguminosas. Como a atividade fotossintética dos tecidos gera oxigênio, são necessários mecanismos para a proteção do bacteróide em nódulos de caule, pelo fato do complexo enzimático da nitrogenase ser sensível ao oxigênio (Ladha *et al.*, 1992a).

Os nódulos podem possuir barreiras variáveis para regular o fluxo de oxigênio para as células infectadas (Gallon, 1992). Em nódulos típicos de raiz o tecido infectado contém bacteróides que são rodeados por um tecido não infectado com barreira de difusão de oxigênio, que regula o influxo de oxigênio para o tecido central (Witty *et al.*, 1986). Os gases penetram no nódulo através de espaços entre camadas de células livres dentro do córtex, porém as células no interior do córtex são mais densamente agrupadas, com menor via interconecção (Minchin & Witty, 1987). Medições realizadas com microeletrodos mostraram um rápido decréscimo da concentração de oxigênio através do interior do córtex, indicando que este é o maior sítio de resistência à difusão de gases dentro dos nódulos (Witty *et al.*, 1987). A difusão do oxigênio é feita em pequenas concentrações na região central do nódulo por uma rede de vias entre as células que contém bacteróide. Dentro do tecido infectado a leghemoglobina permite a rápida difusão de oxigênio para os bacteróides, enquanto mantém baixa a tensão de oxigênio (Asppleby, 1984; Sheehy & Thornley, 1988).

As concentrações de oxigênio conduzidas por leghemoglobina não diferiram entre nódulos de caule e raiz em *Sesbania rostrata*, e a leghemoglobina foi localizada nas células contendo bacteróides, incluindo as imediatamente adjacentes ao córtex, em ambos os tipos de nódulos (James *et al.*, 1996). Diferenças nos componentes de leghemoglobina em nódulos de caule e raiz tanto de *S. rostrata* como em *A. scabra* permitem correlacionar com altos níveis de O₂ na zona do bacteróide em nódulos de caule (Hungria *et al.*, 1992).

A nodulação no caule possibilita à planta fixar nitrogênio em ambientes alagados, onde os nódulos ficam acima das raízes alagadas, evitando a ocorrência de uma redução de oxigênio, ao ponto de afetar o funcionamento dos nódulos submersos de raiz (Ladha *et al.*, 1992a). Em *N. plena* o hábito de crescimento é modificado para adquirir oxigênio para a respiração das raízes e nódulos, ocorrendo a produção de raízes laterais que flutuam próximo da superfície da água ou logo abaixo dela (James *et al.*, 1992a).

James *et al.* (1992 a) e Loureiro *et al.* (1995) concluíram que a estrutura de nódulos submersos de *Neptunia* e nódulos de raiz e caule de *A. fluminensis* diferem pouco crescendo sob condições drenadas ou condições terrestres, e concluíram que as taxas de suprimento de O₂ em nódulos submersos são provavelmente similares aos nódulos terrestres (Loureiro *et al.*, 1998).

Eaglesham & Szalay (1983) estudaram o efeito do alagamento na nodulação de caule e raiz de *A. scabra*, o número de nódulos de raiz decresceu quase a zero comparado com 1000 nódulos de caule por planta. Efeito similar foi encontrado por N'doye & Dreyfus (1988), onde foi observado o efeito do alagamento na inibição da nodulação e fixação de *S. rostrata* e *S. sesban*. Ladha *et al.* (1989), entretanto, não encontraram diferenças na massa de nódulos de raiz e ARA de *S. rostrata* com 45 dias, crescidas em vasos inundados e não inundados.

Os nódulos aéreos de caule contém cloroplastos no tecido cortical rodeando as células que fixam nitrogênio (Dreyfus & Dommergues, 1981; Eaglesham & Szalay, 1983; Duhoux, 1984; Vaughn & Elmore, 1985; de Bruijn,

1989). Cloroplastos também foram relatados em nódulos submersos de *A. fluminensis* (Loureiro *et al.*, 1995), mas são ausentes em nódulos de caule de *Discolobium* (Loureiro *et al.*, 1994). Apesar da presença de cloroplastos havia pouca evidência de que os nódulos de caule pudessem fotossintetizar, até relatos recentes da atividade da nitrogenase induzida pela luz e incorporação de $^{14}\text{CO}_2$ também induzido pela luz em *A. indica*, *A. scabra* e *S. rostrata* (Evans *et al.*, 1990; Hungria *et al.*, 1992).

Várias espécies que foram estudadas em relação à difusão de O_2 como por exemplo, *A. fluminensis*, *Neptunia*, *Discolobium*, demonstraram estruturas típicas de barreira de difusão de O_2 , camadas de células encaixadas com poucos, ou nenhum espaço intercelular no córtex interno imediatamente adjacente à zona infectada e oclusões com glicoproteína nos espaços intercelulares no córtex e no midcortex (James *et al.*, 1992b; Loureiro, 1994; Loureiro *et al.*, 1994, 1995).

O aumento da deposição cortical de glicoproteína dentro dos espaços intercelulares e dentro das paredes das células dos nódulos de caule em *S. rostrata*, aumenta a barreira física de difusão de oxigênio, e é o principal fator de prevenção de dano de oxigênio para a nitrogenase (James *et al.*, 1996). Glicoproteínas também foram encontradas no córtex de nódulos de caule de *Discolobium pulchellum* (Loureiro *et al.*, 1994) e *Aeschynomene fluminensis* (Loureiro *et al.*, 1995) e em estudos anteriores em *S. rostrata* (James *et al.*, 1996). Iannetta *et al.* (1995) demonstraram rápida produção e extrusão de glicoproteína dentro dos espaços intercelulares correlacionados com o aumento da resistência da barreira de oxigênio em nódulos de *Lupinus albus*.

A continuação da atividade da nitrogenase sob condições de alagamento implica no desenvolvimento de uma via para a troca de gases entre nódulos submersos e a atmosfera. Estes efeitos do contínuo alagamento estão correlacionados com o desenvolvimento de diferenças na morfologia de raiz onde mais aerênquima está presente nas raízes das plantas alagadas comparadas com as plantas normalmente molhadas. Possibilitando, dessa forma, o movimento descendente de O_2 através dos espaços de ar dentro deste tecido, similar àquele sugerido para *Neptunia plena* (James *et al.*, 1992b).

Em estudos realizados por Atkins *et al.* (1993) com nódulos de raízes de *Glycine max*, *Vigna unguiculata* e *Medicago sativa* crescendo sob condições de pressão externa de O_2 baixa, foram observadas mudanças morfológicas, incluindo aumento na produção de lenticela e/ou aerênquima, aumentando a proporção de células não infectadas para células infectadas e o aumento do tamanho dos espaços intercelulares tanto no córtex quanto na região infectada, facilitando as trocas gasosas. Resultados similares foram obtidos por Arrese-Igor *et al.* (1993) em trabalho realizado com alfafa (*Medicago sativa* L.); a adaptação envolve mudança na alocação de fotossintatos e a formação de aerênquima nas raízes para a manutenção das taxas de respiração. Os nódulos também apresentam aerênquima e o córtex menos compacto, que proporciona um aumento na permeabilidade de gases. *Sesbania rostrata* sob condições de alagamento tem o caule rodeado por aerênquima, este tecido permite 40% do transporte de N_2 para nódulos de raiz, e 60% é suprido através do caule. A mesma adaptação foi observada em *S. cannabina* e *S. speciosa*, sugerindo que espécies de *Sesbania*

desenvolvem esse tecido especial para a adaptação ao alagamento, permitindo a troca de gases através do caule para as raízes (Saraswati *et al.*, 1992; Evans & Rotar, 1987). Yoshida, (1981), relatou que nódulos de raiz de *Aeschynomene indica* utilizaram N_2 que foi fornecido através do caule alagado.

Estudos de microscopia de nódulos de raízes de trevo branco (*Trifolium repens* cv. *Katrina*) realizados por Pugh *et al.* (1995) demonstraram o aumento na produção de aerênquima nas plantas alagadas. Observou-se que as células infectadas dos nódulos submersos são grandes e os vacúolos são maiores do que aqueles de nódulos de plantas normalmente molhadas, a proporção de volume do vacúolo/volume de protoplasto no tratamento alagado foi 3,7 maior que o controle. Este aumento no volume do vacúolo para o volume do protoplasto de células infectadas pode exercer um papel na tolerância dos nódulos de trevo branco ao alagamento. O aerênquima tem demonstrado ser importante no suprimento de gases para raízes da leguminosa *Viminaria juncea*. Um profuso aerênquima reveste raízes e nódulos de *N. plena* e tem função similar (James *et al.*, 1992 b).

De maneira geral, plantas que se desenvolvem em ambientes alagados formam aerênquima para evitar a anoxia na zona radicular e talvez seja consequência dessa condição. Acredita-se que a formação do aerênquima tem por finalidade fornecer oxigênio para a respiração da raiz (Evans & Rotar, 1987). É portanto, um mecanismo adaptativo construído pelo afastamento de células aumentando os espaços intercelulares a partir de condições impostas pelo ambiente (James *et al.*, 1992 b; Blom *et al.*, 1994; Pugh *et al.*, 1995).

A presença de oleossomos em nódulos de leguminosas tropicais, foi descrito pela primeira vez em nódulos de amendoim em todos os estágios de desenvolvimento (Bal *et al.*, 1989; Jayaram & Bal, 1991). Estudos realizados por Bal & Siddique (1991) e Siddique & Bal (1991) indicaram que os oleossomos, que são organelas de depósito de lipídios, seriam utilizados como uma fonte suplementar de carbono e energia para o processo de fixação de nitrogênio em nódulos do amendoim, onde há uma alta demanda de energia.

Bal & Denduluri, (1996) observaram a ocorrência de oleossomos transitórios durante os estágios iniciais de diferenciação em nódulos de caule e raiz de *Sesbania rostrata*. Em nódulos de caule a primeira observação de oleossomos nas células infectadas foi aos 8 dias após a inoculação. Essas observações indicam que os oleossomos são usados na proliferação do sistema de membrana, que é necessária para proteger os bacteróides e manter seu crescimento e suprir energia para o crescimento das células infectadas. Os nódulos que apresentaram oleossomos eram brancos, ou seja, não tinham sinal visual de leghemoglobina, indicando que há ausência de fixação de nitrogênio nos estágios iniciais. Nos nódulos maduros havia coloração rosa, mas estes não apresentavam oleossomos. Os oleossomos são possivelmente formados por um curto período para armazenar triacilglicerídios, e podem ser prontamente usados para o crescimento e diferenciação de membranas durante os estágios iniciais de formação do nódulo. São uma particularidade dos nódulos de caule, e seu tamanho é cerca de 8 vezes maior do que os encontrados em nódulos de raiz.

Em nódulos radiculares e nódulos inferiores do caule de *A. fluminensis* foi observada a presença de oleossomos, não sendo encontrados nos nódulos da parte superior do caule. Este fato pode ser atribuído à maior submersão dos nódulos inferiores do caule, causando deficiência de O_2 o que conduz a uma reserva de energia não metabolizada (Loureiro, 1994).

Os nódulos de caule que contém cloroplastos no córtex, e os fotossintatos na forma de sacarose podem sofrer acúmulo em resultado do armazenamento de triacilglicerídios nos oleossomos. Isso pode ser a razão para o alto conteúdo lipídico total nos nódulos do caule. Nos nódulos de raiz por outro lado, a translocação dos fotossintatos vindo das folhas percorre uma via mais longa que impede o excesso de acúmulo (Denduluri & Bal, 1996).

Loureiro *et al.* (1994) concluíram que os nódulos de *Discolobium*, provavelmente, recebem o O_2 via profuso tecido lenticular das partes baixas do caule submerso, que são conectados com as lenticelas dos nódulos. O córtex interno dos nódulos são ricos em amiloplastos e contém componentes de uma barreira de difusão de oxigênio composto de camadas de células sem espaços intercelulares no córtex interno, próximas e aparentemente concêntricas à zona infectada. Além disso, outro grande componente da barreira de difusão de O_2 em nódulos de caule de *Discolobium* são as glicoproteínas, que foram observadas preenchendo os espaços intercelulares do córtex interno e médio (Loureiro, 1994).

II.2.6- Fixação biológica de nitrogênio e acumulação de nitrogênio em leguminosas noduladoras de caule

O nitrogênio é um dos fatores mais limitantes para a produção em sistemas agrícolas baseados na subsistência, onde o uso de fertilizante mineral é restrito. O arroz é uma das culturas mais importantes na alimentação no mundo, com cerca de 40% da população mundial utilizando-o como sua maior fonte de calorias. O uso de leguminosas para utilização como adubo verde na cultura de arroz é uma alternativa para o aumento do conteúdo de nitrogênio no solo (Alazard & Becker, 1987).

Na Ásia, os agricultores plantam leguminosas para serem usadas como adubo verde durante 40-60 dias entre o período de transição das duas culturas de arroz. As leguminosas que são usadas para adubação verde e fixam nitrogênio podem fornecer grandes quantidades de N necessárias para esta cultura (Ladha *et al.*, 1988), entretanto a sensibilidade ao fotoperíodo, a estreita adaptação ecológica e a intolerância ao alagamento restringem o uso de leguminosas para serem utilizadas como adubo verde em áreas alagadas. *Aeschynomene afraaspera* e *Sesbania rostrata* são leguminosas tropicais do oeste da África e podem formar nódulos tanto no caule como na raiz e vem sendo usadas como adubo verde em produção de arroz alagado (Ladha *et al.*, 1992a). A utilização dessas espécies deve-se a habilidade em fixar N_2 em ambientes alagados e ao rápido crescimento, e também por apresentarem altas taxas de fixação de N_2 quando comparadas com leguminosas que nodulam somente nas raízes (Rinaudo *et al.*, 1983; Dreyfus *et al.*, 1985; N'Doye & Dreyfus, 1988). As características de ambas espécies,

torna-as promissoras para a utilização como adubo verde na cultura de arroz alagado (Dreyfus & Dommergues, 1981; Eaglesham & Szalay, 1983; Hungria *et al.*, 1992; Ladha *et al.*, 1992a; Watanabe *et al.*, 1992; Diekmann *et al.*, 1996; Boivin *et al.*, 1997), mas também em sistemas de intermitência de alagamento como na região do Pantanal.

A atividade de redução de acetileno em nódulos de caule de *A. afraspera* foi de $309 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4.\text{g}^{-1}.\text{nódulo seco.h}^{-1}$, sendo essa eficiência similar a de outras leguminosas que nodulam caule (Alazard & Duhoux, 1987). Em *S. rostrata*, a atividade de redução de acetileno foi de $259 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4.\text{g}^{-1}.\text{nódulo seco.h}^{-1}$ (Dreyfus & Dommergues, 1981). A atividade de redução de acetileno em nódulos de caule foi maior do que em nódulos de raiz em leguminosas como *Vigna*, *Vicia* e *Lupinus*, que variam de 180 a $250 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4.\text{g}^{-1}.\text{nódulo seco.h}^{-1}$ (Alazard & Duhoux, 1987).

A leguminosa *S. rostrata* tem a capacidade de fixar nitrogênio rapidamente, na ordem de 40-285 kg N/ha em 45-55 dias e *A. afraspera* 80 a 90 kg N/ha (Ladha *et al.*, 1990 ;Watanabe & Liu, 1992). O percentual de contribuição de N derivado da fixação biológica de nitrogênio em plantas bem noduladas de *S. rostrata* com 45 a 55 dias foi em torno de 70% e aos 65 dias houve um aumento em torno de 90%. Pareek *et al.*, (1990) usando ^{15}N em solo comparou porcentagem de nitrogênio fixado biologicamente em *S. rostrata* e *S. cannabina*. Embora ambas espécies tenham acumulado porcentagens similares de N, *S. rostrata* apresentou maior quantidade de N total. Diekmann *et al.*, (1996) encontraram valores de 190 kg .N .ha⁻¹ para *S. rostrata* e 196 Kg. N. ha⁻¹ para *A. afraspera*.

Ladha *et al.*, (1992a) realizaram trabalhos para a avaliação da contribuição da fixação biológica de nitrogênio em nódulos de caule de *S. rostrata* em presença e ausência de nódulos de raiz. Os resultados sugeriram que a dupla nodulação encontra um balanço na competição por energia, que é controlado pela nodulação do caule. Esta conclusão baseia-se no fato de que *S. rostrata* com nódulos radiculares desenvolve, através da inoculação, nódulos no caule, não ocorrendo aumento do peso dos nódulos radiculares e na atividade da nitrogenase. Porém, os nódulos radiculares e a atividade da nitrogenase são recuperados quando os nódulos de caule são removidos. O mecanismo de controle do nódulo de caule é provavelmente devido à proximidade do aparato fotossintético, que permite ao nódulo de caule controlar o suprimento de fotossintatos para os nódulos de raiz e determinar sua longevidade e atividade (Ladha *et al.*, 1992b).

No estágio inicial de crescimento, a contribuição dos nódulos radiculares em relação ao N da planta é provavelmente, mais importante que a contribuição dos nódulos caulinares. Todavia, os nódulos de caule, que surgem entre 20 a 30 dias após a germinação, reprimem a nodulação radicular. Nesse estágio, a principal contribuição ao N das plantas é pelos nódulos caulinares (Ladha *et al.*, 1992a).

O potencial de acumulação de N sob condições de alagamento alcançou de 41 kg N/ha em *A. indica* (Crozat & Sangchoy-sawat, 1985) e mais que 200 kg N/ha em *S. rostrata*, *A. afraspera* e *A. nilotica* (Rinaudo *et al.*, 1983; Alazard & Becker, 1987; Becker *et al.*, 1990) sendo maior que as não noduladoras de caule *S. cannabina* e *S. sesban* (Buresh & De Datta, 1991).

Nodulação em caule foi descrita como sendo um sistema mais eficiente de fixação biológica de nitrogênio do que o sistema de nodulação de raiz. Eaglesham & Szalay (1983) relataram atividades de mais de $165\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{h/planta}$ em *A. scabra* e Alazard & Duhoux (1987) registraram atividade de cerca de $187\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{h/planta}$ em *A. afraspera*. Dreyfus *et al.* (1985) observaram atividade da nitrogenase de cerca de $600\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{h/planta}$ em *S. rostrata* com três meses, cultivada no campo, enquanto nas demais leguminosas estes valores dificilmente ultrapassam $100\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{h/planta}$.

Hungria *et al.* (1992) observaram altos conteúdos de carboidratos solúveis e amido em nódulos de caule de *A. scabra* e *S. rostrata* em relação aos nódulos de raízes dessas espécies. Com maior disponibilidade de carbono, a atividade de redução de acetileno de nódulos de caule foi maior do que a de nódulos de raiz, 50% maior em *S. rostrata* e oito vezes maior em *A. scabra* em relação ao apresentado por nódulos de raiz. Esta alta atividade de nódulos de caule de *A. scabra* já havia sido observada antes por Eaglesham & Szalay (1983). Esta atividade (300 a $400\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{h/planta}$) é maior do que os valores comumente relatados para *Medicago sativa*, *Glycine max* e *Vigna unguiculata*. A maior eficiência de *A. scabra* em relação à *S. rostrata* já havia sido relatada por Eaglesham *et al.* (1990), e tem como um dos fatores a habilidade fotossintética da estirpe BTAi1.

Segundo Ladha *et al.* (1990) *A. afraspera* apresenta alto potencial para ser utilizada como adubo verde e apresenta duas vantagens adicionais em relação à

S. rostrata: é menos sensível ao fotoperíodo e produz menores quantidades de biomassa, o que facilita sua incorporação. O grande volume de biomassa em kg N/ha em adubos verdes requer trabalho adicional na incorporação, portanto um adubo verde com maior quantidade de nitrogênio ou menor biomassa que possa equivaler à aplicação de N deve ser preferido (Becker *et al.*, 1988, 1990).

II.2.7- Efeito do nitrogênio na nodulação

Os efeitos negativos do nitrogênio combinado sobre o número e o tamanho dos nódulos de leguminosas já foram relatados amplamente na literatura, posteriormente foram observados efeitos negativos sobre a massa e a atividade dos nódulos, sugerindo múltiplos efeitos sobre o sistema simbiótico. A fixação biológica de nitrogênio pode ser retardada se o N residual do solo estiver disponível em níveis elevados, podendo reduzir a nodulação e a fixação em leguminosas que nodulam raiz, e o grau de inibição variando de acordo com o composto e sua concentração (Eaglesham & Szalay, 1983).

As leguminosas preferem o nitrogênio do solo ou do fertilizante ao fixado biologicamente, isto se deve ao fato de cerca de 10 a 30% do total líquido de carbono assimilado pela planta poder ser consumido durante o processo de fixação biológica de nitrogênio nos períodos de maior demanda, resultando em um alto custo energético (Straliotto, 1990).

A fixação biológica de N₂ em nódulos de caule é mais tolerante ao nitrogênio combinado do que em nódulos de raiz. Essa característica da

nodulação em caule foi observada por diversos autores (Dreyfus & Dommergues, 1981; Eaglesham & Szalay, 1983; Becker *et al.*, 1986, 1989 e 1991; Watanabe & Liu, 1992).

Becker *et al.* (1986) estudaram o efeito de N mineral em vasos e campo em *A. afraspera*. Os resultados demonstraram efeito positivo na atividade de redução de acetileno e produção de biomassa em nódulos de caule, e efeito negativo em nódulos de raiz quando aplicava-se uréia em doses de 50 e 100 kg/N/ha. Concentrações de N de 200 kg/ha inibiram tanto a nodulação de raiz como de caule em vasos, porém em experimento de campo com essa concentração a nodulação de caule não foi afetada. Efeito similar foi observado em *A. scabra*, onde a adição de nitrogênio reduziu em 95% a nodulação da raiz, ao passo que a redução na nodulação de caule foi de 45% (Eaglesham & Szalay, 1983). Em contrapartida, a nodulação em caule de *A. indica* foi fortemente inibida pela aplicação de nitrogênio (Yatazawa & Susilo; 1980; Sasakawa *et al.*, 1986).

A nodulação no caule de *S. rostrata* não afetada é muito por nitrogênio combinado (Dreyfus *et al.*, 1987; Mergaert *et al.*, 1995). Experimentos de campo e vaso demonstraram que a fixação de N_2 por *S. rostrata* foi estimulada com a aplicação de 30 kg.ha⁻¹ de N, e não foi inibida por 60 kg.ha⁻¹ de N (Becker *et al.*, 1990). Watanabe *et al.* (1992) avaliando a tolerância a níveis de nitrogênio em espécies de *Sesbania*, observaram que *S. rostrata* é mais tolerante a nitrogênio combinado do que *S. cannabina*.

A baixa inibição da nodulação do caule por N mineral pode ser atribuída a vários fatores, como: o estímulo ao crescimento da planta por N mineral, e

consequentemente aumentar a fonte de carboidratos; à separação anatômica dos sítios de absorção de N das raízes e o sítio de fixação de N_2 no caule e por isso menor contato com o N mineral em nódulos de caule; baixa competição por carboidratos entre os nódulos fixando N_2 no caule e à síntese de amino ácidos (Ladha *et al.*, 1992a).

II.2.8- Fixação biológica de nitrogênio em *Discolobium*

A estrutura e a fisiologia dos nódulos de caule, assim como o processo incomum de infecção pelos rizóbios, tem despertado considerável interesse nos gêneros *Sesbania* e *Aeschynomene* (Dreyfus & Dommergues, 1981; Tsien *et al.*, 1983; Vaughn & Elmore, 1985; Alazard & Duhoux, 1987,1990; Hungria *et al.*, 1992; Ladha *et al.*, 1992a), induzindo à busca de mais espécies que nodulam o caule. Loureiro (1994), comunicou a ocorrência, e a estrutura dos nódulos, bem como o estudo do microssimbionte dos nódulos caulinares e radiculares que fixam nitrogênio em *Discolobium* spp. (subfamília Papilionoideae, tribo Aeschynomeneae) (Rudd, 1981), Esse gênero é amplamente encontrado em áreas alagadas no Brasil, Paraguai e Argentina e tem oito espécies todas hidrófitas. As espécies *D. pulchellum* e *D. psoraleaefolium*, ambas com nódulos no caule e na raiz, podem crescer e fixar N_2 quando submersas (Loureiro *et al.*, 1993). Ao contrário de outras hidrófitas nodulantes, os nódulos de raiz e caule de *Discolobium* têm uma necessidade obrigatória de estar submersos e senescem muito rapidamente quando expostos ao ar. *Discolobium* forma nódulos

verdadeiros de caule, pois eles estão conectados vascularmente com o caule e não com raízes adventícias originadas no caule como em *Neptunia* (Loureiro *et al.*, 1994).

As atividades específicas da nitrogenase dos nódulos do caule e da raiz de *Discolobium pulchellum* foram de 469 e 163 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4.\text{g}^{-1}\text{n\acute{o}dulo seco.hora}^{-1}$, respectivamente. Estes resultados mostram alta atividade da nitrogenase, indicando que são potencialmente ativos em fixar N_2 atmosférico (Loureiro *et al.*, 1994).

As análises morfológicas, fisiológicas e moleculares permitiram a diferenciação entre as estirpes de rizóbio, assim como o estabelecimento de grupos, demonstrando a diferença entre as estirpes isoladas dos nódulos de raiz e caule de *Discolobium pulchellum* e espécies representativas de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* (Loureiro, 1994).

II.3- Característica do gênero *Discolobium* Benth

II.3.1. Características gerais

Pequeno gênero com oito espécies, todas hidrófitas, pertence à família Leguminosae, subfamília Papilionoideae, tribo Aeschynomeneae (Faria *et al.*, 1989). Arbusto aquático emergente, perene, com parte aérea renovada na estação chuvosa, 1-4 metros de altura, parte basal do caule engrossada, esponjosa. Floração quase todo o ano, mas em geral apresenta poucos frutos.

D. pulchellum apresenta ampla distribuição no Pantanal, ocorrendo com grande abundância nas planícies de inundação dos rios Paraguai, Negro, Abobral, e Nabileque. É encontrado também no Paraguai e Argentina. Destaca-se por suas vistosas flores amarelas, e é comido por peixes, animais silvestres e pelo gado onde o nível de alagamento permite o acesso dos animais (Allem & Allem, 1981; Allem & Valls, 1987, EMBRAPA/CPAP, 1996; Loureiro *et al.*, 1996).

II.3.2. Importância econômica

A importância desta leguminosa está relacionada com seu aproveitamento como adubo verde ou forragem (Allen & Valls, 1987), e juntamente com *Arachis*, *Dolichopsis*, *Galactia*, *Rhynchosia*, *Teramnus* e *Vigna* constitui uma das principais forrageiras das áreas argilosas (Pott, 1988). Sua importância como forrageira está relacionada com o seu alto teor de proteína bruta, em torno de 28% (Pott, 1988) (Tabela 2).

Tabela 2- Teores médios de PB (%) nas principais forrageiras das sub-regiões Miranda e Nabileque.

Espécies	PB (%)
<i>Discolobium puchellum</i>	28,4
<i>Hymenachne amplexicaulis</i>	20,4
<i>Paspalidum paludivagum</i>	19,5
<i>Leersia hexandra</i>	18,0
<i>Thevetia amazonica</i>	15,9
<i>Oriza latifolia</i>	14,6
<i>Paspalum oteroi</i>	14,5
<i>P. hydrophilum</i>	11,4
<i>P. plicatulum</i>	9,5
<i>Hemarthria altissima</i>	8,0

Fonte: Pott, 1988

III - CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE RIZÓBIO ISOLADAS DE NÓDULOS DE CAULE E RAIZ DE *Discolobium pulchellum* E *Discolobium psoraleaefolium*.

III.1-INTRODUÇÃO

As características culturais e morfológicas das colônias de rizóbio em meio de cultivo específicos são úteis para sua identificação e agrupamento, destacando-se entre várias outras características, o tempo de crescimento e a reação de pH em meio com extrato de levedura, manitol e sais minerais. Estes dados associados a avaliações do comportamento sorológico, bioquímico e fisiológico, são essenciais na determinação taxonômica das espécies de rizóbio (Jordan, 1984).

Segundo Tan & Broughton (1981), certas combinações de aminoácidos e açúcares (e.g. glutamina e galactose) induzem uma reação ácida nos organismos de crescimento rápido ao passo que os de crescimento lento mudam o meio para alcalino. Organismos de crescimento rápido utilizam mais galactose para crescer, comparados com os de crescimento lento, enquanto ambos os tipos de organismos sintetizam e liberam aminoácidos no meio de cultura. Sendo assim, as mudanças de pH produzidas por rizóbio crescidos em meio YMA são causadas

pela utilização preferencial de açúcares por organismos de crescimento rápido e de compostos nitrogenados pelos de crescimento lento.

De acordo com a teoria evolucionária das leguminosas, rizóbios de crescimento lento, produtores de base representam uma forma ancestral e são associadas tipicamente com leguminosas tropicais não especializadas simbioticamente, habitando solos ácidos. Os rizóbios de crescimento rápido produzindo ácido são considerados como associados com leguminosas temperadas, apresentando maior especificidade de hospedeiros e requerem solos com pH neutro à alcalino, altos níveis de cálcio disponível e nutrientes (Norris, 1965). Segundo este autor o rizóbio produzindo álcali representa uma forma mais primitiva do que o rizóbio produzindo ácido. De maneira geral o rizóbio produtor de base que apresenta crescimento lento pode ter co-evoluído com leguminosas de origem tropical.

As espécies de leguminosas forrageiras fixadoras de nitrogênio apresentam-se como uma boa alternativa para os solos pobres e sujeitos à inundação no Pantanal, porém estresses ocasionados por altas temperaturas e salinidade observados na região, podem interferir no processo de nodulação. A ocorrência de solos com salinidade elevada na região do Pantanal (Jacomine *et al.*, 1995), como os registrados com frequência no Pantanal de Nabileque e as altas temperaturas locais que podem influenciar o processo de fixação biológica de nitrogênio, levam à necessidade de buscar estirpes que sejam tolerantes a esses estresses.

III.2- MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados nódulos nas raízes e caule de *D. pulchellum* e *D. psoraleaefolium* em duas regiões do Pantanal Mato-Grossense (MS e MT) sob condições de inundação. Após a coleta, os nódulos de raiz e caule foram dessecados em frascos contendo sílica gel, onde foram mantidos até o momento do isolamento. O isolamento do rizóbio foi feito segundo a metodologia de Vincent (1970). Os nódulos foram reidratados por uma hora em água destilada, sendo posteriormente submersos em álcool 96° GL por 30 segundos e a seguir foram esterelizados em hipoclorito de sódio 5% por dois minutos e lavados seis vezes consecutivas em água destilada estéril. Os isolados foram cultivados em placas contendo meio extrato de levedura com manitol (YMA) (Vincent, 1970) e incubadas a 28° C. As seguintes observações foram realizadas: produção de ácido ou álcali; velocidade de crescimento; produção de muco; diâmetro; cor; forma; elevação e transparência das colônias. Os isolados foram agrupados de acordo com a velocidade de crescimento e modificação do pH em meio de cultura extrato de levedura manitol.

Os isolados foram testados quanto à tolerância a salinidade em níveis de 1, 2 e 3% de NaCl em meio YMA sólido a uma temperatura de incubação de 28⁰C. Para a avaliação da tolerância a temperaturas altas os isolados foram riscados em placas com meio YMA e incubadas a 39 e 42⁰C, foram realizadas observações periódicas até os 20 dias.

III.3 -RESULTADOS E DISCUSSÃO

1-Characterização morfológica

Na caracterização dos isolados de nódulos de raiz e caule de *Discolobium* spp. apresentaram colônias em meio YMA secas ou mucóides, opacas ou translúcidas, circulares ou puntiformes, diâmetro variando de puntiforme a 3mm, e foram agrupadas segundo seu tipo de crescimento em rápidas (crescimento moderado a abundante em 3 a 5 dias) e lentas (pouco crescimento em 6 dias). Dentre os isolados de nódulos de raiz de *Discolobium* spp., 90% apresentaram crescimento lento (Quadro 1), alcalinizando o meio, ao passo que os isolados de nódulos de caule, 46% apresentaram crescimento lento (Quadro 2).

Assim como a estirpe ORS 571 isolada de *Sesbania* rostrata, todas as estirpes de rizóbio que nodulam o caule isoladas de plantas de *Aeschynomene*, incluindo a estirpe BTAi1, são de crescimento intermediário ou rápido e produzem alcali em meio extrato manitol (YMA) (Ladha *et al.*, 1992b). Esses resultados indicam que essas estirpes são de um tipo intermediário, que possui propriedades fisiológicas tanto de crescimento rápido como de crescimento lento (Stowers & Eaglesham, 1983).

Em relação ao tamanho das colônias os isolados provenientes de nódulos de raiz, 79% apresentaram diâmetro $<0,5$ mm e a forma puntiforme e 21% apresentaram diâmetro de 1mm e forma circular. Nos nódulos provenientes do caule houve uma maior variabilidade no parâmetro diâmetro das colônias nos isolados que apresentaram crescimento rápido. No parâmetro cor das colônias, tanto de isolados de nódulos de raiz como de caule, foi predominante a cor branca. Os parâmetros que apresentaram maiores diferenças entre os isolados de nódulos de caule e raiz foram à velocidade de crescimento associada à alteração do pH do meio de cultura e a quantidade de muco produzida. As estirpes de crescimento rápido apesar de mais sensíveis à acidez do solo, podem apresentar uma vantagem competitiva em relação a outros microrganismos.

Loureiro, (1994) avaliou 69 isolados de nódulos de caule e raiz de *D. pulchellum* e *D. psoraleaefolium*, 70% apresentaram crescimento rápido e tornaram o meio ácido, enquanto os demais 30% apresentaram crescimento lento, tornando o meio alcalino ou não alterando o pH. Nenhuma dos isolados de nódulos de caule e raiz de *Discolobium* apresentou características fotossintéticas, como a estirpe BTAi1 (Hungria *et al.*, 1992), assim como as estirpes isoladas de nódulos de caule de *A. fluminensis* (Loureiro, 1994).

Quadro 1: Características morfológicas de isolados de nódulos de raiz de *Discolobium* spp., crescendo em meio de extrato de levedura com manitol à 28° C.

Ident.	Hospedeiro	pH	Cres.	Ø (mm)	muco	Cor	forma	Elevação	Trans.
1.1	<i>D. pulchellum</i>	Al	L	<0,5	+	Br	Pu	Pl	Tr
2.1	<i>D. pulchellum</i>	Al	L	<0,5	+	Br	Pu	Pl	Tr
3.1	<i>D. pulchellum</i>	Ac	L	<0,5	+	Br	Pu	Pl	Tr
4.1	<i>D. pulchellum</i>	Al	L	<0,5	++	Br	Pu	Le	Op
5.1	<i>D. pulchellum</i>	Al	L	<0,5	++	Br	Pu	Le	Op
6.1	<i>D. pulchellum</i>	Ac	R	1,0	++	Cr	Ci	Co	Op
7.1	<i>D. pulchellum</i>	Al	L	1,0	++	Br	Ci	Le	Op
8.1	<i>D. pulchellum</i>	Al	L	1,0	++	Br	Ci	Le	Op
9.1	<i>D. pulchellum</i>	Al	L	<0,5	+	Br	Pu	Pl	Op
10.1	<i>D. pulchellum</i>	Al	L	<0,5	++	Br	Pu	Le	Op
11.1	<i>D. pulchellum</i>	Al	L	<0,5	+	Br	Pu	Le	Tr
12.1	<i>D. pulchellum</i>	Al	L	<0,5	+	Br	Pu	Pl	Op
13.1	<i>D. pulchellum</i>	Al	L	<0,5	+	Br	Pu	Le	Tr
14.1	<i>D. pulchellum</i>	Al	L	<0,5	+	Br	Ci	Co	Op

Legenda: pH: Ac (ácido), Al (alcalino). Crescimento: R (rápido), L (lento). Muco: (+) pouco, (++) médio, (+++) muito. Cor: Br (branca), Cr (creme). Forma: Ci (circular), Pu (puntiforme). Elevação: Le (lenticular), Co (convexa), Pl (Plana). Transparência: Tr (translúcida), Op (opaca).

Quadro 2: Características morfológicas de isolados de nódulos de caule de *Discolobium* spp., crescendo em meio de extrato de levedura com manitol à 28° C.

Ident.	Hospedeiro	pH	Cres.	Ø (mm)	muco	cor	Forma	Elevação	Trans.
1.2	<i>D. pulchellum</i>	Al	L	<0,5	+	Br	Pu	Pl	Tr
2.2	<i>D. pulchellum</i>	Ac	R	1,0	++	Br	Ci	Le	Op
3.2	<i>D. pulchellum</i>	Ac	R	2,0	+++	Br	Ci	Co	Tr
4.2	<i>D. pulchellum</i>	Ac	R	2,0	+++	Br	Ci	Le	Tr
5.2	<i>D. pulchellum</i>	Ac	R	3,0	+++	Cr	Ci	Co	Tr
6.2	<i>D. pulchellum</i>	Ac	R	0,5	+	Br	Pu	Pl	Tr
7.2	<i>D. pulchellum</i>	Al	L	0,5	++	Br	Pu	Pl	Tr
8.2	<i>D. pulchellum</i>	Al	L	0,5	+	Br	Pu	Le	Tr
9.2	<i>D. pulchellum</i>	Al	L	1,0	++	Br	Ci	Le	Op
10.2	<i>D. pulchellum</i>	Al	L	<0,5	+	Br	Pu	Le	Op
11.2	<i>D. pulchellum</i>	Al	R	1,0	+++	Br	Ci	Co	Op
12.2	<i>D. psoraleaefolium</i>	Al	L	<0,5	++	Br	Pu	Pl	Op
13.2	<i>D. psoraleaefolium</i>	Al	R	<0,5	+	Cr	Pu	Pl	Tr

Legenda: pH: Ac (ácido), Al (alcalino). Crescimento: R (rápido), L (lento). Muco: (+) pouco, (++) médio, (+++) muito. Cor: Br (branca), Cr (creme). Forma: Ci (circular), Pu (puntiforme). Elevação: Le (lenticular), Co (convexa), Pl (Plana). Transparência: Tr (translúcida), Op (opaca).

Dos 13 isolados de nódulos de caule, 39%, 39% e 23% foram capazes de crescer respectivamente nas concentrações de 1, 2 e 3% de NaCl, ao passo que nos isolados de raiz, somente 18% e 12% cresceram na concentração de 1 e 2% respectivamente, e nenhum isolado de raiz foi capaz de crescer em meio contendo NaCl 3% (Figura III.1).

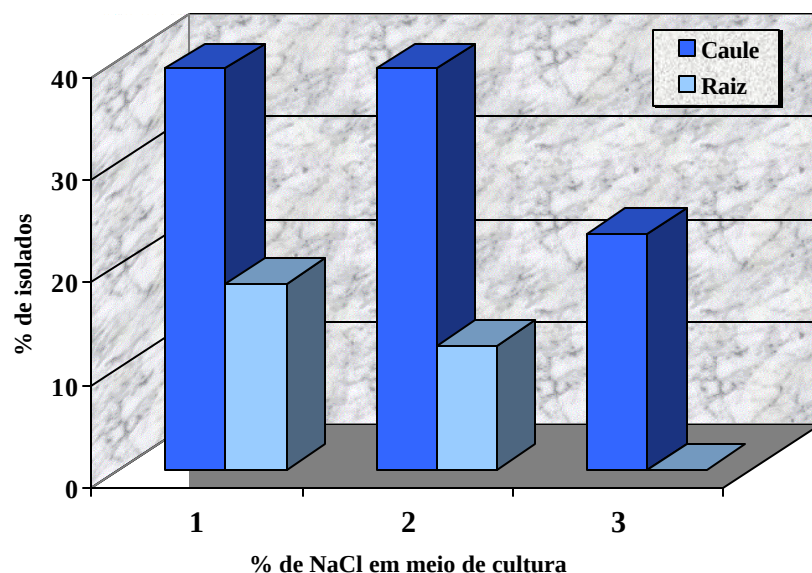


Figura III.1- Porcentagem de isolados de nódulos de caule e raiz de *Discolobium* spp., tolerantes aos níveis crescentes de NaCl.

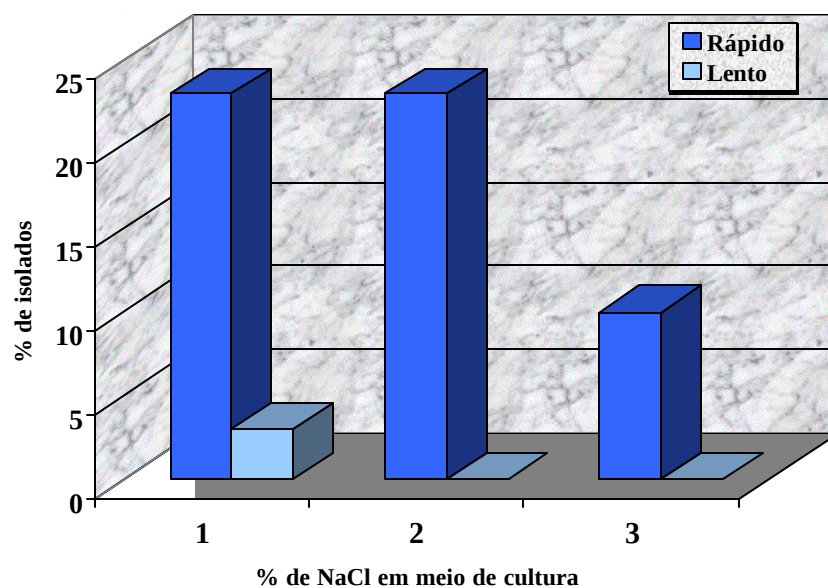


Figura III.2- Porcentagem de isolados de nódulos de caule e raiz de *Discolobium* spp., tolerantes aos níveis crescentes de NaCl de acordo com a velocidade de crescimento.

Isolados de crescimento rápido mostraram-se mais tolerantes as crescentes concentrações salinas do que os de crescimento lento. Nas concentrações de 2 e 3%, somente os isolados de crescimento rápido foram capazes de crescer (Figura III.2). Martins (1996), encontrou resultados similares para isolados de caupi, demonstrando uma tendência a maior resistência à salinidade de isolados de crescimento rápido que acidificam o meio. Jenkins *et al.* (1989) observou padrão de distribuição para rizóbio de crescimento rápido e lento de acordo com a salinidade do solo, concluindo que os rizóbios de crescimento rápido apresentavam maior população em áreas salinas.

Nenhum dos isolados testados foi capaz de crescer em meio YMA à temperatura de 42°C. À temperatura de 39°C, 62% dos isolados de nódulos de caule e 12% dos isolados de nódulos de raiz apresentaram crescimento (Figura III.3), sendo que os isolados de crescimento rápido foram mais tolerantes ao estresse de temperaturas altas que os de crescimento lento. Estes resultados estão de acordo com Sprent (1994) que sugere que rizóbios de crescimento rápido sobrevivem melhor às condições adversas do ambiente.

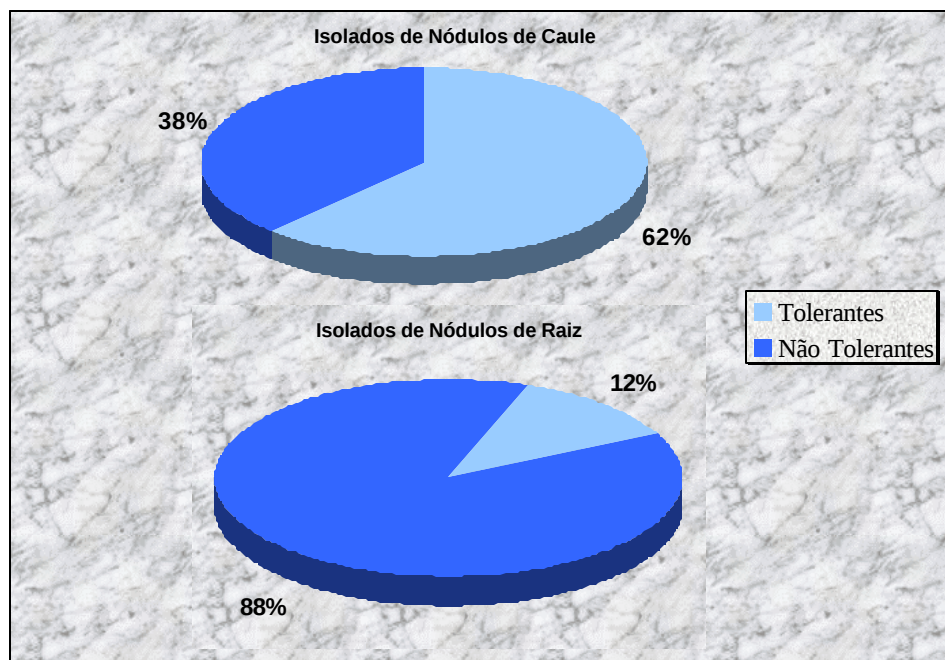


Figura III.3 -Porcentagem de isolados de nódulos de caule e raiz de *Discolobium* spp., tolerantes à temperatura de 39°C.

Loureiro (1994) avaliou 28 estirpes de *A. fluminensis* isoladas do Pantanal Mato-Grossense (Poconé e Nhecolândia), em relação à salinidade (NaCl 2%) e tolerância a temperaturas altas (40°C). Os resultados obtidos demonstraram que a grande maioria das estirpes demonstrou ser resistente às condições de elevada temperatura, assim como à elevada concentração salina. Em relação ao pH em meio YMA, a maioria das estirpes testadas (89%) eram produtoras de álcali. E todas as estirpes isoladas de nódulos de raiz e caule de *A. fluminensis* apresentaram crescimento rápido, independente da característica de acidificar ou

alcalinizar o meio YMA. Segundo Ladha *et al.* (1992b) a estirpe ORS 571 isolada de *S. rostrata* apresentou habilidade de fixar nitrogênio em temperaturas elevadas.

A morfologia das colônias foi utilizada por Jenkins *et al.* (1989) para caracterizar a população rizobial em diferentes ecossistemas e em diferentes profundidades do solo. A caracterização dos isolados de nódulos de caule e raiz de *Discolobium* de acordo com a morfologia das colônias, permitiu encontrar diferenças que foram utilizadas para o agrupamento dos mesmos. Os nódulos de raiz foram divididos em três grupos: a)Grupo 1- isolados que alcalinizavam o meio e apresentavam crescimento lento; b)Grupo 2- isolados que acidificavam o meio e apresentavam crescimento lento e c)Grupo 3- isolados que acidificavam o meio e apresentavam crescimento rápido.

Os nódulos de caule assim como os de raiz, também foram divididos em três grupos: a)Grupo 1- isolados que alcalinizavam o meio e apresentavam crescimento lento; b)Grupo 2- isolados que alcalinizavam o meio e apresentavam crescimento rápido e c) Grupo 3- isolados que acidificavam o meio e apresentavam crescimento rápido.

IV-EFICIÊNCIA DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO DE ISOLADOS DE NÓDULOS DE RAIZ E CAULE DE *Discolobium* spp.

IV.1- INTRODUÇÃO

Na família Leguminosae várias espécies formam simbiose com bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* e *Azorhizobium* coletivamente chamadas de rizóbios, formando nódulos nas raízes e em algumas espécies no caule, fornecendo à bactéria fotossintatos e recebendo em troca produtos nitrogenados. Esta simbiose representa o sistema fixador de N de maior importância para a agricultura e por isso, os rizóbios tem sido dentre os microrganismos diazotróficos, os mais estudados (Neves & Rumjanek, 1996). Além da importância econômica da fixação biológica de nitrogênio, ressalta-se sua importância ecológica, pois essa simbiose permite que leguminosas colonizem áreas pobres em nitrogênio, que serão enriquecidas pela transferência do nitrogênio fixado para o solo (Ladha *et al.*, 1992a).

As espécies que nodulam o caule são hidrófitas tropicais ou subtropicais, de pântanos e rios ou margens de lagos (Dreyfus & Dommergues, 1981; Eaglesham

& Szalay, 1983; Ladha *et al.*, 1992a ; Loureiro *et al.*, 1994, 1995; Boivin *et al.*, 1997) com várias espécies ocorrendo no Pantanal Mato-Grossense.

A nodulação no caule destas espécies é uma adaptação evolucionária às condições de alagamento (Stegink & Vaughn, 1988; James *et al.*, 1992a, 1992 b; Pugh *et al.*, 1995), como as observadas no Pantanal.

Nas espécies *Discolobium pulchellum* e *D. psoraleaefolium*, foram observados nódulos em raiz e caule em áreas alagadas do Pantanal Mato-Grossense (Loureiro *et al.*, 1994). Estas espécies apresentam ampla distribuição no Pantanal, tem alto teor de proteína bruta e são comidas por animais (Allem & Valls, 1987; Pott, 1988; EMBRAPA/CPAP, 1996), apresentando um potencial forrageiro que deve ser explorado na região. Além disso, o enriquecimento das pastagens com estas espécies de leguminosas associadas a estirpes de *Rhizobium* comprovadamente eficientes, poderá beneficiar o crescimento das gramíneas, sendo mais apropriado ao Pantanal do que a simples aplicação de adubos nitrogenados, já que o regime hídrico da região compromete a eficácia do emprego de fertilizantes minerais devido à facilidade de sua diluição, carreamento e lixiviação. Devido ao grande potencial que o gênero *Discolobium* spp. representa para a região do Pantanal Mato-Grossense durante o período alagado, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da fixação biológica de nitrogênio de isolados de nódulos de raiz e caule.

IV.2.MATERIAL E MÉTODOS

- Crescimento da planta e inoculação

As sementes de *D. pulchellum* foram obtidas de tanques mantidos na Embrapa Agrobiologia, onde as sementes eram protegidas utilizando-se sacos de filó. Estas foram germinadas em solução nutritiva de Norris (1965) e agar após escarificação em H_2SO_4 por cinco minutos e esterilização em hipoclorito de sódio 5%, e mantidas em incubadora a 28°C.

As plântulas foram transferidas para caixa tipo plantágil contendo um substrato esterilizado em autoclave, composto de solo Podzólico Vermelho Amarelo e vermiculita, na proporção 3:1 (v/v), suplementado com 5 gramas de fosfato de rocha para cada 3kg de substrato, e mantidas em casa de vegetação. Ao atingirem 10 cm as plantas foram transferidas para vasos de cultivo contendo 400g do mesmo substrato descrito anteriormente, e estes foram colocados em recipientes de 2 litros com água destilada, e mantidos em casa de vegetação. Estes recipientes foram pintados com tinta alumínio visando minimizar a penetração de luz, evitando-se com isso o crescimento de algas. As plantas foram mantidas sob condições de inundação durante todo o período do experimento.

Isolados selecionados aleatoriamente dentro de cada grupo formado a partir da caracterização morfológica, foram testados quanto à capacidade de nodulação em caule e raiz e potencial de fixação biológica de nitrogênio em *Discolobium pulchellum*. Os agrupamentos foram utilizados no trabalho da seguinte forma:

- Nódulos de raiz

Grupo 1- isolados que alcalinizavam o meio e apresentavam crescimento lento.

Grupo 2- isolados que acidificavam o meio e apresentavam crescimento lento.

Grupo 3- isolados que acidificavam o meio e apresentavam crescimento rápido.

- Nódulos de caule

Grupo 1- isolados que alcalinizavam o meio e apresentavam crescimento lento.

Grupo 2- isolados que alcalinizavam o meio e apresentavam crescimento rápido.

Grupo 3- isolados que acidificavam o meio e apresentavam crescimento rápido.

As raízes foram inoculadas, com cada um dos isolados detalhados na Tabela IV.1, sendo adicionado em cada vaso 1 mL de cultura crescida em meio extrato levedura e manitol a 28° C, sob agitação. Os caules de todas as plantas foram inoculados, através do pincelamento com algodão estéril embebido na cultura. Foram usadas estirpes controles de cada um dos gêneros: *Rhizobium* (BR 10026), *Bradyrhizobium* (BR 29) e *Azorhizobium* (BR 5410) e a estirpe fotossintetizante BTAi1. O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso com 4

repetições, nos seguintes tratamentos : 6 estirpes isoladas de nódulos de raiz; 6 isoladas de nódulos de caule, 4 padrões (BTai1; BR10026; BR 29 e BR 5410), testemunha absoluta (sem inoculação e sem nitrogênio) e testemunha nitrogenada (sem inoculação, com adição de 10mg N/planta/semana, na forma de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

A coleta das plantas foi realizada 90 dias após o plantio e foram avaliados os seguintes parâmetros: peso da parte aérea seca, peso de raízes seca, peso de nódulos secos, atividade da redução de acetileno. A atividade da nitrogenase foi medida através da redução de acetileno (ARA) descrito por Hardy *et al.* (1968). Após a medição de ARA os nódulos foram destacados, secos em estufa à 60°C e posteriormente pesados.

A análise da variância foi realizada usando o programa MSTAT-C e o Teste de Tukey foi utilizado para determinar as diferenças significativas entre os tratamentos

Tabela IV.1- Identificação dos isolados de rizóbio, planta hospedeira e tipo de nódulo

Identificação	Planta hospedeira	Tipo de nódulo
4.1	<i>D. pulchellum</i>	Raiz
8.1	<i>D. pulchellum</i>	Raiz
9.1	<i>D. pulchellum</i>	Raiz
14.1	<i>D. pulchellum</i>	Raiz
3.1	<i>D. pulchellum</i>	Raiz
6.1	<i>D. pulchellum</i>	Raiz
9.2	<i>D. pulchellum</i>	Caule
12.2	<i>D. psoraleaefolium</i>	Caule
11.2	<i>D. pulchellum</i>	Caule
13.2	<i>D. psoraleaefolium</i>	Caule
5.2	<i>D. pulchellum</i>	Caule
6.2	<i>D. pulchellum</i>	Caule
<i>Rhizobium etli</i> (BR 10026)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Raiz
<i>B. elkani</i> (BR 29)	<i>Glycine max</i>	Raiz
<i>A. caulinodans</i> (BR 5410)	<i>Sesbania rostrata</i>	Caule
BTAi1	<i>Aeschynomene indica</i>	Caule

IV.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os nódulos caulinares formaram-se somente nas partes submersas das plantas inundadas, como já havia sido observado por Loureiro (1994). A maior produção de parte aérea seca foi obtida com os isolados 4.1, 8.1, 3.1, 9.2, 12.2 sendo estes isolados de crescimento lento que alcalinizaram o meio, com exceção do isolado 3.1 que apresentou crescimento lento e acidificou o meio (Figura IV.1). O maior teor de N total da parte aérea seca e massa de raiz seca foi obtida pelos mesmos isolados que apresentaram maior produção de massa de parte aérea seca (Figura IV.1, IV.2 e IV.3)

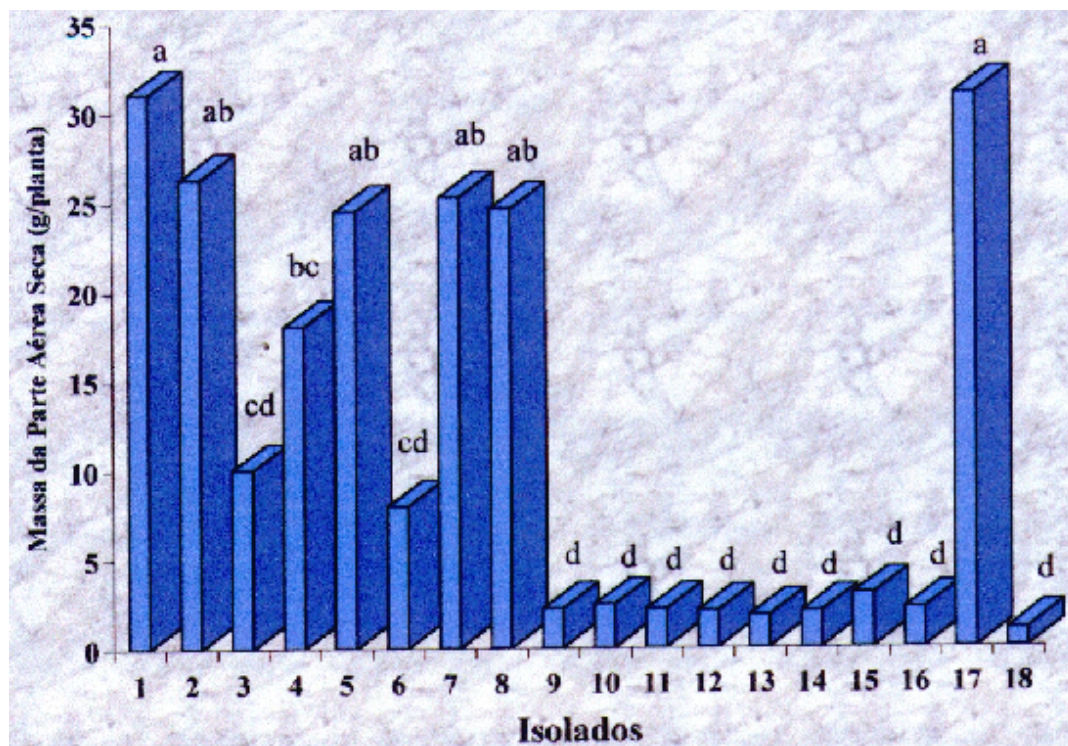


Figura IV.1 - Massa da parte aérea seca de *D. pulchellum* em resposta à inoculação com estirpes de rizóbio em condições de inundação. As médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente ($p \leq 0,05$), pelo teste de Tukey. $cv = 37,59\%$. Isolados: 1(4.1), 2(8.1), 3(9.1), 4(14.1), 5(3.1), 6(6.1), 7(9.2), 8(12.2), 9(11.2), 10(13.2), 11(5.2), 12(6.2), 13(*Rhizobium*), 14(*Bradyrhizobium*), 15(*Azorhizobium*), 16(BTAi1), 17(Testemunha nitrogenada), 18(Testemunha absoluta).

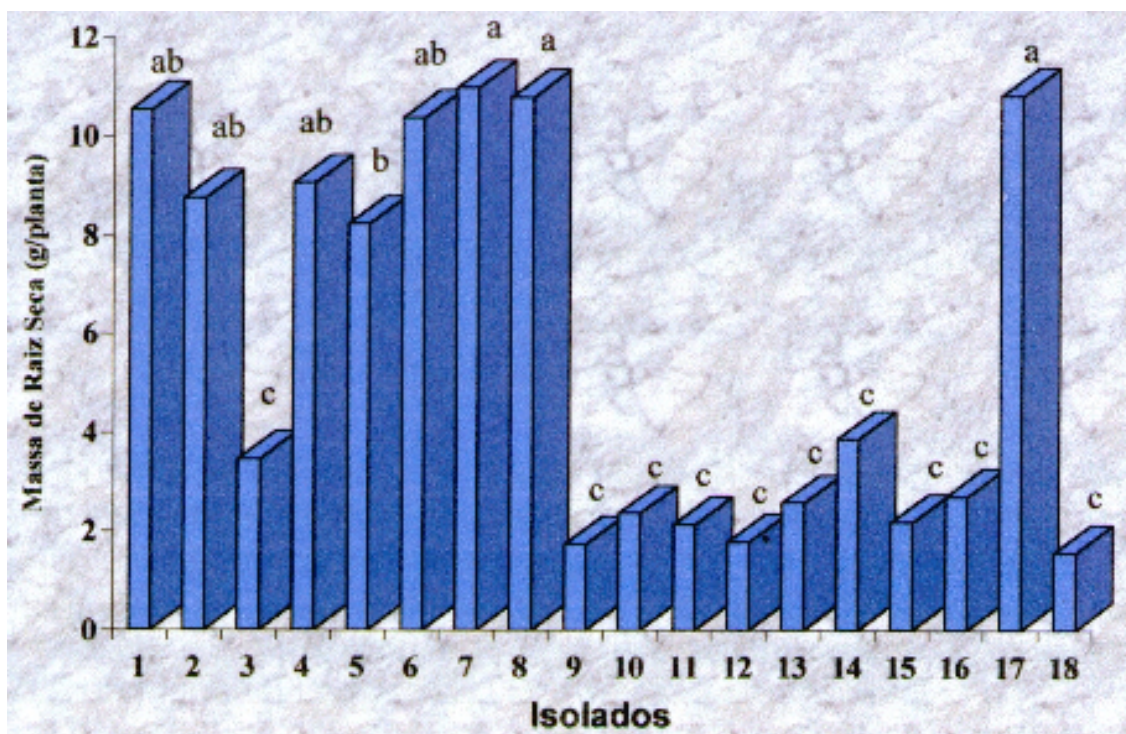


Figura IV.2 - Massa de raiz seca de *D. pulchellum* em resposta à inoculação com estirpes de rizóbio em condições de inundação. As médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente ($p \leq 0,05$), pelo teste de Tukey. cv = 16,68%. Isolados: 1(4.1), 2(8.1), 3(9.1), 4(14.1), 5(3.1), 6(6.1), 7(9.2), 8(12.2), 9(11.2), 10(13.2), 11(5.2), 12(6.2), 13(*Rhizobium*), 14(*Bradyrhizobium*), 15(*Azorhizobium*), 16(BTAi1), 17(Testemunha nitrogenada), 18(Testemunha absoluta).

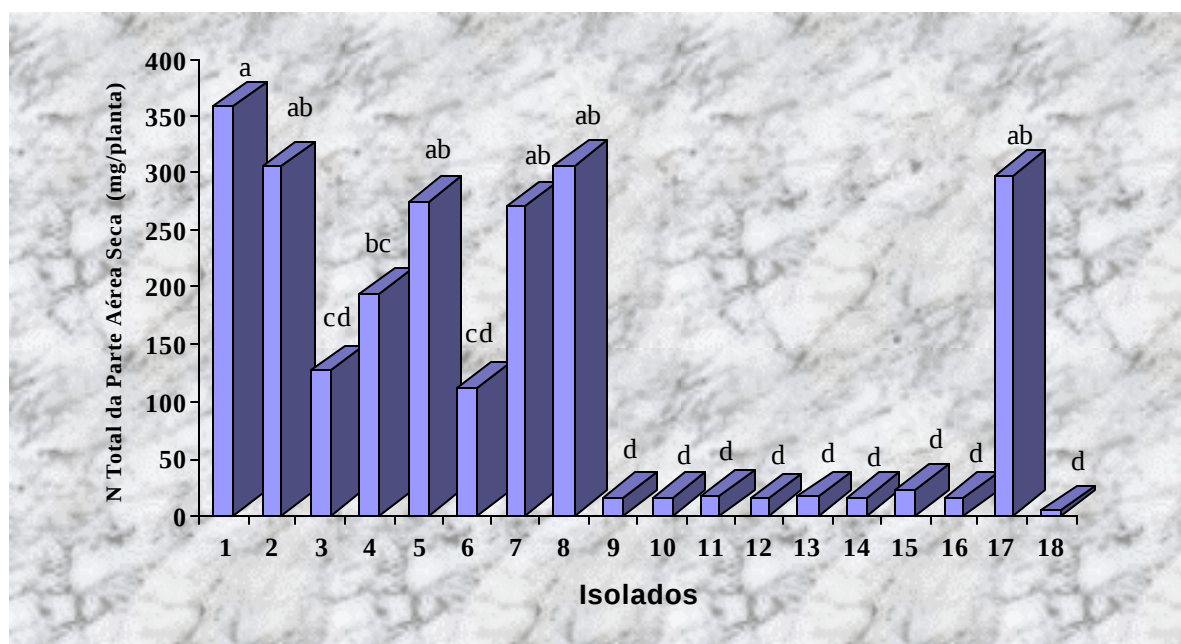


Figura IV.3 - N total acumulado na parte aérea de *D. pulchellum* em resposta à inoculação com estirpes de rizóbio em condições de inundação. As médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente ($p \leq 0,05$), pelo teste de Tukey. cv = 35,27%. Isolados: 1(4.1), 2(8.1), 3(9.1), 4(14.1), 5(3.1), 6(6.1), 7(9.2), 8(12.2), 9(11.2), 10(13.2), 11(5.2), 12(6.2), 13(*Rhizobium*), 14(*Bradyrhizobium*), 15(*Azorhizobium*), 16(BTAi1), 17(Testemunha nitrogenada), 18(Testemunha absoluta).

O isolado 12.2 obtido de *Discolobium psoraleaeefolium* apresentou produção de matéria seca similar à obtida com os melhores isolados de *D. pulchellum* (Figura IV.1). Como os isolados de *D. pulchellum* com maiores produções de matéria seca de parte aérea, este isolado apresenta característica de crescimento lento e alcalinizar o meio YMA. O outro isolado testado oriundo de *D. psoraleaeefolium* identificado como 13.2 não apresentou boa produção de matéria

seca, sendo este isolado pertencente ao grupo de crescimento rápido que alcaliniza o meio YMA.

Os isolados de nódulos de caule pertencentes ao grupo 1 e 2, que apresentavam características de crescimento rápido, sendo que os isolados do grupo 1 alcalinizavam o meio e os do grupo 2 acidificavam, apresentaram produção de massa da parte aérea seca e massa de raiz seca não diferindo significativamente da obtida pela testemunha absoluta (Figura IV.1 e IV.2). O mesmo comportamento foi observado para o isolado de nódulo de raiz 9.1, apesar deste isolado apresentar características de crescimento lento e alcalinizar o meio.

Os resultados mostraram que os rizóbios de crescimento lento que alcalinizam o meio YMA formaram simbiose eficiente, e que os rizóbios de crescimento rápido produzindo ácido foram ineficientes. Apesar do meio de cultura ser absolutamente diferente do solo, estes resultados fortalecem a hipótese de Norris (1965), em que o rizóbio produtor de base que apresenta crescimento lento parece ter co-evoluído com leguminosas de origem tropical. Sendo os solos tropicais tipicamente ácidos, é possível que a habilidade de alcalinizar o meio de cultura represente uma vantagem seletiva em condições de campo (Martins, 1996). Entretanto, as estirpes que alcalinizam o meio mas são de crescimento rápido foram ineficientes.

Estirpes de *Rhizobium* com baixa especificidade simbiótica são mais comuns nos trópicos do que em regiões temperadas do mundo. Esse grupo heterogêneo de rizóbio é caracterizado por um alto nível de promiscuidade simbiótica, e se caracterizam por ter crescimento lento e produção de álcali

(Martins, 1996). Segundo Sprent (1994) estirpes de crescimento rápido são mais comuns em regiões áridas, onde a maior eficiência na fixação biológica de nitrogênio não é a prioridade e sim a sobrevivência no solo.

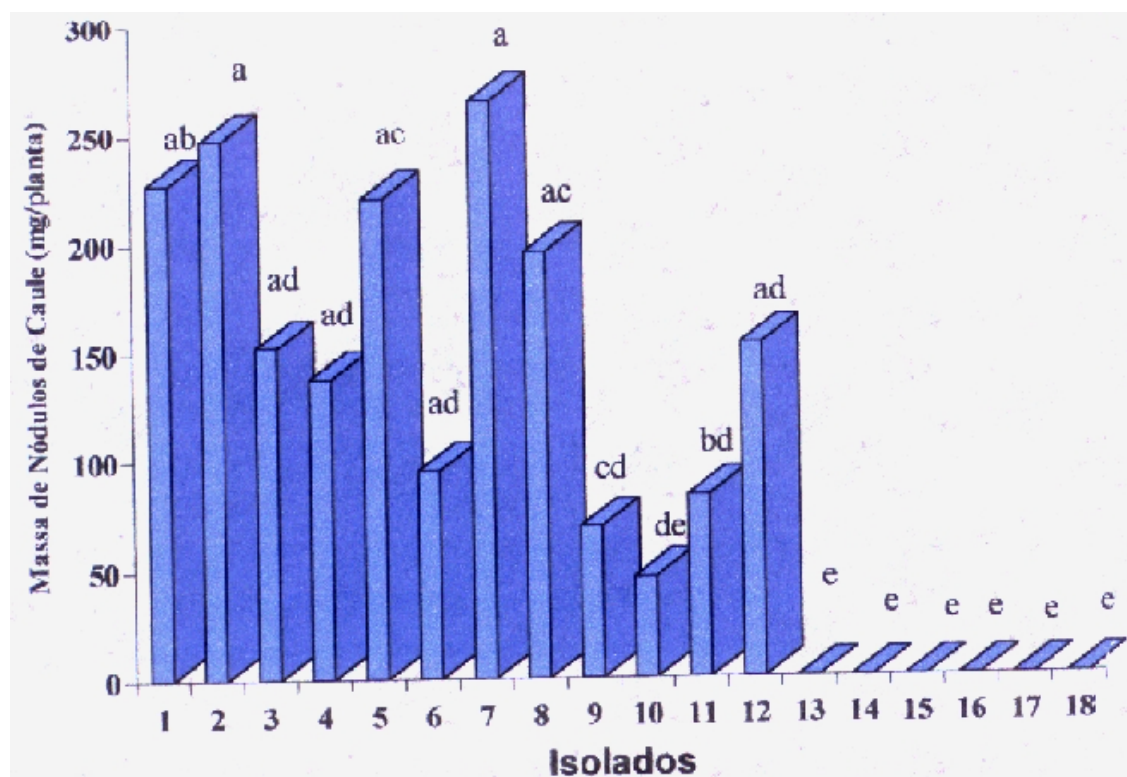


Figura IV.4 – Produção de nódulos em caule de *D. pulchellum* em resposta à inoculação com estirpes de rizóbio em condições de inundação. As médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente ($p \leq 0,05$), pelo teste de Tukey, sendo que ac, bd, ad, correspondem respectivamente a: abc, bcd, abcd. cv = 30,67%. Isolados: 1(4.1), 2(8.1), 3(9.1), 4(14.1), 5(3.1), 6(6.1), 7(9.2), 8(12.2), 9(11.2), 10(13.2), 11(5.2), 12(6.2), 13(*Rhizobium*), 14(*Bradyrhizobium*), 15(*Azorhizobium*), 16(BTAi1), 17(Testemunha nitrogenada), 18(Testemunha absoluta).

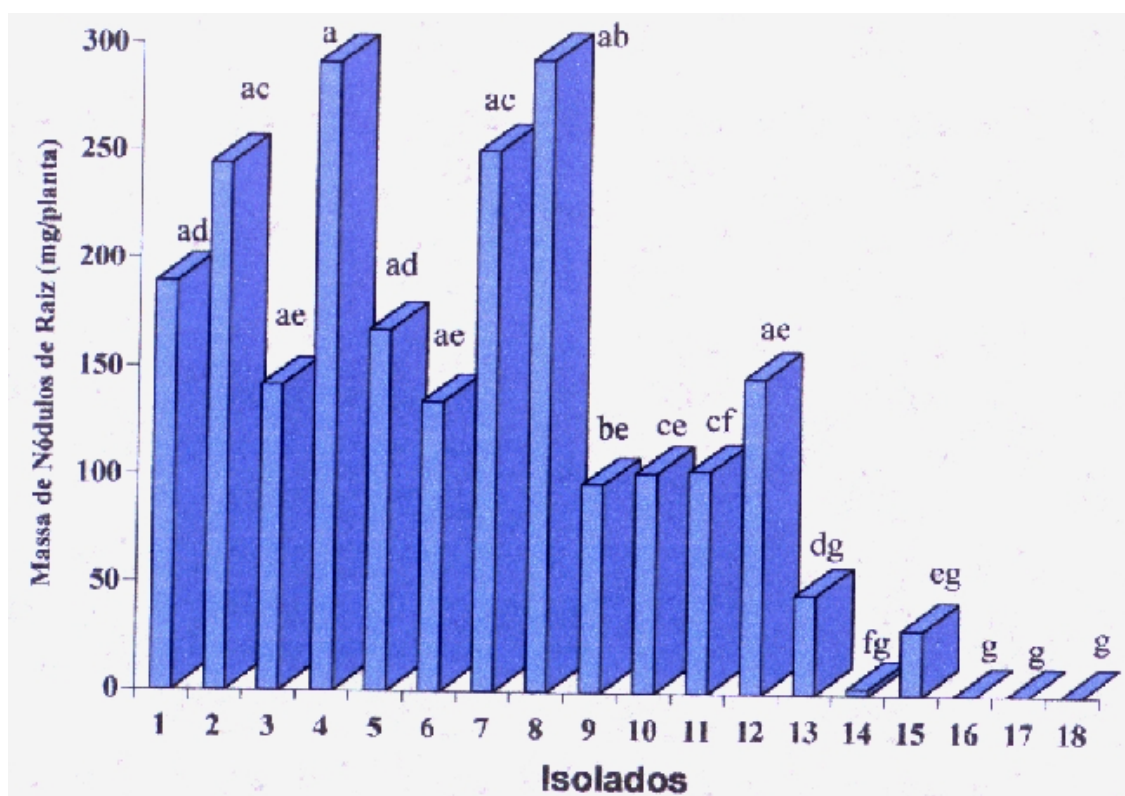


Figura IV.5 – Produção de nódulos em raiz de *D. pulchellum* em resposta à inoculação com estirpes de rizóbio em condições de inundação. As médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente ($p \leq 0,05$), pelo teste de Tukey, sendo que ac, ad, ae, be, ce, cf, dg, eg, correspondem respectivamente a: abc, abcd, abcde, bcde, cde, cdefg, defg, efg. cv = 28,58%. Legenda: 1(4.1), 2(8.1), 3(9.1), 4(14.1), 5(3.1), 6(6.1), 7(9.2), 8(12.2), 9(11.2), 10(13.2), 11(5.2), 12(6.2), 13(*Rhizobium*), 14(*Bradyrhizobium*), 15(*Azorhizobium*), 16(BTAi1), 17(Testemunha nitrogenada), 18(Testemunha absoluta).

As plantas inoculadas com *Rhizobium etli*, *Bradyrhizobium elkani*, *Azorhizobium caulinodans* e a estirpe fotossintetizante BTAi1 não produziram nódulos em caule de *D. pulchellum*, em condições de inundação (Figura IV.4). Escassa nodulação nas raízes foram obtidas por *Rhizobium etli*, *Bradyrhizobium elkani* e *Azorhizobium caulinodans* (Figura IV.5). A produção de massa de parte aérea seca e massa de raiz seca destas estirpes não diferiu da testemunha absoluta (Figura IV.1 e IV.2).

Loureiro (1994) avaliando o efeito da inundação no processo de nodulação de *Aeschynomene fluminensis* em condições de inundação, observou a produção de nódulos radiculares e caulinares em plantas inoculadas com *Rhizobium etli*, *Bradyrhizobium elkani* e *Azorhizobium caulinodans*.

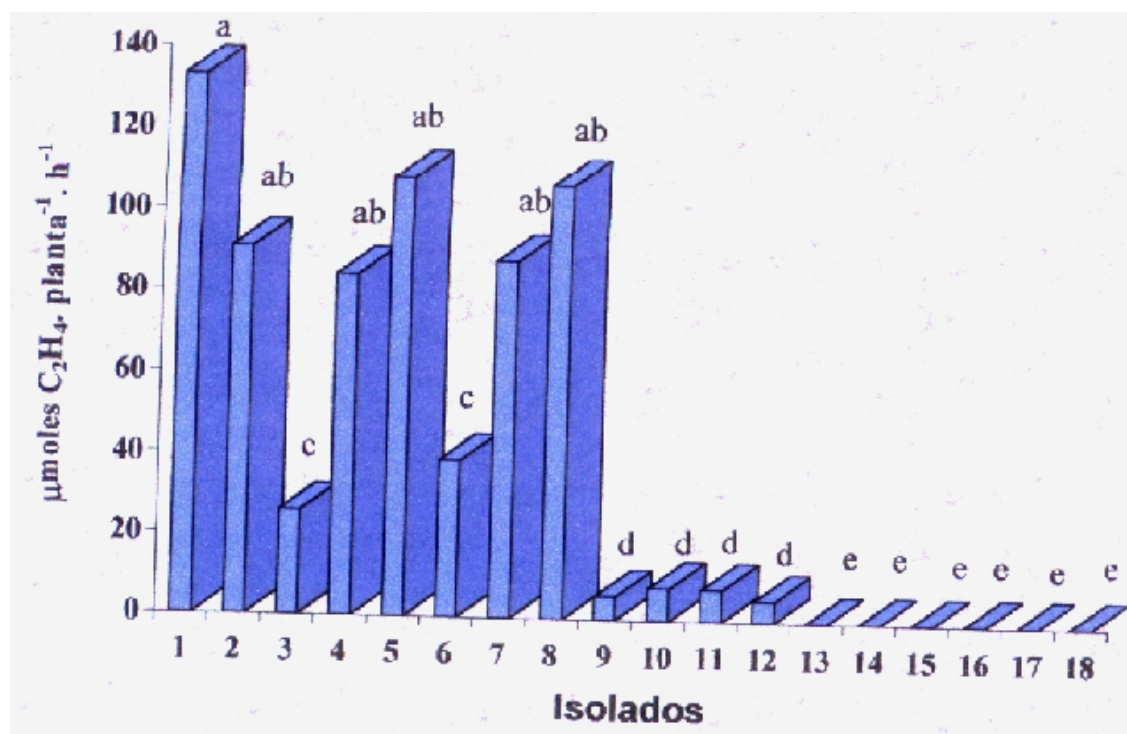


Figura IV.6 – Atividade da nitrogenase de nódulos de caule em resposta à inoculação com estirpes de rizóbio em condições de inundação. As médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente ($p \leq 0,05$), pelo teste de Tukey.cv = 73%. Legenda: 1(4.1), 2(8.1), 3(9.1), 4(14.1), 5(3.1), 6(6.1), 7(9.2), 8(12.2), 9(11.2), 10(13.2), 11(5.2), 12(6.2), 13(*Rhizobium*), 14(*Bradyrhizobium*), 15(*Azorhizobium*), 16(BTAi1), 17(Testemunha nitrogenada), 18(Testemunha absoluta).

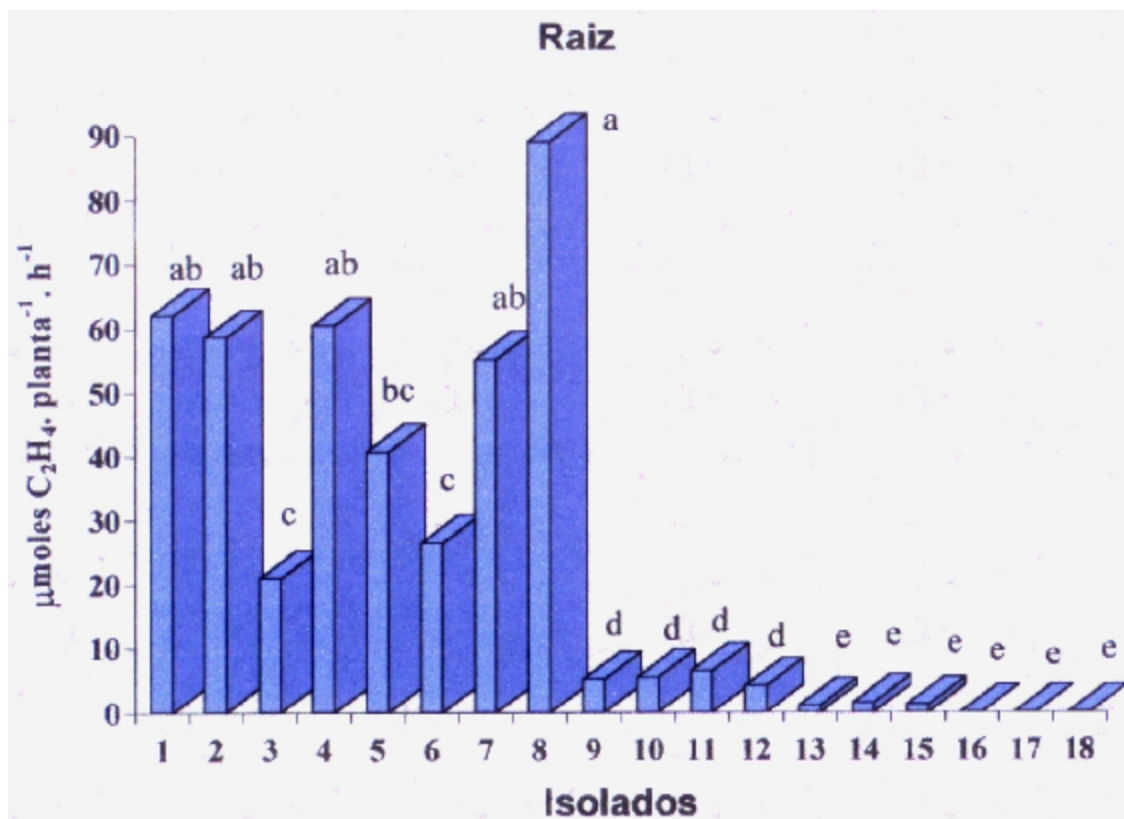


Figura IV.7 – Atividade da nitrogenase de nódulos de raiz em resposta à inoculação com estirpes de rizóbio em condições de inundação. As médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente ($p \leq 0,05$), pelo teste de Tukey.cv = 65%. Legenda: 1(4.1), 2(8.1), 3(9.1), 4(14.1), 5(3.1), 6(6.1), 7(9.2), 8(12.2), 9(11.2), 10(13.2), 11(5.2), 12(6.2), 13(*Rhizobium*), 14(*Bradyrhizobium*), 15(*Azorhizobium*), 16(BTAi1), 17(Testemunha nitrogenada), 18(Testemunha absoluta).

Os resultados obtidos mostraram que isolados de nódulos de caule ou raiz de *D. pulchellum* e *D. psoraleaeifolium* nodularam caule e raiz de *D. pulchellum*. A produção de massa de nódulos secos de caule e raiz foi muito similar dentro de cada isolado (Figura IV.4 e Figura IV.5). A maior produção de massa seca de nódulos de caule dos isolados 4.1, 8.1, 3.1, 9.2, 12.2 e 6.2 também foram obtidas em relação á produção de massa seca de nódulos de raiz.

A avaliação da atividade da nitrogenase através da redução de acetileno mostrou que os maiores valores foram observados nos isolados crescimento lento que alcalinizam o meio, tanto em nódulos de caule como em nódulos de raiz (Figura IV.6 e IV.7). Apesar do método de redução de acetileno para medição da atividade de nitrogenase descrito por Hardy *et al.* (1968) poder subestimar os dados pela redução da permeabilidade dos nódulos ao oxigênio (Minchin *et al.*, 1983), o objetivo da avaliação da atividade da nitrogenase no trabalho foi avaliar os isolados potencialmente ativos em fixar N₂ atmosférico.

Também foi observado por Alazard, (1985) e Dreyfus *et al.*, (1988) que rizóbios isolados de nódulos do caule ou raiz de *Sesbania* e *Aeschynomene* possuem a habilidade de produzir dupla nodulação. Entretanto, *Rhizobium* específico que nodula raiz, incapaz de nodular caule também foi relatado (Dreyfus *et al.*, 1984).

Ladha *et al.*, (1992a) realizaram trabalhos para a avaliação da contribuição da fixação biológica de nitrogênio em nódulos de caule de *S. rostrata* em presença e ausência de nódulos de raiz. Os resultados sugeriram que a dupla nodulação encontra um balanço em competição por energia, que é controlado pela nodulação do caule. Esta conclusão baseia-se no fato que *S. rostrata* com nódulos radiculares desenvolve, através da inoculação, nódulos no caule, não ocorrendo aumento de peso dos nódulos radiculares e na atividade da nitrogenase. Porém, os nódulos radiculares e a atividade da nitrogenase são recuperados quando os nódulos de caule são removidos.

A vantagem dos nódulos de caule deve-se provavelmente, à proximidade do aparato fotossintético, o nódulo de caule pode controlar o suprimento de fotossintatos para os nódulos de raiz e determinar sua longevidade e atividade (Ladha *et al.*, 1992 b).

Pode-se concluir que os isolados de rizóbio com crescimento lento que alcalinizam o meio YMA formaram simbiose eficiente, e que os isolados de rizóbio de crescimento rápido produzindo ácido em meio YMA, foram ineficientes em *D. pulchellum*. Os isolados de nódulos de raiz e caule de *D. pulchellum* e *D. psoraleaefolium* nodularam caule e raiz, com simbiose eficiente em *D. pulchellum*, em condições de inundação.

V- FORMAÇÃO DE NÓDULOS CAULINARES EM *Discolobium pulchellum*

V.1-INTRODUÇÃO

Discolobium pulchellum é uma espécie nativa do Pantanal Mato-Grossense que em associação com rizóbio é capaz de fixar nitrogênio. Como já havia sido relatado para os gêneros *Sesbania* e *Aeschynomene*, as espécies do gênero *Discolobium* spp formam nódulos caulinares, que assim como os radiculares, são capazes de fixar nitrogênio (Dreyfus & Dommergues, 1981; Eaglesham & Szalay, 1983; Loureiro *et al.*, 1994). Normalmente estas espécies são encontradas em regiões de pântanos e áreas inundadas, e apresentam uma série de características peculiares à sua formação, estrutura e desenvolvimento de nódulos caulinares (Boivin *et al.*, 1997; Ladha *et al.*, 1992 a; Loureiro *et al.*, 1994).

A nodulação no caule ocorre em sítios predeterminados, que são na verdade primórdios dormentes de raízes adventícias (Tsien *et al.*, 1983). Esses primórdios, que assumem uma organização típica no caule, são induzidos a formação de raízes quando o caule é imerso em água (Duhoux *et al.*, 1984; Eaglesham & Szalay, 1983). O primórdio é constituído basicamente por meristema

na região distal, em feixe vascular no centro rodeado por células corticais altamente vacuoladas e uma fissura na periferia, causada pelo rompimento da epiderme durante o desenvolvimento do primórdio caular. As bactérias encontram-se nessa fissura que representa um ambiente ideal para o início de desenvolvimento da infecção. Após a infecção o movimento subsequente das bactérias pode ser intercelular, pela digestão da lamela média, via espaços intercelulares ou através das células quando então as bactérias ficam confinadas pela planta hospedeira em cordões de infecção formados por material da parede celular (Dart, 1977).

Os nódulos formados por rizóbio entre diversas espécies de leguminosas apresentam algumas diferenças quanto ao ponto de vista morfológico e funcional. A morfologia dos nódulos é determinada pelo hospedeiro e não pela bactéria. Dois tipos básicos de nódulos podem ser formados: o de crescimento indeterminado e o de crescimento determinado.

O nódulo indeterminado é caracterizado pela persistência de uma região meristemática. Como o meristema está localizado na região distal do nódulo, no decorrer do desenvolvimento ele adquire um formato alongado, onde as células meristemáticas dão origem a células que serão infectadas. O nódulo determinado apresenta meristema não persistente, estando somente presente durante o início de desenvolvimento. Deste modo, o nódulo determinado assume um formato esférico e o seu crescimento fica restrito ao aumento do volume celular (Ferreira, 1997).

O objetivo deste trabalho foi o estudo do desenvolvimento do nódulo caulinar de *Discolobium pulchellum* através da microscopia ótica.

V.2- MATERIAL E MÉTODOS

- Crescimento da planta e inoculação

As sementes de *D. pulchellum* foram obtidas de tanques mantidos na Embrapa/Agrobiologia, onde eram protegidas utilizando-se sacos de filó. Estas foram germinadas em solução nutritiva de Norris (1965) e agar após escarificação em H_2SO_4 por cinco minutos e esterelização em hipoclorito de sódio 5%, lavadas e mantidas em sala de incubação.

As plântulas foram transferidas para caixa tipo plantágil com células de $100cm^3$ contendo um substrato esterelizado composto de solo Podzólico vermelho amarelo e vermiculita, na proporção 3:1 (v/v), suplementado com 5 gramas de fosfato de rocha para cada 3kg de substrato, e mantidas em casa de vegetação. Ao atingirem 10 cm as plantas foram transferidas para vasos de cultivo contendo 400g do mesmo substrato descrito anteriormente, e estes foram colocados em recipientes de 2 litros com água destilada, e mantidos em casa de vegetação. Estes recipientes foram pintados com tinta alumínio visando minimizar a penetração de luz, evitando-se com isso o crescimento de algas.

As raízes foram inoculadas, com um isolado oriundo de nódulos de caule de *Discolobium pulchellum*, sendo adicionado em cada vaso 1 mL de cultura crescida em meio de extrato levedura e manitol a 28° C, sob agitação (Vincent, 1970). Os caules de todas as plantas foram inoculados, através do pincelamento com algodão estéril embebido na cultura, a inoculação do caule foi realizada somente após a formação de aerênquima. Foi realizado o monitoramento diário das plantas, e coleta de nódulos em diferentes estágios de desenvolvimento.

- Preparo do material para microscopia ótica

O material para microscopia ótica foi preparado de acordo com James *et al.*, (1992a). As amostras foram cortadas em pequenos pedaços sobre placa de parafina onde adicionou-se tampão fosfato. Os segmentos foram lavados em solução tampão fosfato 50mM (pH7,0) e fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato por 24 horas. Em seguida as amostras foram lavadas por três vezes em tampão fosfato para remoção do glutaraldeído residual, e procedeu-se a desidratação usando a série alcoólica de 30 a 100%, permanecendo por 15 minutos em cada solução. Após a desidratação o material foi embebido em resina acrílica LR White (London Resin Company, UK) durante 7 dias para infiltração. As amostras foram colocadas em cápsulas de gelatina com resina e colocadas em estufa à 60°C por 12 horas para polimerização. Seções semi-finas (1-2µm) foram cortadas em micrótomo Reichert-Jung Ultracut E. As seções semi-finas foram coletadas em lâminas de vidro com uma gota de água, fixadas e imediatamente

coradas com azul de toluidina solução 0,1% e visualizadas em microscópio ótico Olympus modelo BH2 (Micronal).

V.3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em *Discolobium* spp., como já havia sido relatado por Loureiro (1994), a nodulação no caule somente ocorreu após a formação de abundante aerênquima, sendo portanto, influenciada pelo alagamento (Figura V.1). O início de formação dos nódulos foi observado 12 dias após a inoculação, em plantas sob condições de inundação.

Pode-se observar a atividade mitótica de células já diferenciadas do parênquima cortical durante a formação do primórdio nodular com contínuo aumento do tamanho do nódulo e colonização das células da zona meristemática pela bactéria (Figuras V.2 e V.3). Eventualmente são formados dois primórdios que podem vir a se fundir. Após 4 dias do início de formação do nódulo pode-se observar uma abundante colonização intracelular da bactéria (Figura V.4). Em algumas células o núcleo é visível e pode-se observar feixes vasculares (Figura V.5).

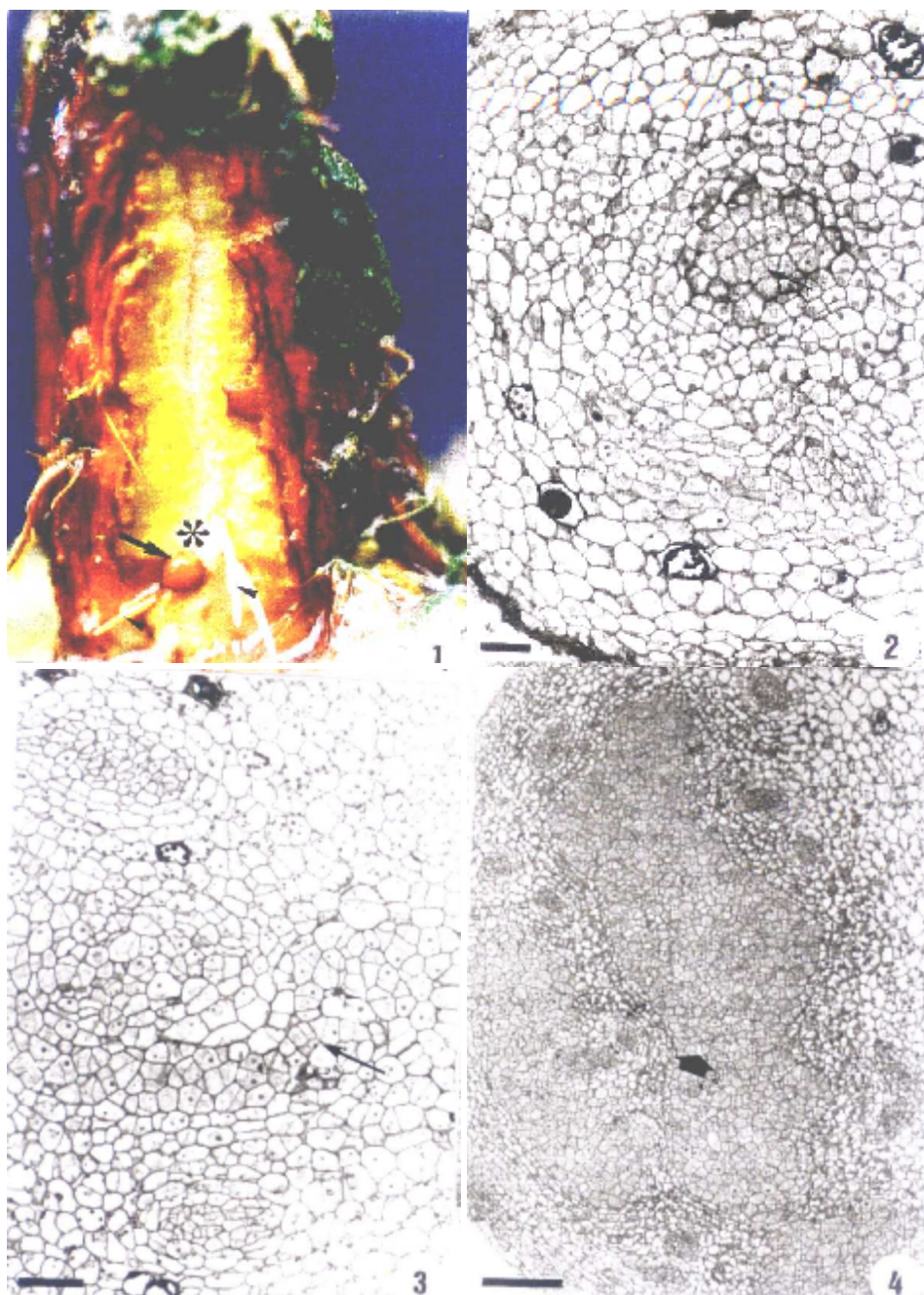


Figura V.1 - Parte do caule submerso de *D. pulchellum* com nódulo de caule (seta). Observa-se profuso aêrenquima revestindo o caule e nódulo (*). Note as raízes adventícias (setas menores).

Figura V.2 - Seção longitudinal de um nódulo de caule de *D. pulchellum* em processo de mitose (seta) (barra, 20 μ m).

Figura V.3 - Seção longitudinal de um nódulo de caule *D. pulchellum* em atividade mitótica de células já diferenciadas durante a formação do primórdio nodular (seta) (barra, 20 μ m).

Figura V.4 - Seção longitudinal de um nódulo de caule *D. pulchellum* em processo de colonização intracelular pelas bactérias (seta) (barra, 20 μ m).

O sistema vascular do caule esta conectado diretamente ao nódulo e ramifica-se por todo o nódulo e penetra nele com projeções alongadas do córtex no tecido infectado (Figuras V.6 e V.7). Nos feixes vasculares internos pode-se observar a presença de células do parênquima contendo amido ao redor (Figura V.8). Segundo Loureiro (1994), o modelo de tecido vascular do nódulo com invaginações corticais na zona infectada, não foram descritos em nódulos de outras leguminosas, sendo provável que seja exclusivo do gênero *Discolobium*.

Os nódulos de caule de *D. pulchellum* são ovóides e apresentam crescimento determinado, ou seja, o meristema não é persistente, estando somente presente durante o desenvolvimento celular. Tanto nos nódulos de caule como nos de raiz, o tecido infectado é do tipo desmodióide, isto é, sem células não infectadas na região infectada, estando assim de acordo com o tipo aesquinomenóide de Corby (1988) (Figuras V.9 e V.10). Yatazawa *et al.* (1984) observou a estrutura de nódulos caulinares de *Aeschynomene indica* relatando que os nódulos eram do tipo aesquinomenóide e na parte central das células não havia células intersticiais não infectadas no tecido infectado.

Os nódulos do gênero *Aeschynomene* são do tipo determinado, sendo tipicamente aesquinomenóide, isto é, com forma circular e achatados nas extremidades e sem células intersticiais no tecido infectado. O nódulo é ligado ao caule por um pedúnculo curto e o tecido nodular contém numerosos espaços intercelulares. O processo de infecção é intracelular sem a formação do cordão de infecção (Dreyfus *et al.*, 1984).

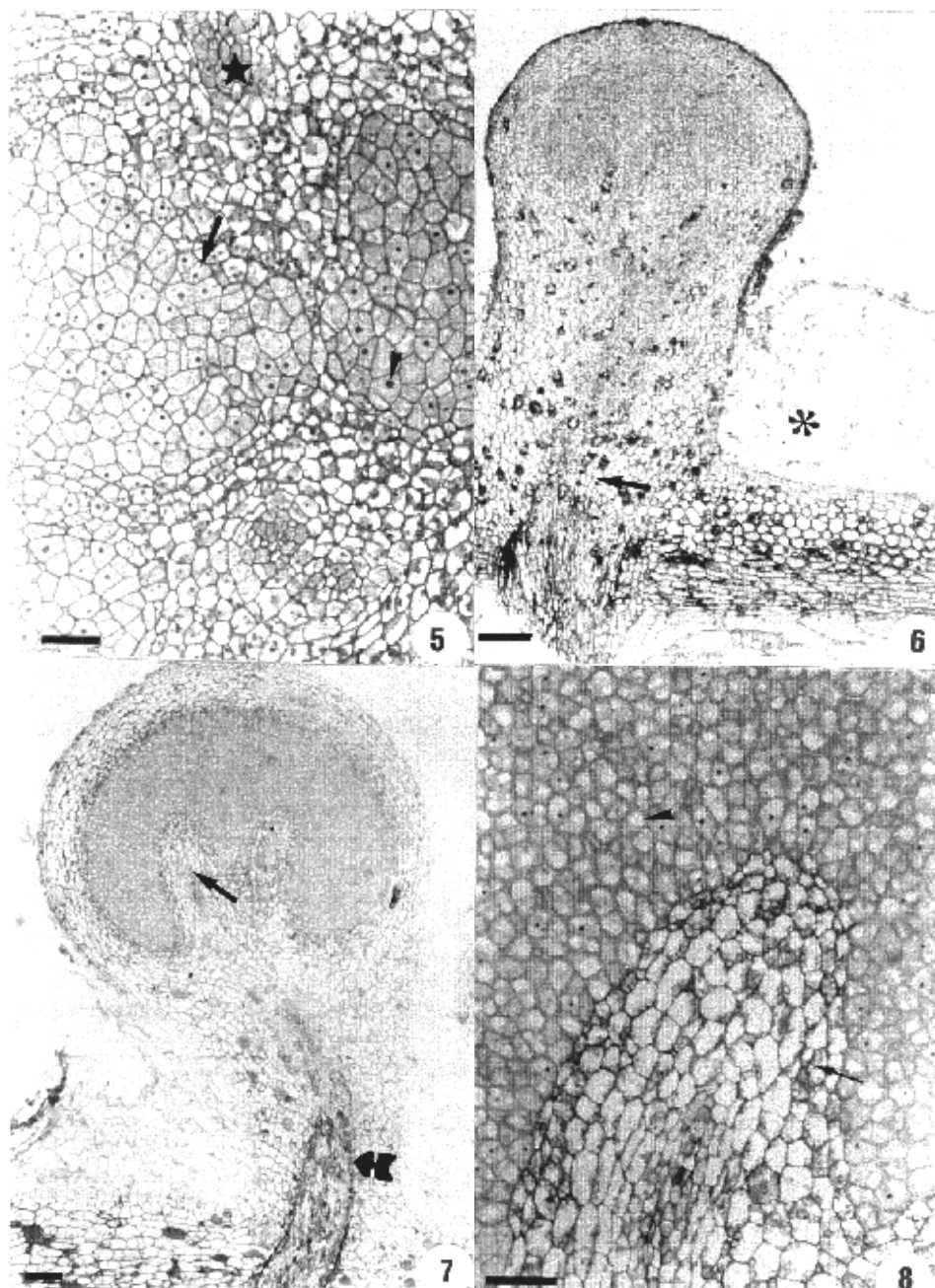


Figura V.5 - Seção de um nódulo de caule de *D. pulchellum*, com colonização pelas bactérias (seta), observa-se feixes vasculares (*). Em algumas células o núcleo é visível (seta menor) (barra, 20 μm).

Figura V.6 - Seção de um nódulo de caule de *D. pulchellum* ligado ao caule, observa-se o sistema vascular do caule conectado diretamente ao nódulo (seta) e aêrenquima cobrindo o caule e adjacente ao nódulo (*) (barra, 100 μm).

Figura V.7 - Seção de um nódulo de caule de *D. pulchellum* ligado ao caule, observa-se o sistema vascular do caule conectado diretamente ao nódulo (seta) e a natureza ramificada do sistema vascular do nódulo (seta grossa) (barra, 200 μm).

Figura V.8 - Feixe vascular interno com células do parênquima contendo amido ao redor (seta). A maioria das células infectadas apresenta vacúolo grande (seta pequena) (barra, 10 μm).

Em *D. pulchellum* nas camadas externas de células contendo amido, o córtex é mais frouxo, consistindo de células progressivamente maiores com alguns espaços intercelulares grandes. Essas camadas de células frouxas são geralmente revestidas com uma camada de células pequenas, comprimidas e empilhadas na parte superior para formar uma hipoderme corticiforme (Figura V.11). Entretanto, acima dos feixes vasculares corticais, as células da periderme expandem-se para formar lenticelas, juntamente com as células frouxas do córtex médio internos à epiderme, estão ligadas ao aerênquima do caule e provavelmente atuam como uma via de aeração entre o caule e o nódulo.

O córtex médio, exterior a camada limite, consiste de células frouxas e estas são contínuas com o aerênquima do caule, que proporcionam um aumento na permeabilidade de gases. De maneira geral, plantas que desenvolvem-se em ambientes alagados formam aerênquima para evitar anoxia na zona radicular. A formação do aerênquima tem por finalidade aumentar o fornecimento de oxigênio para a respiração das raízes, esse mecanismo torna possível prevenir a anoxia e talvez seja consequência dessa condição (Evans & Rotar, 1987).

Em *Discolobium* e em outras espécies como *A. fluminensis* e *Neptunia* observam-se estruturas típicas de barreira de difusão de O₂, como camadas de células do córtex interno sem espaços intercelulares imediatamente adjacentes à zona infectada, e oclusões com glicoproteína nos espaços intercelulares no córtex interno e médio (Loureiro, 1994; Loureiro *et al.*, 1994,1995; James *et al.*, 1992a). Iannetta *et al.* (1995) observou a presença e a importância desta camada limite em

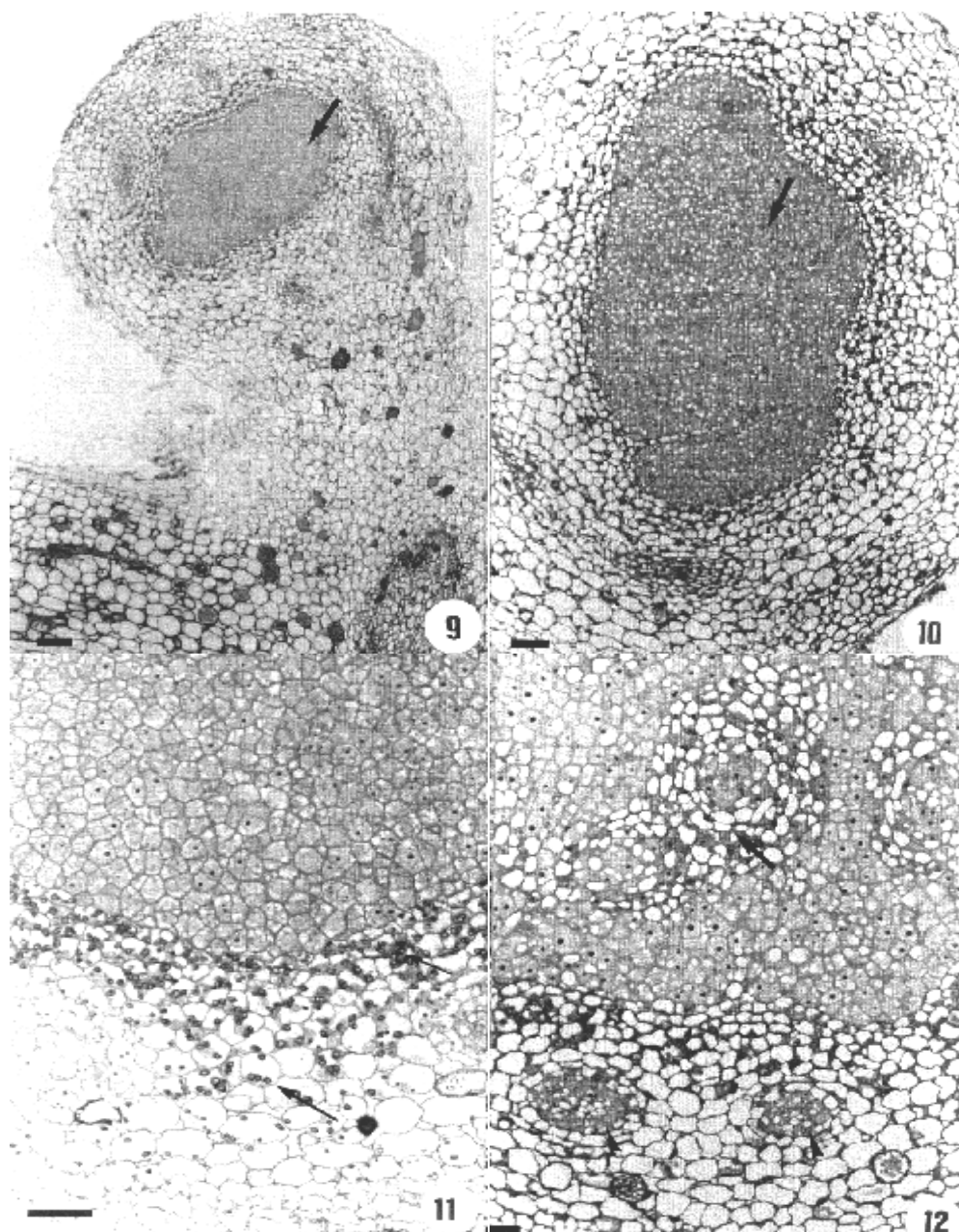


Figura V.9 - Seção longitudinal de um nódulo de caule de *D. pulchellum*, com a região infectada do nódulo com todas as células infectadas (seta) (barra, 200 μm).

Figura V.10 - Maior magnificação da seção anterior mostrando que não há qualquer célula intersticial não infectada (seta) (barra, 50 μm).

Figura V.11 - Seção longitudinal de um nódulo de caule de *D. pulchellum*, mostrando o córtex do nódulo com várias camadas de células. A primeira camada adjacente à zona infectada contém células pequenas, compactadas com poucos espaços intercelulares e com numerosos amiloplastos (seta menor). Na camada a seguir o córtex é mais frouxo, consistindo de células progressivamente maiores com alguns espaços intercelulares grandes, nesta camada os amiloplastos são pouco frequentes (seta maior) (barra, 20 μm).

Figura V.12 - Seção de um nódulo de caule de *D. pulchellum* mais maduro, onde observa-se o sistema vascular pronunciado, ocupando grande parte do nódulo (seta). Note o sistema vascular do córtex do nódulo (seta menor) (barra, 50 μm).

nódulos de soja e lupinus, como o principal componente da barreira de difusão de oxigênio. Em *S. rostrata* foi observado o aumento da deposição cortical de glicoproteína dentro dos espaços intercelulares e dentro das paredes das células dos nódulos de caule, aumentando a barreira física de difusão de oxigênio, e sendo o principal fator de prevenção de dano de oxigênio para a nitrogenase (James *et al.*, 1996). Deposição cortical de glicoproteína também foi observada em nódulos de caule de *A. fluminensis* (Loureiro, 1994).

Ao contrário dos nódulos de caule de algumas espécies de *Aeschynomene* e *Sesbania* (Alazard & Duhoux, 1987; Ladha *et al.*, 1990; Hungria *et al.*, 1992), não há cloroplastos aparentes no córtex interno, médio ou externo dos nódulos de *Discolobium*. Os nódulos de *A. fluminensis* produzidos no caule logo abaixo da superfície diferem dos produzidos em maior profundidade por apresentarem cloroplastos no córtex (Loureiro, 1994).

Os nódulos maduros de *D. pulchellum* foram observados em torno dos 20 dias após a inoculação, nesta fase pode-se observar que todas as células são infectadas e adjacente a essa região há um córtex interno com pequenas células contendo amido (Figura V.11). Em nódulos mais velhos o sistema vascular é pronunciado ocupando grande parte da região central do nódulo (Figura V.12).

Segundo Loureiro (1994) em estudo da ultra-estrutura de nódulos de caule, nas células infectadas havia em geral, somente de um a três bacteróides por unidade peribacterial.

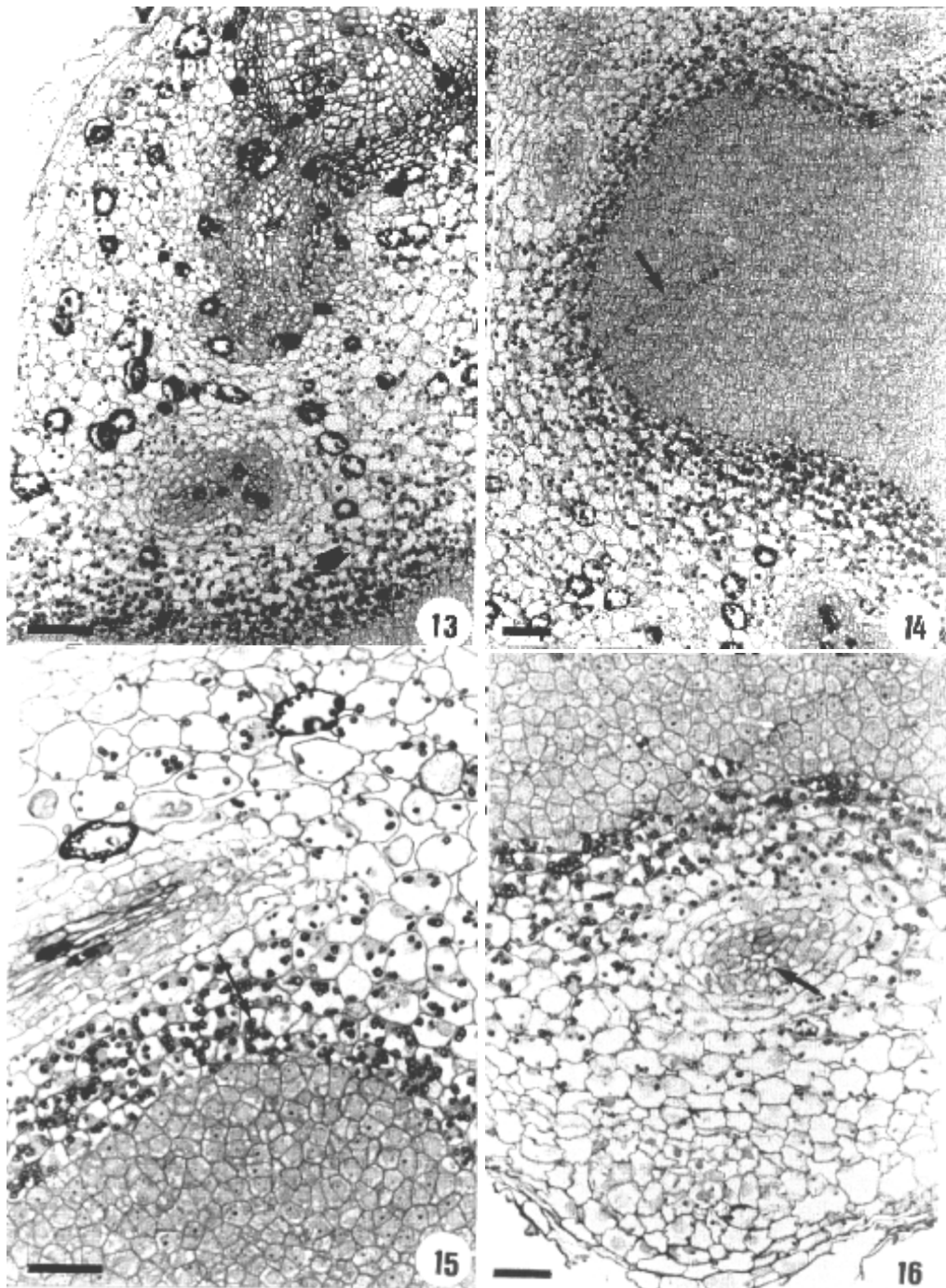


Figura V.13- Seção de um nódulo de raiz de *D. pulchellum* (seta), ligado a um pedaço de raiz (seta vazia) (barra, 20 μ m).

Figura V.14- Seção longitudinal de um nódulo de raiz de *D. pulchellum*, mostrando que não há qualquer célula intersticial não infectada (seta). Note que as células não são vacuoladas (barra, 20 μ m).

Figura V.15- Maior magnificação da seção anterior mostrando que o córtex interno contém células bem compactadas adjacentes ao tecido infectado com presença de amido (seta) (barra, 20 μ m).

Figura V.16- Seção longitudinal de um nódulo de raiz de *D. pulchellum* onde pode -se observar feixes vasculares no córtex médio (seta) (barra, 20 μ m).

Os nódulos radiculares apresentam uma estrutura muito similar à dos nódulos de caule, isto é, encontra-se o sistema vascular nas invaginações corticais na zona infectada, não havendo células não infectadas na zona não infectada (Figura V.13 e V.14). A similaridade na morfologia e estrutura de nódulos de caule e raiz foi relatada em muitas espécies de *Aeschynomene*, incluindo a espécie *A. fluminensis* (Stegink & Vaughn, 1998; Loureiro, 1994). A similaridade entre nódulos de caule e raiz de *Sesbania rostrata* foi observada por N'doye *et al.* (1994).

O córtex interno contém células bem compactadas e adjacentes ao tecido infectado e há espaços intercelulares preenchidos no córtex interno (Figura V.15). Pode-se observar feixes vasculares no córtex médio (Figura V.16).

Na ultra-estrutura de nódulos de raiz foram observados bacteróides maiores e depósitos de poli-B-hidroxibutirato em abundância e menos aerênquima e lenticelas no córtex do nódulo (Loureiro, 1994). Poli-B-hidroxibutirato é um complexo de armazenagem de carbono que é acumulado nos bacteróides sob pO_2 reduzida. Depósitos de poli-B-hidroxibutirato também foram observados em bacteróides de nódulos de caule maduros de *Aeschynomene indica* e *Sesbania rostrata* (Tsien *et al.*, 1983; Vaughn & Elmore, 1985).

A aparência dos sítios de nodulação possibilitaram o agrupamento das leguminosas noduladoras de caule, grupo ao qual *Discolobium* pertence, e que apresenta primórdio invisível e nodulação ocorrendo somente nas porções submersas do caule. Não há quebra de dormência do primórdio de raiz sem o alagamento e nódulos nunca são encontrados na parte não inundada do caule.

Além de *Discolobium*, as espécies típicas deste grupo são: *A. crassicaulis*, *A. elaphroxylon*, *A. pfundii* e *S. javanica* (Ladha *et al.*, 1992a; Loureiro *et al.*, 1994).

Nódulos na parte aérea do caule, acima do nível de água, podem ser formados em *A. afraspera*, *A. indica*, *A. scabra* e *S. rostrata* (Alazard, 1985; Boivin *et al.*, 1997; Dreyfus & Dommergues, 1981; Eaglesham & Szalay, 1983; Ladha *et al.*, 1992a).

Nódulos de caule de *Discolobium* requerem permanente submersão para sua formação e funcionamento, e sendo expostos ao ar senescem rapidamente. Ao contrário de *Discolobium*, nódulos de caule de *Aeschynomene fluminensis*, que necessitam de alagamento para sua formação, uma vez formados são capazes de funcionar sob condições de não inundação (Loureiro, 1994). Eaglesham & Szalay (1983) mostraram que o alagamento não é um pré-requisito para a formação de nódulos do caule de algumas espécies de *Aeschynomene* e *Sesbania rostrata*, no entanto, resultados obtidos por Parsons *et al.*, (1993) com *S. rostrata* demonstraram que a baixa umidade tem efeito adverso no crescimento e na atividade da nitrogenase em nódulos de caule. Efeito similar foi observado para as espécies *A. americana* e *A. indica*, que em baixas condições de umidade apresentaram significativa redução da atividade da nitrogenase (Albrechet *et al.*, 1981; Sasakawa *et al.*, 1986).

Não foi observado cordão de infecção no processo inicial de infecção em *D. pulchellum* como descrito por Loureiro (1994). A utilização de microscopia ótica pode não ter sido suficiente para a observação dessa estrutura, sendo necessária para tal o uso de microscopia eletrônica de transmissão.

VI- MORFOLOGIA DOS NÓDULOS DE CAULE DE *Discolobium leptophyllum*

VI.1-INTRODUÇÃO

A fixação biológica de nitrogênio em nódulos formados nas raízes de leguminosas em resposta à infecção com bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Sinorhizobium* já foi amplamente relatada na literatura. Mais recentemente tem-se dado atenção a um limitado número de leguminosas que fixam nitrogênio em nódulos formados no caule (Boivin *et al.*, 1997).

Inicialmente foram descritos dois gêneros de leguminosas capazes de formar nódulos no caule: *Aeschynomene* e *Sesbania*. Loureiro *et al.*, (1994), observaram um novo gênero com capacidade de produzir nódulos no caule, *Discolobium*. Vinte duas espécies do gênero *Aeschynomene* (Alazard, 1985; Becker *et al.*, 1988), cinco espécies do gênero *Sesbania* (Dreyfus & Dommergues, 1981; Dreyfus *et al.*, 1988; Ladha *et al.*, 1990) e duas espécies do gênero *Discolobium* (Loureiro *et al.*, 1994) foram descritas como leguminosas noduladoras do caule.

O gênero *Discolobium* pertence à subfamília Papilionoideae, tribo Aeschynomeneae (Faria *et al.*, 1989), onde foram descritas apenas 8 espécies, todas hidrófitas, sendo a espécie tipo *D. pulchellum* Benth (Burkart, 1952; Rudd, 1981). Representantes deste gênero ocorrem no Brasil, Paraguai e Argentina (EMBRAPA/CPAP, 1996).

As espécies que nodulam o caule são hidrófitas tropicais ou subtropicais, de pântanos e rios ou margens de lagos (Dreyfus & Dommergues, 1981; Eaglesham & Szalay, 1983; Ladha *et al.*, 1992a; Loureiro *et al.*, 1994, 1995; Boivin *et al.*, 1997) com várias espécies ocorrendo no Pantanal Mato-Grossense. Entre as leguminosas do Pantanal encontram-se várias espécies do gênero *Aeschynomene*, sendo as nodulantes de caule: *A. paniculata* (Pott, 1988); *A. sensitiva* (Pott *et al.*, 1986; Allem & Valls, 1987; Pott, 1988) e *A. fluminensis* (Loureiro, 1994; EMBRAPA/CPAP, 1996;). Além destas, são encontradas espécies de *Discolobium*: *D. pulchellum* (Allem & Valls, 1987; Pott, 1988; Loureiro *et al.*, 1994) e *D. psoraleaefolium* (Loureiro *et al.*, 1994; EMBRAPA/CPAP, 1996).

O habitat natural dessas leguminosas leva à hipótese de que a nodulação no caule pode ser uma adaptação às condições de alagamento (Stegink & Vaughn, 1988; James *et al.*, 1992a, 1992b; Pugh *et al.*, 1995), como as observadas no Pantanal. Nesse trabalho será relatada a ocorrência e a estrutura de nódulos de caule na espécie *Discolobium leptophyllum*, que ocorre no Pantanal Mato-Grossense.

VI.2- MATERIAL E MÉTODOS

- Propagação da planta e inoculação

Foram coletadas plantas e nódulos de caule e raiz *D. leptophyllum* na região do Pantanal de Poconé, sob condições de inundação. Após a coleta, os nódulos de raiz e caule foram dessecados em frascos contendo sílica gel, onde foram mantidos até o momento do isolamento. O isolamento do rizóbio foi feito segundo a metodologia de Vincent (1970).

Os nódulos foram reidratados por uma hora em água destilada, sendo posteriormente submersos em álcool 96° GL por 30 segundos e a seguir foram esterelizados em hipoclorito de sódio 5% por dois minutos e lavados seis vezes consecutivas em água destilada estéril. Os isolados foram cultivados em placas contendo meio extrato de levedura com manitol (YMA) (Vincent, 1970) e incubadas a 28° C.

A propagação das plantas foi feita através de estacas em vasos de 400g com substrato esterilizado composto de solo Podzólico Vermelho Amarelo e vermiculita, na proporção 3:1 (v/v), suplementado com 5 gramas de fosfato de

rocha para cada 3kg de substrato, e mantidas em casa de vegetação. Após o pegamento das estacas, os vasos foram colocados em recipientes de 2 litros com água destilada, e mantidos continuamente sob inundação. Os caules das plantas foram inoculados, através do pincelamento com algodão estéril embebido na cultura crescida em meio de extrato levedura e manitol a 28° C, sob agitação (Vincent, 1970).

- Preparo do material para microscopia ótica

O material para microscopia ótica foi preparado de acordo com James *et al.*, (1992a). As amostras foram cortadas em pequenos pedaços sobre placa de parafina onde adicionou-se tampão fosfato. Os segmentos foram lavados em solução tampão fosfato 50mM (pH7,0) e fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato por 24 horas. Em seguida as amostras foram lavadas por três vezes em tampão fosfato para remoção do glutaraldeído residual, e procedeu-se a desidratação usando a série alcoólica de 30 a 100%, permanecendo por 15 minutos em cada solução. Após a desidratação o material foi embebido em resina acrílica LR White (London Resin Company, UK) durante 7 dias para infiltração. As amostras foram colocadas em cápsulas de gelatina com resina e colocadas em estufa à 60°C por 12 horas para polimerização. Seções semi-finas (1-2µm) foram cortadas em micrótomo Reichert-Jung Ultracut E. As seções semi-finas foram coletadas em lâminas de vidro com uma gota de água, fixadas e imediatamente

coradas com azul de toluidina solução 0,1% e visualizadas em microscópio ótico Olympus modelo BH2 (Micronal).

VI.3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primeiro trabalho em relação ao gênero *Discolobium* realizado por Loureiro (1994) descreveu nodulação no caule nas espécies *Discolobium pulchellum* e *Discolobium psoraleaefolium*. Neste trabalho é descrita a nodulação no caule de outra espécie do gênero *Discolobium*: *D. leptophyllum*.

A espécie *D. leptophyllum* apresenta fruto em forma de disco, com as margens vermelhas, as folhas são alongadas e como os frutos, suas margens são vermelhas (Figura VI.1). É um arbusto aquático, perene, com flores amarelas e inflorescência pegajosa (Pott & Pott, no prelo). Sua ocorrência é relatada na sub região do Pantanal de Poconé (Loureiro, comunicação pessoal).

A formação dos nódulos no caule de *Discolobium leptophyllum* somente ocorreu após a inundação das plantas (Figura VI.2), da mesma forma que foi observada por Loureiro (1994) em *D. pulchellum* e *D. psoraleaefolium*. A necessidade de inundação em algumas espécies para a formação de nódulos no caule, é considerada uma resposta adaptativa às condições de alagamento (Eaglesham & Szalay, 1983; Alazard & Duhoux, 1987; Stegink & Vaughn, 1988).

É provável, pelas observações da morfologia de nódulos de caule do gênero *Discolobium*, que não hajam muitas diferenças entre as espécies *D. leptophyllum* e *D. pulchellum*, contudo não foi observado a formação de cordão de infecção no material analisado.

As seções longitudinais de cortes de nódulos em série de *Discolobium leptophyllum* mostraram conexão vascular do caule na base do nódulo (Figura VI. 3), podendo assim ser considerada uma nova espécie do gênero *Discolobium* com verdadeira nodulação no caule.

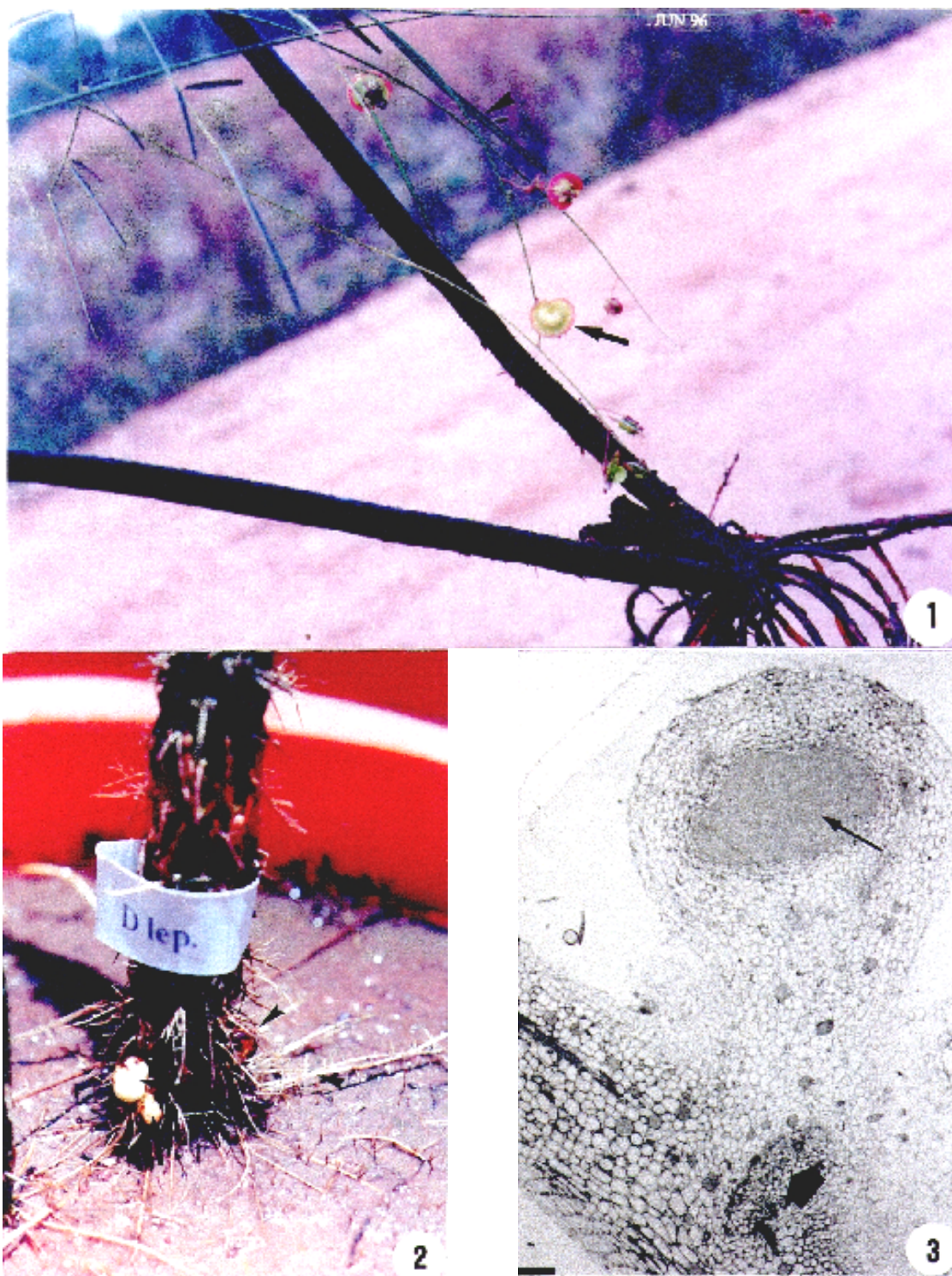


Figura VI.1- Planta de *Discolobium leptophyllum*, note as sementes com margens vermelhas (seta) e folhas alongadas (seta menor).

Figura VI.2- Planta de *Discolobium leptophyllum* com nódulos no caule (setas) e raízes adventícias (seta menor).

Figura VI.3- Seção longitudinal de um nódulo maduro de caule de *Discolobium leptophyllum* (seta) mostrando conexão vascular do caule com o nódulo (seta grossa) (barra, 200 μ m).

Pode-se observar projeções alongadas do córtex no tecido infectado, as células do córtex contém amido (Figuras VI.4 e VI.5). O córtex dos nódulos caulinares apresenta várias camadas de células sendo que, o córtex interno apresenta camadas de células adjacentes à zona infectada são células pequenas, compactadas, com poucos espaços intercelulares e contendo um grande número de amiloplastos (Figura VI.6). As células infectadas apresentam vacúolos grandes e centrais e em algumas células o núcleo é claramente visível (Figura VI.7).

Em nódulos de *D. leptophyllum* o tecido infectado é do tipo desmodióide, isto é, sem células não infectadas no tecido infectado (Figura VI.8).

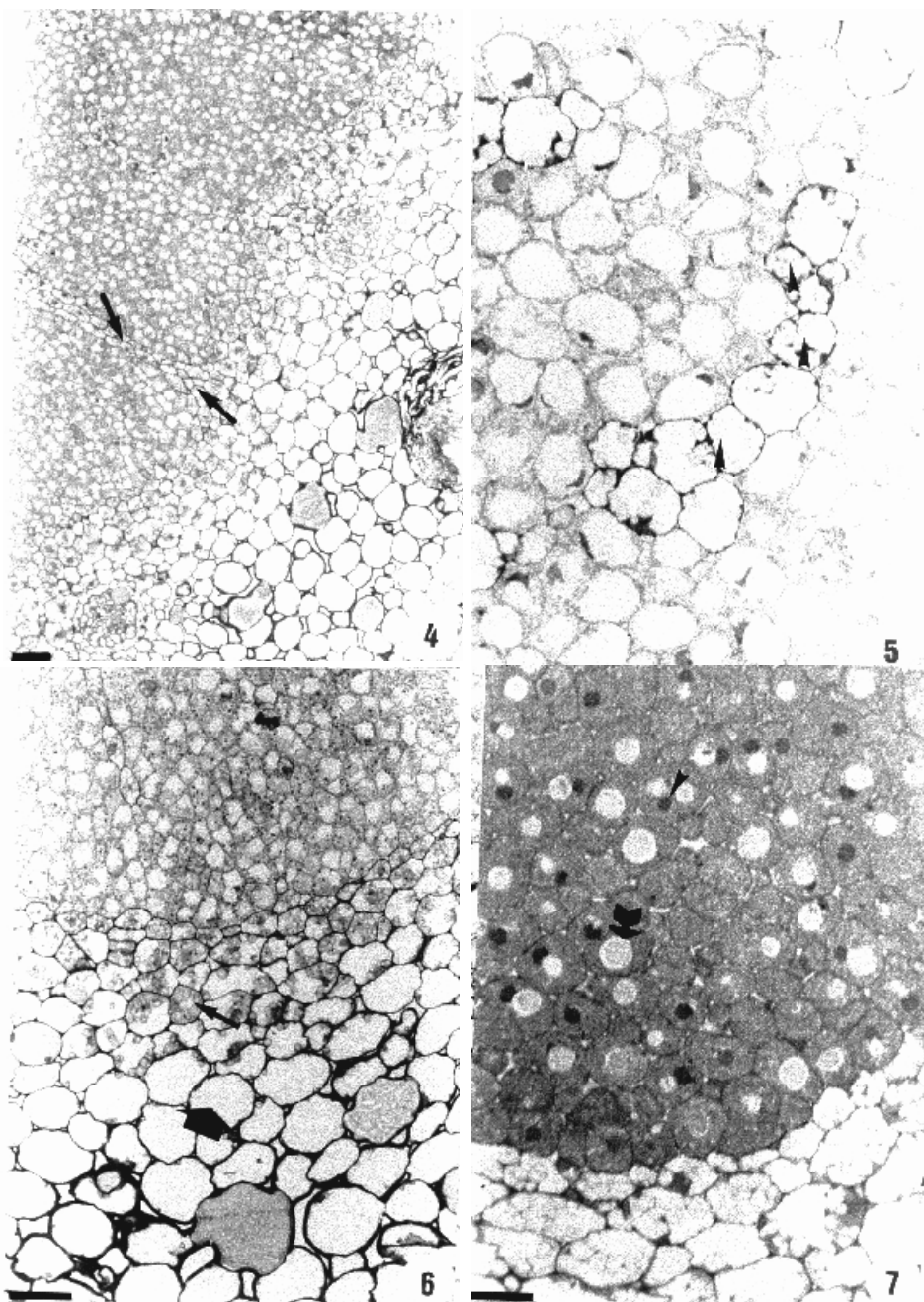


Figura VI.4- Seção longitudinal de um nódulo de caule onde pode-se observar projeções alongadas do córtex no tecido infectado (setas) (barra, 50 μ m).

Figura VI.5- Maior magnificação da foto anterior onde pode-se observar a presença de amido nas projeções alongadas do córtex no tecido infectado (setas) (barra, 10 μ m).

Figura VI.6- Seção longitudinal de um nódulo de caule de *D. leptophyllum* mostrando o córtex com várias camadas de células. A primeira camada adjacente à zona infectada contém células pequenas, compactadas com poucos espaços intercelulares e com amiloplastos (seta). Na camada a seguir o córtex é mais frouxo, com células progressivamente maiores (seta maior) com alguns espaços intercelulares grandes, nesta camada os amiloplastos são pouco frequentes (barra, 20 μ m).

Figura VI.7- As células infectadas apresentam vacúolos grandes e centrais (seta grossa) e em algumas células o núcleo é claramente visível (seta pequena) (barra, 10 μ m).

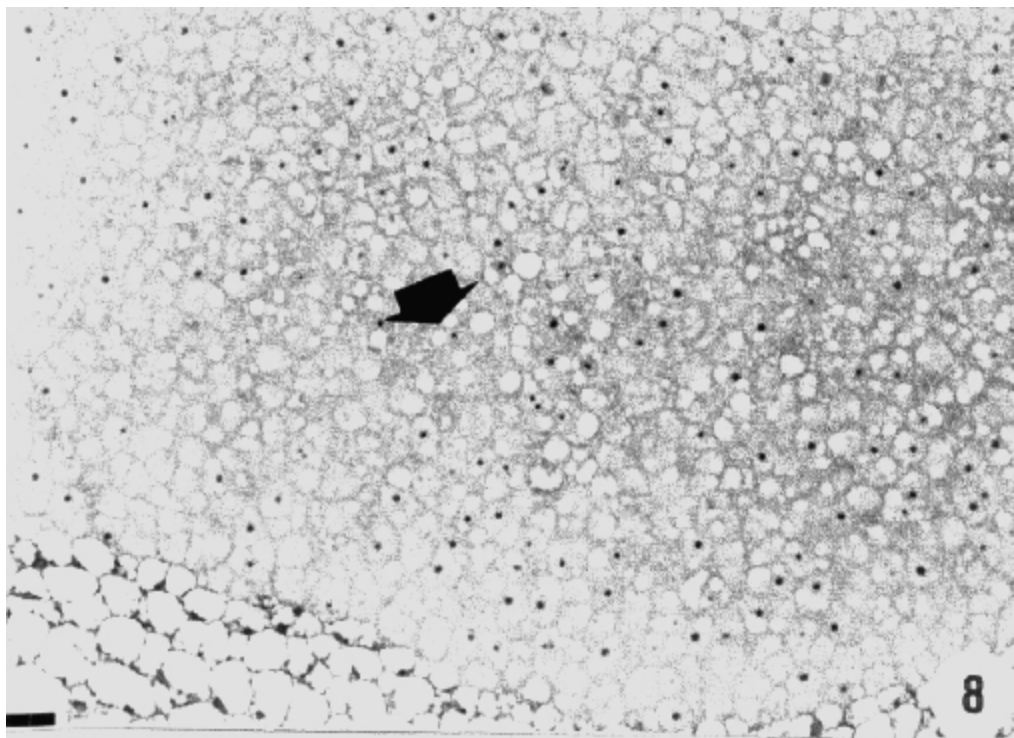


Figura VI.8- Seção longitudinal de um nódulo de caule de *D. leptophyllum*, com a região infectada do nódulo com todas as células infectadas (seta) (barra, 50 μ m).

James *et al.*, (1992a) propõe que somente os nódulos com conexões vasculares com o caule podem ser consideradas como nódulos verdadeiros de caule. Dentro desta proposta, *D. leptophyllum* pode ser considerada como uma nova espécie capaz de formar nódulos no caule em condições de inundação.

VII - CONCLUSÕES

- A caracterização morfológica permitiu o agrupamento dos isolados de *Discolobium pulchellum*. O grupo com crescimento rápido e produção de ácido em meio de cultura YMA mostrou-se mais tolerante a estresses como salinidade e temperaturas elevadas. Em contrapartida, os melhores resultados obtidos na avaliação do potencial de fixação biológica de nitrogênio foram com os de crescimento lento.
- O início de formação de nódulos de caule de *Discolobium pulchellum* foram observados 12 dias após a inoculação, em plantas sob condições de inundação. Nódulos maduros foram observados aos 20 dias após a inoculação. Os nódulos são do tipo aesquinomenóide desmodióide, ou seja, sem células não infectadas no tecido infectado.

- Foi estudada uma nova espécie de *Discolobium*: *D. leptophyllum* com nódulos no caule, com sistema vascular conectado ao sistema vascular do caule. Os nódulos apresentam morfologia semelhante à de *Discolobium pulchellum*, e também as condições de inundação foram necessárias para a formação dos nódulos e sua atividade.

VIII-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADÂMOLI, J. **Recursos forrageiros nativos do Pantanal Mato-grossense**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1987. 339p. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 8).
- ADEBAYO, A.; WATANABE, I.; LADHA, J.K. Epiphytic occurrence of *Azorhizobium caulinodans* and other rhizobia on the host and non host legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.55, p.2407-2409, 1989.
- ALAZARD, D.; BECKER, M. *Aeschynomene* as green manure for rice. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.101, p.141-143, 1987.
- ALAZARD, D.; DUHOUX, E. Development of stem nodules in a tropical forage legume, *Aeschynomene afraspera*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.41, p.1199-1206, 1990.
- ALAZARD, D.; DUHOUX, E. Diversity of stem nodulation sites in *Aeschynomene* spp. **Journal of Plant Physiology**, Rockville, v.132, p.123-125, 1987.
- ALAZARD, D. **La nodulation caulinare dans le genre *Aeschynomene***. Lyon: Université Claude Bernard, 1991. 147p. Tese de Doutorado.
- ALAZARD, D. Nitrogen fixation in pure culture by rhizobia isolated from stem nodules of tropical *Aeschynomene* species. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.68, p.177-182, 1990.
- ALAZARD, D. Stem and root nodulation in *Aeschynomene* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.50, p.732-734, 1985.
- ALBRECHT, S.L.; BENNETT, J.M.; QUESENBERY, K.H. Growth and nitrogen fixation of *Aeschynomene* under water stressed condition. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.60, p.309-315, 1981.

- ALLEN, A.C.; VALLS, J.F.M. **Recursos forrageiros do Pantanal Matogrossense**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1987. 339p. (EMBRAPA/CENARGEM, Documentos 8).
- ALLEN, O.N. ; ALLEN, E.K. *Sesbania* Scop. In: ALLEN, O.N. ; ALLEN, E.K., ed. **The Leguminosae: a source book of characteristics, uses and nodulation**. Madison: University of Wisconsin, 1981. p.604-607.
- ARORA, N. Morphological development of the root and stem nodules of *Aeschynomene indica* L. **Phytomorphology**, New Delhi, v.4, p.211-216, 1954.
- ARRESE-IGOR, C.; ROYUELA, M.; LORENZO, C.; FELIPE, M.R.; APARICIO-TEJO, P.M. Effect of low rhizosphere oxygen on growth, nitrogen fixation and nodule morphology. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.89, p.55-63, 1993.
- ASPPLEBY, C.A. Leghaemoglobin and *Rhizobium* respiration. **Annual Reviews in Plant Physiology**, Palo Alto, v.35, p.443-478, 1984.
- ATKINS, C.A.; HUNT, S.; LAYZELL, D.B. Gaseous diffusive properties of soybean nodules cultures with non-ambient pO₂. **Physiologia Plantarum**, Palo Alto, v.87, p.89-95, 1993.
- BAL, A.K.; DENDULURI, S. Transient oelosomes (lipid bodies) in early differentiation of *Sesbania rostrata* nodules. **International Journal Plant Sciences**, Chicago, v.157, p.71-79, 1996.
- BAL, A.K.; SIDDIQUE, A.M. Fine structure of peanut root nodules induced by Nod⁺ Fix⁻ strains of *Bradyrhizobium* with special reference to lipid bodies. **Annals of Botany**, London, v.67, p.309-315, 1991.
- BAL, A.K.; HAMEED, S.; JAYARAM, S. Ultrastructural characteristics of host-symbiont interface on nitrogen-fixing peanut nodules. **Protoplasma**, New York, v.150, p.19-26, 1989.
- BARRIOS, S.; GONZALEZ, V. Rhizobial symbioses on Venezuelan savannas. **Plant and Soil**, The Hague, v.34, p.707-719, 1971.
- BECKER, M.; ALAZARD, D.; OTTOW, J.C.G. Mineral nitrogen effect on nodulation and nitrogen fixation of the stem nodulating legume *Aeschynomene afraspera*. **Zeitschrift für Pflanzenernährung Bodenkunde**, Weinheim, v.149, p.485-491, 1986.
- BECKER, M.; DIEKMANN, K.H.; LADHA, J.K.; DATTA, S.K. de; OTTOW, J.C.G. Effect of NPK on growth and nitrogen fixation of *Sesbania rostrata* as a green

- manure for lowland rice (*Oryza sativa* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v.132, p. 149-158, 1991.
- BECKER, M.; LADHA, J.K.; OTTOW, J.C.G. Growth and N₂-fixation of two stem-nodulating legumes and their effect as green manure on lowland rice. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.22, p.1109-1119, 1990.
- BECKER, M.; LADHA, J.K.; OTTOW, J.C.G. Stem nodulating legumes as green manure for lowland rice. **Philippines Journal Crop Science**, Philippines, v.13, p.121, 1988.
- BECKER, M.; PAREEK, R.P.; LADHA, J.K.; OTTOW, J.C.G. Biofertilizer production of stem-cut planted and seeded *Sesbania rostrata*. **International Rice Research Newsletter**, Manila, v.14, p.30-31, 1989.
- BERGSTROM, D.W.; TENUTA, M.; BEAUCHAMP, E.G. Increase in nitrous oxide production in soil induced by ammonium and organic carbon. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.18, p.1-6, 1994.
- BLOM, C.W.P.M.; VOESENEK, L.A.C.J.; BANGA, M.; ENGELAAR, W.M.H.G.; RIJNDERS, J.H.G.M.; STEEG, H.M.V.; VISSER, E.J.W. Physiological ecology of riverside species: adaptive responses of plants to submergence. **Annals of Botany**, London, v.74, p.253-263, 1994.
- BOIVIN, C.; N'DOYE, I.; MOLOUBA, F.; de LAJUDIE, P.; DUPUY, N.; DREYFUS, B. Stem nodulation in legumes: diversity, mechanisms, and unusual characteristics. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.16, p.1-30, 1997.
- BURESH, R.J.; DATTA, S.K. Nitrogen dynamics and management in rice-legume cropping systems. **Advances in Agronomy**, Madison, v.45, p.1-59, 1991.
- CADAVID GARCIA, E.A. **Estudo técnico-econômico da pecuária bovina de corte no Pantanal Mato-grossense**. Corumbá, MS: EMBRAPA/CPAP, 1986. 150p. (EMBRAPA/CPAP. Documentos, 4).
- COMASTRI FILHO, J.A.; POTT, A. Introdução e avaliação de forrageiras em cordilheira e campo cerrado na parte leste da sub-região de Paiaguás, Pantanal Mato-grossense. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.30, p.1117-1127, 1995.
- COOKE, J.G. Rapid freezing effects on nitrification and denitrification enzyme activity in saturated soil and aquatic sediments. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.22, p.1171-1172, 1990.

- CORADIN, L.; VALLS, J.F.M. **Variabilidade genética em forrageiras para a Amazônia brasileira**. In: SIMPÓSIO DO TRÓPICO ÚMIDO, 1, 1984, Belém. **Resumos...** Belém: EMBRAPA-CPATU, 1984. p.319. (EMBRAPA-CPATU. Documento, 31).
- CORBY, H.D.L. Types of rhizobial nodules and their distribution among the Leguminosae. **Kirkia**, Harare, v.13, p.53-123, 1988.
- CROZAT, I.; SANGCHYO-SAWAT, C. Evaluation of different green manures on rice yield in Sonkla Iaka Basin, Sonklanadarin. **Journal of Science and Technology**, San Diego, v.7, p.391-397, 1985.
- DART, P.J. Infection and development of leguminous nodules: In: HARDY, R.W.F.; SILVER, W.S., ed. **A treatise of dinitrogen fixation**. New York: John Wiley, 1977. p.57-60, 1977.
- DE BRUIJN, F.J. The unusual symbiosis between the diazotrophic stem-nodulating bacterium *Azorhizobium caulinodans* ORS571 and its host, the tropical legume *Sesbania rostrata*. In: KOSUGE, T.; NESTER, E.W., ed. **Plant-microbe interactions, molecular and genetic perspectives**. New York: McGraw-Hill, 1989. p.457-504.
- DE LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS, M.D.; DREYFUS, B.; KERSTERS, K.; GILLIS. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.44, p.715-733, 1994.
- DENDULURI, S.; BAL, A.K. Fatty acid composition of oleosomes (lipid bodies) from stem and root nodules of *Sesbania rostrata*. **Journal of Plant Physiology**, Ottawa, v.147, p.633-636, 1996.
- DIEKMANN, K.H.; OTTOW, J.C.G.; DE-DATTA, S.K. Yield and nitrogen response of lowland rice (*Oryza sativa* L.) to *Sesbania rostrata* and *Aeschynomene afraaspera* green manure in different marginally productive soils in the Philippines. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.21, p.103-108, 1996.
- DREYFUS, B.; DOMMERGUES, Y.R. Nitrogen-fixing nodules induced by *Rhizobium* on the stem of the tropical legume *Sesbania rostrata*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.10, p. 313-317, 1981.
- DREYFUS, B.; GARCIA, J.L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem nodulating nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.38, p.89-98, 1988.

- DREYFUS, B.; RINAUDO, G.; DOMMERGUES, Y. Observation on the use of *Sesbania rostrata* as green manure in paddy field. **Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v.1, p.711-721, 1985.
- DREYFUS, B.L.; ALAZARD, D.; DOMMERGUES, Y.R. Stem-nodulating rhizobia. In: KLUG, M.G.; REDDY, C.E., ed. **Current Perspectives of Microbial Ecology**. Washington: American Society of Microbiology, 1984. p.161-169.
- DREYFUS, B.L.; DIEM, H.G.; FREIRE, J.; KEYA, S.O.; DOMMERGUES, Y.R. Nitrogen fixation in tropical agriculture and forestry. In: DA SILVA, DOMMERGUES. NYNS, Ratlege, ed. **Microbial technology in the developing world**. Oxford: University Press, 1987. p.7-50.
- DUHOUX, E.; DREYFUS, B.L. Nature des sites d'infection par le *Rhizobium* de la tige de la légumineuse *Sesbania rostrata* Brem. **Comptes Rendus des Sciences de L'Academie des Sciences**. Série III: Sciences de la vie, Paris, v.294, p.407-411, 1982.
- DUHOUX, E. Ontogénese des nodules caulinaires du *Sesbania rostrata*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.62, p.982-994, 1984.
- EAGLESHAM, A.R.J.; SZALAY, A.A. Aerial stem nodules on *Aeschynomene* spp. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v.29, p.265-272, 1983.
- EAGLESHAM, A.R.J.; ELLIS, J.M.; EVANS, W R.; FLEISCHMAN, D.E.; HUNGRIA, M.; HARDY, R.W.F. The first photosynthetic N_2 fixing *Rhizobium* characteristics. In: GRESSHOFF, P.M.; ROTH, L.E.; STACEY, G.; NEWTON, W.E., ed. **Nitrogen fixation: Achievements and objectives**. New York: Chapman, 1990. p.805-811.
- EARDLY, B.D.; EAGLESHAM, A.R.J. Fixation of nitrogen and carbon by legume stem nodules. In: EVANS, H.J., BOTTOMLEY, P.J.; NEWTON, W.E., ed. **Nitrogen Fixation Research Progress**. Dordrecht: Martinus, 1985. p.324. (Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture).
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa Agropecuária do Pantanal–CPAP. **Pantanal**. Corumbá, MS.: CPAP / SEBRAE, 1996. CD-ROM.
- EVANS, D.O.; ROTAR, P.P. *Sesbania* in agriculture. **Westview Tropical Agriculture**. nº.8. 1987.
- EVANS, W.R.; FLEISCHMAN, D.E.; CALVERT, H.E.; PYATI, P.V.; ALTER, G.M.; SUBBA RAO, N.S. Bacteriochlorophyll and photosynthetic reaction centers in *Rhizobium* strain BTAi1. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, p.3445-3449, 1990.

- FAHRAEUS, G. The infection clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. **Journal of General Microbiology**, London, v.16, p.347-381, 1957
- FARIA, S.M. de; SPRENT, J.I. Legume nodule development: an evolutionary hypothesis. In: SPRENT, J.I.; MCKEY, D., ed. **Advances in Legume**. London: Royal Botanic Gardens, 1994. p.33-39.
- FARIA, S.M. de; LEWIS, G.P.; SPRENT, J.I.; SUTHERLAND, J.M. Occurrence of nodulation in the Leguminosae. **New Phytologist**, Oxford, v.111, p.607-619, 1989.
- FERREIRA, M.A. **Estudo do desenvolvimento vegetal através da utilização de técnicas de biologia molecular associadas à microscopia**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1997. 134p. Tese de Doutorado.
- FLEISCHMAN, D.; KRAMER, D. Photosynthetic rhizobia. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1364, p.17-36, 1998.
- FRANCO, A.A.; MONTEIRO, R.; FARIA, S.M. Regional field experience with *Sesbania* species in Latin America. In: MACKLIN, B.; EVANS, D.O., ed. **Perennial Sesbania species in agroforestry systems**. Nairobi: INRA, 1990. p.151.
- FRED, E.B.; WAKSMAN, S.A. **Laboratory Manual of General Microbiology With special reference to the microorganism of the soil**. New York: Mc-Graw-Hill, 1928. 145p.
- GALLON, J.R. Reconciling the incompatible: N fixation and O. **New Phytologist**, Oxford, v.122, p.571-609, 1992.
- GILLER, K.E.; WILSON, K.J. **Nitrogen Fixation in Cropping Systems**. Wallingford: C.A.B. International, 1991. 313p.
- HARDY, R.W.F.; HOLSTEN, R.D.; JACKSON, E.K.; BURNS, R.C. The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation. **Plant Physiology**, Bethesda, v.43, p.1185-1207, 1968.
- HAGERUP, O. En hygrefil Baelgplante (*Aeschynomene aspera* L.) med bakterrieknolde paa staengelen. **Dan Botany**, v.5, p.19, 1928.
- HUNGRIA, M.; EAGLESHAM, A.R.J.; HARDY, R.W.F. Physiological comparisons of root and stem nodules of *Aeschynomene scabra* and *Sesbania rostrata*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.139, p.7-13, 1992.

- IANNETTA, P.P.M.; JAMES, E.K.; SPRENT, J.I.; MINCHIN, F.R. Time-course of changes involved in the operation of the oxygen diffusion barrier in white lupin nodules. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.46, p.565-575, 1995.
- JACOMINE, P.K.T.; CASTRO FILHO, C.; MOREIRA, M.L.C.; VASCONCELOS, T.N.N.; LEITE SOBRINHO, J.B.P.; MENDES, A.M. **Guia para identificação dos principais solos do Estado de Mato Grosso**. Mato Grosso: PODEAGRO, 1995. 118p.
- JAMES, E.K.; IANNETTA, P.P.M.; NAISBITT, T.; GOI, S.R.; SUTHERLAND, J.M.; SPRENT, J.I.; MINCHIN, F.R.; BREWIN, N.J. A survey of N₂-fixing nodules in the leguminosae with particular reference to intercellular glycoproteins and the control of oxygen diffusion. **Proceedings of the Royal Society of Edinburgh**, Series B. Biological Sciences, London, v.102, p.429-432, 1994.
- JAMES, E.K.; MINCHIN, F.R.; OXBOROUGH, K.; COOKSON, A.; BAKER, N.R.; WITTY, J.F.; CRAWFORD, R.M.M.; SPRENT, J.I. Photosynthetic oxygen evolution within *Sesbania rostrata* stem nodules. **The Plant Journal**, Oxford, v.13, p.29-38, 1998.
- JAMES, E.K.; MINCHIN, F.R.; SPRENT, J.I. The physiology and nitrogen-fixing capability of aquatically and terrestrially grown *Neptunia plena*: the importance of nodule oxygen supply. **Annals of Botany**, London, v.69, p.181-187, 1992b.
- JAMES, E.K.; SPRENT, J.I.; SUTHERLAND, J.M.; McINROY, S.G.; MINCHIN, F.R. The structure of nitrogen-fixing root nodules on the aquatic mimosoid legume *Neptunia plena*. **Annals of Botany**, v.69, p.173-180, 1992a.
- JAMES, E.K.; BARRIOS, E.; CRAWFORD, R.M.M. Tolerance to flooding in nitrogen-fixing trees from the Orinoco basin. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.46, p.23, 1995.
- JAMES, E.K.; IANNETTA, P.P.M.; NIXON, P.J.; WHISTON, A.J.; PEAT, L.; CRAWFORD, R.M.M.; SPRENT, J.I.; BREWIN, N.J. Photosystem II and oxygen regulation in *Sesbania rostrata* stem nodules. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.19, p.895-910, 1996.
- JAYARAM, S.; BAL, A.K. Oleosomos (lipides bodies) in nitrogen-fixing peanut nodules. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.14, p.195-203, 1991.
- JENIK, J.; KUBIKOVA, J. Root systems of tropical trees. III. The heterorhizis of *Aeschynomene elaphroxylon* (Guill et Perr.) Taub. **Preslia**, Czechoslovak, v.41, p.59-65, 1969.

- JENKINS, M.B.; VIRGINIA, R.A.; JARRELL, W.M. Ecology of fast-growing and slow-growing mesquite nodulating rhizobia in Chihuahuan and Sonoran desert ecosystems. **Soil Science of America Journal**, Madison, v.53, p.543-549, 1989.
- JORDAN, D.C. Rhizobiaceae Conn 1938. In: KJRIEG, N.R. ; HOLT, J.G., ed. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wikins, 1984. p.235-244.
- LADHA, J. K.; SO, R.B. Numerical taxonomy of photosynthetic rhizobia nodulating *Aeschynomene* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.44, p.62-73, 1994.
- LADHA, J. K.; PAREEK, R.P.; SO, R. ; BECKER, M. Stem nodule symbiosis and its unusual properties. In GRESSHOFF, P.M.; ROTH, L.E.; STACEY, C.; NEWTON, W.L., eds. **N₂ fixation: Achievements and objectives**. New York: Chapman, 1990. p.633-640.
- LADHA, J.K.; WATANABE, I.; SOANO, S. Nitrogen fixation by leguminous green manure and pratice. In: **Sustainable Agriculture**. Green manure in rice farming. Manila: The International Rice Research Institute, 1988. p.165-183.
- LADHA, J.K.; GARCIA, M; PAREEK, R.P.; RARIVOSON, G. Relative contributions to nitrogenase (acetylene reducing) activity of stem and root nodules in *Sesbania rostrata*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, p.577-583, 1992b.
- LADHA, J.K.; MIYAN, S.; GARCIA, M.: *Sesbania rostrata* green manure for lowland rice: Growth, N fixation *Azorhizobium* spp. inoculation and effects on succeeding crop yields and nitrogen balance. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.7, p.191-197, 1989.
- LADHA, J.K.; PAREEK, R.P.; BECKER, M. Stem-nodulating legume-*Rhizobium* symbiosis and its agronomic use in lowland rice. **Advances in Soil Science**, New York, v.20, p.148-192, 1992a.
- LEVANONY, H.; BASHAN, Y.; KAHANA, Z. Enzyme-linked immunosorbent assay for especif identification and enumeration of *Azospirillum brasiliense* Cd in cereal roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.53, p.358-364, 1987.
- LORQUIN, J.; MOLOUBA, F.; DUPUY, N.; NDIAYE, S.; ALAZARD, D.; GILLIS, M.; DREYFUS, B. Diversity of photosynthetic *Bradyrhizobium* strains from stem nodules of *Aeschynomene* species. In: PALACIOS, R.; MORA, J. ; NEWTON, W.E., eds. **New Horizons in Nitrogen Fixation**. Dordrecht: Kluwer, 1993. p. 683-689.

- LOUREIRO, M. de F. **Caracterização das estirpes de rizóbio e morfologia dos nódulos de raiz e caule de *Aeschynomene* spp. e *Discolobium* spp. nativas do Pantanal Mato-Grossense.** Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1994. 205p. Tese de Doutorado.
- LOUREIRO, M. de F.; FARIA, S.M., JAMES, E.K.; POTT, A. ; FRANCO, A.A. Stem and root nodules on the tropical wetland legume *Aeschynomene fluminensis*. **New Phytologist**, Oxford, v.130, p.283-295, 1995.
- LOUREIRO, M. de F.; HUNGRIA, M.; SAMPAIO, M.J.A.; BALDANI, J.I. Photosynthetic characteristics of strains rhizobia isolated from stem nodules of *Aeschynomene fluminensis* grown in the Pantanal region of Brazil. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W.E., ed. **New horizons in nitrogen fixation**. Dordrecht: Kluwer, 1993. p.629.
- LOUREIRO, M. de F.; JAMES, E.K.; POTT, A. Ocorrência de nodulação em leguminosas do Pantanal Mato-Grossense. In: SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SÓCIO-ECONÔMICOS DO PANTANAL. MANEJO E CONSERVAÇÃO, 2., 1996, Corumbá. SANTORO, M.; DANTAS, M., eds. II. EMBRAPA/CPAP, p.131, 1996, Corumbá. **Resumos...** Corumbá, M.S. 1996.
- LOUREIRO, M. de F.; JAMES, E.K.; SPRENT, J.I. ; FRANCO, A.A. Nitrogen-fixing stem nodules of the legume, *Discolobium pulchellum* Benth. **New Phytologist**, v. 128, p. 283-295, 1994.
- LOUREIRO, M. de F; FARIA, S.M. de; BALDANI, J.I.; POTT, A.; FRANCO, A.A. *Discolobium*: a new genus of leguminosae with stem nodules. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.64, p.428, 1992.
- LOUREIRO, M. de F; JAMES, E.K.; FRANCO, A. A. Nitrogen fixation by legumes in flooded regions. In: SCARANO, F.R.; FRANCO, A.C., eds. **Ecophysiological strategies of xerophytic and amphibious plants in the neotropics**. Series. **Oecologia Brasiliensis**. Rio de Janeiro: UFRJ, 1998. p.191-219. (Oecologia Brasiliensis, 4).
- MARTINS, L.M.V. **Características ecológicas e fisiológicas de rizóbio de caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) isolados a partir de solos da região nordeste do Brasil.** Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996. 213p. Tese de Mestrado.
- MAZZA, M.C.M.; MAZZA, C.A. S.; SERENO, J. R. B. ; SANTOS, S. A.; PELLEGRIN, A.O. **Etnobiologia e conservação do bovino pantaneiro.** Brasília: EMBRAPA/CPAP; Corumbá: EMBRAPA/CPAP, 1994. 61p.
- MERGAERT, P.; GOORMACHTIG, S.; GEELEN, D.; GEREMIA, R.; VALERIO-LEPINIEC, M.; FERNÁNDEZ-LÓPES, M.; GOETHALS, K.; D'HAENZE, W.;

- PROMÉ, J.C.; de BRUIJN, F.J.; VAN MONTAGU, M.; HOLSTERS, M. Early events in the *Azorhizobium caulinodans*-*Sesbania rostrata* symbiosis. In: TIKHONOVICH, I.A.; PROVOROV, N.A.; ROMANOV, V.I.; NEWTON, W.E. **Nitrogen fixation: fundamentals and applications**. Proceedings of the 10th International CONGRESS on Nitrogen Fixation, St. Petersburg, Rússia, 1995. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p.61-66. (Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, 27).
- MINCHIN, F.R.; WITTY, J.F. Nitrogen fixation and oxygen supply in legume nodules. **Journal of the Science of Food Agriculture**, London, v.40, p.122-123, 1987.
- N'DOYE, I.; DE BILLY, F.; VASSE, J.; DREYFUS, B.; TRUCHET, G. Root nodulation of *Sesbania rostrata*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.176, p.1060-1068, 1994.
- N'DOYE, I.; DREYFUS, B. N₂ fixation by *Sesbania rostrata* and *Sesbania sesban* estimated using ¹⁵N and total N difference methods. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.20, p.209-213, 1988.
- NORRIS, D.O. Acid production by *Rhizobium*: a unifying concept. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.22, p.143-166, 1965.
- OLIVARES, F.L. **Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. híbrido) por bactérias endofíticas do gênero *Herbaspirillum***. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1997. 344p. Tese de Doutorado.
- OLSSON, J.E.; ROLFE, B.G. Stem and root nodulation of the tropical legume *Sesbania rostrata* by *Rhizobium* strains ORS 571 and WE7. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.121, p.199-210, 1985.
- PALADINES, O.; LEAL, J.A. Manejo y productividad de las praderas en los Llanos Orientales de Colombia. In: TERGAS, L.E., ed. **Producción de pastos en suelos ácidos de los trópicos**. Cali: CIAT, p.1979. p.331-346.
- PALADINES, O. Management and utilization of native tropical pastures in America. IN: Centro Internacional de Agricultura Tropical. **Proceedings of the Seminar on potential to increase beef production**. (CIAT. Series CE-nº10), Cali, p.25-47. 1974.
- PAREEK, R.P.; LADHA, J.K.; WATANABE, I. Estimating N₂-fixation by *Sesbania rostrata* and *Sesbania cannabina* (Syn *S. Aculeata*) in lowland rice soil by ¹⁵N dilution method. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.10, p.77-88, 1990.

- PARR, J.F.; GARDNER, W.R.; ELLIOT, L.F. **Water potential relations in soil microbiology**. Madison: Soil Science Society of America, 1981. 151p. (SSSA, 9).
- PARSONS, R.; RAVEN, J.A.; SPRENT, J.I. A simple open flow system used to measure acetylene reduction activity of *Sesbania rostrata* stem and root nodules. **Journal of Experimental Botany**, London, v.43, p.595-604, 1992.
- PARSONS, R.; RAVEN, J.A.; SPRENT, J.I. Translocation of iron to the N₂-fixing stem nodules of *Sesbania rostrata* (Brem). **Journal of Experimental Botany**, London, v.46, p.291-296, 1995.
- PARSONS, R.; SPRENT, J.I.; RAVEN, J.A. Humidity and light affect the growth, development and nitrogenase activity of stem nodules of *Sesbania rostrata* (Brem). **New Phytologist**, Oxford, v.125, p.749-755, 1993.
- PINTO-SILVA, V. **Variação diurna dos principais parâmetros limnológicos nos Lagos Recreio e Buritizal- Pantanal Mato-grossense, Barão de Melgaço/MT**. São Carlos: UFSCar, 1991. 322p. Tese de Mestrado.
- POTT, A. Ecosistema Pantanal. In: PUIGNAU, J.P., ed. **Utilización y manejo de pastizales**. Montevideo: IICA-PROCISUR, 1994. p.31-44. (IICA-PROCISUR. Diálogo 40).
- POTT, A. **Pastagens no Pantanal**. Corumbá-MS: EMBRAPA/CPAP, 1988. 58p. (EMBRAPA/CPAP. Documentos, 7).
- POTT, A.; COMASTRI FILHO, J.A. Pastagens no ecossistema Pantanal: Pesquisas para o desenvolvimento sustentável. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 1995, Brasília, D.F. **Anais...** Brasília: SBZ, 1995.
- POTT, A.; POTT, V.J. **Plantas do Pantanal**. Brasília: EMBRAPA/CPAP/SPI, 1994. 320p.
- POTT, E.B., CATTO, J.B., BRUM, P.A.R. de. Períodos críticos de alimentação de bovinos em pastagens nativas no Pantanal Mato-grossense. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.24, p.1427-1332, 1989.
- POTT, V.J.; POTT, A. **Plantas aquáticas do Pantanal**. Corumbá: EMBRAPA/CPAP, Brasília: EMBRAPA-SPI, No prelo.
- POTT, V.J.; REGO, S.C. de A.; POTT, A. **Plantas oleaginosas e aquáticas do Pantanal arenoso**, Corumbá: EMBRAPA/CPAP, 1986. 13p. (EMBRAPA/CPAP. Pesquisa em andamento, 6).

- PUGH, R.; WITTY, J.F.; MYTTON, L.R., MINCHIN, F.R. 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.
- REIS, V.M.; CRUZ, G.B.; FERREIRA, A.; FERNANDES, M.F.; FERREIRA, A.C.; REIS, F.B.; RIBEIRO, J.R.A.; SALLES, J.F.; WEBER, O.B. **Produção e caracterização de soros policlonais para detecção de bactérias diazotróficas**. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1997. 11p. (EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 30).
- RINAUDO, G.; DREYFUS, B.; DOMMERGUES, Y. *Sesbania rostrata* green manure and the nitrogen content of rice crop and soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.15, p.111-113, 1983.
- ROBERTSON, B.K.; ALEXANDER, M. Mode of dispersal of the stem-nodulating bacterium *Azorhizobium*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.26, p.1535-1540, 1994.
- ROBERTSON, B.K.; DREYFUS, B.; ALEXANDER, M. Ecology of stem-nodulating *Rhizobium* and *Azorhizobium* in four vegetation zones of Senegal. **Microbial Ecology**, New York, v.29, p.71-81. 1995.
- RUDD, V.E. *Aeschynomene*. In: POLHILL, R.M.; RAVEN, P.M., ed. **Advances in legume systematics**. Londres: Kew Royal Botanic Gardens, 1981. Part 1. p. 347-354.
- SARASWATI, R.; MATOH, T.; SEKIYA, J. Nitrogen-fixation of *Sesbania rostrata* contribution of stem nodules to nitrogen acquisition. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v.38, p.775-780.1992.
- SASAKAWA, H.; TRUNG, B.C.; YOSHIDA, S. Stem nodulation on *Aeschynomene indica* plants by isolated rhizobia. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v.32, p.145-149, 1986.
- SHEEHY, J.E.; THORNLEY, J.H.M. Oxygen, the *Nif A* gene, nodule structure and the initiation of nitrogen fixation. **Annals of Botany**, London, v.61, p.605-609, 1988.
- SIDDIQUE, A.B.M.; BAL, A.K. Nitrogen fixation in peanut nodules during dark periods and detopped conditions with special reference to lipid bodies. **Plant Physiology**, Bethesda, v.95, p.896-899, 1991.
- SPRENT, J.I. Evolution and diversity in the legume-*Rhizobium* symbiosis: theory. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.161, p.1-10, 1994.

- STEGINK, S.J.; VAUGHN, K.C. Correlation between nodule ultrastructure and ability to produce stem nodules in *Aeschynomene* spp. **Cytologia**, San Francisco, v.53, p.401-406, 1988.
- STOWERS, M.D.; EAGLESHAM, A.R.J. A stem-nodulating *Rhizobium* with physiological characteristics of both fast and slow growers. **Journal of General Microbiology**, London, v.129, p.3651-3655, 1983.
- STRALIOTTO, R. **Custo energético da fixação de nitrogênio em soja inoculada com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* com diferentes capacidades de reciclar H₂**. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1990. 148p. Tese de Mestrado.
- SCHUBERT, K.R.; EVANS, H.J. Hydrogen evolution: a major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbiontes. **Proceedings National Academy Sciences**, USA, v.73, 1207-1211, 1976.
- TAN, I.K.P.; BROUGHTON, W.J. Rhizobia in tropical legumes- XVIII Biochemical basis of acid and alkali reations. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.13, p.389-393, 1981.
- TSIEN, H.C.; DREYFUS, B.L.; SCHMIDT, E.L. Initial stages in the morphogenesis of nitrogen- fixing stem nodules of *Sesbania rostrata*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.156, p.888-897, 1983.
- VAN BERKUN, P.; TULLY, R.E.; KEISTER, D.L. Non pigment and bacteriochlorophyll containing brarhyrhizobia isolated from *Aeschynomene indica*. **Applied and Enviromental Microbiology**, Washington, v.61, p.623-629, 1995.
- VANDEN BOSCH, K.A. Light and electron microscopic visualization of uricase by imunogolg labelling of sections of resin-embedded soybean. **Journal of Microscopy**, Oxford, v.143, p.187-197, 1989.
- VAUGHN, K.C.; ELMORE, C.D. Ultrastructural characterization of nitrogen fixing stem nodules on *Aeschynomene indica*. **Cytobios**, Cambridge, v.42, p.49-62, 1985.
- VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root nodules bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164p. (IBP Handbook, 15).
- VINCENT, J.M. Factors controlling the legume-*Rhizobium* symbioses. In: NEWTON, W.E.; ORME-JOHNSON, W.H., ed. **Nitrogen fixation**. Baltimore: University Park Press, 1980. v.2. p.103-129.

- WATANABE, I.; LIU, C.C. Improving nitrogen-fixing systems and integrating them into sustainable rice farming. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.141, p.57-67, 1992.
- WATANABE, I.; ROGER, P.A.; LADHA, J.K.; VAN HOVE, C. IRRI-International Rice Research Institute. **Biofertilizer Germoplasm Collections at IRRI**. Manila, Philippines, p.66.1992.
- WITTY, J.F.; MINCHIN, F.R.; STOK, L.; SHEEHY, J.E. Nitrogen fixation and oxygen in legume root nodules. **Oxford Surveys of Plant Molecular & Cell Biology**, v.3, p.275.1986.
- WITTY, J.F.; STOK, L.; REVESBECH, N.P. Direct evidence for changes in the resistance of legume root nodules to O₂ diffusion. **Journal of Experimental Botany**, London, v.39, p.1129-1140, 1987.
- WONG, F.Y.K.; STACKEBRANDT, E.; LADHA, J.K.; FLEISCHMAN, D.E.; DATE, A.R.; FUERST, J.A. Phylogenetic analysis of *Bradyrhizobium japonicum* and photosynthetic stem nodulating bacteria from *Aeschynomene* species grown in separated geographical regions. **Applied and Environment Microbiology**, Washington, v.60, p.940, 1994.
- YATAZAWA, M.; SUSILO, H. Development of upper stem nodules in *Aeschynomene indica* under experimental conditions. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v.26, p.315-319, 1980.
- YATAZAWA, M.; YOSHIDA, S.; MAEDA, E. Fine structure of root nodules of *Aeschynomene indica* L. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v.30, p.405-416, 1984.
- YOSHIDA, S. **Fundamentals of crop science**. Manila: International Rice Research Institute, 1981.
- YOUNG, J.P.W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J., ed. **Biological Nitrogen Fixation**. Routledge: Chapman, 1992. p.43-86.
- YOUNG, J.P.W.; DOWNER, H.L. ; EARDLY, B.D. Phylogeny of the phototropic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction based sequencing of a 16 SrRNA gene segment. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.173, p.2271-2277, 1991.