

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

RELAÇÕES HÍDRICAS E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE N₂ EM
Cratylia mollis Mart. ex Benth.

FERNANDA CÍNTIA PIRES E TEIXEIRA

SOB A ORIENTAÇÃO DOS PROFESSORES
SÉRGIO MIANA DE FARIA
CARLOS PIMENTEL

Tese submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
Magister Scientiae em Agronomia,
Área de concentração em
Ciência do Solo.

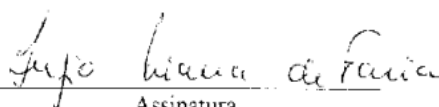
Seropédica, RJ.
Abril, 1999.

**FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE N₂, CONDUTÂNCIA ESTOMÁTICA, CONTEÚDO
HÍDRICO E ALGUNS ASPECTOS METABÓLICOS EM *Cratylia mollis* SOB
DEFICIÊNCIA HÍDRICA.**

FERNANDA CÍNTIA PIRES E TEIXEIRA

APROVADA EM: 18/04/1999

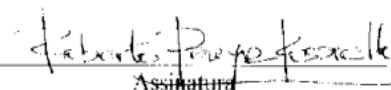
Sérgio Miana de Faria
(Orientador)


Assinatura

Carlos Pimentel
(Co-orientador)


Assinatura

Roberto Oscar Pereyra Rossiello
(Professor)


Assinatura

A Deus

À caatinga, pelos arbustos secos, pelo chão seco, pelas folhas secas,
pelas flores secas, pelo homem forte.
Pela chuva, que chega um dia,
misericordiosa!

A Fernando e Thêra, meus pais, as pessoas que, sem dúvidas, mais deram e
mais esperam por minha construção.

A Lukas e Riandro, dois grandes homens meninos, meus irmãos.

Agradecimentos

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,
À EMBRAPA – Agrobiologia,
Aos Departamentos de Solos e de Fitotecnia,
À CAPES, pelos recursos humanos, infraestrutura e suporte financeiro para desenvolvimento do trabalho.

Aos professores do departamento de Solos, em especial ao Prof. Roberto Oscar Rossiello, pela dedicação e amizade.

Ao Prof. Sérgio Miana de Faria pela orientação para o desenvolvimento do trabalho de tese, e em especial, por me acolher em seu laboratório, em estágios de férias durante graduação.

Ao Prof. Carlos Pimentel pela orientação para o desenvolvimento dos trabalhos de tese.

À Academia Brasileira de Ciências pelo Programa Aristídes Leão de Estímulo às Vocações Científicas que vem contribuindo grandemente para a formação de futuros pesquisadores.

A Lindete Míria Vieira pelo envio de semente, solo, bibliografia, e principalmente pela amizade e acolhida.

A Marta Viana e Carlos Fernando da Cunha pelo grande apoio técnico e amizade durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Ao Luciano Paganucci de Queiroz, Francisco Ataíde Bernardino e Martiniano da Silva, pelas contribuições e dicas sobre *Cratylia*.

Aos funcionários da casa de vegetação e terraço da EMBRAPA, pela grande contribuição na manutenção e montagem dos experimentos, em especial, Jorge Carlos, Cláudio, Rosinaldo, Sérgio, Hélio e Paulo Libano.

A Geraldo Baeta, Rojane Chapeta, Roberto Grégio, Rosa Pittard, Gonzalo Moya, Ademir, Virgínia, dentre tantos que contribuíram com imensa boa vontade para o desenrolar dos trabalhos.

A Dorimar, Sérgio, Vânia, Jorge e Rodrigo pelo auxílio nas buscas bibliográficas.

Ao Aurélio, Jorge Cunha e Paulo pelas grandes vigílias noturnas.

A Rogério Xavier e Ricardo Alexandre pelo auxílio nos cortes para microscopia, pela amizade e paciência.

Aos outros amigos – e portanto os descreverei como os chamo corriqueiramente - todos, enfim, que contribuíram diretamente neste processo, seja com apoio intelectual, técnico, afetivo, moral, alguns dentre eles: Marcelo, Luisão, Marta B., Paulinho, Claudinha, Zezé, Beth, Luiz Cláudio, Lúcia B., Rodrigo, Jolimar, Jorge, Gustavo Duda, Polidoro, Elysson, João Carlos, Vandeir, Mauro, Ernani, Gilmar, Cléa, Janete Jane, Washington Rocha, Marjorie, Lúcia, Jane Cleide, Luciano Mendes, Fabiano, Flavia, Eduardo, Ana Kosawa, Jonas, Zé Roberto e Ricardo.

Aos demais fica a intenção de ter escrito e a certeza de que este caminho foi trilhado com passos amortecidos pelo apoio, e amizade de muitos.

Índice

1- Introdução	01
2- Revisão Bibliográfica	04
2.1- <i>Cratylia mollis</i>	04
2.1.1- Importância Econômica e Distribuição Geográfica	04
2.1.2- Fenologia de <i>C. mollis</i> .	06
2.1.3- Características da Vegetação de Caatinga	07
2.2- Respostas de <i>C. mollis</i> ao Estresse Hídrico	08
2.2.1- Mecanismos de Adaptação à Seca	08
2.2.1.1- Mecanismo de Evitamento	10
2.2.1.1.1- Raiz	11
2.2.1.1.2- Parte Aérea	11
2.2.1.2- Tolerância à Desidratação	13
2.2.1.2.1- Ajuste Osmótico	14
2.2.1.3- Mecanismos de Escape	16
2.2.2- Efeitos do Estresse Hídrico na Fixação Biológica de Nitrogênio	17
3- Materiais e Métodos	21
3.1- Seleção de Estirpes de Rizóbio	21
3.1.1-Experimento 01- Seleção de estirpes para <i>C. mollis</i> em vaso “Leonard”	21
3.1.2- Experimento 02 – Seleção de estirpes para <i>C. mollis</i> em vaso com solo em regimes seco e irrigado	23
3.1.2.1- Condições Ambientais no Local da Experimentação	26

3.1.2.1a- Umidade Relativa do Ar	26
3.1.2.1b- Água Gravimétrica	27
3.2- Respostas de <i>C. mollis</i> ao Estresse Hídrico	29
3.2.1- Mecanismos de Adaptação à Seca	29
3.2.1.1- Conteúdo Relativo de Água na Folha (CRAF)	29
3.2.1.2- Condutância Estomática (gs)	30
3.2.1.3- Determinação do Conteúdo de Açúcares Solúveis e N-amino	31
3.2.2- Efeito do Estresse Hídrico na Fixação Biológica de Nitrogênio	32
3.2.2.1- Massa Seca Acumulada	32
3.2.2.2- Avaliação da Atividade da Nitrogenase (Atividade de Redução de Acetileno – ARA)	32
4- Resultados	33
4.1- Seleção de Estirpes de Rizóbio	33
4.1.1- Experimento 01- Seleção de estirpes para <i>Cratylia mollis</i> em vaso “Leonard”	33
4.1.2- Experimento 02 – Seleção de estirpes para <i>Cratylia mollis</i> em vaso com solo em regimes seco e irrigado	35
4.2- Respostas de <i>C. mollis</i> ao Estresse Hídrico	37
4.2.1- Efeitos do Estresse Hídrico em Parâmetros Fisiológicos	37
4.2.1.1- Conteúdo Relativo de Água na Folha (CRA)	37
4.2.1.2- Condutância Estomática	41
4.2.1.3- Determinação do Conteúdo de Açúcares Solúveis e N-amino	45
4.2.2- Efeito do Estresse Hídrico no Acúmulo de Massa Seca	47

4.2.2..1-Parte Aérea Seca	47
4.2.2..2-Massa Seca de Raiz	47
4.2.2..3-Massa Seca de Nódulo	48
4.2.3- Avaliação da Atividade da Nitrogenase (Atividade de Redução de Acetileno – ARA).	51
5- Discussão	53
5.1- Seleção de Estirpes de Rizóbio	53
5.1.1- Experimento 01- Seleção de estirpes para <i>Cratylia mollis</i> em vaso “Leonard”	53
5.1.2- Experimento 02 – Seleção de estirpes para <i>Cratylia mollis</i> em vaso com solo em regimes seco e irrigado	54
5.2- Respostas de <i>C. mollis</i> ao Estresse Hídrico	55
5.2.1- Efeitos do Estresse Hídrico em Parâmetros Fisiológicos	55
5.2.1.1- Conteúdo Relativo de Água na Folha (CRA)	56
5.2.1.2- Condutância Estomática (gs)	58
5.2.1.3- Determinação do Conteúdo de Açúcares Solúveis e N-amino	60
5.2.2- Efeito do Estresse Hídrico no Acúmulo de Massa Seca	62
5.2.2.1- Massa Seca Acumulada	63
5.2.3- Avaliação da Atividade da Nitrogenase (Atividade de Redução de Acetileno – ARA).	64
6-Conclusões	67
7- Referências Bibliográficas	68

Índice de Tabelas e Figuras

Tabela 01- Tratamentos utilizados no experimento de *C. mollis* em vaso “Leonard”. 22

Tabela 02- Tratamentos utilizados no experimento de *C. mollis* em vaso com solo. 25

Tabela 03 - Valores de água gravimétrica sob diferentes pressões exercidas nas amostras do solo utilizado no experimento 28

Tabela 04- Acúmulo de biomassa em *C. mollis*. As siglas indicam representadas indicam: (MSPA) massa seca de parte aérea; (MSN) massa seca de nódulos; (NN) número de nódulo. 36

Tabela 05- Acúmulo de biomassa em *C. mollis* nas parcelas seca e irrigada após rehidratação. As siglas indicam representadas indicam: (MSPA) massa seca de parte aérea; (MSN) massa seca de nódulos; (NN) número de nódulo. 50

Figura 01- Umidade relativa e temperatura do ar em casa de vegetação no período das avaliações fisiológicas em *C. mollis*. 27

Figura 02- Capacidade de retenção de água no solo utilizado no experimento em casa de vegetação. 28

Figura 03- Acúmulo de biomassa de parte aérea em *C. mollis* plantada em vaso “Leonard” 34

Figura 04- Acúmulo de biomassa de parte aérea em *C. mollis* plantada em vaso “Leonard” 34

Figura 05- Conteúdo relativo de água em folha de <i>C. mollis</i> ao longo de 46 dias de estresse hídrico.	37
Figura 06- Foto de folha de <i>C. mollis</i> com conteúdo de água de 30%.	39
Figura 07- Foto de folha de <i>C. mollis</i> em condições de boa hidratação.	39
Figura 08- Foto de corte longitudinal em folha bem hidratada de <i>C. mollis</i> evidenciando estômatos abaxiais e pêlos. Células apresentam-se bem definidas com presença de grânulos de amido. Maior magnificação da figura 07.	40
Figura 9- Foto de corte longitudinal em folha de <i>C. mollis</i> , após 45 dias de supressão de rega. Maior magnificação da figura 08.	40
Figura 10- Condutância estomática em <i>C. mollis</i> seca e irrigada às 9:00h. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos seco e irrigado, enquanto letras minúsculas indicam variações ocorridas durante o estresse.	42
Figura 11- Condutância estomática em <i>C. mollis</i> seca e irrigada às 12:00h. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos seco e irrigado, enquanto letras minúsculas indicam variações diárias ocorridas durante o estresse.	43
Figura 12- Condutância estomática em <i>C. mollis</i> seca e irrigada às 16:00h. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos seco e irrigado, enquanto letras minúsculas indicam variações ocorridas durante o estresse.	44
Figura 13- Concentração de açúcares solúveis em <i>C. mollis</i> seca e irrigada.	46
Figura 14- Concentração de N-amino em <i>C. mollis</i> seca e irrigada.	46

Figura 15- Acúmulo de biomassa de parte aérea em *C. mollis* nas parcelas secas e irrigadas após rehidratação. **49**

Figura 16- Acúmulo de biomassa de raiz em *C. mollis* nas parcelas secas e irrigadas após rehidratação. **49**

Figura 17- Massa seca de nódulos de *C. mollis* seca e irrigada após um mês de rehidratação. **51**

Figura 18- ARA total de *C. mollis*, inoculada com solo de Petrolina em regimes seco e irrigado após um mês de rehidratação. **52**

Resumo

Cratylia mollis Mart. ex Benth. é uma espécie leguminosa, utilizada como forrageira destinada à caprinocultura, e é nativa do semi-árido nordestino. Estudou-se os efeitos do estresse hídrico no processo de fixação biológica de N₂, a fim de se compreender o comportamento desta planta em condições estressantes. Realizou-se seleção de estirpes de rizóbio noduladoras de *Cratylia* em vaso “Leonard”, e estas foram testadas em experimento com solo. Nestas plantas após oito meses do plantio, coincidente com o início da fase reprodutiva, estabeleceu-se estresse hídrico através de suspensão de rega durante quarenta e seis dias. As plantas estressadas foram comparadas com plantas controle, irrigadas diariamente com água destilada. Com a avaliação da condutância estomática(gs) pôde se observar que *C. mollis* realiza eficiente controle de perda d’água, através da manutenção dos estômatos fechados, nos horários de 12:00h. O status metabólico, avaliado através da quantificação de açúcares solúveis e teor de N-amino, indica uma tendência de que a planta realiza ajuste osmótico. Quando o conteúdo de água na folha oscilou em torno de 33%, a planta, após rehidratação, recuperou-se, formando novas folhas. O controle de perda d’água e a manutenção de baixo status metabólico indicam predominância dos mecanismos de evitamento, utilizados por *C. mollis* para tolerar déficit de umidade. Observou-se interrupção na fixação de N₂ durante o período de suspensão de rega, normalizando-se após rehidratação, com a formação de novos nódulos ativos.

Abstract

The forage legume *Cratylia mollis* Mart. ex Bent., used to feed goats is common in the semi-arid Northeast of Brazil. Physiological studies related to water stress and its effects on the biological nitrogen fixation of the plant in symbiosis with *Rhizobium* strains. These rizobia strains that nodulate *Cratylia* were selected under greenhouse conditions using “Leonard” jars and then tested under soil conditions also at the greenhouse. After eight months of growth, in the beginning of the reproductive stage of the plants, water stress was imposed by withholding water for forty-six days. Control plants were irrigated every other day throughout the experimental period. Stomatal conductances was measured assuming that the stomata were fully closed by the time of highest photosynthetic activity and results suggests that *C. mollis* has a efficient water control. Quantification of soluble sugars and N-amine also suggest that the plant is capable of osmotic adjustment. The relative content of water in the leaf (RCWL) oscillated around 33% and showed the permanent wilting point (PWP) . These characteristics show that *C. mollis* uses avoidance mechanisms to tolerate water stress. The biological nitrogen fixation process was interrupted by the time of water stress but, after rehydration new actives nodules were formed.

1-Introdução

O gênero *Cratylia* tem sido estudado para uso como forrageira por diferentes grupos de pesquisas relacionados à agricultura tropical devido as suas características de tolerância à solos ácidos e à seca em regiões semi-áridas (QUEIROZ & CORADIN,1995).

A região nordeste possui grande parte das áreas semi-áridas brasileiras, sendo desta forma, um grande arcabouço de plantas tolerantes a pouca disponibilidade de água, características da vegetação de Caatinga. Nesta região, esta vegetação tem grande importância econômica, na bovinocultura e, principalmente, na caprinocultura. Entretanto, o cultivo de pastagens para estes animais é limitado em decorrência de baixos índices pluviométricos. As áreas de pastagens de baixo porte são bastante ricas, porém insuficientes, obrigando o rebanho a procurar plantas de porte arbustivo e arbóreo para alimentação alternativa (SILVA *et al.*, 1984).

Segundo SUBARAO *et al.*, (1995), em avaliação agronômica, o estresse hídrico é definido como uma redução na produção de grãos atribuída à deficiência de água. O cultivo de leguminosas produtoras de grãos, que depende da umidade do solo mantida pelas

chuvas, é propensa a secas intermitentes durante a fase vegetativa e/ou de crescimento reprodutivo, a recuperação das culturas após uma seca é determinada por chuvas subsequentes (SUBARAO *et al.*, 1995). O estresse é dito terminal quando ocorre a fase de enchimento de grãos (NAGESWARA RAO *et al.*, 1985) mas é ainda mais crítico para culturas crescidas depois de uma estação chuvosa e é dependente da umidade retida no solo.

Parentes selvagens podem possuir características relevantes para mecanismos de resistência à seca de legumes cultivados (PARSONS & HOWE, 1984). Estudos indicam *Vigna unguiculata* (L.) Walp., como uma espécie bem adaptada a ambientes quentes (RACHIE & ROBERTS, 1974; SPRENT, 1976), e isto sugere uma preocupação em se estudar outros indivíduos da vegetação de Caatinga.

Em geral, as espécies bem adaptadas às condições adversas têm baixo potencial de produção despeito de sua superior adaptação local. Muitas dessas espécies não estão presentes na agricultura atual, onde os sistemas de plantio e práticas de manutenção da cultura são radicalmente diferentes das condições sob as quais desenvolvem-se as nativas. Assim, é importante para a perspectiva de melhora nas culturas, identificar os atributos fisiológicos específicos que contribuem para sua adaptabilidade em condições de déficit umidade nos ambientes nativos (SUBARAO *et al.*, 1995).

As adaptações que as leguminosas desenvolveram durante o curso de sua evolução, tem grande importância na compreensão e usufruto de ecossistemas que são marcados por déficit de umidade, a exemplo da Caatinga .

Tem-se demonstrado preocupação em estudar características peculiares de espécies forrageiras arbustivas definindo a importância e o potencial de uso, além de perspectivas de

avaliação da susceptibilidade a pragas e doenças, exigências nutricionais e principalmente a sua adaptação ao ambiente. Desta forma, este trabalho objetiva-se estudar alguns aspectos do comportamento da espécie *Cratylia mollis* em, nas seguintes perspectivas:

- Avaliar o comportamento de *C. mollis* sob condições de déficit hídrico, verificando suas respostas ao estresse submetido.
- Isolar e selecionar estirpes de rizóbio eficientes para fixação de nitrogênio em simbiose com *C. mollis*.

2- Revisão Bibliográfica

2.1-*Cratylia mollis*

2.1.1- Importância Econômica e Distribuição Geográfica

Cratylia mollis Mart. ex Benth. é uma leguminosa arbustiva, espécie perene, nativa do semi-árido brasileiro, conhecida na região como feijão camaratuba, e é considerada excelente recurso forrageiro para o período seco. Cultivada em Petrolina, PE, floresce geralmente no período abril - maio e matura em julho - agosto, porém o período entre a antese e a maturação não é uniforme (SILVA *et al.*, 1984). Produz grandes quantidades de sementes com reprodução vigorosa. Em condições naturais, observou-se que a planta é resistente a pragas e doenças. Todavia, as plantas do banco de germoplasma do CPATSA - EMBRAPA apresentam susceptibilidade ao ataque de ferrugem (*Ravenalia* sp.) (SILVA *et al.*, 1984).

Sua ocorrência é observada na região nordeste do Brasil nos estados da Bahia, Pernambuco, Ceará e Piauí. Na Bahia ocorre no centro-norte, na região do Raso da Catarina

e municípios de Canudos, Casa Nova, Irecê, Jacobina, Morro do Chapéu e Paulo Afonso; em Pernambuco ocorre principalmente no vale do Moxotó, entre Arcoverde e Ibimirim; no Ceará ocorre no Planalto do Ibiapava, além dos municípios de Jaicós, Oeiras, Picos, Serra Branca e São Raimundo Nonato. É uma planta típica da Caatinga, ocorrendo em geral em formações arbustivas densas hiperxerófilas, como as encontradas no Raso da Catarina e no Vale do Moxotó (QUEIROZ & CORADIN, 1995).

C. mollis é indicada por SILVA (1984) como destacado recurso forrageiro para regiões semi-áridas, principalmente no período seco, por ter grande resistência à seca, à pragas e doenças, além de produzir grande quantidade de sementes, reiterando OTERO (1952), que já descrevia o feijão camaratuba com uma leguminosa que vegetava abundantemente no interior da Bahia, constituindo valioso recurso para alimentação do gado no período de estiagem.

A camaratuba tem uma participação na dieta dos caprinos, em Caatinga nativa e rebaixada, avaliada em 18,20%, o que é considerada elevada (LIMA *et al.*, 1987). A participação da camaratuba e das outras espécies arbustivas forrageiras juntas, com potencial de uso no semi-árido nordestino, na fitomassa foi de 4,30% e 39,10%, respectivamente, segundo LIMA *et al.*, (1987). Encontra-se entre as forrageiras de boa produtividade quando comparado à leucena (*Leucaena leucocephala* (L.) De Wit) que é a mais usada na região como fonte de proteínas. SILVA (1992), afirma que a camaratuba possui de produtividade de matéria seca em torno de 1697 Kg/ha/ano, intermediários ao mororó (*Bahinia cheilantha* (Bong.) Steud.) e a leucena, com 1275 e 2434 kg/ha/ano, respectivamente.

C. mollis, quando avaliada por OLIVEIRA (1988), dentre outras leguminosas forrageiras indicadas para pastejo direto e produção de feno na região semi-árida, obteve maiores índices de aceitação pelos animais, juntamente com duas cultivares de leucena - peru e canningham - e o mororó. Em relação ao desenvolvimento fenológico e produção de matéria seca, OLIVEIRA (1988) não conseguiu observar resultados tão rápidos quanto para leucena, sendo desta forma, indicada para condições naturais de Caatinga rebaixada, por possuir crescimento lento. A condição de perenidade e resistência a baixas taxas de pluviosidade a caracterizam como bom recurso forrageiro.

Dados de digestibilidade in vitro, na fração comestível desta forrageira estão entre 56,16% e 45,47%, considerados bons para leguminosas arbustivas (SILVA, 1988). O teor de proteína bruta foi avaliada em torno de 20% (SILVA, 1988). Forrageira perene, no banco de germoplasma de forrageiras do CPATSA, a camaratuba é cultivada há doze anos, demonstrando que pode ser utilizada em bancos de proteína para pastejo.

2.1.2- Fenologia de *Cratylia mollis*.

Pertence à família *Leguminosae*, sub-tribo *Papilionoideae*, tribo *Phaseoleae*, sub-tribo *Dioclecinae*.

Segundo QUEIROZ & CORADIN (1995), o gênero *Cratylia* compreende arbustos de 1,5 a 3m ou lianas volúveis, com folhas trifolioladas, estipeladas, folíolos membranáceos a cartáceos, os laterais ligeiramente assimétricos. A inflorescência é um pseudoracemo nodoso com nodosidades capitadas a clavadas; com 6 a 9 flores por nodosidade. As flores medem de 1,5 cm a 3 cm com pétalas lilases a magenta. O fruto

mede em torno de 15 cm x 1,5 cm, sendo um legume com deiscência elástica com 4 a 8 sementes. As sementes são lenticulares, compressas, elípticas a orbiculares medindo cerca de 8-12 x 6 - 8 x 2-3mm.

A camaratuba, classificada como *Cratylia mollis* Mart. ex Benth., foi identificada por LEWIS (1987) e o gênero foi revisado por QUEROZ (1995), devido a problemas de sinonimias e equívocos encontrados na literatura. Difere-se das demais espécies do gênero por possuir face abaxial do folíolo com colorido branco-suave; e ser endêmica de ecossistema de caatinga. *Cratylia mollis* tem hábito arbustivo, folíolos ovais com ápice obtuso e hipófilo viloso; a inflorescência possui eixo ereto de mais de 15cm; flores maiores que 2,5 cm com estandarte oval, seríceo (QUEIROZ & CORADIN, 1995).

2.1.3- Características da Vegetação de Caatinga

Caatinga é uma palavra de origem indígena que significa floresta branca, na linguagem Tupi e, provavelmente, faz alusão a uma aparência de esqueleto desta vegetação de mata espinhosa na estação seca quando muitas espécies perdem as folhas. O clima é semi-árido, com médias de chuvas anuais entre 300 mm (em áreas secas) a 750 – 800 mm quando a caatinga limita-se com vegetação de cerrado. A estação seca dura em torno de 7 a 11 meses. A vegetação de caatinga é espinhosa, fechada, com arvoretas secas, medindo entre 3 e 5 metros, e ocasionalmente pequenas árvores de 6 a 8 metros. A grande maioria dos indivíduos que ocorre na Caatinga é da família *Legumionosae* (LEWIS, 1987).

2.2- Respostas de *C.mollis* ao Estresse Hídrico

2.2.1-Mecanismos de Adaptação à Seca

Segundo PASSIOURA (1996), os puristas insistem que seca é um termo meteorológico que se refere, substancialmente, a períodos em que as chuvas são insuficientes para conservar o potencial de evaporação, ao contrário de uma interpretação mais ampla, que define seca como uma circunstância em que as plantas sofrem redução de crescimento ou produção, devido ao suprimento de água insuficiente, ou por causa de altos déficits de umidade, apesar da quantidade de água no solo estar aparentemente em níveis adequada.

Seca pode ser considerada como um conjunto de diferentes pressões climáticas. Vários fenômenos podem produzir seca: choques térmicos, déficit hídrico, baixos valores de umidade relativa do ar, insolação e salinidade. A combinação desses fenômenos induz diferentes tipos de seca e esta diversidade de formas de seca conduz à seleção de numerosos tipos de mecanismos de tolerância para diferentes níveis de organização (MONNEVEUX & BELHASSEN, 1996).

Um estresse biológico pode ser definido como um fator capaz de induzir uma força potencialmente injuriosa aos organismos vivos. As plantas, de um modo geral, possuem diversas adaptações a estresses ambientais, que se manifestam em diversas fases de desenvolvimento da planta, inclusive nas formas de sementes e esporos. Entretanto, segundo LEVITT (1980) não se compreende estas adaptações como resistência, pois esta diz respeito a mecanismos utilizados pela planta durante sua fase vegetativa. LEVITT

(1980) considera mecanismos utilizados pela planta, seja parcial ou completamente, que isole as células dos efeitos do estresse hídrico por uma barreira física ou por um dispositivo de exclusão (uma barreira química ou metabólica), dotada de resistência através do evitamento.

O decréscimo do conteúdo de água na planta é acompanhado de redução na turgescência das células, fechamento dos estômatos, redução na atividade fotossintética, e interferência em muitos processos metabólicos básicos. Eventualmente, a desidratação contínua causa desorganização no protoplasma. Os efeitos da água nos processos fisiológicos podem ser considerados como os maiores fatores de regulação do crescimento da planta, associados aos efeitos de hormônios produzidos em resposta ao déficit hídrico (KRAMER & BOYER, 1995).

Algumas espécies bem adaptadas a condições locais empregam uma gama de mecanismos morfológicos, fenológicos e fisiológicos para uso eficiente dos recursos ambientais disponíveis. Estas adaptações caracterizam-se como instrumentos para a agricultura atual, no intuito de favorecer a produção nos diferentes ecossistemas, principalmente, onde a deficiência de água constitui-se como fator limitante. KRAMER & BOYER, (1995) afirmam que as plantas, incluindo principalmente as espécies tropicais, e em particular as leguminosas, desenvolveram adaptações ao longo do seu processo evolutivo bastante significativas em relação ao déficit hídrico, por estarem frequentemente sujeitas a este estresse.

LEVITT (1980), agrupou os atributos adaptativos à seca de determinadas plantas em dois grupos básicos de mecanismos de resistência à seca, classificados em grupos de baixo e alto status hídrico, como tolerância e evitamento, respectivamente.

Algumas espécies são aptas a manter ou prolongar o seu ciclo reprodutivo em função do conteúdo de água estocado no solo. SUBARAO *et al.*, (1995) observaram que espécies de grão de bico (*Cicer arietinum* L.), guandu (*Cajanus cajan* L. Millsp.) e amendoim (*Arachis hypogaea* L.) crescem em seus ambientes naturais, frequentemente sujeitos a estresses de seca, evidenciando maiores colheitas quando ocorre aumento da umidade do solo durante a fase reprodutiva.

As características de evitamento e tolerância, não ocorrem isoladamente e adequam-se aos diferentes níveis de organização de plantas. SUBARAO *et al.*, (1995), descrevem uma classificação atualizada, a partir dos dois grupos de mecanismos classificados por LEVITT, (1980).

2.2.1.1- Mecanismos de Evitamento

SUBARAO *et al.*, (1995) mostram uma divisão em dois grupos baseados nas seguintes premissas: máxima absorção de água através do aumento na capacidade do sistema radicular adquirir água e otimização no uso de água absorvida para a produção de matéria seca. São considerados atributos morfológicos de parte aérea e raiz que são importantes na regulação do uso de água pelas plantas, e na maximização de extração da umidade do solo, respectivamente.

2.2.1.1.1- Raiz

As plantas nativas, freqüentemente, mantêm alta densidade e grandes comprimentos de raiz, que são requeridos superficialmente para facilitar a rápida absorção de chuvas recentes, antes que sejam evaporadas; providenciam reservas em caso de doenças ou ataque de pragas; retiram nutrientes praticamente imóveis como o P e competem com ervas daninhas e plantas vizinhas por água e nutrientes (PASSIOURA, 1983).

2.2.1.1.2- Parte Aérea

Os movimentos contribuem para proteger a planta das injúrias da seca, antes mesmo de atingir o tecido. Exemplos clássicos dizem respeito ao enrolamento de folhas em gramíneas e paralelotropismo em feijão, ao meio-dia ou em horários em que a atividade fotossintética é intensa.

LUDLOW *et al.*, (1985), observaram que siratro (*Macropitilum artropurpureum* Benth.) tem limitada capacidade para fazer ajuste estomático, assegurando alta sensibilidade dos estômatos para potencial hídrico e para umidade, com o aumento do déficit hídrico, juntamente com movimentos foliares e mudança de folha, que minimizam as perdas d'água.

Tratando-se de atributos de parte aérea, o controle estomático assume grande peso na sobrevivência e desenvolvimento da planta, de forma que o ajuste estomático é bastante explorado no sentido de compreender as relações hídricas a nível foliar (BURROWS & MILTHORPE, 1976, TARDIEU & SIMONNEAU, 1998; DAVIES & JARVIS, 1998 MOTT & BUCKLEY, 1998). A condutância estomática responde a fatores ambientais

como densidade do fluxo de luz, potencial hídrico de folha, umidade, temperatura, velocidade do vento, nutrição mineral, concentração de dióxido de carbono (BURROWS & MILTHORPE, 1976).

Avaliando a planta como um todo, as respostas estomáticas, para transpiração e para controle do conteúdo de água, não podem ser consideradas como a soma de mecanismos individuais cujos pesos são independentes das condições ambientais (TARDIEU & SIMONNEAU, 1998). Isto requer identificação dos mecanismos que tenham uma grande contribuição para o comportamento estomático em condições ambientais especificadas (TARDIEU & SIMONNEAU, 1998).

As raízes tem papel essencial na percepção da seca, via emissão de mensagens químicas que chegam até a parte aérea, através do xilema. Essa mensagem contribui para o controle da abertura estomática, taxa de expansão foliar e provavelmente muitos outros processos. A natureza das mensagens é sujeita a controvérsias, mas o ácido abscísico (ABA) tem provavelmente uma contribuição crucial (TARDIEU, 1996; JANSEN, *et al.*, 1996). JANSEN, *et al.*, (1996) classificam o controle hormonal do ABA como mediador de processos fisiológicos, e a resposta de plantas para o estresse hídrico, como um mecanismo que contribui para a tolerância à desidratação de algumas plantas.

O aumento da concentração de ABA na seiva de plantas de trigo causa fechamento estomático (ZHANG & DAVIS, 1991). Entretanto, o fechamento estomático também ocorre sem que haja aumento de ABA no xilema, sugerindo que outros compostos podem também influenciar na sinalização da raiz na parte aérea (TARDIEU, 1996). Hormônios vegetais exercem importante papel na regulação de respostas a mudanças ambientais.

Muitas adaptações morfológicas e fisiológicas para o estresse hídrico são controladas pelo ABA. Este envolve-se no fechamento estomático e na expressão gênica.

TURNER (1986), observou a influência do déficit hídrico na produção de ABA, a partir de conclusões anteriores de que o ácido abscísico é um inibidor do crescimento foliar, funcionando portanto, como uma mensagem da raiz controladora do crescimento da parte aérea.

2.2.1.2- Tolerância à Desidratação

SUBARAO, (1995) descreve tolerância à desidratação como a habilidade que as células possuem em continuar metabolizando sob baixos potenciais hídrico na folha. Em ambientes onde pode ocorrer deficiência hídrica em algum estágio de crescimento da planta, tolerância à desidratação pode realizar importante papel na sobrevivência da cultura, até o momento em que chuvas subsequentes aumentem umidade do solo (TURNER,1979). Alta tolerância é usualmente associada com baixas taxas de crescimento e desenvolvimento, LUDLOW, (1980) considera que a exploração deste mecanismo por muitas plantas, torna-as carentes de estratégias de evitamento.

Como característica de tolerância, SUBARAO, (1995) cita ainda, a plasticidade de desenvolvimento de algumas culturas, que é ajustado de acordo com a avaliação da umidade do solo, realizada pela planta, e pode envolver ajustamento de área foliar; movimentos foliares; controle estomático; a habilidade para produzir novas folhas, além de regular a fase reprodutiva produzindo novas flores e vagens quando há aumento de umidade.

2.2.1.2.1- Ajuste Osmótico

Este mecanismo, apesar de ser compreendido na sua essência, como um conceito relativamente comum entre os autores principais, a sua posição dentro dos grupos dos mecanismos de adaptação à seca, vem sendo repensada após várias discussões no tema (LEVITT, 1980, MORGAN, 1984, SUBARAO *et al.*, 1995).

LEVITT(1980), considera o ajuste osmótico como um mecanismo de tolerância e baseia-se na redução do potencial osmótico da planta em função do potencial de pressão. Reduzido o potencial hídrico há um considerável aumento no potencial osmótico proporcional ao aumento de sais na planta, e uma conseqüente absorção de água do solo. Segundo MORGAN, (1984) ajuste osmótico como o acúmulo ativo de solutos nos tecidos da planta (raiz ou parte aérea) em resposta às reduções no potencial hídrico de folha. Altos conteúdos de açúcares solúveis mantidos durante a rehidratação em espécies vegetais submetidas a estresse hídrico, podem ser considerados um critério para tolerância celular (VASQUEZ-TELLO *et al.*,1990).

Solutos compatíveis como açúcares, aminoácidos como prolina e componentes de amônio quaternário como glicina e betaina, protegem as membranas e as enzimas dos prejuízos induzidos pela desidratação (HSIAO *et al.*, 1984).

A redução na atividade fotossintética reduz o movimento do nitrato e outros compostos da raiz para as folhas, portanto, a redução de nitrogênio e síntese de aminoácidos pode ser inibida em ambientes com limitações de água (MULLETT & WHITSITT, 1996). Algumas mudanças metabólicas induzidas por déficit hídrico são resultado da diminuição no crescimento das folhas novas, e portanto, o decréscimo da utilização de carbono e nitrogênio produzidos em folhas velhas e implicam a necessidade

de estocagem de carbono e nitrogênio para tamponar os efeitos dessas mudanças transitórias, durante condições de estresse hídrico (MULLET & WHITSITT, 1996). A despolimerização dos compostos estocados dá suporte ao ajuste osmótico (MULLET & WHITSITT, 1996).

As modificações causadas no metabolismo de nitrogênio são indicadoras de estresse hídrico em plantas. Estas indicações são relatadas como uma tendência a diminuição de síntese de proteínas redução da relação proteína/ aminoácido e queda na atividade da redutase do NO_3^- (APARICIO-TEJO, 1982).

A degradação de proteínas constitui-se um mecanismo reparador de substrato nitrogenado para as reações metabólicas essenciais à planta durante o estresse hídrico. CASTRILO *et al.*, (1990) mostram uma queda drástica da atividade da redutase do NO_3^- em consequência da diminuição de nitratos procedentes do fluxo de xilema; uma redução inicial no conteúdo de proteínas causado por degradação, o qual é mantido pelos altos valores de amônio encontrados e um subsequente aumento no teor de proteínas, indicando nova síntese protéica.

Entretanto, TURNER (1986), além de inserir mais um grupo de mecanismos, passa a considerar ajuste osmótico como um mecanismo de evitamento e não mais de tolerância, como descrito anteriormente, apesar dele dizer respeito às mesmas maneiras fisiológicas da planta se proteger dos efeitos da seca.

A ocorrência e extensão do ajuste osmótico em plantas submetidas à seca depende de três fatores: a razão da seca, o nível do déficit hídrico e a capacidade da espécie para fazer ajuste estomático (LUDLOW *et al.*, 1985).

Segundo PIMENTEL,(1998), as leguminosas, em geral, não fazem ajuste osmótico, tornando o controle estomático e os grandes comprimentos radiculares como os principais mecanismos para controle do status hídrico, entretanto o guandu (*C. cajans*) e amendoim (*A. hypogaea*) realizam o ajuste, sendo mais adaptadas que as demais.

2.2.1.3-Mecanismos de Escape

Escape à seca é uma estratégia que busca um ajuste entre o desenvolvimento fenológico e o período em que o solo mantém seus maiores índices de umidade. TURNER (1986), avalia a produção das culturas que se utilizam do escape como mecanismo de superaproveitamento da água disponível, em ambientes onde a estação de crescimento é curta e a seca severa é predominante.

Para muitas espécies cultivadas, a curta duração é o maior objetivo agrônômico, não somente para adequar a fenologia à extensão das estações climáticas, mas também por outras razões, como combinar cultura/genótipos num intensivo sistema de rotação de culturas SUBARAO, (1995).

2.2.2- Efeitos do Estresse Hídrico na Fixação Biológica de Nitrogênio

Bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* através da simbiose com espécies leguminosas, realizam a fixação biológica de N₂. As plantas

desenvolvem nódulos nas raízes, onde as bactérias se alojam, podendo também ocorrer no caule em algumas espécies.

Gravuras de leguminosas noduladas do gênero *Ornithopodium* datam de 1858, sendo que em torno de 1908 já se recomendava a inoculação de lavouras de leguminosas utilizando solos de áreas cultivadas anteriormente com a espécie (SIQUEIRA & FRANCO, 1988).

Em amplo levantamento realizado por FARIA *et al.*, (1989) na Família Leguminosae, a sub-família Mimosoideae apresentou 90% das suas espécies aptas a desenvolver simbiose com o rizóbio; Papilionoideae, com 97% e Caesalpinoideae com menor proporção de cerca de 27%. Desta maneira, *C. mollis* encontra-se taxionomicamente localizada no grupo com maior número de indivíduos descritos, que desenvolvem associação simbiótica com bactérias diazotróficas.

O processo de nodulação envolve mudanças fisiológicas tanto na bactéria quanto na planta. A bactéria torna-se apta a realizar a fixação biológica de N₂ através do consumo de compostos carbônicos enviados pela planta, conferindo-a o status de simbiótica. A planta, em contra partida, apesar de desprender mais energia no processo metabólico devido ao consumo alto consumo de C requerido pela bactéria, passa a receber a amônia gerada nos nódulos (ARAUJO & HUNGRIA, 1994).

Por causa da alta sensibilidade da simbiose leguminosa – rizóbio para déficit hídrico, o nitrogênio é freqüentemente um fator limitante para o crescimento e produtividade de muitos legumes crescidos em ambientes com limitação de água (SUBARAO, *et al.*, 1995).

A simbiose leguminosa – rizóbio é uma interação complexa entre a bactéria, a raiz hospedeira e o ambiente. O rizóbio sobrevive e cresce em volumes de solo ou na rizosfera, então o déficit de umidade neste ambiente pode afetar alguma fase da simbiose, como a infecção da raiz pelo rizóbio; a iniciação, o desenvolvimento e a função do nódulo; o crescimento do legume hospedeiro, além de dificultar a manutenção dos teores de fotossintatos, nutrientes e água nos nódulos radiculares (SUBARAO, *et al.*, 1995). O processo envolve uma série de etapas que dizem respeito ao simbiote e ao hospedeiro, constituindo uma troca de sinais químicos e genéticos. Estes sinais de atração ao rizóbio são produzidos através de compostos exudados pelas plantas como aminoácidos, açúcares, ácidos carboxílicos, homoserina e flavonoides (DHARMATILAKE & BAUER, 1992). Além da adesão ocorre também estímulos à multiplicação das bactérias a partir de outras substâncias exudadas, principalmente pelas raízes laterais (ARAUJO & HUNGRIA, 1994).

O rizóbio é capaz de estabelecer, com sucesso, simbiose com leguminosas em ambientes com déficit hídrico, entretanto requer tolerância a alto níveis de nitrato (SUBARAO, *et al.*, 1995). Já a presença deste composto em grandes quantidades no solo, inibem a nodulação. Outro fator, que pode alterar a relação entre a bactéria e a raiz, é citado por SPRENT, (1975), e diz respeito à grande adesão entre os pêlos radiculares e as partículas do solo, conseqüente da perda de umidade. WARRAL & ROUGHLEY(1976), constataram que em solos dessecados plantas diminuem o número de pêlos radiculares e os que existem apresentam-se curtos e é também observado um baixo número de cordões de infecção nessas condições de estresse severo.

O suprimento de água tem um grande efeito na nodulação e fixação de nitrogênio. SPRENT, (1971) examinou vários sistemas de fixação de nitrogênio (nódulos de

leguminosas, nódulos de não-leguminosas, algas azuis e verdes e líquens) e observou grande sensibilidade dos mesmos para o suprimento de água, seja excesso ou deficiência, ou ambos.

Em *Trifolium subterraneum* (L.), um decréscimo no potencial de água no solo de 0.036 para 0.36 MPa significa uma queda no número de cordões de infecção formados e inibição completa da nodulação, havendo inibição do crescimento de raízes e pêlos radiculares, e conseqüentemente, a infecção (SPRENT, 1979). PANKHUST & SPRENT,(1975) observaram redução no tamanho dos nódulos após perda de água na superfície dos mesmos, após sofrerem estresse hídrico.

Baixas razões de fixação podem ocorrer em condições severas. Baixos potenciais hídricos em nódulos podem reduzir diretamente a atividade de fixação de nitrogênio acompanhada de redução nas taxas de respiração do nódulo, o transporte de nitrogênio fixado no interior dos nódulos pode diminuir, além de que a atividade pode ser reduzida indiretamente pelo consumo dos fotossintatos armazenados, requeridos pela parte aérea estressada.

O potencial hídrico das folhas é correlacionado à fixação de N_2 em plantas sob deficiência hídrica (VENKATESWARLU & RAO 1987). As plantas desenvolvidas em solo seco podem apresentar um potencial hídrico do nódulo mais baixo que o da folha, sendo a atividade da nitrogenase bastante sensível à redução do potencial hídrico do nódulo (BENNETT & ALBRECHAT, 1984). PIMENTEL *et al.*, (1990) observaram sensível redução no peso de nódulos e redução nos valores da atividade da nitrogenase em cultivares de feijão menos tolerantes, quando submetidas ao estresse hídrico.

Com a diminuição da hidratação do solo, a temperatura deste apresenta uma tendência a aproximar-se aos valores da temperatura do ar atmosférico. Este aumento da temperatura do solo pode afetar o metabolismo das raízes e do rizóbio, somando-se ao efeito da deficiência hídrica (BENNETT & ALBRECHAT, 1984).

Após a formação dos nódulos, o estresse hídrico pode induzir alterações morfológicas e fisiológicas. SPRENT (1971), observou que as modificações na absorção de oxigênio causadas pelo estresse hídrico, traduz-se em efeitos metabólicos. Em soja e em fotografias publicadas de outras espécies, indicam que entre as células com atividade de fixação de N_2 existe uma rede de espaços intracelulares e um mosaico de muitas células não infectados, sugerindo que o sistema dos espaços intercelulares provavelmente serve para aerar o tecido (SPRENT, 1971).

3- Materiais e Métodos

3.1- Seleção de Estirpes de Rizóbio

3.1.1-Experimento 01- Seleção de estirpes para *Cratylia mollis* em vaso “Leonard”

A implantação do experimento ocorreu nas instalações da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – Agrobiologia, localizada no Km 47 da Antiga Rodovia Rio - São Paulo, em Seropédica, no estado do Rio de Janeiro. A área localiza-se geograficamente 22°45’S de latitude e 43°41’W com altitude de 33m. Segundo Köppen , o clima da região pertence ao grupo AW.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação em sistema de vaso “Leonard” (VINCENT,1970). O substrato foi areia e vermiculita na proporção 2:1 (v:v), autoclavados e desprovidos de qualquer adubação nitrogenada. As sementes de *C. mollis*, procedentes do Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS), e coletadas no município de Juazeiro-Ba, foram escarificadas em ácido sulfúrico concentrado por um minuto e esterilizadas com H₂O₂, durante cinco minutos. Posteriormente, foram lavadas cinco vezes com água estéril, colocadas placas de Petri autoclavadas contendo papel de filtro e algodão

embebidos em água estéril, e levados a uma câmara de germinação. Todas as etapas do experimento foram monitoradas a fim de manter o caráter estéril, próprio do sistema de plantio em vaso Leonard, que permite a visualização da expressão individual de cada tratamento proposto.

As bactérias cresceram em meio YMA semi-sólido para bactérias de crescimento rápido (VINCENT,1970) durante quatro dias em sala de incubação. Foram colocadas duas sementes por vaso e a inoculação ocorreu no momento da montagem do experimento com a colocação de 2ml do inóculo. As estirpes utilizadas encontram-se descritas na tabela 01. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com três repetições.

Tabela 01- Tratamentos utilizados no experimento de *C. mollis* em vaso “Leonard”

Tratamento (Estirpe)	Hospedeiro
1.HCL 3889-1	<i>Camptosema</i> sp.
2.HCL 3889-8	<i>Camptosema</i> sp.
3.HCL 3889-16	<i>Camptosema</i> sp.
4.HCL 3889-17	<i>Camptosema</i> sp.
5.SMF 556-5	<i>Dioclea violacea</i>
6.SMF 556-8	<i>Dioclea violacea</i>
7.PNPBS 143-5	<i>Pachyrhizus tuberosus</i> cv. (‘Jacatupé’)
8.BR 2003	<i>Canavalia ensiformes</i>
9.BR 2811	<i>Canavalia ensiformes</i>
10.BR 3101	<i>Galactia striata</i>
11.BR 3102	<i>Galactia striata</i>
12.BR 1602	<i>Calopogonium mucunoides</i>
13.CIAT 18516	<i>Cratylia argentea</i>

A cada quinze dias era acrescentada aos vasos uma solução nutritiva isenta de nitrogênio (NORRIS, 1965). Este procedimento foi iniciado após 11 dias de implantação do experimento, quando os cotilédones apresentaram-se amarelados e em processo de abscisão.

Às plantas utilizadas como testemunhas, foi adicionada solução de nitrogênio na concentração de 1%, também na periodicidade de quinze dias. A primeira alíquota foi de 3ml por planta e as seqüentes, 2,5ml/pl. O nitrogênio foi adicionado na forma de NH_4NO_3 , na concentração de 0,7 mM.

As estirpes citadas na tabela 01 e 02 são originárias da EMBRAPA – Abrobiologia, As indicadas pela sigla BR correspondem à coleção de culturas, indicadas comercialmente; as PNPBS e CNPAB A – 17, correspondem a isolados provenientes de experimentos desenvolvidos neste centro de pesquisa; e as HCL e SMF correspondem a isolados de nódulos coletados por Haroldo C. de Lima e Sérgio Miana de Faria, respectivamente.

3.1.2- Experimento 02 – Seleção de estirpes para *Cratylia mollis* em vaso com solo em regimes seco e irrigado.

As sementes de *Cratylia mollis* utilizadas neste experimento foram coletadas em Petrolina – PE em área de caatinga rebaixada. Para os processos de escarificação das sementes e produção de inocúlo de rizóbio, os procedimentos foram idênticos aos utilizados no experimento número 01.

Utilizou-se um solo podzólico vermelho-amarelo, série Itaguaí, horizonte A, com as seguintes propriedades químicas: pH em água – 4.8; P- 1,6 mg.kg^{-1} ; K – 108 mg.kg^{-1} ;

Ca – $1,8 \text{ cmol}_c.\text{dm}^{-3}$; Mg – $1,2 \text{ cmol}_c.\text{dm}^{-3}$; Al – $0,2 \text{ cmol}_c.\text{dm}^{-3}$. Antes da montagem do experimento o solo foi esterilizado com brometo de metila na proporção de $100\text{ml}.\text{m}^{-3}$.

O experimento teve delineamento experimental em split-plot, com duas sub-parcelas: seca e irrigado, contendo dezesseis tratamentos (Tabela 02), para fins de seleção de estirpes de rizóbio além das avaliações correspondentes à *Respostas de C.mollis ao Estresse Hídrico*, descritas no próximo tópico. As estirpes de rizóbio utilizadas fazem parte da coleção de culturas de bactérias da EMBRAPA – Agrobiologia, indicadas comercialmente para espécies leguminosas correspondentes. Foi conduzido em casa de vegetação durante um período de 10 meses. As avaliações realizadas com a planta viva ocorreram após 08 meses de plantio quando as plantas mediam cerca de 0.7 m de altura. Os valores de umidade relativa foram medidos no local, com o auxílio de um termohigrógrafo durante a avaliação dos parâmetros fisiológicos.

As plantas foram submetidas ao estresse hídrico com suspensão da rega durante 46 dias e comparadas com o controle, irrigado diariamente com água destilada. Foram usados vasos de PVC contendo 18kg de solo, adicionando-se 1g de P_2O_5 e 4g de KCl por kg de solo, sendo essas dosagens adaptadas a partir do manual de adubação para o estado do Rio de Janeiro (ALMEIDA *et al.*, 1988).

Tabela 02- Tratamentos utilizados no experimento de *C. mollis* em vaso com solo

Estirpes	Hospedeiro
1. HCL 3889/17	<i>Camptosema</i> sp.
2. SMF 556/8	<i>Diocleia violaceae</i>
3. SMF 556/5	<i>D. violaceae</i>
4. PNPBS 1484/5	<i>Pachyrhizus tuberosos</i> cv. (Jacatupé)
5. BR 1602	<i>Calopogonium mucunoides</i>
6. BR 3101	<i>Galactia striata</i>
7. BR 3102	<i>G. striata</i>
8. BR 2003	<i>Canavalia ensiformes</i>
9. BR 2811	<i>C. ensiformes</i>
10. CNPAB A – 17 (BR 519)	<i>Cratylia argentea</i> Martius ex Bentham
11. CNPAB E –1	<i>C. argentea</i>
12. CNPAB N – 5 (BR 518)	<i>C. argentea</i>
13. SMF 226	<i>C. hypargyrea</i>
14. Solo – Petrolina *	

O tratamento 14 não é uma estirpe isolada, corresponde ao solo não esterilizado, coletado na área de ocorrência nativa de *C. mollis*.

Às plantas designadas para testemunhas nitrogenadas, foi adicionada solução de nitrogênio na concentração de 1%, também na periodicidade de quinze dias. A primeira alíquota foi de 3ml por planta e as seqüentes, 5ml/kg.solo. O nitrogênio foi adicionado na forma de NH_4NO_3 , na concentração de 10mg/L^{-1} (0,7mM).

3.1.2.1- Condições Ambientais no Local da Experimentação

3.1.2.1a- Umidade Relativa do Ar

Foi instalado um termohigrógrafo na casa de vegetação, no período em que foi avaliado o status hídrico da planta, com a finalidade de mensurar a umidade relativa do ar *in loco*.

Os valores de umidade relativa do ar e temperatura, indicados pela figura 01 foram medidos no local de implantação do experimento com a finalidade de se avaliar possíveis correlações entre variações microclimáticas e o comportamento fisiológico de *Cratylia mollis* em resposta ao estresse hídrico.

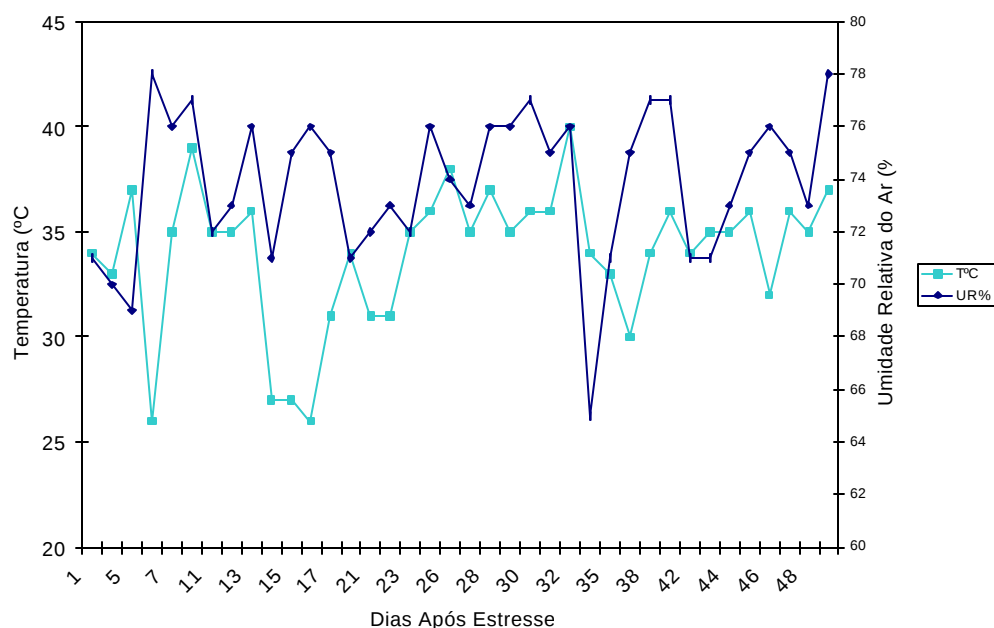


Figura 01- Umidade relativa do ar e temperatura em casa de vegetação no período das avaliações fisiológicas em *C. mollis*.

3.1.2.1b- Água Gravimétrica do Solo

Amostras indeformadas de solo com profundidade de 7,5cm foram retiradas de vasos aleatórios com o auxílio de um trado, na parcela seca, com três repetições, numa frequência de dois em dois dias, do início até o final do estresse hídrico. As amostras foram depositadas em cadinhos de alumínio tampados e pesadas imediatamente após a coleta, a fim de avaliar o peso úmido com as menores perdas possíveis para o ambiente. Estas mesmas amostras foram levadas a estufa com temperatura controlada em 105°C por 24h e então procedeu-se a pesagem do material seco.

Os cálculos que geraram os valores de umidade gravimétrica (UG%) foram conseqüentes da equação abaixo:

$$UG\% = 100 \times \frac{\text{Massa Úmida} - \text{Massa Seca}}{\text{Massa Seca}}$$

No decorrer do estresse hídrico, o status hídrico do solo foi avaliado em função da umidade relativa. Ao final do estresse, o percentual de água no solo foi de 1,71%, correspondendo a 9,8% da água do solo no início do estresse, na sua capacidade de campo (Figura 02) e a capacidade de retenção de água do solo utilizado no experimento é indicada pelos valores mostrados na tabela 03, que foram obtidos através com o auxílio de panelas de pressão calibradas nas atmosferas (atm) correspondentes.

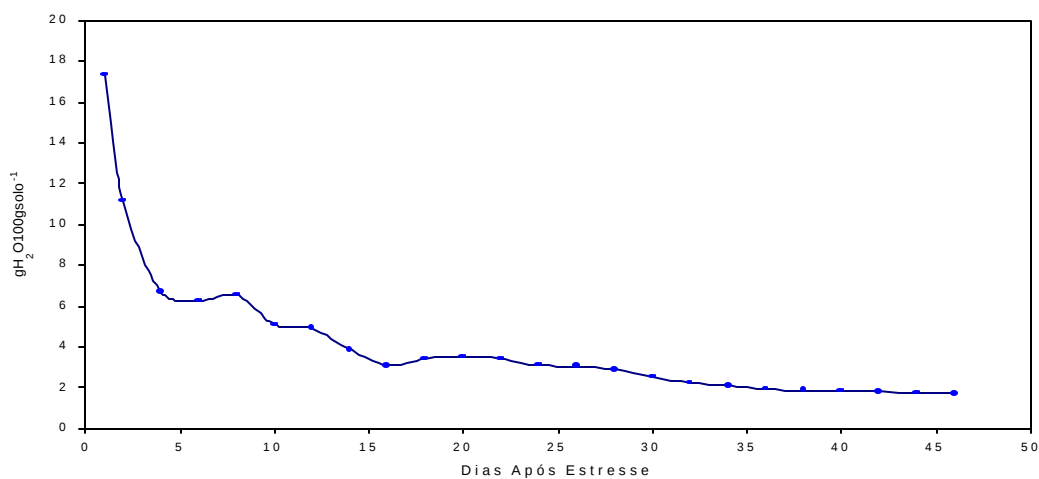


Figura 02- Capacidade de retenção de água no solo utilizado no experimento em casa de vegetação

Tabela 03- Valores de água gravimétrica sob diferentes pressões exercidas nas amostras do solo utilizado no experimento

atm	U % (água gravimétrica)
0,006	20,90576
0,01	16,71526
0,03	14,31629
0,1	13,2973
0,3	11,49111
0,5	10,98953
1,2	9,565988

3.2- Respostas de *C. mollis* ao Estresse Hídrico

3.2.1- Mecanismos de Adaptação à Seca

Antes da montagem e avaliação deste experimento, foi montado um experimento prévio com a finalidade de indicar os níveis de estresse hídrico que não comprometeriam a sobrevivência em *C. mollis*. Duas sementes foram plantadas em cada um dos vasos contendo 10kg de solo PVA, de mesma origem daquele utilizado no experimento final. Na ocasião do plantio, as sementes, pré-germinadas, foram inoculadas com uma mistura de três estirpes de rizóbio - BR 1602, BR 3102, SMF 556-8 (procedentes da *Embrapa Agrobiologia*), indicadas para algumas espécies da tribo Phaseolae. Aos sete meses, no início da fase reprodutiva da planta, foram avaliados a condutância estomática (às nove, doze e dezesseis horas) e o conteúdo relativo de água em plantas não irrigadas e no controle, alcançando mínimos valores em torno de 28% de água na folha ao final de 27 dias de suspensão da rega.

3.2.1.1- Conteúdo Relativo de Água na Folha (CRA)

O conteúdo relativo de água na folha foi mensurado na intenção de indicar o status hídrico da planta ao longo do estresse hídrico. Foram retiradas discos foliares de tamanho uniforme de 7mm de diâmetro com três repetições, de dois em dois dias durante os 46 dias de estresse nas parcelas secas e irrigadas.

Imediatamente após a coleta, as amostras foram pesadas evitando a perda de umidade, gerando os valores de massa fresca com as menores perdas possíveis. Logo após, os discos foram embebidos em água destilada e mantidas em geladeira durante vinte e quatro horas. O excesso de umidade foi retirado com um papel absorvente, colocado tenuemente sobre as amostras. Finalizando o processo, os discos foram secos em estufa a 60°C por 24 horas.

Os valores de conteúdo relativo de água (CRA) foram gerados através da equação abaixo, desenvolvida por SLAVIK, (1974) :

$$\text{CRA} = 100 \times \frac{\text{Massa Úmida} - \text{Massa Seca}}{\text{Massa Túrgida} - \text{Massa Seca}}$$

3.2.1.2- Condutância Estomática (gs)

Mediu-se diariamente a condutância estomática (gs - $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) utilizando-se um porômetro (modelo Delta AP4) em grupos de medições nos horários de 9:00h, 12:00h e 16:00h com a finalidade de avaliar o comportamento estomático em *C. mollis*. Ao longo do dia, foram feitas leituras em um folíolo completamente expandido, considerado fisiologicamente maduro (esta característica foi considerada para as demais avaliações realizadas em folha). As medições foram suspensas em condições de umidade relativa superior a 80%, devido as limitações de uso do aparelho, que não pode ser manuseado em tais condições, sob pena de ser danificado.

3.2.1.3- Determinação do Conteúdo de Açúcares Solúveis e N-amino

Para avaliação do status metabólico foram feitas análises dos conteúdos de açúcares solúveis e aminoácidos. Foram coletadas amostras de *C. mollis*, correspondente a folhas fisiologicamente maduras, nas parcelas seca e irrigada durante o período de ocorrência do estresse hídrico na frequência de dois em dois dias. As amostras foram correspondentes a 1g de material fresco foram depositadas em frascos contendo 60 ml de etanol a 80% e armazenados em geladeira até um mês após o término do estresse. As folhas foram moídas em liquidificador para volumes inferiores a 50ml, com o intuito de aumentar a eficiência na extração dos compostos da folha. Após este procedimento as amostras foram separadas foram colocados em balões volumétricos com capacidade para 120ml e foram adicionados 60ml de clorofórmio P.A. (CHCl_3) para a separação dos compostos mais leves, não avaliados nesta metodologia.

O material resultante destes procedimentos foi destinado às determinações analíticas de açúcares solúveis e N-amino.

A análise de açúcares solúveis foi realizada a partir do método de antrona segundo YEMM & WILLIS, (1954) com leitura em espectrofotômetro na faixa da 640nm.

A concentração de aminoácidos foi avaliada pelo método de ninidrina segundo YEMM & COCKING, (1955) com leitura em espectrofotômetro na faixa de 570nm.

3.2.2- Efeito do Estresse Hídrico na Fixação Biológica de Nitrogênio

3.2.2.1- Massa Seca Acumulada

Na ocasião da colheita do experimento, as plantas foram separadas em raiz, parte aérea e nódulos, que foram secos em estufa a 65°C até peso constante com total perda de umidade. A pesagem foi realizada imediatamente após a retirada do material.

3.2.2.2- Avaliação da Atividade da Nitrogenase (Atividade de Redução de Acetileno – ARA)

A atividade da enzima nitrogenase foi avaliada através do ensaio de redução de acetileno em raízes isoladas contendo nódulos na sua estrutura. As raízes foram depositadas em frascos de vidro de 250ml, fechados hermeticamente com tampas emborrachadas tipo “suba seal”. Injetou-se 30ml de C_2H_2 que permaneceram incubando durante 10 minutos. Retirou-se alíquotas de 6ml que foram lidas em um cromatógrafo de chama Perkin Elmer F 11, para determinação do etileno produzido (HARDY *et al.*,1968).

4- Resultados

4.1- Seleção de Estirpes de Rizóbio

4.1.1- Experimento 01- Seleção de estirpes para *Cratyliia mollis* em vaso “Leonard”

Os resultados do experimento de seleção de estirpes em vaso "Leonard" dizem respeito aos dados obtidos em apenas dois blocos, em função da colheita de uma das repetições, após um mês e onze dias de implantação do experimento.

Durante o período de desenvolvimento das plantas, foram realizadas colheitas sucessivas no intuito de visualizar o processo de infecção nas raízes. Os vasos colhidos pertenciam a plantas extra que se destinavam a esta finalidade. A primeira colheita ocorreu após 29 dias após o plantio, a segunda após 34 dias e a terceira após 40 dias. Em todas as colheitas não foi observada a formação dos nódulos, no momento em que foi coletado primeiro bloco já foram em processo inicial de formação, entretanto não havia diferença visual entre as plantas de diferentes tratamentos.

Após quatro meses de implantação do experimento, pôde ser observada nodulação nas plantas de *C. mollis* inoculadas com estirpes HCL 3889/17, SMF 556/5, SMF 556/8, PNPBS 143/5, BR 1602, BR 2811, BR 3102, BR 2003 (Figura 04). As diferenças em acúmulo de biomassa de parte aérea podem ser visualizadas na figura 03.

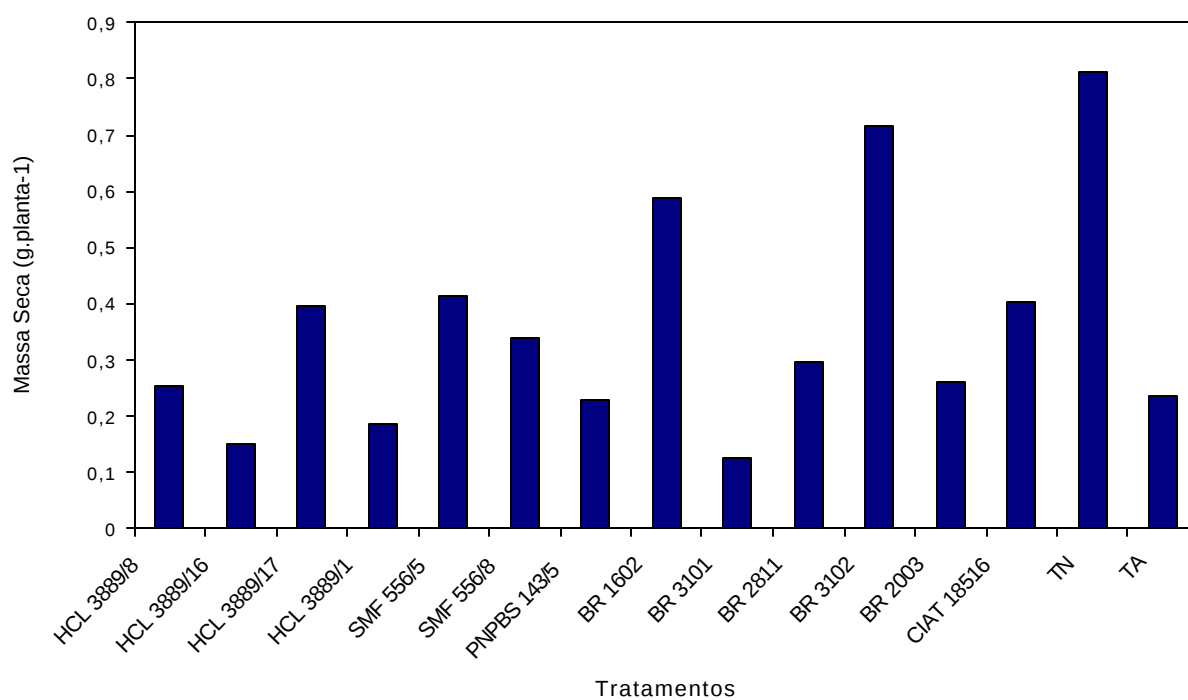


Figura 03- Acúmulo de biomassa de parte aérea em *C. mollis* plantada em vaso “Leonard”

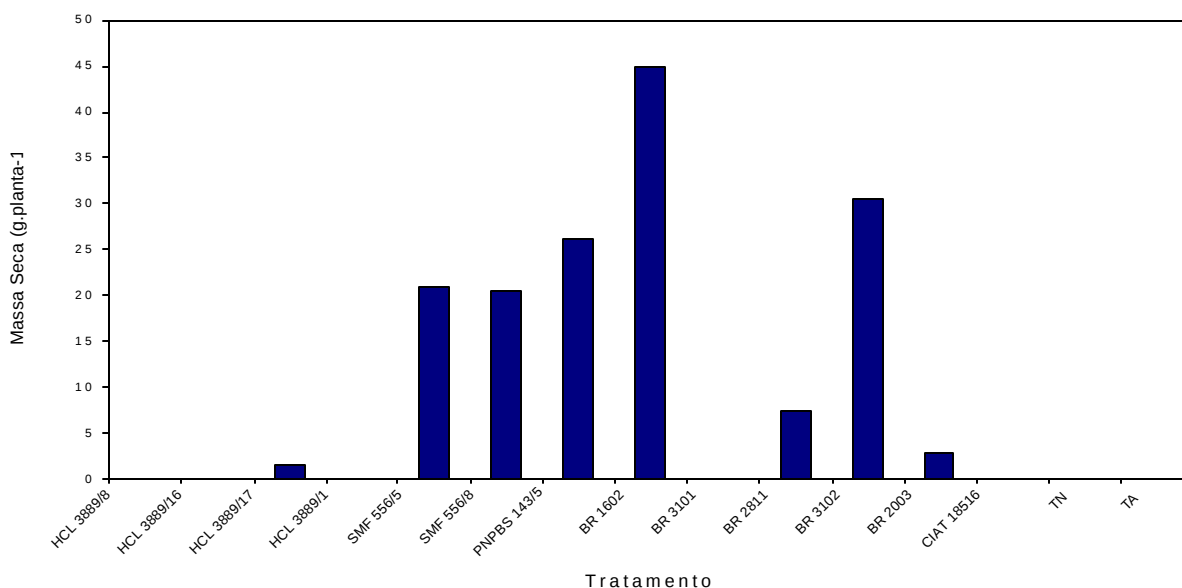


Figura 04- Acúmulo de biomassa de nódulo em *C. mollis* plantada em vaso “Leonard”

4.1.2- Experimento 02 – Seleção de estirpes para *Cratylia mollis* em vaso com solo em regimes seco e irrigado.

Plantas de *C. mollis* nodularam em experimento em solo brometado, apenas em resposta a um tratamento para inoculação de rizóbio, correspondente ao solo oriundo da área de ocorrência natural do feijão camaratuba (Solo - Petro). Nos demais tratamentos correspondentes à inoculação com estirpes de rizóbio, isoladas de nódulos de algumas espécies leguminosas da tribo Phaseolae, indicadas como noduladoras de *C. mollis* não foi observada nodulação, exceto em dois dos tratamentos - SMF 556/5 e CNPAB A-1, entretanto não ocorreu repetibilidade (para cada um, em apenas um vaso), indicando uma possível contaminação dos vasos na casa de vegetação (Tabela 04). As testemunhas nitrogenadas não sobreviveram, uma das hipóteses é que estas sofreram intoxicação por excesso de nitrogênio aplicado em forma de solução.

Tabela 04- Acúmulo de biomassa em *C. mollis*. As siglas representadas indicam: (MSPA) massa seca de parte aérea; (MSN) massa seca de nódulos; (NN) número de nódulo.

Tratamentos		Regime Irrigado		
		MSPA(g)	MSN(g)	NN(g)
1	HCL 3889/17	5,99	-	-
2	SMF 556/8	14,75	-	-
3	SMF 556/5	25,49	0,40*	64,0*
4	PNPBS 1484/5	8,30	-	-
5	BR 1602	6,16	-	-
6	BR 2811	6,75	-	-
7	BR 3101	4,97	-	-
8	BR 3102	4,90	-	-
9	BR 2003	6,76	-	-
10	CNPAB E - 17	3,95	-	-
11	CNPAB A - 1	15,09	0,16*	22,0*
12	CNPAB N - 5	7,85	-	-
13	SMF 226	12,81	-	-
14	Solo-Petro	72,72	0,51	42,7
15	T	7,12	-	-

*Os valores assinalados correspondem a apenas uma das repetições, enquanto os demais, são médias de três repetições.

Após a coleta do experimento, alguns nódulos destinaram-se ao isolamento de rizóbio, que depois do processo de purificação em meio YMA para bactérias de crescimento rápido (VINCENT, 1970), geraram sete isolados que poderão ser utilizados em estudos posteriores.

4.2- Respostas de *C.mollis* ao Estresse Hídrico

4.2.1-Mecanismos de Adaptação à Seca

4.2.1.1- Conteúdo Relativo de Água na Folha (CRA)

As avaliações de conteúdo relativo de água foliar (CRA) foram realizadas até 46º dia de suspensão de rega. O retorno da rega realizado no momento em que se observou sinais de perda de vitalidade pela planta, através de grande redução na turgescência foliar, amarelamento das estruturas vegetais, além de altos índices de senescência, causando considerada perda de fitomassa. O conteúdo relativo de água para o tratamento com regime irrigado nas folhas, mantendo-se nos valores as máximas e mínimas de 72,8% e 57,0% $\text{gH}_2\text{O.planta}^{-1}$ (Figura 05).

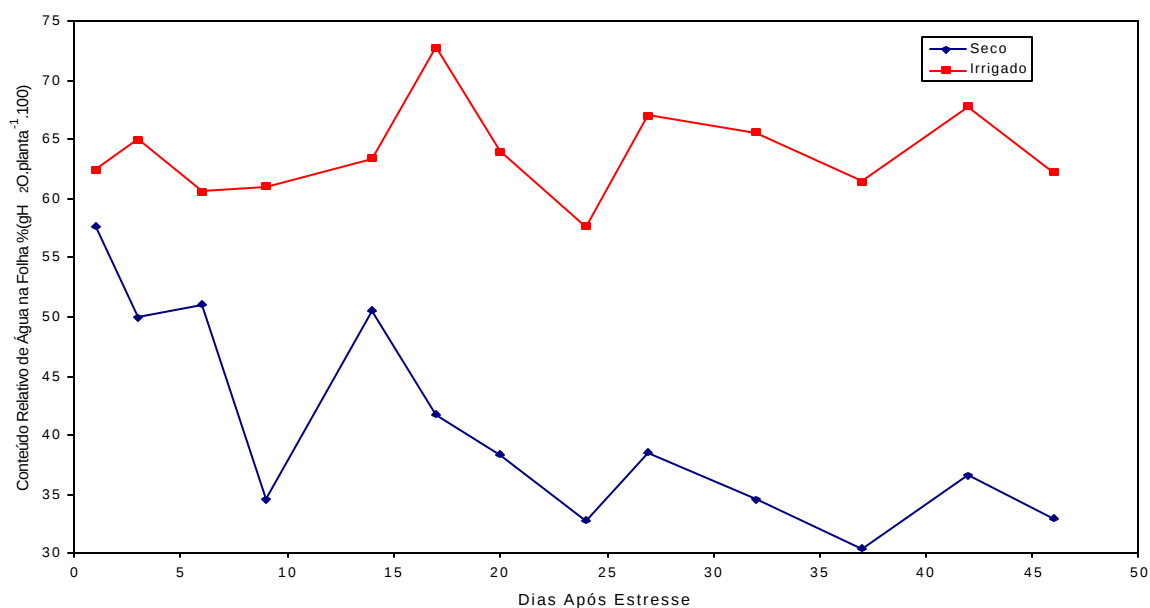


Figura 05- Conteúdo relativo de água em folha de *C .mollis* ao longo de 46 dias de estresse hídrico.

As modificações observadas no CRA ao longo do estresse refletem-se claramente na morfologia foliar, indicadas por redução na turgescência celular (Figuras 07 e 09). O fechamento estomático e o diferenciado acúmulo de amido também podem ser evidenciados nas mesmas ilustrações. Observações da organização celular através da microscopia óptica no 37º dia indicam perda de turgescência das células e desorganização do conteúdo citoplasmático, estando algumas células com conteúdo citoplasmático desorganizado. As plantas hidratadas apresentam células túrgidas com grande quantidade de grânulos de amido e com um nível organizacional perfeito, o que é verificado pelo estado sadio dos cloroplastos (06 e 08).

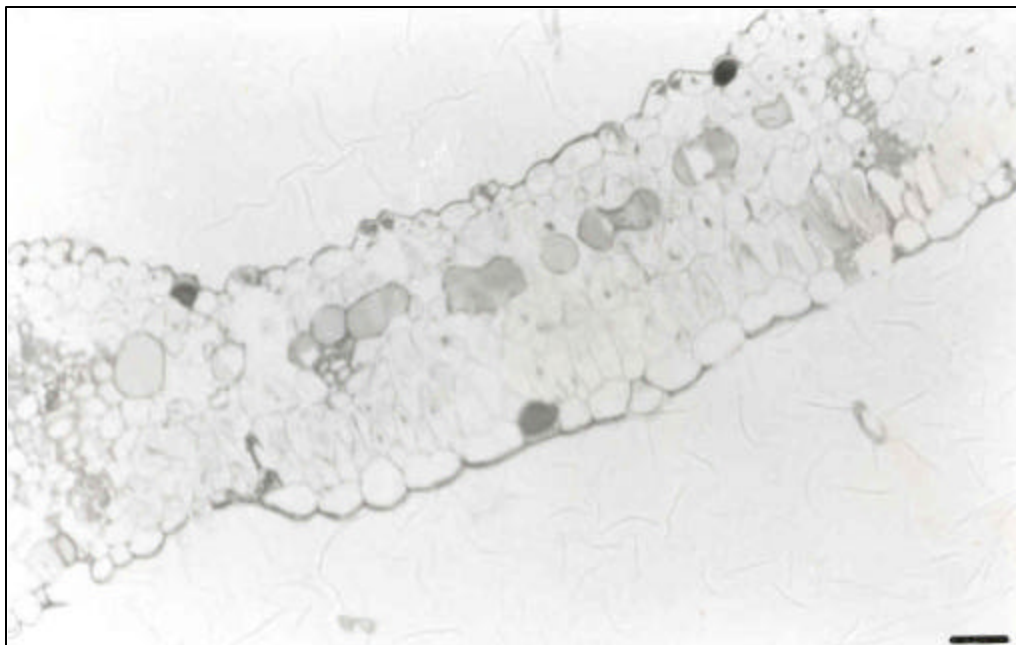


Figura 06- Foto de folha de *C. mollis* com conteúdo de água de 30%. (*) Células desorganizadas. (— 30 μ m)

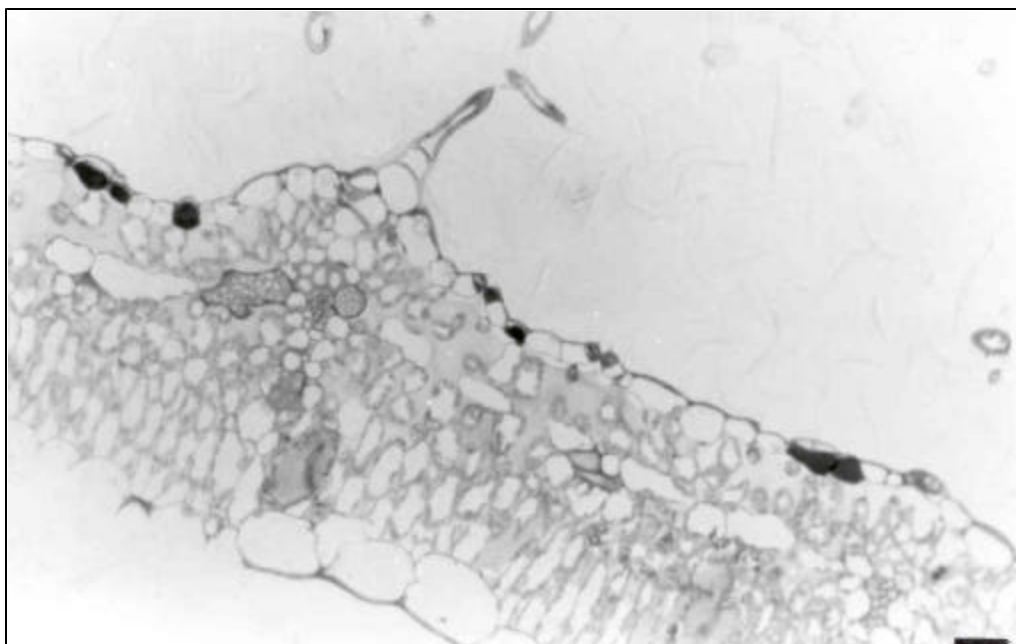


Figura 07- Foto de folha de *C. mollis* em condições de boa hidratação. (— 30 μ m)



Figura 08- Foto de corte longitudinal em folha estressada de *C. mollis*. Observar aspecto irregular da parede celular e redução na turgescência. Maior magnificação da figura 07. (— 10 μ m)



Figura 09- Foto de corte longitudinal em folha bem hidratada de *C. mollis* evidenciando estômatos abaxiais e pêlos. Células apresentam-se bem definidas com presença de grânulos de amido. Maior magnificação da figura 06. (— 10 μ m)

4.2.1.2- Condutância Estomática

Após a suspensão de rega no experimento com *Cratylia mollis* desenvolvido em potes em casa de vegetação, observou-se uma redução gradativa nos valores de condutância estomática (gs) até o terceiro dia, em comparação com os indivíduos irrigados. Nos dias subsequentes houve uma queda drástica na condutância, mantendo baixos valores até ser reiniciado o processo de hidratação das plantas (Figura 12).

A redução nos valores de gs seguiram comportamento semelhante para os horários de 9:00, 12:00 e 16:00h, indicados pela mesma tendência evidenciada nas três curvas correspondentes.

Nas medições de 9:00h foram encontrados os valores mais altos de gs para a parcela seca, em comparação com os outros horários de medições. Neste horário, os valores máximos e mínimos encontrados foram $95,79\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ e $20,47\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ respectivamente, antes que fosse reiniciada a rehidratação (Figura 10). Os valores de condutância estomática às 9:00h horas apresentam diferença entre o tratamento seco e irrigado ao longo do estresse, caracterizando-se estatisticamente com maior constância, a partir do 22º até o 46º dia. Levando-se os dias em consideração, observou-se variações estatisticamente significativas, representadas na Figura 10.

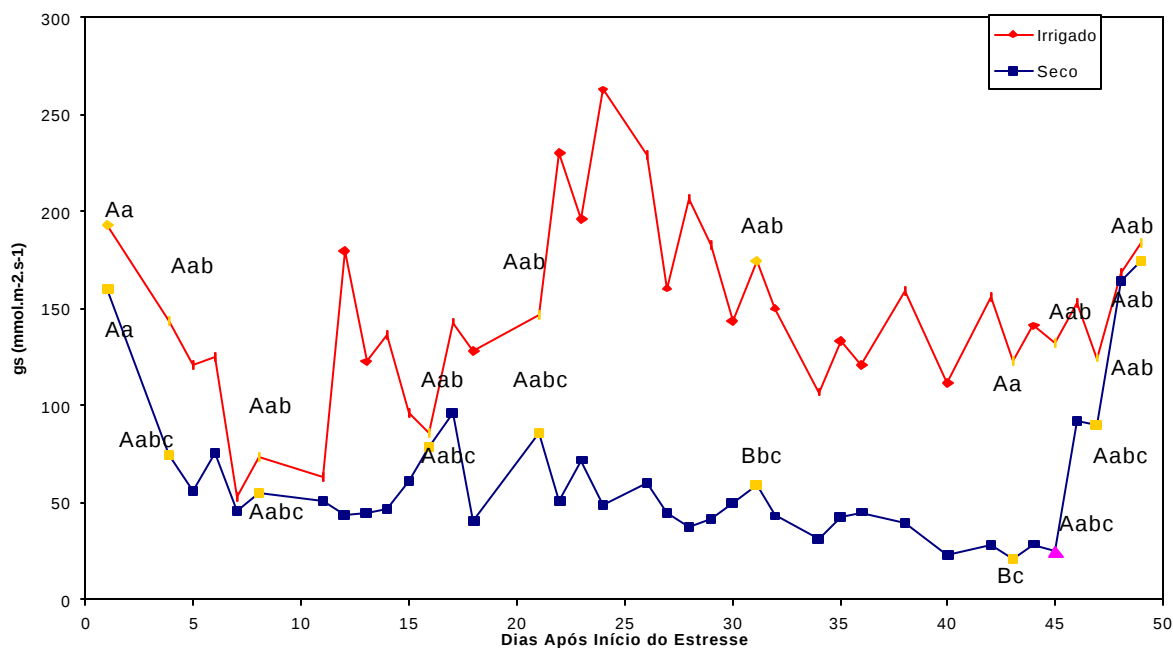


Figura 10- Condutância estomática em *C. mollis* seca e irrigada às 9:00h. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos seco e irrigado, enquanto letras minúsculas indicam variações ocorridas durante o estresse. Seta indica início da rehidratação.

Às 12:00h foram encontradas as menores médias de todas as medições, com gs máxima observada de $55,2 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e mínima de $10,6 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Figura 11). Foram observadas diferenças entre os tratamentos a partir do segundo dia de estresse hídrico, até a retomada da hidratação, indicando que o controle estomático é realizado às doze horas com maior intensidade que nas horas iniciais da manhã. As variações diárias foram pequenas, considerando que os estômatos respondem rapidamente, tentando manter o status hídrico aos primeiros sinais de redução de umidade no solo.

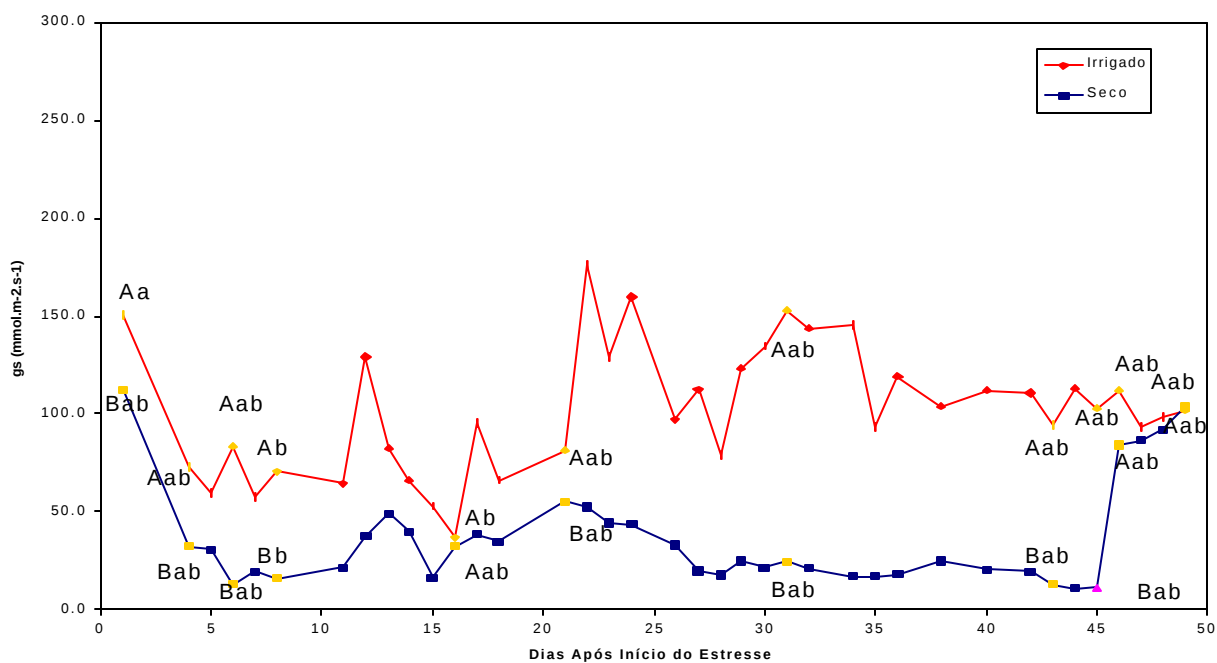


Figura 11- Condutância estomática em *C. mollis* seca e irrigada às 12:00h. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos seco e irrigado, enquanto letras minúsculas indicam variações diárias ocorridas durante o estresse. Seta indica início da rehidratação.

As médias das medições das 16:00h variaram entre 50,6 e $11,6\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, observando-se diferenças entre os tratamentos a partir do quarto dia até o final do estresse. Entretanto, variações significativas foram evidenciadas quando comparou-se os dias (Figura 12).

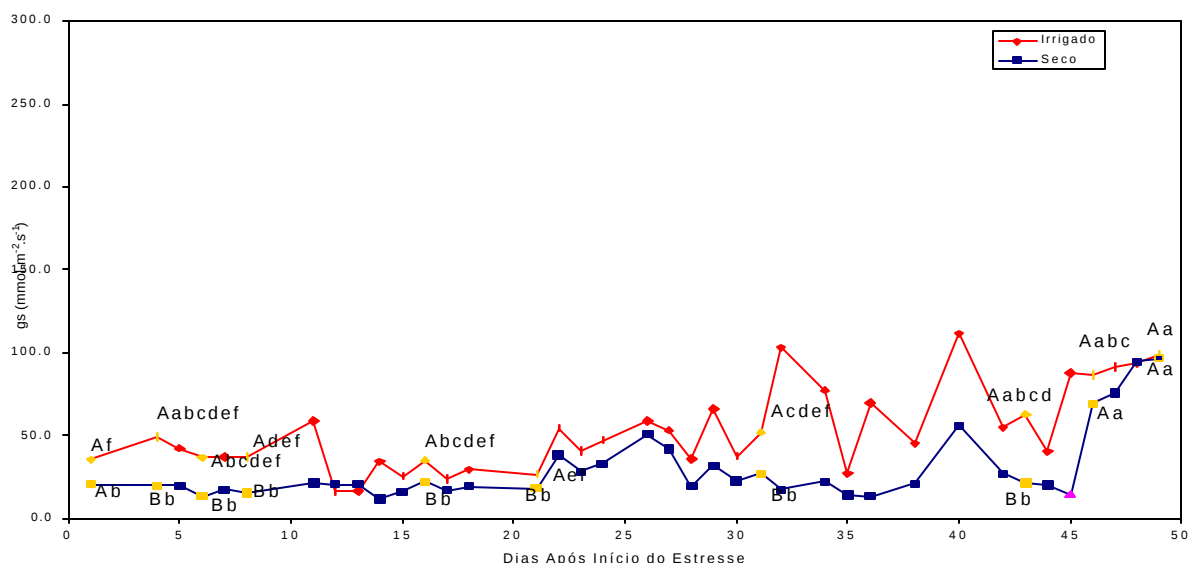


Figura 12- Condutância estomática em *C. mollis* seca e irrigada às 16:00h. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos seco e irrigado, enquanto letras minúsculas indicam variações ocorridas durante o estresse. Seta indica início da rehidratação.

As mensurações de umidade relativa e temperatura representam o microclima da casa de vegetação durante as medições de conteúdo hídrico e condutância estomática. Entretanto, não foram observadas correlações entre a umidade relativa do ar e as oscilações de gs avaliados diariamente, para nenhum dos três horários pré-fixados (09, 12 e 16:00h)

4.2.1.3- Determinação do Conteúdo de Açúcares Solúveis e N-amino

Os valores que expressam o acúmulo de açúcares solúveis em folha de *C. mollis* em regime seco e irrigado, obtiveram coeficiente de variação de 73%, bastante alto, em função da natureza das medições.

Apesar da grande variação nos valores, a curva é marcada por uma tendência de que os teores de açúcares solúveis aumentam nos dias iniciais de estresse hídrico, evidenciadas graficamente (Figura 13).

O procedimento estatístico dispensado para os dados incluiu as transformações possíveis na estatística paramétrica, entretanto, nenhum dos procedimentos foi suficiente para torná-los normais e homocedásticos. A análise de variância foi encaminhada da forma convencional considerando a natureza biológica dos dados, que é extremamente variável.

Não foi observada correlação entre os valores de açúcar e N-amino, com os teores de água na folha, mostrando que a planta respondeu com redução nas taxas fotossintéticas, em função do fechamento estomático.

Semelhante aos valores de açúcares solúveis, foi o comportamento dos valores indicativos da concentração de aminoácidos em folhas maduras de *C. mollis*, com coeficiente de variação de 82%. Da mesma forma, a curva de concentração de N-amino, indica aumento na concentração do mesmo, no período inicial do estresse hídrico (Figura 15).

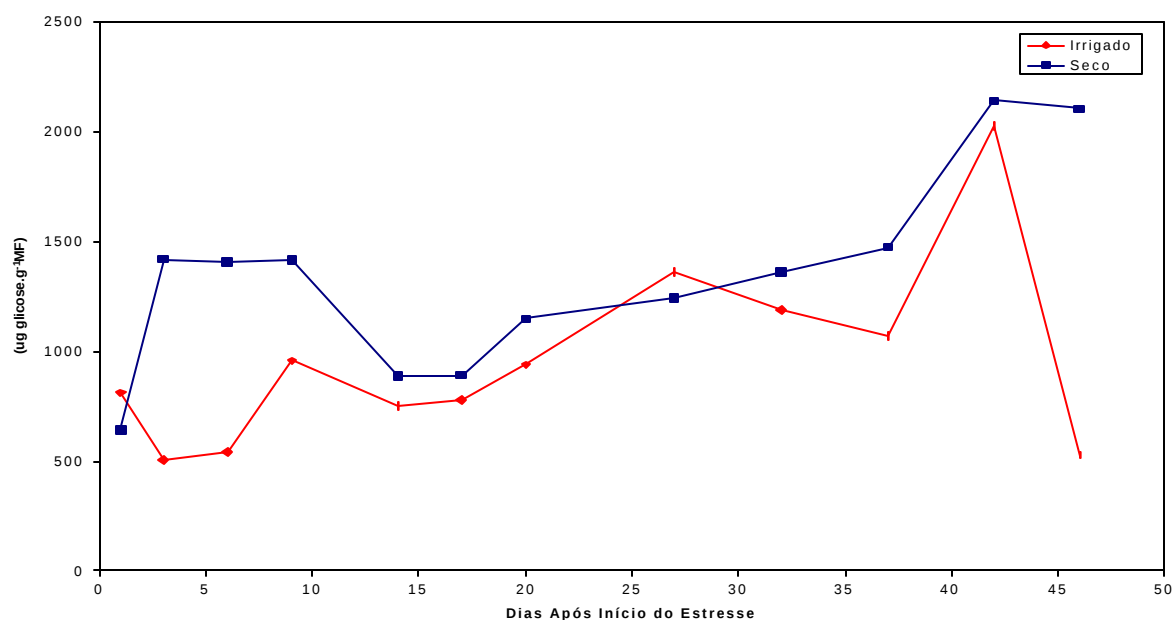


Figura 13- Concentração de açúcares solúveis em *C. mollis* seca e irrigada.

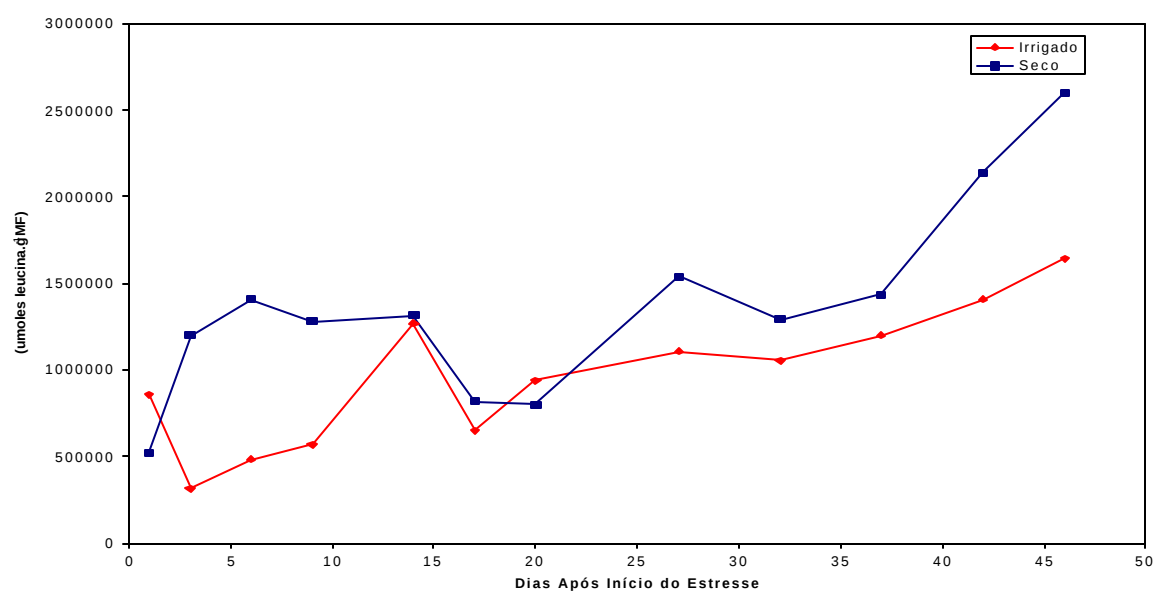


Figura 14- Concentração de N-amino em *C. mollis* seca e irrigada.

4.2.2- Efeito do Estresse Hídrico no Acúmulo de massa Seca Fixação Biológica de Nitrogênio

4.2.2.1-Parte Aérea Seca

O efeito da inoculação de rizóbio no peso de parte aérea em *Cratylia mollis*, nas parcelas seca e irrigada, é mostrado na figura 15. A partir do quarto mês de plantio já podiam ser observadas leves diferenças no tamanho e vigor das plantas, que puderam ser mais fortemente observadas à medida em que se aproximou a fase reprodutiva. As avaliações correspondentes à fixação biológica de nitrogênio em *C. mollis* ocorreram um mês após a rehidratação do experimento, em função da reabilitação das plantas e conseqüente retorno à atividade fotossintética potencial.

As plantas inoculadas com solo proveniente da área de ocorrência natural do Feijão camaratuba em Petrolina, identificadas como tratamento Solo - Petro, tiveram maior acúmulo de biomassa de parte aérea tanto nas parcelas permanentemente hidratadas, quanto na parcela que sofreu supressão de rega (Figura 15). Este tratamento diferiu estatisticamente dos demais pelo teste de Tukey a 5%, mostrando-se mais eficiente.

Quatro plantas, distribuídas em diferentes tratamentos, apresentaram nodulação e crescimento diferenciado das cinco demais repetições (Tabela 05), indicando possível contaminação.

4.2.2.2-Massa Seca de Raiz

Foi observada grande semelhança entre os valores de massa seca de raízes e massa seca de parte aérea, em diferentes escalas, indicando que o sistema radicular não emitiu respostas diferenciadas em função do estresse induzido (Figura 16), respondendo apenas à inoculação.

4.2.2.3-Massa Seca de Nódulo

No período para avaliação da massa dos nódulos, um mês após o fim do estresse hídrico, os nódulos provenientes da parcela seca apresentaram valores de massa inferiores aos valores correspondentes à parcela irrigada (Figura 17). Entretanto, não diferem-se estatisticamente, segundo Tukey a 5% de probabilidade.

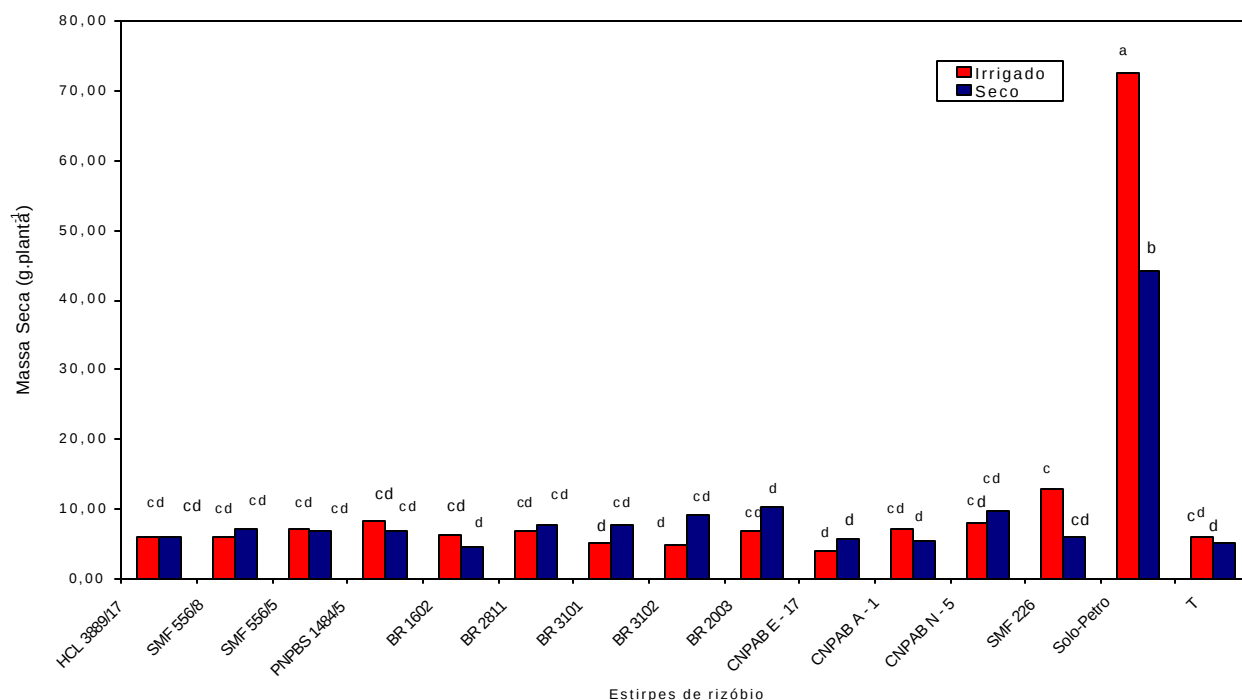


Figura 15- Acúmulo de biomassa de parte aérea em *C. mollis* nas parcelas secas e irrigadas após rehidratação.

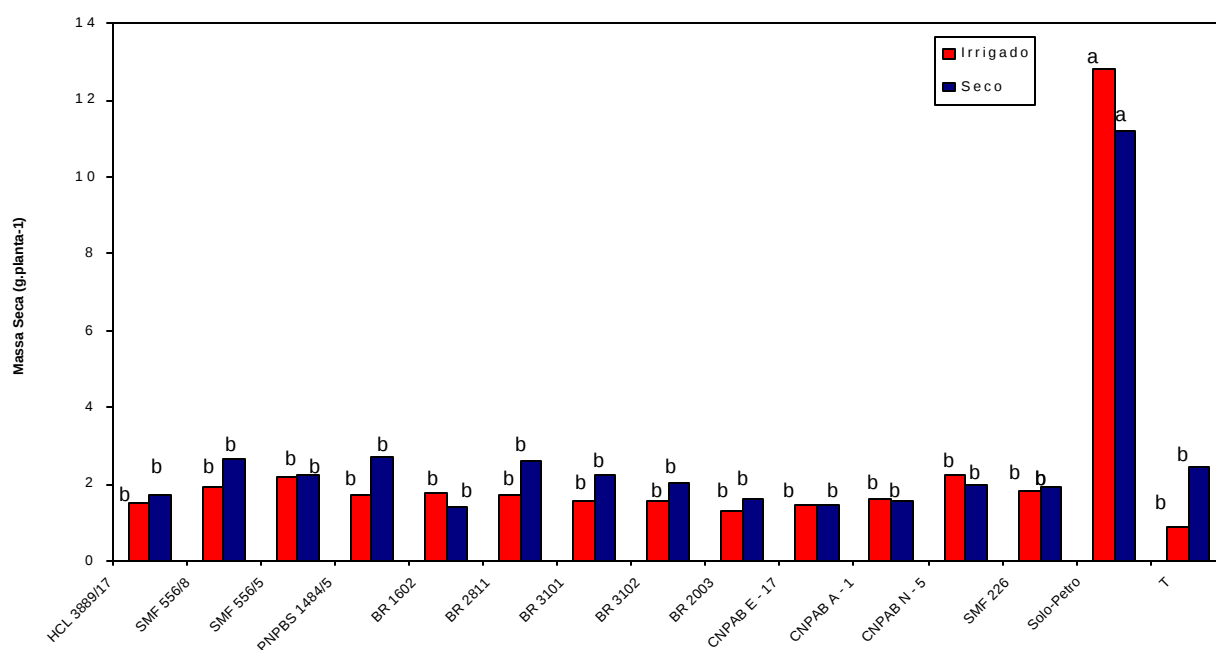


Figura 16- Acúmulo de biomassa de raiz em *C. mollis* nas parcelas secas e irrigadas após rehidratação.

Tabela 05- Acúmulo de biomassa em *C. mollis* nas parcelas seca e irrigada após rehidratação. As siglas indicam representadas indicam: (MSPA) massa seca de parte aérea; (MSN) massa seca de nódulos; (NN) número de nódulo.

Tratamentos		Regime Seco			Regime Irrigado		
		MSPA(g)	MSN(g)	NN(g)	MSPA(g)	MSN(g)	NN(g)
1	HCL 3889/17	5,86	-	-	5,99	-	-
2	SMF 556/8	7,08	-	-	14,75	-	-
3	SMF 556/5	6,87	-	-	25,49	0,40*	64,0*
4	PNPBS 1484/5	6,86	-	-	8,30	-	-
5	BR 1602	4,44	-	-	6,16	-	-
6	BR 2811	7,82	-	-	6,75	-	-
7	BR 3101	7,54	-	-	4,97	-	-
8	BR 3102	9,10	0,05*	14,0*	4,90	-	-
9	BR 2003	10,28	0,12*	19,0*	6,76	-	-
10	CNPAB E - 17	5,79	-	-	3,95	-	-
11	CNPAB A - 1	5,27	-	-	15,09	0,16*	22,0*
12	CNPAB N - 5	9,65	-	-	7,85	-	-
13	SMF 226	5,98	-	-	12,81	-	-
14	Solo-Petro	44,27	0,41	54,7	72,72	0,51	42,7
15	T	7,89	-	-	7,12	-	-

**Os valores assinalados correspondem a apenas uma das repetições, enquanto os demais, são médias de três repetições.*

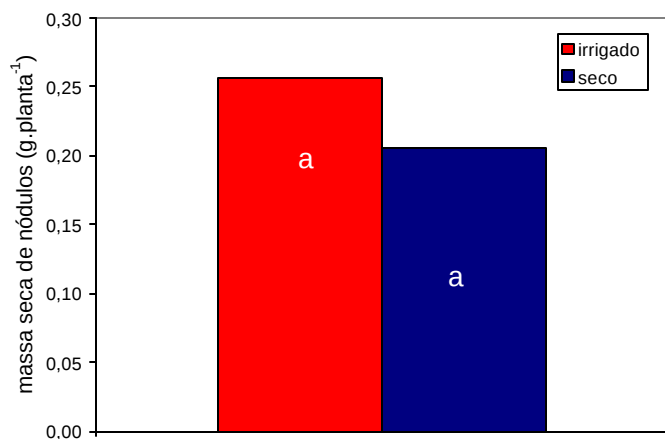


Figura 17- Massa seca de nódulos de *C. mollis* seca e irrigada após um mês de rehidratação. CV= 83,7%.

4.2.3- Avaliação da Atividade da Nitrogenase (Atividade de Redução de Acetileno – ARA).

A avaliação da nitrogenase nas plantas inoculadas com o tratamento solo – Petro, através do ensaio de redução de acetileno (ARA), indicou resultados significativamente diferentes entre as parcelas seca e irrigada, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (Figura 18). Os resultados mostram equivalência no peso de nódulos para as diferentes parcelas, enquanto que para a atividade dos nódulos, são observadas taxas inferiores de ARA nas parcelas que foram submetidas a déficit de umidade.

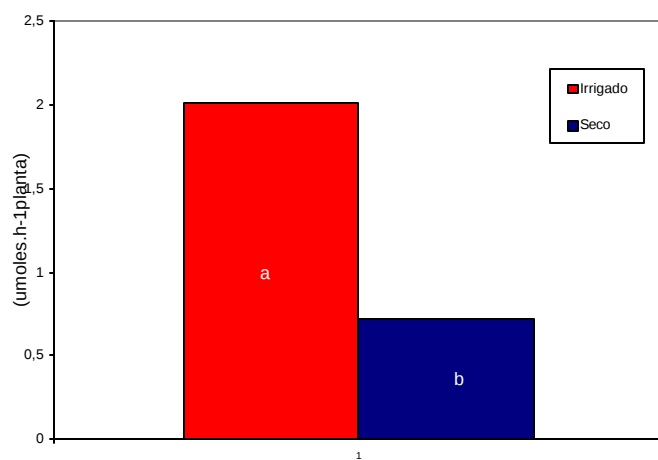


Figura 18- ARA total de *C. mollis*, inoculada com solo de Petrolina em regimes seco e irrigado após um mês de rehidratação. CV= 38,4%.

5- Discussão

5.1- Seleção de Estirpe de Rizóbio

5.1.1- Experimento 01- Seleção de estirpes para *Cratyliia mollis* em vaso “Leonard”

ALEN&ALEN(1981), afirmam que de cinco a oito espécies catalogadas no gênero, apenas uma foi testada e foi constatada nodulação. A espécie citada é *Cratyliia argentea* Mart. ex Bent. (como *C. flloribunda*), observada por GALI no Brasil em 1958. Desta forma, o experimento de seleção de estirpes para *C. mollis* teve for finalidade, ampliar as informações à respeito de fixação biológica de N₂ para o gênero.

Observou-se que o feijão camaratuba respondeu positivamente para nodulação à inoculação com as estirpes HCL 3889/17, SMF 556/5, SMF 556/8, PNPBS 143/5, BR 1602, BR 2811, BR 3102, BR 2003 (Figura 02), indicando baixa especificidade desta leguminosa para simbiose com rizóbio. De acordo com NEVES & RUMJANEK (1996), à medida que mais estudos são realizados sobre a biodiversidade de rizóbio, observa-se que

tanto uma espécie de leguminosa pode ser nodulada por várias de rizóbio como o contrário também acontece, indicando baixa especificidade em relação ao hospedeiro.

5.1.2- Experimento 02 – Seleção de estirpes para *Cratylia mollis* em vaso com solo em regimes seco e irrigado.

Os resultados obtidos no experimento de seleção de estirpe para *C. mollis* em solo brometado não refletiram os resultados encontrados no experimento anterior, desenvolvido em vaso “Leonard”. Das estirpes anteriormente constatadas como simbióticas com o feijão camaratuba, não foram obtidos resultados positivos para nodulação. A partir destes resultados questionou-se os possíveis motivos desta resposta negativa, através de uma reavaliação da etapa de implantação do experimento, que, caso tivessem ocorrido falhas, estas poderiam ter interferido no processo de fixação através de inviabilização do inoculante utilizado no momento do plantio, entretanto os procedimentos metodológicos foram seguidos na íntegra, anulando esta possibilidade. A segunda hipótese é a de que pode ter ocorrido perda de plasmídios responsáveis pelo armazenamento das informações concernentes à nodulação.

Em geral as informações genéticas correspondentes à nodulação (gen nod) são de carácter cromossomial ou extracromossomial (NEVES & RUMJANEK 1996), o gen nod quando não está contido no cromossomo, encontra-se nos plasmídios (LENINGER *et al.*, 1993), e a perda destes implica na não expressão gênica da nodulação em plantas. BROM

et al., (1991) sugeriram que pode haver perda de alguma característica genética, durante o processo de isolamento do rizóbio a partir do nódulo.

Ao contrário, nas plantas correspondentes ao tratamento de inoculação com o solo proveniente da área de plantio (Solo – Petro), pôde ser observado maior acúmulo de biomassa de parte aérea e de raiz, além da presença de nódulos ativos.

5.2- Respostas de *C.mollis* ao Estresse Hídrico

5.2.1- Efeito do Estresse hídrico em Parâmetros Fisiológicos

As primeiras mudanças na planta após o estresse hídrico são indicadas por paralisação no crescimento foliar, senescência das folhas, seguindo por redução do volume citoplasmático e diminuição da síntese de proteínas nos tecidos em crescimento (KRAMER & BOYER, 1995). Segundo RAMOS *et al.*, (1999), a divisão celular pode se tornar mais lenta e os níveis de algumas enzimas, como a nitrato redutase, começam a decrescer, então os estômatos podem se fechar, reduzindo a transpiração e assimilação de CO₂.

Em relação os diversos mecanismos de tolerância ao estresse hídrico descritos, deve-se ressaltar que as plantas utilizam vários destes ao mesmo tempo e existem diferenças interespecíficas quanto à presença de um ou outro mecanismo relacionado com as características genéticas daquela espécie (KRAMER & BOYER, 1995).

5.2.1.1- Conteúdo Relativo de Água na Folha (CRA)

O equilíbrio hídrico pode ser estimado através do conteúdo relativo de água ou do potencial hídrico da planta e, segundo LARCHER(1986), a mudança no CRA pode ser usado como indicador do balanço hídrico, por medições repetidas em folha e em outras partes da planta. As medições pontuais de conteúdo real de água devem ser obtidas com base em uma medição padrão, por exemplo, o conteúdo de água das folhas sob condições de saturação.

Após o 46º de estresse hídrico, as plantas crescidas em potes contendo 18kg de solo, foram irrigadas novamente no momento em que os valores de conteúdo de água nas folhas (CRA) eram inferiores a 33%. Estes valores indicam grande resistência á seca desta espécie, comparando-se com *A. hypogea* (amendoim), planta largamente descrita como tolerante, que em trabalhos realizados por NWALOZIE & ANNEROSE, (1996), alcançou o ponto de murcha permanente com CRA abaixo de 55%, após 18 dias de estresse, em casa de vegetação. TEIXEIRA (1978), estudando tolerância à seca em algumas espécies forrageiras, observou os valores de CRA de 35,5 e 33,2%, *Glicine wighti* (Wight & Arn.) e *Cajanus indicus* Sprengel, respectivamente, que para estas espécies, correspondem à eficiência máxima no uso da água.

Um comportamento contrário a este observado em *C. mollis* pode ser notado em caupi (*V. unguiculata*), que, segundo NWALOZIE & ANNEROSE (1996), alcançou ponto de murcha com valores de CRA superiores a 78%, abaixo destes valores, estabeleceu-se o ponto de murcha permanente.

Guandu (*C. cajans*) é uma leguminosa com alta tolerância à desidratação (LOPES *et al.*, 1987), com habito arbustivo que ocorre em regiões semi-áridas, desta forma, é uma cultura que pode ser usada como espécie comparativa a *C. mollis* em situações semelhantes. KELLER & LUDLOW(1993), avaliando relações hídricas em *C. cajans* observaram valores de CRA de 53% em potencial hídrico de -4.8MPa , após 27 dias sem hidratação, plantadas em volumes de solo correspondentes à 50kg, recuperando-se rapidamente após rehidratação.

Foi observada senescência foliar em *C. mollis* à medida em que a planta deu sinais de estresse em função do déficit de água. Segundo TARDIEU (1996), senescência se caracteriza como consequência da redução no CRA, pode ser considerada como um mecanismo de planta inteira por reduzir área foliar em presença de estresse, inicialmente para diminuir a transpiração e a diferença no potencial entre raízes e folhas, e depois remobilizar os assimilados para sementes ou órgãos em crescimento.

CRA consistiu num bom parâmetro de avaliação do estresse em *C. mollis*, pela correlação encontrada e entre o intervalo temporal do estresse mecanismos de condutância estomática. TURNER (1986), observou a correlação da condutância foliar em girassol e o conteúdo hídrico do solo, demonstrando a influência direta do status hídrico do solo ou da raiz na condutância estomática e nas taxas fotossintéticas. SINCLAIR & LUDLOW (1986), consideram conteúdo relativo de água crítico, como um significativo índice para identificação de legumes com diferenças contrastantes na tolerância desidratação.

5.2.1.2- Condutância Estomática (gs)

O fechamento estomático durante a seca é uma característica desejável, tornando-se um critério que pode ser utilizado para o melhoramento vegetal, na busca de plantas tolerantes ao déficit hídrico (LAFRAY & LOUGUET, 1990).

Nos valores de condutância estomática em *C. mollis* pode ser observada queda nos índices de transpiração à medida em que os valores de conteúdo relativo de água na folha (CRA) cheguem próximos ao limite de tolerância da planta, que varia em torno de 30% do volume hídrico.. Por outro lado, o fechamento parcial dos estômatos em caupi (*V. unguiculata*) em trabalhos desenvolvidos por FISCHER & TURNER, (1978) durante o estresse hídrico resultam em improvável eficiência no uso da água, e que o seu extremo evitamento à seca é uma resposta conservativa. Entretanto, as respostas de plantas anuais não são conservativas; em vez disso, a transpiração é mantida com riscos de completa exaustão da água no solo, além de baixo potencial hídrico e prejuízos para o protoplasma (FISCHER & TURNER, 1978).

Verifica-se a partir das avaliações de condutância estomática ao longo dos 46 dias de estresse hídrico que, mesmo que a diferença entre os valores de gs para o regime seco e para o irrigado seja estatisticamente significativa, ocorre uma grande variação nos valores alcançados nos diversos tratamentos num mesmo sistema de rega, provavelmente em função de variações na temperatura, umidade relativa e teor de CO₂ da atmosfera, o que justifica altos valores de coeficiente de variação para este parâmetro. Segundo LAFRAY & LOUGUET(1990), os estômatos podem se fechar com o aumento no déficit de pressão

de vapor (VDP), independente do volume de água da folha que passam por estresse hídrico podem ser mais ou menos sensíveis às mudanças de VDP.

As medições de condutância realizadas às 9:00, 12:00 e 16:00 h indicaram que a redução no volume de água no solo ainda nos primeiros quatro dias, já foi suficiente para uma rápida resposta da planta no controle estomático. Entretanto, os valores alcançados nas medições de 12:00h foram ainda mais baixos que os valores das medições das 09:00h, indicando intensificação do controle estomático nos horários de maior incidência de luz no ambiente. Entretanto, segundo (KRAMER & BOYER, 1995), este eficiente controle realizado pelo fechamento dos estômatos, permite melhor aproveitamento da água pelos tecidos da planta, controlando o fluxo do contínuo solo - água - atmosfera de modo a garantir a sobrevivência da planta.

Este tipo de comportamento caracteriza *C. mollis* como uma planta anisohídrica, que segundo TARDIEU & SIMONNEAU, (1998), são plantas que possuem controle estomático, caracterizado por fechamento dos estômatos às 12:00h e manutenção de baixas taxas transpiratorias ao longo do dia, até o entardecer, evitando maiores perdas d'água. A maior gs às 9:00 h diminuindo às 12:00 e 16:00 h é vantajoso para planta devido ao menor déficit de pressão de vapor (DPV).

A literatura demonstra que, em geral, as plantas que fazem eficiente controle do uso da água, apresentam reduzida abertura estomática às 12:00h em condições de pouca disponibilidade de água, como pode ser observado em algodão, milho, feijão, sorgo e fumo (LOPES, *et al.*, 1992, LAFFRAY & LOUGUET, 1990).

O funcionamento estomático responde a diversas características do ambiente que causam efeitos quantitativos. Nestas condições, TARDIEU & SIMONNEAU, (1998),

sugerem identificação de mecanismos, isoladamente, que tenham uma grande contribuição para o comportamento estomático em um dado grupo de condições ambientais, já que diversas características podem ter ação antagônica.

A seringueira possui alta sensibilidade estomática ao déficit hídrico, sendo que em plantas com um ano de idade, submetidas a ciclos de tensão hídrica no solo, observou-se que o potencial hídrico da folhas durante o dia é regulado pela resistência dos estômatos a difusão d'água (MARTINS *et al.*, 1992).

MEDRI apud MARTINS *et al.*, (1992) encontrou resultados comportamentais do andamento diário do balanço hídrico, bastante semelhantes para diferentes cultivares de seringueira. Todos cultivares apresentaram aumentos na transpiração com o aumento da radiação a partir d 5:30 horas e diminuições a partir das 12:00horas, atingindo valores mínimos e constantes no período noturno.

5.2.1.3- Determinação do Conteúdo de Açúcares Solúveis e de N-amino

O mecanismo de ajuste osmótico é comum em gramíneas, e em geral, as leguminosas não o realizam (PIMENTEL, 1998), entretanto, algumas delas desenvolveram este mecanismo de tolerância, a exemplo de soja (*Glycine max* [L.] Merr.) (HUBER *et al.*, (1984), tremoço (*Lupinus albus* L.) (QUICK *et al.*, 1992), feijão (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Topcrop) (RAGGI, 1994).

Nos primeiros oito dias de estresse, a redução nas reservas de carboidratos são evidenciadas pelo aumento no conteúdo de N-amino e de açúcares solúveis. HSIAO & ACEVEDO (1974), contataram que a síntese e o acúmulo de amido são bastante afetados

pelo estresse hídrico devido a diminuição das taxa fotossintética e do acúmulo de matéria seca, juntamente com o aumento da atividade da amilase, quando em condições de estresse mais severo. Com o estresse hídrico SEVERO, o amido de reserva sofre hidrólise com intensificação da atividade da amilase, contribuindo para o acúmulo de carboidratos solúveis, aminoácidos e ácidos orgânicos, que servirão para manutenção do status metabólico da planta (HSIAO, 1973).

Durante o estresse hídrico, as reações metabólicas essenciais à planta são mantidas por um substrato nitrogenado gerado a partir da degradação das proteínas de reserva. Segundo FERNANDES (1978), o acúmulo de grandes quantidades de N-amino livre pode ser um indicador de interrupção nos caminhos para síntese, ou acúmulo nas taxas de degradação de proteínas.

RAGGI (1994), observou progressivo acréscimo de asparagina em folhas de *P. vulgaris* sob regime seco, ocorrido provavelmente em função de inibição precoce da síntese de proteína e degradação de proteínas estocadas.

Outro fato importante relacionado ao metabolismo de carbono e nitrogênio em *C. mollis* diz respeito a uma gradativa queda de folhas no decorrer do estresse hídrico. Em muitos casos, a abscisão ou morte das folhas ocorre para diminuir a superfície de transpiração (SUBARAO, 1995). Quando a senescência é seja causada principalmente por dissecação celular ou estresse oxidativo, envolve folhas superiores que recebem luz direta e experimentam baixos potenciais hídricos que folhas velhas, localizadas na porção inferior do dossel (TARDIEU, 1996). Inicialmente as folhas sofrem rápida expansão, importando carbono e nitrogênio, reiniciando síntese de proteínas até que a capacidade fotossintética seja recuperada. Então as folhas maduras tornam-se vantajosas para a planta, contribuindo

com o suprimento de carbono durante certo tempo, e o remanejamento de proteínas ocorre em níveis baixos (BUCHANAN-WOLLASTON, 1997).

5.2.2 - Efeitos do Estresse Hídrico no acúmulo de Massa Seca

Em função da simbiose realizada entre o rizóbio e espécies leguminosas, devem ser considerados, além dos efeitos causados na planta após estresse hídrico, os possíveis efeitos na formação, desenvolvimento e funcionamento do nódulo (WARRAL & ROUGHLEY, 1976). Dessa forma, avaliação das respostas da planta à fixação de N_2 em condições de estresse pode ser indicativa de prejuízos para plantas exploradas economicamente.

Flutuações na disponibilidade de água são freqüentemente observadas nos solos tropicais, com ciclos de seca e encharcamento que resultam em baixa sobrevivência dos microrganismos diazotróficos (RUMJANRK & NEVES, 1996). SPRENT & PANKHUST (1975), especularam que o status hídrico do nódulo inibe a fixação durante o período de estresse hídrico e que após a rehidratação, tanto o status hídrico da planta quanto a atividade da nitrogenase retornam à atividade inicial. A expectativa do trabalho foi gerar informações à respeito do comportamento de *C. mollis*, quando sujeita a ciclos de seca e encharcamento, e os resultados contatam a expectativa de retomada de atividade pelo nódulo.

5.2.1.1- Massa Seca Acumulada

O grande ganho de massa seca, tanto em raiz quanto em parte aérea, em plantas inoculadas com o solo da área de ocorrência natural (solo- petro) indicam que a inoculação de *Cratylia mollis* com uma eficiente estirpe de rizóbio, viabilizam o bom desenvolvimento destas plantas em áreas com baixos níveis de nitrogênio no solo. FRANCO & FARIA (1997) enfatizam a importância de identificação de estirpes de rizóbio que realizam eficiente simbiose com leguminosas, face à limitação de nitrogênio em solos tropicais.

Avaliando os efeitos desta simbiose em condições de estresse hídrico, nota-se significativa diferença no acúmulo de biomassa seca de parte aérea nos regimes seco e irrigado. Houve interrupção de fixação de N_2 no período de estresse severo, em função da senescência de nódulos. Entretanto, o fato que mais contribuiu para a redução nos valores de massa seca de parte aérea, diz respeito à senescência foliar que ocorreu ao longo do estresse e se intensificou à medida que o conteúdo relativo de água na folha (CRA) foi diminuindo. Segundo ALBECHT, *et al.*, (1984) a atividade da nitrogenase em nódulos e plantas bem hidratadas, sofre pequeno declínio na atividade específica nas plantas anteriormente irrigadas, e este comportamento é atribuído à senescência dos nódulos. A senescência é conseqüente do declínio das taxas de carbono durante a fase de enchimento de grãos, e translocação de maiores quantidades de fotossintatos para as sementes e que a queda da de assimilação de substratos de carbono para o nódulo, e conseqüente redução na fixação de N_2 (ALBECHT, *et al.*, 1984).

Os nódulos de *Cratylia mollis* formados após a rehidratação tem marcado aumento em número e redução na massa seca, quando comparados com nódulos de plantas

freqüentemente hidratadas, com a mesma idade e plantadas nas mesmas condições experimentais, indicando redução de eficiência da fixação no período avaliado. PIMENTEL *et al.*, (1990), observaram aumento no número e peso de nódulos por planta em cultivares de feijão, e pequena redução na atividade específica de redução de acetileno por peso de nódulos. Entretanto, em soja sob regime de estresse hídrico severo, correspondente a 5% de água no solo (-0.5 MPa), segundo KIRDA *et al.*, (1989), houve redução no número de nódulos em comparação com o regime irrigado. De forma semelhante CARTER & SHEAFFER (1983), observaram redução no número de nódulos em cerca de 41% sob regime de estresse suave (-0.9 MPa).

Segundo SMITH, *et al.*, (1988) a causa para a redução na fixação de N₂ por legumes com déficit de umidade da ordem de dias ou semanas pode aumentar a resistência estomática para difusão de CO₂ nas folhas e resulta em redução nas taxas de fotossíntese.

Avaliando os efeitos adversos do estresse hídrico em soja (*G. max.*), KINDA, *et al.*, (1989) observaram que este interferiu mais no peso que na quantidade dos nódulos, sugerindo que o crescimento destes pode ser mais afetado que o sucesso da infecção das raízes, em condições de seca.

5.2.3- Avaliação da Atividade da Nitrogenase (Atividade de Redução de Acetileno – ARA).

A avaliação de ARA permitiu constatar valores inferiores para atividade da nitrogenase nas plantas que sofreram estresse hídrico, indicando menor eficiência na fixação de nitrogênio nas condições de seca, após o período de um mês após rehidratação.

PIMENTEL, *et al.*, (1990) consideram que a atividade da nitrogenase sofre mais rapidamente o estresse, do que processos morfológicos como nodulação ou queda de folhas.

Segundo ALBRECHT *et al.*, (1984), a redução na atividade dos nódulos é atribuída à senescência dos mesmos, e quando é iniciada a fase reprodutiva da planta, há um declínio nas trocas de carbono no dossel durante o enchimento de grãos, reduzindo os processos de translocação de compostos de carbono e nitrogênio na planta, em função da solicitação de fotossintatos para as sementes e nódulos, com baixa taxa assimilação de carbono, substrato para fixação de N_2 .

WILLIAM & SICARDI DE MALLORCA, (1984), observaram em duas cultivares de soja, que a indução de um baixo estresse hídrico reduziu o número e a atividade específica dos nódulos, sem afetar a largura dos nódulos ou o tempo requerido para a formação macroscópica inicial dos nódulos. Em plantas sob médio estresse de umidade na folha e subsequente desenvolvimento dos nódulos iniciais foi inibido e algumas plantas foram inativas para os ensaios de redução de C_2H_2 (WILLIAM & SICARDI DE MALLORCA, 1984).

Estresse hídrico moderado causa rápido declínio na atividade dos nódulos em soja, que é provavelmente ocasionado por queda na turgescência de células corticais vacuoladas (SPRENT, 1972).

Deste modo, *C. mollis* fica caracterizada como uma leguminosa bastante tolerante às limitações de umidade no ambiente tanto para sobrevivência quanto para a capacidade de reiniciar o processo de fixação de N_2 , após novas chuvas. Ela se disponibiliza de alguns

mecanismos de adaptação à seca, que, na grande maioria, são formas de evitamento e tolerância à desidratação como o ajuste estomático, redução de área foliar.

Estas características indicam que o feijão camaratuba é uma planta que vegeta em locais com restrições hídricas e nutricionais devido às suas poucas exigências além de poder contribuir com o aporte de nutrientes para o solo.

6-Conclusões

1. *Cratylia mollis* nodulou com a inoculação das estirpes HCL 3889/17, SMF 556/5, SMF 556/8, PNPBS 143/5, BR 1602, BR 2811, BR 3102, BR 2003, o que permite afirmar pouca especificidade desta espécie para estabelecimento de relação simbiótica com rizóbio.

2. *C. mollis* possui comportamento estomático caracterizado como anisohídrico, sendo observados baixos valores de g_s (condutância estomática) ao meio-dia e mantendo-os ao entardecer, recuperando-se durante o período noturno, definindo máxima abertura estomática nos primeiros horários da manhã.

3. Os baixos conteúdos relativos de água em folha após estresse prolongado, indicam grande tolerância à dissecação, visto que a planta se reestabelece logo após o reinício da irrigação

4. Em função da senescência dos nódulos ao longo do estresse hídrico, *C. mollis* sofre redução nas taxas de fixação de N_2 , mas recupera a atividade da enzima nitrogenase após a formação de novos nódulos, retomada a hidratação.

7- Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, D.L. de; SANTOS, G. de A.; DE-POLLI, H.; CUNHA, L.H.; FREIRE, L.R.; AMARAL SOBRINHO, N.M.B. do; PEREIRA, N.N.C.; EIRA, P.A. da; BLOISE, R.M.; SALEK, R.C. **Manual de adubação para o Estado do Rio de Janeiro**. Itaguaí: Editora Universidade Rural, 1988. 179p. (Coleção Universidade Rural. Ciências Agrárias, n.2).
- ALLEN, O.N.; ALLEN, E.K. **The leguminosae**: a source book of characteristics, uses, and nodulation. Madison: The University of Wisconsin, 1981. 812p.
- APARICIO-TEJO, P.; SANCHES-DIAZ, M. Nodule and leaf nitrate reductases and nitrogen fixation in *Medicago sativa* L. under water stress. **Plant Physiology**, Rockville, v.69, p.479-482, 1982.
- APARICIO-TEJO, P.; SANCHES-DIAZ, M.; PEN77A, J.I Nitrogen fixation, stomatal responses and transpiration in *Medicago sativa*, *Trifolium repens* and *T. subterraneum* under water stress and recovery. **Plant Physiology**, Rockville, v.48, p.1-4, 1980.
- ARAÚJO, R.S.; HUNGRIA, M. **Microorganismos de Importância Agrícola**. Brasília: EMBRAPA– SPI, 1994. 235p.
- BENNET, J.M.; ALBRECHT, S.L. Drought and flooding effects on N₂ fixation, water relations, and diffusive resistance of soybean. **Agronomy Journal**, Madison, v.76, p.735-740, 1984.

- BENNET, J.M.; ALBRECHT, S.L.; BOOTE, J.K. Relationship of nitrogenase activity to plant water stress in field-grown soybeans. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.8, p.61-71, 1984.
- BROM, S.A.; SANTOS, A.G. de los; GIRARD, M.L.; DAVILA, G.; PALÁCIOS, R.; ROMERO, D. Hight-frequence rearrangements in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* plasmids. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.173, p.1344-1246, 1991.
- BUCHANAN-WOLLASTON, V. The molecular biology of leaf senescence. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.48, p.181-199, 1997.
- CARTER, P.R.; SHEAFFER, C.C. Alfafa response to soil water deficit. III. Nodulation and N₂ fixation. **Crop Science**, Madison, v.23, p.985-990, 1983.
- CASTRILLO, M.; FERNANDEZ, P.; MOLINA, B.; KAZANDJIAN, A. Metabolismo del nitrógeno en *Phaseolus vulgaris* L. bajo déficit hídrico. **Turrialba**, Costa Rica, v.40, p.515-519, 1990.
- DAVIES, W.J.; JARVIS, A.J. The coupled response of stomatal condutance to photosynthesis and transpiration. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.49, p.399-406, 1998.
- DHARMATILAKE, A.J.; BAUER, W.D. Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* towards nodulation gene – inducing compounds from alfafa roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.1153-1158, 1992.
- 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.
- FERNANDES, M.S. **Absorção e metabolismo de nitrogênio em plantas**. Itaguaí: UFRRJ, 1978. 50p. (UFRRJ. Boletim Técnico, 1).

- FISCHER, R.A.; TURNER, N.C. Plant productivity in the arid and semi-arid zones. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.29, p.277-317, 1978.
- HARDY, R.W.F.; HOLSTEN, R.D.; JACKSON, E.K.; BURNS, R.C. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation. **Plant Physiology**, Rockville, v.43, p.1185-1207, 1968.
- HISAO, T.C. Plant responses to water stress. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.24, p.514-570, 1973.
- HISAO, T.C.; ACEVEDO, E. Plant responses to water deficits, water-use efficiency, and drought resistance. **Agricultural Meteorology**, Amsterdam, v.14, p.59-84, 1974.
- JANSEN, A.B.; BUSK, P.K.; FIGUEIRAS, M.; MAR ALBA, M.; PERACCHIA, G.; MESSEGUER, R.; GODAY, A.; PAGÈS, . Drought signal transduction in plants. **Plant Growth Regulation**, The Hague, v.20, p.105-110, 1996.
- LAFRAY, D.; LOUGUET, P. Stomatal responses and drought Resistance. Bulletin de la Societe Botaniques de France. **Actualites Botaniques**, Cedex, v.137, p.47-60, 1990.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária, 1986. 319p.
- LASCANO, C.E. Calidad nutritiva y utilización de *Cratylia argentea*. In: PIZARRO, E.A.; CORADIN, L., ed. **Potencial del Género *Cratylia* como leguminosa forrajera**; Memorias del taller de trabajo realizado sobre *Cratylia*. Cali: CIAT; Planaltina: EMBRAPA/CPAC/CENARGEN, 1996. p.50-52
- LEDGARD, S.F.; STEELE, K.W. Biological nitrogen fixation in mixed legume/grass pastures. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.141, p.137-154, 1992.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principles of biochemistry**. 2.ed. New York: Worth Publishers, 1993.
- LEVITT, J. **Responses of plants to environmental stresses**. 2.ed. New York: Academic, 1980. 497p.
- LEWIS, G.P. **Legumes of Bahia**. Rkew: Royal Botanic Gardens, 1987. 369p.
- LOPEZ, F.B.; SETTER, T.L.; McDAVID, C.R. Carbon dioxide and light responses of photosynthesis in cowpea and pigeonpea during water deficit and recovery. **Plant Physiology**, Rockville, v.85, p.990-995, 1987.

- LOPEZ, J.M.; LEIDI, E.O.; LOPEZ, M.; GUTIERREZ, J.C. Fotossíntesis, condutância estomática, eficiência en el uso de agua y temperatura foliar de cultivares de algodón en respuesta al estrés hídrico. **Investigacion Agraria; Produccion y Proteccion Vegetales**, Madrid, v.8, 1992.
- LUDLOW, M.M.; FISCHER, M.J.; WILSON, J.R. Stomatal adjustment to water deficits in three tropical grasses and a tropical legume grown in controlled conditions and in the field. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v.12, p.131-149, 1985.
- KELLER, F.; LUDLOW, M.M. Carbohydrate metabolism in drought-stressed leaves of pigeonpea (*Cajanus cajan*). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.44, p.1351-1359, 1993.
- KINDA, C.; DANSO, S.K.A.; ZAPATA, F. Temporal water stress effects on nodulation, nitrogen accumulation and growth of soybean. **Plant and Soil**, Netherlands, v.120, p.49-55, 1989.
- KRAMER, P.J.; BOYER, J.S. **Water relations of plants and soils**. New York: Academic, 1995.
- MARTINS, A.L.; CASTRO, P.R.C.; APPEZZATO, B.; BERNARDES, M.S. Transpiração, frequência estomática relativa do tronco de cultivares de seringueira (*Hevea brasiliensis* Murell. Arg.). **Ecossistema**, Espírito Santo do Pinhal, v.17, 1992.
- MASS, B.L.; SCHULTZE-KRAFT, R.; ARGEL, P.J. Revisão de la evaluación agronómica de especies arbustivas. In: PIZARRO, E.A.; CORADIN, L., ed. **Potencial del Género *Cratylia* como leguminosa Forrageira**. Memorias del taller de trabajo realizado sobre *Cratylia*, Cali: CIAT; Planaltina: EMBRAPA/CPAC/CENARGEN, 1996. p.50-52.
- MONNEVEUX, P.; BELHASSEN, E. The diversity of drought adaptation in the wide. **Plant Growth Regulation**, The Hague, v.20, p.85-92, 1996.
- MORGAN, J.M. Osmoregulation and water stress in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.35, p.299-319, 1984.

- MOTT, K.A.; BUCKLEY, T.N. **Stomatal heterogeneity**. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.49, p.399-406, 1998.
- MULLET, J.E.; WHITSITT, M.S. Plant cellular responses to water deficit. **Plant Growth Regulation**, Palo Alto, v.20, p.119-124, 1996.
- NAGESWARA RAO, R.C.; SINGH, S.; SIVAKUMAR, M.V.K.; SRIVASTAVA, K.L.; WILLIAMS, J.H. Effect of water deficit at different growth phases of peanut. I. Yield responses. **Agronomy Journal**, Madison, v.77, p.728-786, 1985.
- NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, G. **Ecologia de rizóbio em solos tropicais**. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1996. 27p. (EMBRAPA:CNPAB. Documentos, 23).
- NORRIS, D.O. Acid production by *Rhizobium*: A Unifying concept. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.22, p.143-166, 1965.
- NWALOIZIE, M.C.; ANNEROSE, J.M. Stomatal behaviour and water status of cowpea and peanut at low soil moisture levels. **Acta Agronomica Hungarica**, Budapest, V.44, p.229-236, 1996.
- OLIVEIRA, M.C.; SOUZA, F.B. Avaliação Agronômica do gênero *Cratylia* na Região Semi-árida do Brasil. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 1995, Brasília, DF. **Anais...** Brasília: SBZ, 1995.
- OLIVEIRA, M.C.; ALBUQUERQUE, S.G.; SILVA, C.M.M. de S. **Avaliação indireta da produção de forragem de plantas arbustivas e arbóreas da caatinga**. Petrolina: Embrapa-CPATSA, 1980. 3p. (Embrapa-CPATSA. Pesquisa em Andamento, 7).
- OTERO, J.R. de. **Informações sobre algumas forrageiras**. Rio de Janeiro: SIA (Serviço de Informação Agrícola), 1952. 339 p. (Série Didática, 11).
- PANKHURST, C.E.; SPRENT, J.I. Effects of water stress on the respiratory and nitrogen-fixing activity of soybean root nodules. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.26, p.287-303, 1975.
- PARSONS, L.R.; HOWE, T. Effects of Water Stress on The Water Relations of *Phaseolus vulgaris* and Drought Resistant *Phaseolus acutifolius*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.60, p.197-202, 1984.

- PASSIOURA, J.B. Drought and drought tolerance. **Plant Growth Regulation**, Palo Alto, v.20, p.79-83, 1996.
- PIMENTEL, C. **Metabolismo de Carbono na Agricultura Tropical**. Seropédica: Edur (UFRRJ), 1998. 150p.
- PIMENTEL, C.; JACOB NETO, J.; GOI, S.R.; PESSANHA, G.G. Estresse Hídrico em cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. em simbiose com o *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. **Turrialba**, Costa Rica, v.40, p.520-526, 1990.
- POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H. **Advances in legumes systematic**, Kew: Royal Botanic Garden, 1981. V.1. 425p.
- QUEIROZ, L.P. de; CORADIN, L. Biogeografia de *Cratylia* e áreas prioritárias para coleta. In: PIZARRO, E.A.; CORADIN, L., ed. **Potencial del género *Cratylia* como leguminosa forrageira**. Memorias del taller de trabajo realizado sobre *Cratylia*, Cali: CIAT; Planaltina: EMBRAPA/CPAC/CENARGEN, 1996. p.1-28.
- QUEIROZ, L.P. **O género *Cratylia* Martius ex Benth (LEGUMINOSAE:PAPILIONOIDEAE:PHASEOLEAE): Revisão Taxionômica e Aspectos Biológicos**. Campinas: UNICAMP, 1991. 116p. Tese de Mestrado.
- RACHIE, K.O.; ROBERTS, L.M. Grains legumes of the low-lands tropics. **Advances in Agronomy**, Madison, v.26, p.1-132, 1974.
- RAGGI, V. Changes in free amino acids and osmotic adjustment in leaves of water-stressed bean. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.91, p.427-434, 1994.
- RAMOS, M.L.G.; GORDON, A.J.; MINCHIN, F.R.; SPRENT, J.I.; PARSONS, R. Effect of water stress on nodule physiology and biochemistry of a drought tolerant cultivar of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Annals of Botany**, London, v.83, p.57-63, 1999.
- RAO, A.V.; VENKATESWARLU, B. Nitrogen fixation as influenced by water stress in select crop legumes of the Indian arid zone. **Arid Soil Research Rehabilitation**, v.1, p. 89-96, 1987.
- SILVA, C.M.M. de S. **Avaliação da Camaratuba no semi-árido nordestino**. Pedrolina: Embrapa-CPATSA, 1992. 22p. (Embrapa-CPATSA. Boletim de Pesquisa, 43).

- SILVA, C.M.M. de S.; OLIVEIRA, M.C. de. **Comportamento de algumas leguminosas forrageiras para o pastejo direto e produção de feno na região semi-árida do nordeste.** Petrolina: Embrapa-CPATSA, 1988. 6p. (Embrapa-CPATSA. Comunicado Técnico, 24).
- SILVA, C.M.M. de S.; OLIVEIRA, M.C. de; SOARES, J.G.G. **Avaliação de forrageiras nativas e exóticas para a região semi-árida do nordeste.** Petrolina: Embrapa-CPATSA, 1984. 38p. (Embrapa-CPATSA. Documentos, 27).
- SINCLAIR, T.R.; LUDLOW, M.M. Influence of changes in soybean nodule number and dry weight in response to drought. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.18, p.197-202, 1988.
- SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. **Biotechnologia do Solo.** Brasília: MEC, ABEAS; Lavras: ESAL, FAEPE, 1988. 235p.
- SLAVIK, B. **Methods of studying plant water relations.** Berlin: Springer Verlag, 1974. (Ecological Studies, 9).
- SMITH, D.J.; DIJACK, M.; HUME, D.J. The effect of water deficit on $N_2(C_2H_2)$ fixation by the bean and soybean. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.68, p.957-967, 1988.
- SOBRINHO, J.M.; NUNES, M.R. Estudos Desenvolvidos Pela Empresa Goiana de Pesquisa Agropecuária com *Cratylia argentea*. In: PIZARRO, E.A.; CORADIN, L., ed. **Potencial del Género *Cratylia* como leguminosa Forrageira.** Memorias del taller de trabajo realizado sobre *Cratylia*. Cali: CIAT; Planaltina: EMBRAPA/CPAC/CENARGEN, 1996. p.1-28.
- SOUZA, W. de; HADDAD, A.; SILVEIRA, M.; BARTH, O.M.; MACHADO, R.D.; SOUTO-PADRÓN, T. **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica.** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletronica, 1989. V.1.
- SPRENT, J.I. **Aderence of sand particles to soybean roots under water deficits.** **New Phytologist**, Oxford, v.74, p.461-463, 1975.
- SPRENT, J.I. Effects of water stress on nitrogen fixation in root nodules. **Plant and Soil**, The Hague, Volume Especial, p.225-228, 1971.

- SPRENT, J.I. Water deficits and nitrogen fixation on root nodules. In: KOZLOSKI, T.T., ed. **Water deficits and plant growth**. New York: Academic, 1976. p.291-315.
- SUBARAO, G.V.; JORANSEN, C.; NAGUESWARARAO, R.C.; SAXENA, N.P.; CHAUHAN, Y.S. Strategies for improving drought resistance In grain legumes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Palo Alto, v.14, n.6,1995.
- SWARAJ, K. Environmental stress and symbiotic N₂ in legumes. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v.14, p.117-130, 1987.
- TARDIEU, F.; SIMONNEAU, T. Variabilidade among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. **Journal of Experimental Botany**, London, v.49, Special issue, p.419-432, 1998.
- TARDIEU, F. Drought perception by plants. Do cells of droughted plants experience water stress? **Plant Growth Regulation**, The Hague, v.20, p.93-104, 1996.
- TEIXEIRA, J.B. **Efeito do déficit hídrico sobre a fotossíntese, a respiração, a transpiração e a eficiência no uso da água em seis espécies de leguminosa forrageira**. Viçosa: UFV, 1978. 45p. Tese de Mestrado.
- TURNER, N.C. Adaptation to water deficits: A Changing perspective. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v.13, p.175-190, 1986.
- TURNER, N.C.; BEGG, J.E.; RAWSON, H.M.; ENGLISH, S.D.; HEARN, A.B. Agronomic and physiological responses of soybean and sorghum crops to water potential, leaf conductance, ¹⁴CO₂ photosynthesis, and adaptation to water deficits. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v.5, p.179-194, 1978.
- VASQUEZ-TELLO, A.; ZUILY-FODIL, Y.; PHAM THI, A.T.; VIEIRA da SILVA, J.B. Electrolyte and Pi leakages and soluble sugar content as physiological testes for screening resistance to stress in *Phaseolus* and *Vigna Species*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.41, p.827-832, 1990.
- VENKATESWARLU, B.; RAO, A.V. Quantitative effects of field water deficits on N₂(C₂H₂) fixation in selected legumes grown in the Indian desert. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.5, p.18-22, 1987.

- VINCENT, J.M. **A Manual for the practical study of the root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 164p.
- WILLIAM, P.M.; SICARDI de MALLORCA, M. Effect of osmotically induced leaf moisture stress on nodulation and nitrogenase activity of *Glycine max*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.80, p.267-283, 1984.
- WONG, S.C.; COWAN, I.R.; FAQUHAR, G.D. Leaf conductance in relation to rate of CO₂ assimilation. Influence of nitrogen nutrition, phosphorus nutrition, photon flux density, and ambient partial pressure of CO₂ during ontogeny. **Plant Physiology**, Rockville, v.78, p.821-825, 1985.
- WORRALL, V.S.; ROUGHLEY, R.J. The effect of moisture stress on infection of *Trifolium subterraneum* L. by *Rhizobium trifolii* Dang. **Journal of Experimental Botany**, London, v.27, p.1233-1241, 1976.
- XAVIER, D.F.; CARVALHO, M.M.; BOTREL, M.A. **Cratylia argentea: Informações Preliminares para sua Utilização como Forrageira**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1995. 18p. (EMBRAPA-CNPGL. Circular Técnica, 40).
- YEMM, E.W.; COOCKING, E.C. **The determination of amino-acids with ninhydrin**. **Analyst**, London, v.80, p.209-213, 1954.
- YEMM, E.W.; WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemistry**, New York, v.57, p.508-514, 1954.