

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA - UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM MANEJO DO SOLO**

JANAINA VERONEZI ALBERTON

**EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DA ASSOCIAÇÃO DE ERVILHACA
COM ISOLADOS DE RIZÓBIOS**

LAGES – SC

2011

JANAINA VERONEZI ALBERTON

**EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DA ASSOCIAÇÃO DE ERVILHACA
COM ISOLADOS DE RIZÓBIOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de mestre no Curso de
Pós-Graduação em Manejo do Solo da
Universidade do Estado de Santa Catarina –
UDESC.

Orientador: Julio Cesar Pires Santos
Co-orientador: Osmar Klauberg Filho

LAGES – SC

2011

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária
Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14ª Região
(Biblioteca Setorial do CAV/UDESC)

Alberton, Janaina Veronezi
Eficiência agronômica da associação de ervilhaca com isolados de
rizóbios
/ Janaina Veronezi Alberton ; orientador: Julio Cesar Pires Santos. –
Lages, 2011.
58f.

Inclui referências.
Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências Agroveterinárias /
UDESC.

1. Ervilhaca. 2. Nitrogênio. 3. Bactérias fixadoras. 4. Inoculação. I. Título.

CDD – 633.2

JANAINA VERONEZI ALBERTON

**EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DA ASSOCIAÇÃO DE ERVILHACA
COM ISOLADOS DE RIZÓBIOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre no Curso de Pós-Graduação em Manejo do Solo da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

Aprovada em: _____/_____/_____

Homologada em: _____/_____/_____

Banca Examinadora:

Orientador/presidente: Dr. Julio Cesar Pires Santos (UDESC/Lages - SC)

Dr. Luciano Colpo Gatiboni
Coordenador Técnico do Curso de
Mestrado em Manejo do Solo

Membro: Dra. Cileide Maria Medeiros Coelho Arruda de Souza (UDESC/Lages - SC)

Dr. Leo Rufato
Coordenador do Programa de Pós-
Graduação em Ciências
Agrárias – UDESC/Lages – SC

Membro: Dr. Alfredo do Nascimento Junior (EMBRAPA TRIGO)

Dr. Cleimon Eduardo do Amaral Dias
Diretor Geral do Centro de Ciências
Agroveterinárias – UDESC/Lages - SC

Lages, Santa Catarina
19 de dezembro de 2011

*Aos meus pais Romilda Veronezi
Alberton e Valmir Alberton, por todo
amor, confiança e incentivo.*

Dedico...

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e infinita proteção.

Aos meus amados pais, Valmir Alberton e Romilda Veronezi Alberton, que me apoiaram muitas vezes sem entender o porque, apenas acreditando na minha felicidade, pelo amor e incentivo.

A Santo Expedito, Santa Paulina e Nossa Senhora Aparecida, aos quais sou devota e acredito que muito são responsáveis por eu ter chegado até aqui.

Aos meus irmãos, Jadson e Gustavo, pelas palavras de apoio, e por simplesmente fazerem parte da minha vida.

Aos meu avós que me acompanharam desde o início e torceram sempre por mim.

Ao professor Julio por ter participado diretamente na minha evolução durante o curso, por ter me orientado e me compreendido.

Ao amigo Maurício por ter acreditado na minha capacidade e me impulsionado a seguir em frente.

A todos os professores da UDESC pelos ensinamentos repassados em sala de aula, corredores, laboratórios e também pelos conselhos dados e ouvidos cedidos.

Aos bolsistas Larissa e Alisson por toda ajuda que deram.

Aos lindos amigos que estiveram junto nesta caminhada, Luiz, Juliano, Paula, Luciana, Juliana, Gessiane, Daiana, Estefania, Ariane e em especial Alessandra e Gabriela, pelos momentos de desabafo, alegrias, tristeza e compreensão. Tenho certeza que sem vocês eu não teria chegado até o fim.

A todos aqueles que contribuíram para a realização dessa dissertação, deixo aqui meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

ALBERTON, Janaina Veronezi. Eficiência agronômica da associação de ervilhaca com isolados de rizóbios. 2011. 58f. Dissertação (Mestrado em Manejo do Solo) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Lages, SC. 2011.

A adubação nitrogenada representa um alto custo para os pequenos produtores que não apresentam subsídios suficientes para investirem em suas lavouras e assim obterem maior rendimento das culturas e consequentemente lucratividade. Este custo pode ser reduzido a partir da fixação biológica de nitrogênio pelo cultivo de leguminosas de cobertura do solo. O objetivo geral do trabalho foi avaliar a eficiência agronômica de fixação de N de 9 isolados de rizóbios obtidos de nódulos de plantas voluntárias de ervilhaca (*Vicia sativa* e *Vicia villosa*) mais 2 isolados utilizados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a cultura da ervilhaca e o rendimento de massa seca de dois genótipos de ervilhacas. Foram coletadas plantas de ervilhaca nos municípios de Pontão e Passo Fundo no Rio Grande do Sul, e em Lages e Urupema em Santa Catarina, dos quais procedeu-se o isolamento de bactérias dos nódulos radiculares. Os genótipos de ervilhaca utilizados são cultivares comerciais denominados SS Esmeralda (ervilhaca peluda) e SS Ametista (ervilhaca comum). Este trabalho constou de duas etapas. A primeira etapa constou de dois experimentos, um cultivado em substrato não esterilizado e o outro em substrato esterilizado, com dois genótipos de ervilhaca e constando dos tratamentos com e sem inoculação dos isolados de rizóbios. A segunda etapa com apenas de um experimento, repetiu-se os mesmos tratamentos somente em solo não esterilizado. Todos os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, no Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV/UDESC, Lages, SC. Utilizou-se vasos com capacidade para dois litros, preenchidos com uma mistura de 1/3 de areia e 2/3 de solo. Antes da semeadura o solo teve seu pH, P e K corrigidos conforme a recomendação técnica para a cultura. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial com quatro repetições. A ervilhaca foi colhida 60 dias após a emergência e foram avaliados massa seca da parte aérea, número e massa seca de nódulos e acúmulo de nitrogênio na parte aérea. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de médias de tukey a 5%. A ervilhaca peluda apresentou maior potencial para produção de matéria seca de parte aérea e de acúmulo de N em relação à comum nos dois experimentos. As bactérias inoculadas não influenciaram significativamente no acúmulo de nitrogênio da parte aérea e em nenhum dos outros parâmetros avaliados, mostrando que a ervilhaca não respondeu bem a inoculação.

Palavras-chave: Ervilhaca. Nitrogênio. Bactérias fixadoras. Inoculação

ABSTRACT

ALBERTON, Janaina Veronezi Alberton. **Agronomic efficiency of association of vetch with rhizobial isolates.** 2011. 58f. Dissertation (Mestrado em Manejo do Solo) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Lages, SC. 2011.

Nitrogen fertilization represents a high cost for small producers who do not have sufficient allowances to invest in their crops and thus gain a greater crop yields and therefore profitability. This cost can be reduced from biological nitrogen fixation by legumes growing ground cover. The objective of this study was to evaluate the agronomic efficiency of N fixation in 11 populations of rhizobia from the nodules of plants voluntary vetch (*Vicia sativa* and *Vicia villosa*), and dry matter of two genotypes of vetches. Vetch plants were collected in the towns of Pontão and Passo Fundo in Rio Grande do Sul, and in Lages and Urupema in Santa Catarina, which proceeded to the isolation of bacteria from root nodules. The genotypes of vetches commercial strains used are called Emerald SS (hairy vetch) and SS Amenti (common vetch). This work consisted of two steps. The first phase consisted of two experiments, one grown on the substrate non-sterile and other sterile substrates containing two genotypes of vetches and consisting of treatments with and without inoculation of rhizobia isolates. The second phase consisted of only one experiment, where repeated the same treatments, but only in non-sterile soil. All experiments were conducted in a greenhouse at the Center for Science Agroveterinárias - CAV/UDESC, Lages, Santa Catarina. We used pots with a capacity of two liters, filled with a mixture of 1/3 sand and 2/3soil. Before sowing the soil had its pH, P and K corrected as recommended technique for culture. The experimental design was completely randomized factorial design with four replications. Vetch was harvested 60 days after emergence were evaluated and shoot dry mass, number and dry weight of nodules and nitrogen accumulation in the shoot. The results were statistically analyzed by Tukey at 5%. The hairy vetch showed a higher potential for production of dry matter and shoot N accumulation for the variety common in the two experiments, in agreement with the literature. The inoculated bacteria did not influence significantly the accumulation of nitrogen in the shoot and none of the other parameters evaluated, showing that vetch not responded well to inoculation.

Keywords: Vetch. Nitrogen. Fixing bacteria. Inoculation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Demonstração de raiz e nódulo.....	30
Figura 2 - Obtenção de cultura pura.....	30
Figura 3 - Experimento conduzido em casa de vegetação.....	34
Figura 4 - Parte aérea da ervilhaca.....	35
Figura 5 - Destaque da parte aérea da raiz.....	36
Figura 6 - Lavagem da raiz.....	37
Figura 7 - Destaque dos nódulos das raízes.....	37
Figura 8 - Comparação entre as ervilhacas para Massa Seca de Raiz (MSR) em substrato esterilizado. Média de quatro repetições. Lages-SC.....	42
Figura 9 - Comparação entre as ervilhacas para Massa Seca de Parte Aérea (MSPA) em substrato esterilizado.....	42
Figura 10 - Comparação entre as ervilhacas para o Nitrogênio Total (NT) em substrato esterilizado.....	43
Figura 11 - Comparação entre as ervilhacas para o Número de Nódulos (NN) em substrato não estéril.....	47
Figura 12 - Comparação entre as ervilhacas para o Massa Seca de Nódulos (MSN) em substrato não estéril.....	47
Figura 13 - Comparação entre as ervilhacas para a Massa seca de parte aérea (MSPA) em substrato não estéril.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química da ervilhaca.....	17
Tabela 2 - Composição do meio de cultura Extrato de Levedura-Manitol (YMA).....	29
Tabela 3 - Origem das bactérias isoladas e denominação atribuída.	31
Tabela 4 - Tratamentos realizados entre os isolados de bactérias e os genótipos de ervilhacas.....	32
Tabela 5 - Resultados da análise do solo utilizado no experimento antes das correções de pH, fósforo e potássio.....	33
Tabela 6 - Número de nódulos (NN) e massa seca de nódulos (MSN) em ervilhaca peluda e comum, influenciados pela inoculação com isolados nativos de rizóbios em solo esterilizado. Média de quatro repetições. Lages-SC.....	41
Tabela 7 - Massa seca de raiz (MSR), Massa seca da parte aérea (MSPA) e Nitrogênio total (NT) em ervilhaca peluda e comum, influenciados pela inoculação com isolados nativos de rizóbios em solo esterilizado. Média de quatro repetições. Lages-SC	41
Tabela 8 - Massa seca de raiz (MSR) e Nitrogênio total (NT) em ervilhaca peluda e comum, influenciados pela inoculação com isolados nativos de rizóbios em substrato não esterilizado. Média de quatro repetições. Lages-SC.....	46
Tabela 9 - Número de nódulo (NN), Massa seca de nódulo (MSN) e massa seca da parte aérea (MSPA) em ervilhaca peluda e comum, influenciados pela inoculação com isolados nativos de rizóbios em substrato não esterilizado. Média de quatro repetições. Lages-SC	46
Tabela 10 - Valores de Número de Nódulos (NN), Massa seca de nódulos (MSN), Massa seca de parte aérea (MSPA), nitrogênio total acumulado por planta (NT) e Massa seca de raíz (MSR) em ervilhaca peluda e comum, influenciados pela inoculação com isolados nativos de rizobios em solo não esterilizado. Médias de quatro repetições. Lages-2011.	49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2. 1 O GÊNERO <i>VICIA</i>	16
2.2 AS ESPÉCIES <i>VICIA SATIVA L.</i> E <i>VICIA VILLOSA ROTH</i>	17
2.3 O NITROGÊNIO.....	19
2.4 IMPORTÂNCIA DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	20
2.5 USOS DA ERVILHACA.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 PRIMEIRA ETAPA	28
3.1.1 Preparo do meio de cultura para isolamento das bactérias.....	28
3.1.2 Isolamento das bactérias.....	29
3.1.3 Preparo do inoculante	30
3.2 SEGUNDA ETAPA	31
3.2.1 Ensaios em casa de vegetação:	31
3.2.2 Primeira época	32
3.2.2.1 Substrato esterilizado.....	32
3.2.2.2 Substrato não esterilizado	33
3.3 INSTALAÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	33
3.3.1 Obtenção dos resultados da primeira etapa	34
3.3.2 Preparo das amostras para análise de massa seca da parte aérea das plantas	35
3.3.3 Determinação da massa seca de raíz, número de nódulos e massa seca de nódulos	36
3.3.4 Determinação do nitrogênio da parte aérea das plantas	37
3.4 SEGUNDA ÉPOCA	38
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 PRIMEIRA ÉPOCA	40
4.1.1 Substrato esterilizado	40
4.1.2 Substrato não esterilizado	44
4.2 SEGUNDA ÉPOCA	48
5 CONCLUSÕES	53

1 INTRODUÇÃO GERAL

O segmento da agricultura familiar no Brasil é representada por um grande número de produtores com pequenas áreas agrícolas, e a maior parte de suas áreas localizam-se em solos ácidos e pouco férteis, cultivados com nível de tecnologia baixo. Em Santa Catarina essa realidade tem sido responsável por restrições na obtenção de rendimentos satisfatórios das culturas, resultando em baixos retornos financeiros a estes pequenos agricultores.

Nesse quadro, no qual o fornecimento adequado de nutrientes representa um dos fatores limitantes à obtenção de maiores rendimentos no Brasil (Araujo, 1994), um nutriente limitante para o bom desenvolvimento das culturas é o nitrogênio, e os produtores para suprir a necessidade desse nutriente utilizam adubação nitrogenada obtendo respostas positivas para as culturas, principalmente para o rendimento de grãos.

A falta deste nutriente causa restrições no desenvolvimento da cultura e no aumento do rendimento, como também nas questões nutricionais, já que o nitrogênio nas plantas é componente de proteínas, aminoácidos, vitaminas e coenzimas. De todo nitrogênio adicionado, em geral 50% é utilizado pelas plantas, o restante é perdido por lixiviação, gerando maiores custos de implantação da lavoura. Isto, associado ao baixo incentivo ao pequeno produtor, gera perda de espaço do mesmo no mercado. Mesmo os grandes produtores, em anos em que o tempo não é favorável a agricultura, encontram dificuldades em obter lucro, devido estes altos custos de implantação das culturas.

Outra forma de suprir a necessidade de nitrogênio pelas plantas é através da fixação biológica deste nutriente por plantas hospedeiras como a ervilhaca, que quando decompõem, deixam uma grande quantidade deste nutriente no solo, livre para o uso da cultura que ali será implantada. A ervilhaca por se tratar de uma planta da família das leguminosas, possui uma vantagem evolutiva ímpar em relação às plantas de outras famílias na fixação de nitrogênio, pois as leguminosas são capazes de formar associações simbióticas com bactérias do gênero *Rhizobium*, onde ocorre uma simbiose entre a bactéria e a planta hospedeira.

Essas associações formam estruturas típicas, denominadas de nódulos, onde ocorre o processo de fixação biológica de (N_2), que é responsável por grande parte do N utilizado pelas plantas nos processos metabólicos e consequentemente o crescimento. Essa forma de suprimento de nitrogênio as plantas é fundamental para a redução do uso de fertilizantes nitrogenados e consequentemente o custo de produção.

Contudo, o sucesso esperado pela prática da inoculação nem sempre é alcançado e quando obtido pode tornar-se limitado devido a características da planta, como dificuldade de se estabelecer um desenvolvimento da simbiose com estirpes desejadas, que possam fornecer uma máxima quantidade de N_2 fixado, já que como a ervilhaca não tem muita especificidade em relação ao simbionte, muitas vezes pode-se formar uma associação que não se traduz em eficiência na fixação de N, fatores edáficos como pH solo, toxidez de Al, nutrição nitrogenada e pragas. Além disso, o uso de bactérias eficientes pode proporcionar produtividades superiores às obtidas quando do uso de adubos nitrogenados. A pouca existência de trabalhos avaliando a eficiência de fixação biológica de nitrogênio da ervilhaca e estirpes promissoras para esta fixação é de grande importância, pois representa um campo vasto para obtenção de conhecimento e posterior aplicação de técnicas, que auxiliarão nas estratégias de manejo do solo e da vegetação, em uma área de expressiva representatividade nos sistemas agrícolas brasileiros, colaborando para obtenção de uma agricultura sustentável, auxiliando nas verificações sobre a diversidade de espécies que podem representar a confiança das características da microbiota do solo (GRANGE & HUNGRIA, 2004).

O solo é um sistema aberto com equilíbrio dinâmico e complexo, onde diferentes organismos desempenham papéis fundamentais para a manutenção e a sobrevivência de comunidades vegetais e animais nos ecossistemas. Os avanços das técnicas moleculares, bioquímicas e fisiológicas para o estudo de comunidades microbianas dos solos tornaram possível avaliar a diversidade e a composição destas comunidades complexas.

Os estudos sobre a interação entre estirpes eficientes na fixação biológica de nitrogênio (FBN) e genótipos de plantas adaptados, são ainda restritos. Isso enfatiza a necessidade de se obter índices de eficiência do processo simbiótico, que podem ser obtidos pela realização de estudos confrontando estirpes de *Rhizobium* contrastantes com genótipos de ervilhaca.

Em função disto, instituiu-se a estratégia de produção de inoculantes bacterianos com bactérias pré-selecionadas e mais eficientes, que em associação a genótipos de

ervilhaca podem ser implantados nas lavouras em antecedência a implantação da cultura principal, diminuindo os custos de implantação da lavoura. Quando decomposta, a ervilhaca libera o nitrogênio fixado ao solo, ficando este livre para o uso da cultura principal, aumentando assim os benefícios nutricionais e agronômicos e lucratividade da mesma, desse modo incentivando a agricultura em geral.

Com base nessas informações, a hipótese a ser testada é que existem bactérias mais eficientes para fixação de nitrogênio em associação com a ervilhaca do que a atualmente recomendada para produção de inoculante.

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a eficiência agronômica da associação de bactérias fixadoras de nitrogênio com genótipos de ervilhaca, sobre a produção de massa seca de parte aérea e o acúmulo de nitrogênio.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2. 1 O GÊNERO VICIA

O gênero *Vicia* é composto por leguminosas de inverno de crescimento anual e é tido como originário do sul da Europa e norte da África (ALCANTRA & BUFARAH, 1979 e PUPO, 1979). Atualmente são conhecidas 160 espécies, distribuídas principalmente no norte da Europa e Ásia (com 110 spp, principalmente no Mediterrâneo e regiões de Irano-Turaniana, algumas espécies na China, Coreia e Japão), Norte da África (com aproximadamente 15 spp), centro e norte da América (com 17 spp, incluindo 1 spp no Hawaii) e sul da América (com 18 spp) (LEWIS et al, 2006). As mais comumente encontradas na região sul são: *Vicia sativa*, *Vicia benghalensis* ou *Atrio púrpura* e *Vicia villosa* (MORAES, 1995), conhecidas popularmente como ervilhaca.

A melhor época para semeadura dessa leguminosa é no outono, sendo os meses de março a abril os mais indicados (MORAES 1995). Em regiões com inverno ameno, desenvolve-se do outono até o início da primavera, época em que apresenta florescimento.

As quantidades de sementes por hectare variam conforme o manejo, procedimento da cultura, semeadura e a utilização que a mesma terá, além das consorciações utilizadas. Em cultura singular para corte pode-se empregar em torno de 60 kg por hectare de sementes, quando consorciada com outra cultura em torno de 40 kg de sementes por hectare, em áreas destinadas a multiplicação das sementes em torno de 15-20 kg por hectare são o suficiente (MORAES, 1995).

Para o preparo do solo deve-se ter especial cuidado, pois é deste particular que depende o sucesso do desenvolvimento da cultura. A adubação deve ser feita conforme a indicação para a cultura, porém segundo Moraes (1995) a adubação fosfatada com prévia correção de calcário é que tem dado melhores resultados, gerando maior produção e rendimento da mesma.

Apresentam excelente cobertura de solos com texturas de médias a pesadas (SEYMOUR et al, 2003). Quando for consorciada com gramínea, como aveia preta e centeio, pelo seu hábito de crescimento trepador, possui maior biomassa do que em cultivo solteiro (TOMM, 1990), podendo produzir 6,0 toneladas MS/ha (FONTANELLI et al., 2009). A seguir é apresentada na Tabela 1, a composição química da ervilhaca.

Tabela 1 - Composição química da ervilhaca.

	Umidade %	Substância Seca %	Proteína bruta %	Gordura bruta %	Cinza bruta %	Fibra bruta %	Extrativos não Nitrogenados %
Matéria verde	76,04	23,96	5,95	0,58	2,85	4,82	9,76
Feno	7,89	92,11	22,89	2,24	10,95	18,54	37,49
Matéria seca	-	100,00	24,85	2,43	11,89	26,13	40,70

Fonte: MORAES, 1995.

2.2 AS ESPÉCIES *Vicia sativa* L. E *Vicia villosa* ROTH

No Sul do Brasil as espécies *Vicia sativa* L. (Ervilhaca comum) e *Vicia villosa* Roth (Ervilhaca peluda) são usadas como plantas de cobertura e também como forrageira sendo que suas folhas geralmente apresentam o dobro de proteína do que seu caule (FONTANELLI, et al., 2009).

A ervilhaca comum é uma leguminosa anual de inverno, herbácea e glabra e apresenta raízes profundas e ramificadas (FONTANELLI et al., 2009), que auxiliam na melhoria da estrutura do solo. Seu caule é fino, flexível, decumbente e trepador, que atinge até 0,90 m de comprimento (CALEGARI et al., 1993). A planta atinge em média 0,35 m de altura, suas folhas são alternadas, paripenadas, com gavinhas terminais. As flores são geralmente pareadas nas axilas das folhas, em forma de racemo, com número variável, subsséis, com 1,8 a 3,0 cm de comprimento, cor violeta púrpura, ou, raramente brancas. Os legumes são quase cilíndricos, compridos, com 2,5 a 7,0 cm de comprimento e 5 a 8 mm de largura, de cor marrom, com 4 a 12 sementes (FONTANELLI et al., 2009). As sementes são globosas ou compridas, com 3 a 5 mm de diâmetro, lisas com cor verde acinzentada, raramente amarela. As sementes da *V. sativa* são maiores que as da *V. villosa* (SALERNO & TCACENCO, 1986). Aparecem de forma espontânea onde já foi cultivada. É cultivada em todo mundo como planta forrageira de inverno por ser uma planta rica em proteínas e muito indicada para vacas

leiteiras e, segundo Fontanelli et al. (2009), em geral apresenta expressiva capacidade de rebrote.

A *Vicia villosa* é uma planta herbácea anual, glabra e apresenta pelos de forma suave sob todas as partes jovens, tem hábito trepador e as folhas são pilosas. Espécie nativa da Europa, Grécia, Sicília e região Egípcia, apresentando seu principal centro de diversidade provavelmente na Ásia oriental (IZAGUIRRE & BEYHAUT, 1998). Segundo estes autores, na América do Sul (Uruguai, Argentina e Brasil) se comporta como uma planta subespontânea e é amplamente cultivada para produção de forragens no sul. Também é muito utilizada para produção de feno, silagem, adubo verde e como planta de cobertura. Freqüentemente pode-se encontrar essa ervilhaca ao longo das estradas dos Estados Unidos e do Canadá (DUCKE, 1983).

Rosengurtt (1939) iniciou ensaios no Uruguai com sementes de ervilhaca peluda provenientes da França, apresentando como resultado um cultivo vigoroso, com uma abundante forragem que conseguiu manter a floração durante o inverno.

Os estudos com as duas espécies apresentam resultados contraditórios em diferentes situações. Rolfo e Odiozabol (1950) constataram a adaptabilidade da *V. sativa*, concluindo que a mesma apresenta diferentes adaptações para produção de grãos e forragem. Os mesmos também verificaram que seu plantio junto com cereais de inverno apresentou rendimento satisfatório, ampliando a possibilidade de realizar cultivos consorciados e assim resolver o problema da falta de proteína que a *V. sativa* apresenta para alimentação animal.

O uso das ervilhacas para fins forrageiros, entretanto, deve ser cercado de muito cuidado. Algumas as variedades disponíveis de *V. sativa* (ervilhaca comum) apresentam uma neurotoxina (RESSLER, 1962, RESSLER et al., 1963, ROY et al, 1996) β -cyanoalanine e γ -L-glutamy- β -cyanoalanine (SEYMOUR et al, 2003), portanto quando seu uso for destinado a alimentação animal, o pastejo deve ser feito antes da floração (DERPSCH & CALEGARI, 1992), para evitar intoxicação do animal. Também é considerada tóxica quando cortada, pois após iniciar sua murcha, produz intensa fermentação gerando subprodutos tóxicos. Isto pode ser evitado não ministrando a mesma cortada ou misturando com outras espécies forrageiras (IZAGUIRRE & BEYHAUT, 1998).

A resistência ao frio é variável, dependendo da espécie. A *V. sativa* é de baixa resistência a baixas temperaturas, sendo que a mesma é prejudicada com temperaturas abaixo de zero graus centígrados (MORAES, 1995). Apesar de não ser tida como a mais

resistente ao frio, tem-se notícias de que 75% das plantas de algumas cultivares de *V. sativa* sobrevivem a exposição por 2 horas a temperatura de -8°C (ACIKGOS, 1982). Derpsch & Calegari (1992), também verificaram que a ervilhaca comum é sensível a deficiência hídrica e ao calor, embora muitas plantas tenham se adaptado a invernos rigorosos e secos.

A *V. villosa*, por outro lado, é a mais resistente de todas as espécies do gênero e é usada como cultura anual de inverno mesmo em regiões bastante frias. É inclusive conhecida como vicia de inverno (WHYTE et al, 1955). A mesma apresenta ampla adaptação no sul no Brasil e proporciona considerável cobertura do solo.

A ervilhaca comum é exigente em fertilidade e desenvolve-se bem em solos corrigidos ou já cultivados, com bons teores de cálcio, fósforo e sem problemas de acidez (SANTOS, 2010) e não tolera umidade excessiva (PUPO, 1979). Para Whyte et al (1955) a *Vicia sativa* adapta-se a solos ácidos, porém não se adapta a alcalinidade. Entretanto, a variedade peluda consegue produzir grandes quantidades de massa, mesmo em solos de baixa fertilidade e com problemas de acidez (NETTO, 2003) e pesados (HEATH et al, 1973).

2.3 O NITROGÊNIO

O nitrogênio é o macronutriente mais exigido para o desenvolvimento das plantas superiores. Este é o principal constituinte das proteínas, as quais participam ativamente na síntese dos compostos orgânicos que formam a estrutura vegetal (HAAG, 1977). O nitrogênio pode ser um nutriente crítico para as plantas porque seu suprimento no solo é limitado e, além disso, ele também é utilizado pelos microrganismos que habitam esse solo. Para as culturas agrícolas econômicas a necessidade deste nutriente é superior a 100 kg há.⁻¹ano, para que as mesmas apresentem boa manutenção do metabolismo, bom crescimento e reprodução (SOUZA, 2011).

O nitrogênio corresponde a cerca de 78% da atmosfera, porém apenas 0,04% do N total existente se encontra combinado nas formas orgânicas e inorgânicas nos ecossistemas aquáticos e terrestres. Os animais, os vegetais e a maioria dos microrganismos dependem dessa pequena parcela de N nas formas combinadas, pois o N atmosférico não está disponível nutricionalmente a todos os eucariotos (incluindo as plantas) e à maioria dos procariotos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

O gasto energético para produção de adubos nitrogenados na forma mineral é alto. A fixação industrial do N₂, processo de Haber-Bosch, utiliza temperaturas em torno de 400-600 °C e pressões em torno de 100-200 atm, sendo dispendiosa do ponto de vista energético (Reação: N₂ + 3 H₂ ---> 2 NH₃). Devido estes fatores a produção do adubo mineral resulta em alto custo operacional e de produção, tornando-se um dos fatores limitantes ao desenvolvimento dos sistemas agrícolas (SOUZA, 2011).

Uma estratégia para redução deste custo é o uso de uma pequena parcela de procariotos que consegue reduzir o N₂ atmosférico a forma inorgânica combinada NH₃ (amônia), produto este assimilável pelas plantas. Estes organismos são o que chamamos de Fixadores Biológicos de Nitrogênio (FBN) (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Outra alternativa de fixação de nitrogênio ocorre na natureza mediante descargas elétricas na atmosfera. Porém, as estimativas de contribuição a partir desta forma são relativamente baixas quando comparadas ao processo biológico ou industrial (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

2.4 IMPORTÂNCIA DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

O nitrogênio é um dos elementos mais abundantes da Terra, constituindo quase 80% dos gases atmosféricos. Nenhum animal ou planta, porém, é capaz de utilizá-lo como fonte protéica, pois o N encontra-se sob a forma gasosa de N₂, uma molécula formada por dois átomos de N unidos por uma tripla ligação extremamente estável e que requer uma elevada energia de ativação para que venha a reagir com outros elementos (ARAUJO, 2006). Uma forma de se obter esse nutriente da atmosfera é a fixação biológica de nitrogênio.

Os benefícios causados pela fixação biológica de nitrogênio são conhecidos desde os tempos pré-cristãos (GOIS, 2011). A fixação biológica do N₂ (FBN) ocorre através da associação entre plantas hospedeiras e organismos fixadores de N₂, que transformam o N₂ em formas assimiláveis para as plantas, através do complexo enzimático denominado de dinitrogenase, que é composto por duas unidades protéicas, a Fe-proteína e a Mo-Fe-proteína e que, auxiliadas pela ferridoxina, reduzem o N₂ a amônia (NH₃) (MORGANTE, 2003).

A descoberta de que as leguminosas têm o nitrogênio da atmosfera como uma segunda fonte de suprimento, além do solo, coube a H. Hellriegel em 1886. Em 1888,

em colaboração com H. Wilfarth, publicou um trabalho, demonstrando que os nódulos das raízes das leguminosas são responsáveis pela sua peculiar habilidade de usar o nitrogênio do ar (FRED et al, 1932; ROCHA, 1991). Para que ocorra o processo de fixação é necessário haver um reconhecimento entre planta e hospedeiro, ou seja, há uma troca de sinais moleculares que ativam genes dos dois parceiros e liberam substâncias com propriedades quimiotáticas pelas raízes hospedeiras, aproximando e estimulando a multiplicação dessas bactérias na rizosfera e induzindo à transcrição dos genes essenciais à nodulação, *nod*, *nol* e *noe* (HUNGRIA et al., 1997), em seguida ocorre a formação de nódulos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Esses genes codificam a produção dos fatores de nodulação, ou fatores Nod, que são oligossacarídeos lipoquitínicos secretados pelas bactérias simbióticas, relacionados aos estágios iniciais de nodulação. Os fatores Nod, mediante reconhecimento pela planta, induzem a uma intensa divisão celular no córtex da raiz (MORGANTE, 2003).

As bactérias colonizam a rizosfera, multiplicando-se ao redor dos pêlos radiculares, resultando na formação de raízes curtas e grossas, bem como no encurvamento e no aumento no número de pêlos radiculares. Em seguida, as bactérias degradam uma porção da parede celular na região encurvada dos pêlos radiculares e o plasmalema começa a invaginar. Com isso, ocorre a restauração da parede celular, resultando na formação de um canal, originando o cordão de infecção (MORGANTE, 2003; HUNGRIA, et al., 1997; HUNGRIA, et al., 1994). O cordão de infecção cresce em direção às células em divisão no córtex da raiz, até atingir o primórdio do nódulo, que se diferencia em nódulos maduros e as bactérias são liberadas dentro do citoplasma da planta hospedeira. A seguir, as bactérias são envoltas por uma membrana, no interior da qual param de se multiplicar, aumentam de tamanho e sofrem várias alterações bioquímicas, sendo diferenciados em bacteróides, formas capazes de fixar N₂ (MORGANTE, 2003; SCHULTZE & KONDOROSI, 1998; HUNGRIA, et al., 1997).

As primeiras bactérias que foram tidas como capazes de fixar nitrogênio em leguminosas foram agrupadas no gênero *Rhizobium*, todas pertencentes a família Rhizobiaceae, chamadas comumente de rizóbios. Durante muito tempo se pensou que essas seriam as únicas bactérias capazes de realizar este processo. Até quase o fim da década de 1970 apenas seis espécies haviam sido descritas, todas pertencentes ao gênero *Rhizobium*, mas com os recentes avanços da biologia molecular, houve a descoberta de novas espécies e hoje já são conhecidos 13 gêneros e destes 54 espécies conhecidas (SOUZA, 2011). Atualmente o termo rizóbio é utilizado de modo geral para designar as

bactérias capazes de formar nódulo e realizar a fixação de nitrogênio em simbiose com as leguminosas.

Alguns autores tratam os rizóbios como bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas (BFNNL) (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Estes procariotos pertencem ao filo α -proteobacteria e a ordem Rizobiales (FILHO, 2009). Até o ano de 2001, acreditava-se que as bactérias capazes de nodular leguminosas estavam restritas à classe das α -proteobactérias. Atualmente sabe-se que membros da classe γ -proteobacteria, especificamente *Pseudomonas* (SHIRAISHI et al., 2010) e β -proteobactéria, particularmente dos gêneros *Burkholderia* (MOULIN et al., 2001; SHIRAISHI, 2010) e *Cupriavidus* (sin. *Ralstonia* ou *Wautesia taiwanensis*) (CHEN et al., 2001) podem estabelecer simbiose com essas plantas, podendo também ser designadas como Rizobios.

Das associações entre plantas e bactérias diazotróficas, a simbiose entre leguminosas e rizobios é a mais eficiente na fixação biológica de nitrogênio. Dentre as subfamílias de Leguminosae, a Papilionoideae, considerada família Fabaceae por alguns autores, representa o grupo com maior número de espécies capazes de formar nódulos (FILHO, 2009). Nesta família encontra-se espécies de grande importância na produção de grãos para alimentação humana e animal como feijão (*Phaseolus vulgaris*), ervilha (*Pisum sativum*) e soja (*Glicine max*), para produção de forragem, como a alfafa (*Medicago sativa*), os cornichões (*Lottus spp*) e os trevos (*Trifolium spp*), e para a produção de adubos verdes como as ervilhacas (*Vicia spp*), o guandu (*Cajanus cajan*) e mucuna (*Stizolobium spp*).

Os teores de nitrogênio encontrados nos tecidos das leguminosas são maiores que em plantas de outras famílias (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006), e o uso de leguminosas como forrageiras em entre safra tem sido uma estratégia amplamente utilizada para diminuir a adubação nitrogenada mineral, representando grande economia de recurso e diminuindo o potencial de poluição por nitrato. A ervilhaca é uma leguminosa com alta capacidade de fixação biológica de nitrogênio. Segundo Sullivan (2003) e Cutler et al. (2003) a ervilhaca peluda pode fixar acima de 200 kg N ha⁻¹, mas a média conhecida gira ao redor de 100 kg N ha⁻¹, e para Monegat (1991) a espécie *vicia sativa* pode chegar a 220 kg de N ha⁻¹.

2.5 USOS DA ERVILHACA

No século 3 aC., Teosfrato descreve uma leguminosa, conhecida como fava ou ervilhaca (*Vicia sativa*), que era utilizada pelos gregos para enriquecer o solo. A ervilhaca é uma leguminosa a de inverno de interesse forrageiro, que apresenta inúmeras vantagens, como adubo verde ou forragem de inverno (COSTA et al. 1993; BARRADAS et al, 2001). Além disso, devido à capacidade de fixação de nitrogênio, melhoram a qualidade do solo (NEGRELO, 2007), sendo que a ervilhaca é uma boa opção para o cultivo de Outono/Inverno, como adubação verde e como planta forrageira devido o seu hábito de crescimento, pode ser consorciada com uma gramínea produzindo maior quantidade de massa verde.

O uso da ervilhaca é devido à estratégias criadas para melhorar a longo prazo a rentabilidade e sustentabilidade dos solos (SEYMOUR et al, 2003).

Estima-se que 46 kg de N são acumulados por tonelada de matéria seca de parte aérea da ervilhaca comum (BORKERT et al., 2003). Por sua vez, (AMADO et al. 2002) estimam que a contribuição média de N da ervilhaca é de 120 kg ha^{-1} , variando de 50 a 200 kg ha^{-1} . Barradas et al (2001) verificaram que quantidades de N obtidas na parte aérea das plantas acima de 220 kg ha^{-1} foram apresentadas por tremoço branco cultivar comum, tremoço-amarelo e ervilhaca comum. No entanto, devido à baixa relação C/N, a velocidade de liberação de N dos resíduos de leguminosas é muito rápida, quando comparada a outras espécies, tais como as poáceas. Cerca de 60% do N presente na matéria seca da parte aérea desta espécie é liberado durante os primeiros 30 dias após seu manejo (AMADO et al. 1999; AITA et al., 2001; AITA & GIACOMIMI, 2003), permitindo assim reduzir o uso de fertilizantes nitrogenados industriais e, consequentemente, o custo de produção da lavoura. Outra vantagem do uso de leguminosas como cobertura de solo é a liberação mais lenta do N em relação aos adubos nitrogenados químicos, gerando menor risco de poluição ao ambiente.

Os trabalhos de pesquisa realizados com esta espécie evidenciam que, além de propiciar a cobertura do solo, protegendo-o da erosão, ela fornece N à cultura em sucessão, podendo substituir parcial (AITA et al., 1994) ou totalmente (DA ROS & AITA, 1996) a adubação mineral nitrogenada necessária. Alguns resultados obtidos indicam que a ervilhaca, em decorrência da sua capacidade em fixar biologicamente o N_2 atmosférico e da elevada taxa de decomposição dos resíduos culturais, é capaz de fornecer quantidades significativas de N ao milho em sucessão, proporcionando, em

alguns casos, uma produtividade de grãos equivalente à adubação nitrogenada mineral (HEINRICHS et al., 2001; AITA et al., 2001).

O efeito positivo da ervilhaca sobre a produtividade de grãos de milho é relatado em diversos trabalhos (AITA et al., 1994; AITA et al., 2001; HEINRICHS et al., 2001) e deve-se ao N adicionado ao solo pela leguminosa, via FBN, e a facilidade com que esse N é liberado dos resíduos culturais durante a sua decomposição.

Aita et al. (1994) constataram que o milho cultivado após chicharo (*Lathyrus sativus*), tremoço azul (*Lupinus angustifolius*), ervilhaca comum e ervilha forrageira (*Pisum arvense*) acumulou, em média, 43% mais N na fitomassa da parte aérea do que quando cultivado após aveia preta.

Giacomini et al (2004), no trabalho consorciação de plantas de cobertura antecedendo o milho em plantio, constataram que 42 dias após o manejo das plantas de cobertura, a quantidade média de N mineral no solo da camada 0-90 cm no tratamento com ervilhaca solteira superou aquela encontrada no pousio em 55 kg ha^{-1} de N mineral, em 1998/99, e em 37 kg ha^{-1} de N mineral, em 1999/00. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Wagger (1989) e Bortolini et al. (2000), evidenciando a assincronia entre a liberação de N dos resíduos culturais da ervilhaca e a demanda em N do milho. O potencial de perdas desse N mineral por volatilização de amônia, denitrificação e, principalmente, por lixiviação de N-NO_3^- reforça a importância de seguir a estratégia proposta por Heinzmann (1985) e Aita et al. (2001) de realizar a semeadura do milho o mais próximo possível do manejo das leguminosas.

Comparando a produtividade de grãos de milho dos tratamentos com ervilhaca solteira com aquela obtida após aveia solteira, Giacomini et al, 2004, observaram que os valores após a leguminosa superam a gramínea em 36% ($1,97 \text{ Mg ha}^{-1}$), 52% ($1,91 \text{ Mg ha}^{-1}$) e 34% ($1,22 \text{ Mg ha}^{-1}$), em 1998/99, 1999/00 e 2000/01, respectivamente. Em relação ao pousio, o aumento na produtividade de grãos proporcionado pela ervilhaca foi de 48%, em 1998/99, 73%, em 1999/00, e de 74%, em 2000/01 (GIACOMINI, et al, 2004).

Da Ros (1993), trabalhando com adubos verdes de inverno, obteve maiores rendimentos de milho na ausência de adubação nitrogenada mineral, quando cultivado após a ervilhaca comum, seguido pelo chicharo (*Lathyrus sativus*), tremoço azul (*Lupinus angustifolius*) e ervilha forrageira (*Pisum sativum arvense*), que forneceram ao milho 90, 74, 54 e 30 kg ha^{-1} de nitrogênio, respectivamente. Para o nível de produtividade inferior a 5.000 kg ha^{-1} , estas leguminosas, destacando-se a ervilhaca

comum, forneceram o nutriente em quantidades suficientes ao milho (BEUTLER, et al, 1997).

Giacomini et al, (2004), observaram que embora as diferenças não tenham sido significativas, houve uma tendência de o milho recuperar menor quantidade de N com a inclusão da aveia nos consórcios com a ervilhaca. Também observou que, em 1999/00, a recuperação de N pelo milho diminuiu de 31,9% na ervilhaca solteira para 20,5 no tratamento com maior proporção de aveia (45% AP + 55% EC). Comparando esses mesmos tratamentos em 2000/01, a diminuição foi de 34,0% para 16,9%. Tais resultados corroboram com os obtidos por Heinrichs (1996), em que a recuperação aparente de N pelo milho diminuiu de 36% na ervilhaca solteira para apenas 12% quando a leguminosa foi consorciada com 10% de aveia. Esta redução na recuperação de N devida à inclusão da gramínea nos consórcios deve estar relacionada com a menor liberação de N pelos consórcios e, ou, com a imobilização de N pela presença da aveia, haja vista que estes tratamentos adicionaram quantidades de N muito próximas à leguminosa solteira.

A ervilhaca também apresenta acúmulo de nitrogênio na raiz. Em trabalho realizado por Barradas et al. (2001), os autores verificaram que as espécies que acumularam maior quantidade de N nas raízes aos 51 dias após a semeadura, foram tremoço-branco, a ervilhaca comum, a ervilhaca peluda e o azevém anual.

Para produtividade de grãos, a ervilhaca se mostra também muito eficiente. Alguns trabalhos mostram as vantagens do uso desta leguminosa neste parâmetro, como realizado por Giacomini (2004), onde o mesmo verifica que os consórcios de aveia + ervilhaca, até uma proporção máxima de 30% de sementes de aveia, proporcionam uma produtividade de grãos equivalente a 70% daquela obtida com o uso de 180 kg ha⁻¹ de N-uréia no pousio. O N acumulado e a produtividade de grãos de milho em sucessão aos consórcios de aveia + ervilhaca são diretamente proporcionais à quantidade do N do consórcio que está presente na fitomassa da ervilhaca.

Beutler (1997), observou que a pequena proporção de ervilhaca na consorciação (15%) teve efeitos positivos no rendimento de grãos de milho. Resultados obtidos por Heinrichs et al. (1993), avaliando diferentes proporções de aveia preta + ervilhaca comum no aporte de N ao milho, observaram que o maior rendimento de grãos foi obtido com 100% de ervilhaca (5.437 kg ha⁻¹), diminuindo gradativamente com o acréscimo da aveia na consorciação.

Giacomini et al. (2004), no trabalho Consorciação de plantas de cobertura antecedendo o milho em plantio direto, constataram que por três anos, a produtividade de grãos após a ervilhaca solteira superou aquela do tratamento com aveia solteira. Já nos tratamentos com consórcio entre aveia e ervilhaca, observa-se que, com exceção do primeiro ano, a produtividade de grãos foi maior do que aquela obtida após a aveia solteira. Tais resultados evidenciam a importância da inclusão da leguminosa no consórcio com a gramínea, quando o objetivo for o fornecimento de N ao milho.

A perda de solo resultando na redução da fertilidade, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, ocorre principalmente devido a falta de cobertura e proteção do solo. Neste contexto, a adubação verde pode contribuir para a proteção da superfície do solo (HEINRICH & FANCELLI, 1999). As ervilhacas, além de serem forrageiras do mais alto valor, são importantes no aproveitamento para adubação verde, devido ao grande volume produzido de massa vegetal. O rendimento de massa verde numa cultura bem estabelecida pode chegar a 35 toneladas por hectare (MORAES, 1995). A literatura considera a ervilhaca peluda como uma das melhores leguminosas para produção de massa seca, apresentando uma produção de 3-7 ton ha^{-1} e a ervilhaca comum em torno de 3-4 ton ha^{-1} (BORTOLINI, et al., 2000).

Fontaneli et al. (1991) avaliaram o efeito da consorciação entre gramíneas e leguminosas de inverno e observaram, no primeiro corte, que a aveia se destacou entre as gramíneas e a ervilhaca obteve o melhor rendimento de fitomassa entre as leguminosas estudadas. Calegari (1987), trabalhando com chícharo, ervilhaca comum, ervilha forrageira, tremoço azul e aveia preta, obteve 3.924, 3.322, 5.490, 4.429 e 4.150 $kg.ha^{-1}$ de matéria seca, respectivamente.

Cabarello et al. (1995) relataram que a melhor produção relativa na consorciação entre ervilhaca comum e ervilha com aveia, foi obtida quando a proporção na densidade de semeadura foi de 90% e 10% ou 80% e 20%, respectivamente. No mesmo trabalho, a produção de matéria seca total não foi afetada pela proporção utilizada na semeadura. Assim, infere-se que o efeito da aveia no consórcio sobre a produção de ervilhaca comum aumenta em função da sua participação na densidade de semeadura. Sugerem os autores, que a proporção de sementes de aveia a ser utilizada, para assegurar melhor produção de ervilhaca, esteja em torno de 10%.

Apesar destes benefícios, nota-se que os resíduos culturais da ervilhaca, como cultura solteira, desaparecem rapidamente, mesmo quando deixados na superfície do solo, dada à facilidade com que são decompostos pela população microbiana,

contrariamente àqueles da aveia que persistem por mais tempo (DA ROS & AITA, 1996). Uma estratégia que se pode aplicar para obter uma liberação mais lenta é o plantio direto, onde a palhada da cultura anterior fica no solo retardando a decomposição e liberação de nitrogênio da ervilhaca, ou o cultivo consorciado de ervilhaca com alguma outra gramínea, como por exemplo, a aveia, proporcionando uma fitomassa que se decompõem mais lentamente no solo do que a ervilhaca solteira, protegendo-o dos agentes erosivos (SILVA, et al. 2007).

Porém, como se trata de uma leguminosa, é de fundamental importância efetuar inoculação com inoculante específico (FONTANELI et al., 2009) para se obter um bom resultado tanto na fixação biológica de N como na produção de massa seca de parte aérea. Segundo Moraes (1995) como as demais leguminosas, a inoculação das sementes, através do contato de inoculante com ou sem peletização, é uma prática absolutamente necessária, na medida em, que se queira ter melhor resultado na cultura.

Para que exista uma simbiose perfeita as bactérias devem encontrar no solo condições apropriadas para seu desempenho, dentre outros fatores, reação do solo e fornecimento adequados de outros nutrientes, quando em condições inadequadas pode ocorrer deficiência de nitrogênio cujos sintomas são semelhantes aos da maioria das outras plantas, as folhas se tornam amarelas, o crescimento se reduz, etc. Segundo LIMA (1983), o diagnóstico da deficiência pode ser feito arrancando-se a planta para constatar se as raízes estão bem noduladas.

A bactéria utilizada no preparo do inoculante deve ser previamente estudada, permitindo que se use a bactéria que melhor expresse o potencial de fixação biológica de nitrogênio. Além disso, o uso de bactérias eficientes proporciona produtividades superiores às obtidas quando do uso de adubos nitrogenados. Atualmente a bactéria recomendada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento é a SEMIA 384 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*) (MAPA, 2006). Entretanto, essa bactéria está em processo de descredenciamento porque ainda não tem a experimentação exigida em solo em casa de vegetação e a campo. Isso demonstra a importância de mais estudos nessa associação. O MAPA ainda possui a SEMIA 310, que está em processo de estudo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado em duas etapas. Na primeira foi feita uma coleta de nódulos de plantas voluntárias de ervilhaca e isolamento de rizóbios com o objetivo de encontrar bactérias fixadoras de nitrogênio com potencial superior aos das bactérias atualmente recomendadas pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) para a cultura da ervilhaca. Na segunda etapa os isolados de rizóbio obtidos foram testados em dois genótipos de ervilhaca. Esses genótipos no início do experimento eram ainda pré-comerciais sendo a ervilhaca peluda denominada SS200801 e a comum SS200813 e no dia 16/06/2011 foram registradas com os nomes SS Esmeralda e SS Ametista, ervilhaca peluda e comum respectivamente. Para facilitar o entendimento durante a leitura deste trabalho, os nomes comerciais não serão empregados, utilizando apenas os termos ervilhaca peluda e ervilhaca comum.

3.1 PRIMEIRA ETAPA

3.1.1 Preparo do meio de cultura para isolamento das bactérias

Para o isolamento das bactérias foi preparado o meio de cultura Extrato de Levedura-Manitol-Agar (YMA), diferencial para o crescimento de bactérias fixadoras de nitrogênio, misturando-se os componentes do meio em água destilada e ajustando o pH para 6,8. A composição do meio é apresentada na Tabela 2. Depois do preparo do meio o mesmo foi esterilizado em autoclave a 1 atm por 30 minutos, após foi vertido em placas de Petri antecipadamente esterilizadas sob câmara de fluxo. Feito este procedimento, as placas contendo o meio foram assepticamente estocadas em geladeira a 3 °C para posterior uso.

Tabela 2 - Composição do meio de cultura Extrato de Levedura-Manitol (YMA).

Material	Quantidade
Manitol	5,0g
K ₂ HPO ₄	0,5g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2g
NaCl	0,1g
Extrato de Levedura	0,5g
Vermelho Congo	10 ml
Ágar	15 a 20g por litro
Água destilada	Completar para 1L.

3.1.2 Isolamento das bactérias

Em setembro de 2010 foram coletadas plantas voluntárias de ervilhaca nos municípios de Pontão e Passo Fundo (RS) e em Lages e Urupema (SC), que apresentavam a formação de nódulos radiculares característicos da associação com rizóbios.

As plantas coletadas foram trazidas para o Laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências Agroveterinárias - CAV-UDESC, onde se destacou a parte aérea das raízes e estas foram cuidadosamente lavadas. Os nódulos mais desenvolvidos de cada planta foram destacados e identificados para posterior isolamento das bactérias (figura 1). Após o destaque os nódulos foram separadamente submersos em álcool a 96% por de 60 segundos e após por 2 minutos em hipoclorito de sódio a 2% para eliminação dos microorganismos que se encontravam superficialmente nos mesmos. Em seguida, foram lavados seis vezes em água destilada esterilizada para eliminação de resíduos do hipoclorito. Logo após os nódulos foram macerados em tubos de ensaio esterilizados e isolados com auxílio de alça de platina em placas de Petri com meio YMA. Após isso as placas foram levadas para a câmara de crescimento (BOD) com temperatura controlada de 28 °C por três dias. Após esse período passou-se a fase de obtenção de culturas puras para a caracterização dos isolados obtidos e posterior seleção (Figura 2).

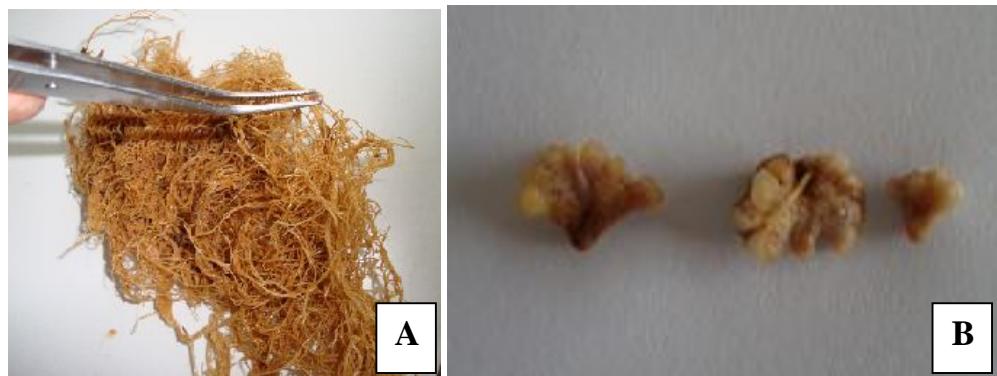


Figura 1 - Demonstração de raiz e nódulo.
A: Destaque dos nódulos das raízes de ervilhaca, B: nódulos de ervilhaca. Fonte: O Autor, 2011.



Figura 2 - Obtenção de cultura pura.
Fonte: O Autor, 2011.

Foram obtidos 9 isolados puros, o isolado SEMIA 384 indicado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a cultura da ervilhaca, e SEMIA 310 que está em teste pelo MAPA, totalizando 11 isolados. A relação dos isolados estão descritas na Tabela 3.

3.1.3 Preparo do inoculante

Após a obtenção de todos os isolados que seriam utilizados no experimento, procedeu-se o preparo do inoculante. Este foi obtido a partir do preparo do meio YM líquido e incolor, ou seja, sem o ágar e sem o corante. Após o meio pronto e esterilizado, foram dispostos 50 mL em erlenmeyer de 150 mL, também esterilizado (um erlenmeyer para cada isolado). Em câmara de fluxo, com a ajuda de uma alça de platina, procedeu-se a inoculação a partir da cultura pura que já se encontrava em placas

de petri. Os erlenmeyers foram tapados com algodão para permitir a troca de gases, identificados e dispostos em agitador orbital com temperatura controlada, mantida a 45 rotações por minuto e 28°C por cerca de 3 dias. Após este período foi aplicada a metodologia de contagem de células usadas para pré-inóculos. Para isso pipetou-se 2 mL da solução do pré-inóculo e colocou-se na câmara de Neubawer (câmara especial para contagem), logo, uma lamínula foi disposta sobre a câmara e a mesma colocada em microscópio. Escolheu-se um dos “quadrados” da câmara e contou-se as bactérias ali presentes. O cálculo do valor final foi determinado pela fórmula:

$$\text{Número de células} = \text{número de células contadas} / (0,0156252 * 0,1 * 0,02)$$

Foi considerado pronto para uso o inoculante que atingiu o mínimo de 10^8 células mL^{-1} .

Tabela 3 - Origem das bactérias isoladas e denominação atribuída.

ORIGEM	DENOMINAÇÃO
Urupema-SC	Bactéria 1 (B1)
Pontão-RS	Bactéria 2 (B2)
Passo Fundo-RS	Bactéria 3 (B3)
Pontão-RS	Bactéria 4 (B4)
Urupema-SC	Bactéria 5 (B5)
Lages-SC	Bactéria 6 (B6)
Lages-SC (B4)	Bactéria 7 (B7)
Pontão-RS	Bactéria 8 (B8)
POA 310 SEMIA 310	Bactéria 9 (B9)
Pontão-RS	Bactéria 10 (B10)
POA 384 SEMIA 384	Bactéria 11 (B11)

3.2 SEGUNDA ETAPA

3.2.1 Ensaios em casa de vegetação

Nesta segunda etapa foram realizados ensaios em duas épocas, que constaram da combinação de cada um dos genótipos de ervilhaca com os isolados de bactérias obtidos dos nódulos com quatro repetições. A Tabela 4 mostra as combinações realizadas.

Tabela 4 - Tratamentos realizados entre os isolados de bactérias e os genótipos de ervilhacas.

Tratamento	Formulação
T1	Bactéria 1 x Ervilhaca peluda
T2	Bactéria 2 x Ervilhaca peluda
T3	Bactéria 3 x Ervilhaca peluda
T4	Bactéria 4 x Ervilhaca peluda
T4	Bactéria 5 x Ervilhaca peluda
T5	Bactéria 6 x Ervilhaca peluda
T6	Bactéria 7 x Ervilhaca peluda
T7	Bactéria 8 x Ervilhaca peluda
T8	Bactéria 9 x Ervilhaca peluda
T10	Bactéria 10 x Ervilhaca peluda
T11	Bactéria 11 x Ervilhaca peluda
T12	Ervilhaca Peluda (testemunha)
T13	Bactéria 1 x Ervilhaca comum
T14	Bactéria 2 x Ervilhaca comum
T15	Bactéria 3 x Ervilhaca comum
T16	Bactéria 4 x Ervilhaca comum
T17	Bactéria 5 x Ervilhaca comum
T18	Bactéria 6 x Ervilhaca comum
T19	Bactéria 7 x Ervilhaca comum
T20	Bactéria 8 x Ervilhaca comum
T21	Bactéria 9 x Ervilhaca comum
T22	Bactéria 10 x Ervilhaca comum
T23	Bactéria 11 x Ervilhaca comum
T24	Ervilhaca comum (testemunha)

T= Tratamento. Testemunha= Ervilhaca sem inoculação

3.2.2 Primeira época

Em outubro de 2010, foram instalados dois ensaios, um em substrato esterilizado e outro em substrato natural sem esterilização. Os mesmos são abaixo descritos.

3.2.2.1 Substrato esterilizado

Esse substrato constituiu-se de uma mistura de areia e solo esterilizados em autoclave. O solo utilizado foi um Nitossolo Bruno, que foi peneirado, com peneiras de 4 mm. Após a peneiragem foi realizada a análise do solo, procedendo-se a correção de acidez para pH 5,8 e a adubação fosfatada e potássica necessária conforme

recomendado pelo Manual de Adubação e Calagem para o Rio Grande do Sul e Santa Catarina (2006). Na Tabela 5 encontram-se os resultados da análise do solo utilizado. Esperou-se o tempo necessário para reação do calcário para neutralização da acidez (aproximadamente 15 dias, uma vez que o calcário utilizado foi o filler) e então este foi misturado com areia na proporção 2:1, sendo que para 2 kg de solo misturou-se 1 kg de areia. Depois de preparado foi esterilizado em autoclave por cerca de 60 minutos a 120 °C. Após esta etapa, montou-se os vasos com o substrato esterilizado e instalou-se o experimento em casa de vegetação.

Tabela 5 - Resultados da análise do solo utilizado no experimento antes das correções de pH, fósforo e potássio.

Capacidade de armazenamento de água (%)	Argila (%)	pH-água	pH-SMP	P mg/dm ³	K mg/dm ³
47,5	72	4,8	4,9	3,7	84
Na mg/dm ³	MO (%)	H+Al cmolc/dm ³	Al cmolc/dm ³	Ca cmole/dm ³	Mg cmolc/dm ³
0	2,8	15,5	1,76	1,1	0,7

3.2.2.2 Substrato não esterilizado

Esse substrato assim como já descrito acima, também foi composto por uma mistura de areia e solo, porém sem esterilização. O solo utilizado (Nitossolo bruno) e os procedimentos seguidos para o preparo do substrato, (peneiragem, adubação, calagem e mistura com a areia) foram os mesmos adotados para o substrato esterilizado, com a diferença de que logo que o substrato estava pronto, já foi transferido para os vasos sem a esterilização. Após esta etapa, instalou-se os experimentos em casa de vegetação.

3.3 INSTALAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram instalados em casa de vegetação no Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina-CAV-UDESC (Figura 3). Os mesmos foram conduzidos com o objetivo de examinar a interação entre os isolados de bactérias nodulíferas x genótipos de ervilhaca, e perfizeram um total de vinte e quatro tratamentos (Quadro 4). O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com 4 repetições, dispostos em um fatorial de 11 isolados de

bactérias e dois genótipos de ervilhaca (ervilhaca peluda (*Vicia villosa*) variedade SS Esmeralda e ervilhaca comum (*Vicia sativa*) variedade SS Ametista), num total de 96 vasos em cada um dos três experimentos (primeira etapa, substrato com e sem esterilização e segunda etapa, substrato sem esterilização).

Em cada vaso colocou-se três sementes de ervilhaca inoculadas com bactéria, posteriormente à emergência procedeu-se o desbaste deixando-se uma planta por vaso na primeira etapa devido alto índice de morte de plântula e na segunda etapa, duas plantas por vaso. A escolha da ervilhaca e da bactéria que foi em cada vaso foi determinada a partir de um sorteio manual pré-realizado antes da implantação dos experimentos. O inoculante contendo a bactéria foi disposto sobre cada uma das três sementes colocadas no vaso com o auxílio de uma micropipeta. Pipetou-se 1 ml de inoculante em cada semente, e logo se cobriu a mesma para germinação. Durante o decorrer dos experimentos, estes receberam irrigação com água destilada e esterilizada cerca de 4 vezes por semana e tratamento fitossanitário quando necessário.



Figura 3 - Experimento conduzido em casa de vegetação.
Fonte: O Autor, 2011.

3.3.1 Obtenção dos resultados da primeira etapa

Assim que os experimentos montados com substratos esterilizados e não esterilizados atingiram 60 dias após a emergência (DAE) foram colhidos e

imediatamente analisados. A colheita foi realizada 60 DAE devido o início do florescimento das plantas. Foram avaliadas às variáveis número (NN) e massa seca de nódulos (MSN), massa seca da parte aérea das plantas (MSPA), nitrogênio total por planta (NT) e massa seca de raiz (MSR). As etapas seguidas após a instalação do experimento, serão descritas abaixo.

3.3.2 Preparo das amostras para análise de massa seca da parte aérea das plantas

A parte aérea das plantas foram colhidas destacando-se a mesma da raiz e dispostas em sacos de papel identificados (figuras 4 e 5) e logo levadas à estufa com circulação de ar forçada a 60 °C, por três dias ou até obtenção de massa constante. Após esse período as amostras foram levadas para laboratório e pesadas para obtenção de massa seca de parte aérea.



Figura 4 - Parte aérea da ervilhaca.

Fonte: O Autor, 2011.



Figura 5 - Destaque da parte aérea da raiz.
Fonte: O Autor, 2011.

3.3.3 Determinação da massa seca de raiz, número de nódulos e massa seca de nódulos

Após o destaque da parte aérea, as raízes foram lavadas para retirar o substrato e em seguida foram dispostas em sacos plásticos, identificadas e levadas a laboratório para a contagem de nódulos, destacando os mesmos com ajuda de pinça (Figuras 6 e 7). Após a contagem os nódulos foram devidamente identificados assim como as raízes, e então levadas a estufa com circulação de ar forçada a 60 °C, por três dias ou até obtenção de massa constante. Passado esse período os mesmos foram levados ao laboratório novamente para pesagem e obtenção de massa seca de raiz e nódulo.



Figura 6 - Lavagem da raiz.
Fonte: O Autor, 2011.



Figura 7 - Destaque dos nódulos das raízes.
Fonte: O Autor, 2011.

3.3.4 Determinação do nitrogênio da parte aérea das plantas

O nitrogênio da parte aérea foi determinado pelo método semi-micro Kjeldahl (TEDESCO et al, 1995). A parte aérea, após ter sido pesada para obtenção da massa seca, foi moída e submetida à digestão ácida, sendo pesado 200 mg de cada amostra e colocada em tubos de ensaio de 20 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro. Adicionou-se 1 mL de peróxido de hidrogênio (30%) em cada amostra e 2 mL de ácido sulfúrico. Os tubos foram colocados em bloco digestor com temperatura inicial de 180

°C. A temperatura foi elevada em 60 °C em intervalo de uma hora até chegar à temperatura de 360 °C, permanecendo até adquirir cor verde claro. Após a digestão as amostras ficaram em repouso até diminuir a temperatura. As amostras foram diluídas em balões de 50 mL com água destilada e transferidas para tubos *snaps*. O sal formado, borato de amônio, após processo de destilação, foi titulado com solução padrão de HCl 0,025 N, até ponto de viragem do indicador de ácido bórico, que é a passagem da coloração verde da amostra para coloração rosa claro. Os valores foram transformados para mg planta⁻¹ pela fórmula:

$$((QAT-QATPB)*700*5*5) / 10000 * (0,2 / PD), \text{ onde:}$$

QAT= quantidade de ácido titulado na amostra

QATPB= quantidade de ácido titulado na prova em branco

PD= peso da amostra usado para digestão.

3.4 SEGUNDA ÉPOCA

No dia 17 de fevereiro de 2011, foi instalado o segundo ensaio. Esse constava apenas de substrato não esterilizado, uma vez que esta condição se aproxima mais das condições a campo e a casa de vegetação, como observado na primeira época, não oferecia suporte suficiente para instalação do substrato esterilizado. O mesmo era composto de areia e solo e o solo utilizado foi o mesmo do experimento anterior (Nitossolo bruno). Também passou por todas as etapas anteriores, foi peneirado, com peneiras manuais, após a peneiragem foi realizada a análise do solo e o mesmo recebeu a adubação fosfatada e potássica necessária conforme o Manual de Adubação e Calagem para o Rio Grande do Sul e Santa Catarina, assim como a correção de acidez para pH 5,8. Esperou-se o tempo necessário pra reação do calcário e então este foi misturado com areia na proporção 2:1, sendo que para 2 kg de solo misturou-se 1 kg de areia. Após isto, montou-se os vasos e os mesmos foram levados para casa de vegetação.

Em 28 de abril de 2011, efetuou-se a colheita das plantas do experimento, seguiu-se as mesmas etapas descritas na primeira etapa para obtenção dos resultados.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram conduzidas de acordo com o delineamento experimental inteiramente casualizado adotando-se um modelo linear de análise de variância, com os parâmetros comparados pelo teste F. As comparações entre os valores médios, de cada uma das variáveis nos diferentes tratamentos foram efetuadas por meio do teste de Tukey. Para atenderem-se as pressuposições teóricas dos testes, aos valores das variáveis foi adicionada a constante 0,375 e a seguir elevados à potência $\frac{1}{2}$ (transformação raiz quadrada). Todas as transformações foram efetuadas conforme sugeridas pela análise descritiva dos dados, no entanto, os resultados são apresentados na escala original. Todas as análises foram executadas usando-se os procedimentos GLM (LITTEL; FREUND; SPECTOR, 1991) e MIXED (LITTEL et all, 2006) do software computacional SAS[®] (Statistical Analysis System). Para todos os testes efetuados foi considerado o nível mínimo de significância de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PRIMEIRA ÉPOCA

4.1.1 Substrato esterilizado

O potencial do uso dos resíduos de ervilhaca como fonte alternativa de N às culturas está diretamente associado à fixação biológica de N da atmosfera. Neste trabalho se observou diferença entre as bactérias somente para os parâmetros número de nódulos (NN) e massa seca de nódulos (MSN) para ervilhaca peluda, onde a bactéria B6 foi superior ao tratamento testemunha para o NN e a bactéria B5 foi superior a B3 e B9 para a MSN (Tabela 3). Para os demais parâmetros avaliados, houve diferença apenas entre as ervilhacas, onde a ervilhaca peluda foi superior a comum para o NN nos tratamentos B4 e B6 e inferior no tratamento testemunha, e para MSN a peluda foi superior a comum nos tratamentos B2, B5 e B6 (Tabela 6). Para massa seca de raiz (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA) e nitrogênio total (NT), a ervilhaca peluda foi superior a comum nos tratamentos B2 e B9, nos tratamentos B4, B5, B6, B7 e B10 e nos tratamentos B5 e B6 respectivamente (Tabela 7, Figuras 8, 9 e 10).

Para a ervilhaca comum as bactérias isoladas não apresentaram efeito em nenhum dos parâmetros avaliados. Esses resultados mostram que naturalmente a ervilhaca peluda é mais agressiva que a comum, se destacando em produtividade e porte.

O maior NN encontrados na ervilhaca peluda não coincide em todos os tratamentos com os tratamentos que apresentaram maior MSN, isto indica a baixa correlação entre número de nódulos e a massa seca dos mesmos, pois se pode encontrar um número superior de nódulos com tamanho reduzido bem como um pequeno número de nódulos com tamanhos avantajados.

Tabela 6 - Número de nódulos (NN) e massa seca de nódulos (MSN) em ervilhaca peluda e comum, influenciados pela inoculação com isolados nativos de rizóbios em solo esterilizado. Média de quatro repetições. Lages-SC.

Bact.	NN		MSN (g)	
	Erv. Comum	Erv. Peluda	Erv. Comum	Erv. Peluda
B2	4,66 NS ns	4,77 ab	0,003 B ns	0,013 A ab
B3	4,52 NS	4,22 ab	0,003 NS	0,003 b
B4	2,98 B	3,97 A ab	0,001 NS	0,005 ab
B5	3,94 NS	4,87 ab	0,002 B	0,021 A a
B6	3,72 B	5,07 A a	0,002 B	0,016 A ab
B7	3,74 NS	4,62 ab	0,003 NS	0,011 ab
B8	4,59 NS	4,89 ab	0,007 NS	0,005 ab
B9	4,34 NS	4,33 ab	0,002 NS	0,005 b
B10	4,30 NS	4,77 ab	0,002 NS	0,008 ab
B11	4,13 NS	4,32 ab	0,008 NS	0,008 ab
Test.	4,34 A	3,16 B b	0,012 NS	0,008 ab
CV	15,51%		21,01%	

Letras maiúsculas referem-se a diferença entre ervilhacas para cada bactéria. Letras minúsculas referem-se a diferença entre as bactérias para cada ervilhaca. Test= testemunha. NS/ns= não significativo

Tabela 7 - Massa seca de raiz (MSR), Massa seca da parte aérea (MSPA) e Nitrogênio total (NT) em ervilhaca peluda e comum, influenciados pela inoculação com isolados nativos de rizóbios em solo esterilizado. Média de quatro repetições. Lages-SC.

Bact.	MSR (g)		MSPA (g)		NT (mg/pl)	
	Erv. Comum	Erv. Peluda	Erv. Comum	Erv. Peluda	Erv. Comum	Erv. Peluda
B2	0.71 B ns	1.03 A	0.30 AB ns	0.43 AB	1.81 AB ns	2.17 AB
B3	0.69 AB	0.88 AB	0.45 AB	0.47 AB	2.60 AB	2.50 AB
B4	0.79 AB	0.90 AB	0.11 B	0.53 A	1.66 AB	2.29 AB
B5	0.74 AB	0.81 AB	0.30 B	0.69 A	1.92 B	3.25 A
B6	0.78 AB	0.78 AB	0.26 B	0.61 A	2.06 B	2.85 A
B7	0.70 AB	0.76 AB	0.22 B	0.58 A	1.91 AB	2.67 AB
B8	0.76 AB	0.92 AB	0.53 AB	0.51 AB	2.53 AB	2.46 AB
B9	0.68 B	1.12 A	0.30 AB	0.41 AB	1.70 AB	2.27 AB
B10	0.84 AB	0.77 AB	0.30 B	0.60 A	2.23 AB	2.58 AB
B11	0.77 AB	0.85 AB	0.27 AB	0.33 AB	1.48 AB	1.89 AB
Test.	0.73 AB	0.89 AB	0.27 AB	0.50 AB	1.53 AB	2.21 AB
CV	81,69%		39,62%		23,70%	

Letras maiúsculas referem-se a diferença entre ervilhacas para cada bactéria . Letras minúsculas referem-se a diferença entre as bactérias para cada ervilhaca. Test= testemunha. NS/ns= não significativo

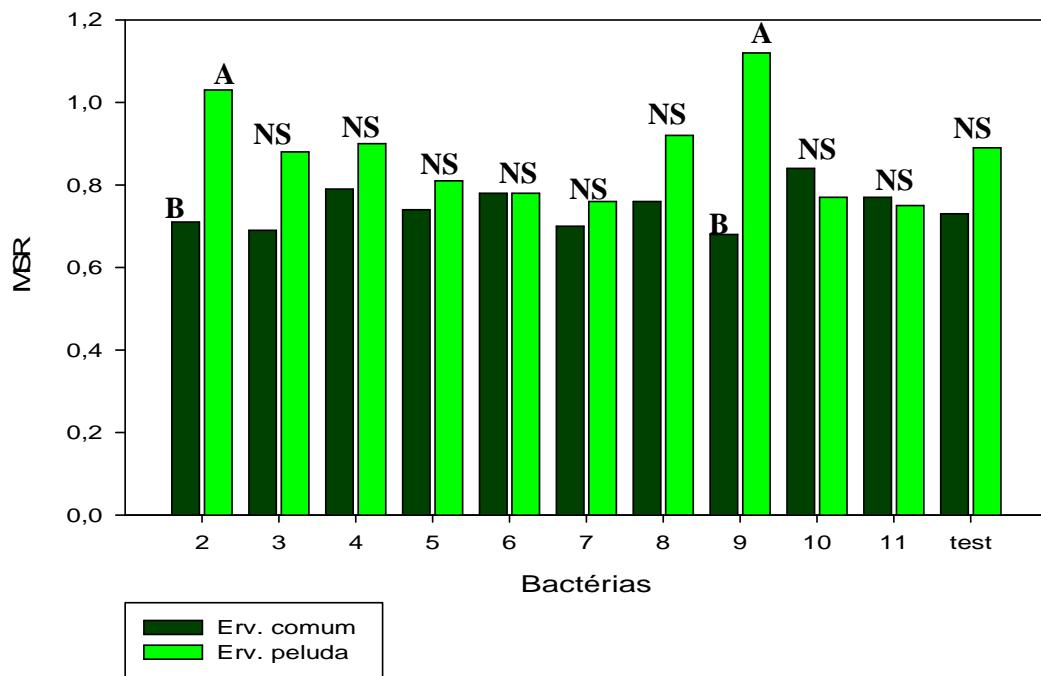


Figura 8 - Comparação entre as ervilhacas para Massa Seca de Raiz (MSR) em substrato esterilizado. Média de quatro repetições. Lages-SC.

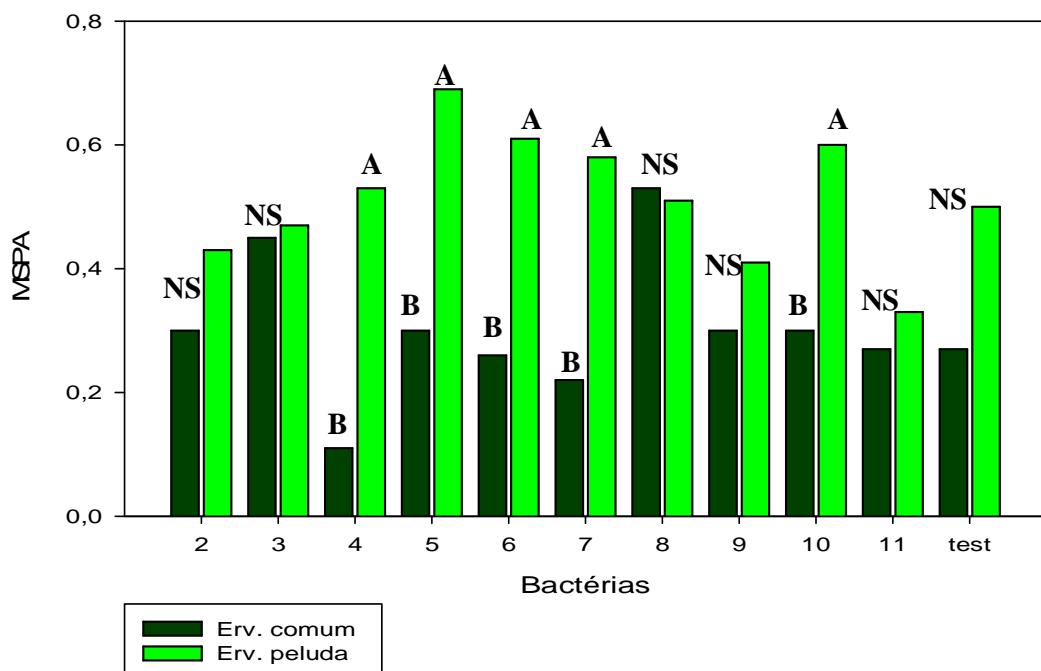


Figura 9 - Comparação entre as ervilhacas para Massa Seca de Parte Aérea (MSPA) em substrato esterilizado.

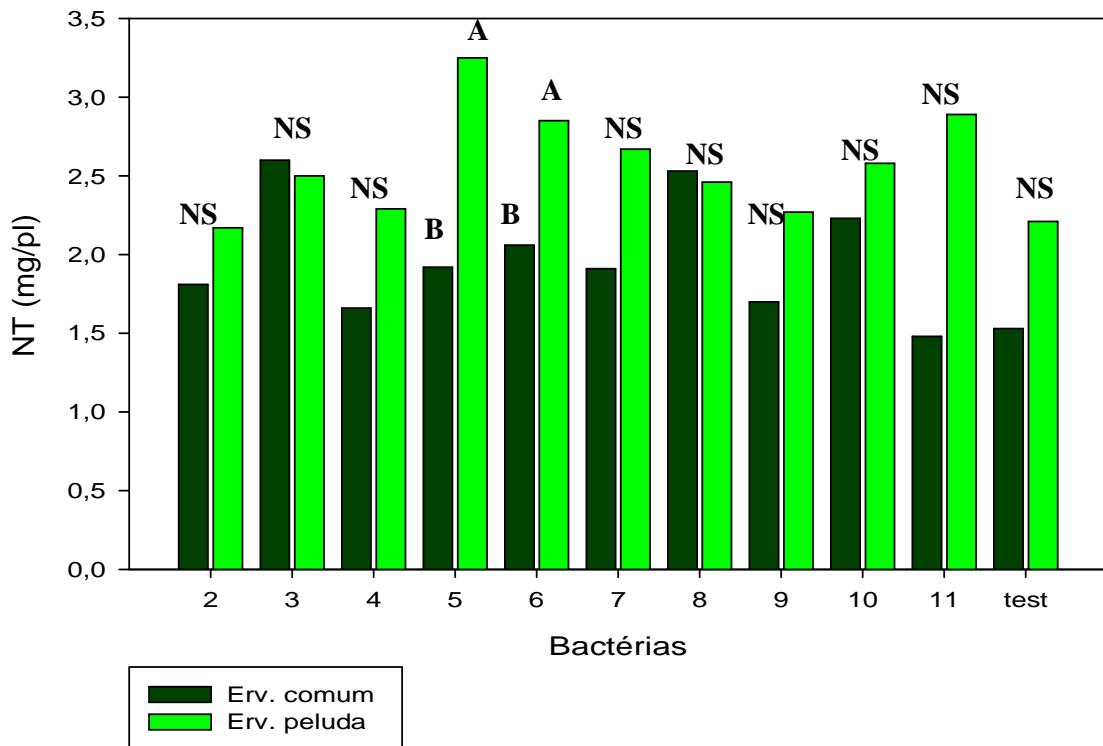


Figura 10 - Comparação entre as ervilhacas para o Nitrogênio Total (NT) em substrato esterilizado.

A igualdade entre os tratamentos observada na MSPA e NT para ambas as ervilhacas quando se compara a eficiência das bactérias, pode indicar que o cultivo em condições estéreis prejudicou interações microbianas importantes ao processo de fixação. Por outro lado, a inoculação em condições estéreis potencialmente permite a nodulação por bactérias que normalmente apresentam baixa capacidade de competir por sítios de nodulação na raiz.

A diferença encontrada entre os isolados na vica peluda para NN e MSN não refletiu em nenhum dos outros parâmetros avaliados, o que reflete a baixa correlação entre esses parâmetros e a eficiência de fixação de nitrogênio. O tamanho e a atividade da microbiota do solo são influenciados por fatores físicos (temperatura, umidade, aeração, luz), fatores químicos (pH, disponibilidade de nutrientes, salinidade, etc.) e fatores biológicos (competição, associação, antagonismo, parasitismo, etc.) que por sua vez sofrem modificações em função da forma de uso e manejo do solo (TSAI et al., 1992, MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

As testemunhas pra ambas as ervilhacas, que não receberam nenhum tipo de inoculação, nem adubação nitrogenada, não apresentaram as diferenças esperadas. Isso

pode ser explicado pela contaminação que ocorreu durante a condução do experimento em casa de vegetação, onde o solo que estava estéril entrou em contato com materiais provindos de outros experimentos que estavam sendo também conduzidos no mesmo local, e o próprio ambiente da casa de vegetação que se encontrava contaminado, refletindo nos resultados obtidos. Todos esses problemas resultaram na formação de nódulos nos tratamentos testemunha, onde não deveriam aparecer.

O trabalho realizado com substrato estéril procurou destacar as bactérias com maior potencial de FBN, sendo que as bactérias B5 e B6 se destacaram na ervilhaca peluda para os fatores MSPA E NT, podendo ser consideradas bactérias com potencial a serem mais estudadas. No entanto, uma análise genética dessas bactérias se faz necessário para correta identificação das mesmas, garantindo assim, serem genéticamente diferentes, uma vez que estas são de regiões próximas (B5=Urupema-SC e B6=Lages-SC). Esta capacidade de fixação de N atmosférico e o acúmulo de N na fitomassa proporcionam a formação de um resíduo orgânico de elevada qualidade bioquímica, em termos de velocidade decomposição e liberação de N ao solo, principalmente quando comparada a gramíneas como a aveia preta (BOLLIGER et al., 2006). Acosta (2009), encontrou que a maior concentração de nitrogênio na massa seca, quando comparados ao nabo forrageiro e aveia preta foi da ervilhaca, que segundo Giller & Wilson (2003), estaria associada a capacidade obter pela FBN 70 a 80% do N.

4.1.2 Substrato não esterilizado

No substrato não esterilizado foi observada diferença entre as bactérias apenas para MSR e NT (Tabela 8), e apenas para variedade comum, diferenciando do substrato esterilizado. Para a MSR a B8 foi superior a B11 e para NT a testemunha foi superior a B11, mostrando a grande capacidade da ervilhaca em formar associação com as bactérias fixadoras de nitrogênio do solo. Para os demais parâmetros avaliados, foi observado diferença apenas entre as ervilhacas, sendo que para MSR a ervilhaca peluda foi superior a comum no tratamento B11 e inferior no tratamento B8, e para NT a ervilhaca peluda foi superior a comum nos tratamentos B3, B5, B10 e B11 (Tabela 8). Para NN, MSN e MSPA a ervilhaca peluda foi superior a comum nos tratamentos B3 e B11, nos tratamentos B3 e B9 e nos tratamentos B5 e B11 respectivamente (Tabela 9, Figuras 11, 12 e 13).

Nesta etapa do experimento a bactéria B11 que não havia se destacado em substrato estéril, se destacou para ervilhaca peluda quando comparada a comum em quase todos os parâmetros avaliado, bem como a B5 que se destacou novamente para o NT e MSPA. Já a B6, que anteriormente em substratos esterilizado havia se destacado junto com a B5, agora não mostrou potencial. Isso pode ser explicado pela competitividade da bactéria no solo, pois uma vez o solo não estando estéril, a bactéria inoculada tem que competir com as nativas por sítios de associação na raiz, podendo ou não obter sucesso. Como essas duas bactérias mostraram bom desempenho em substrato não estéril, que é a condição que mais se aproxima do campo, torna-se necessário um maior estudo sobre elas, para explorar seu máximo potencial.

Nas condições de experimentação, quando se comparou apenas a relação entre ervilhaca peluda e as bactérias inoculadas, nenhum dos isolados de rizóbio inoculados foi eficiente para causar efeito significativo nos parâmetros avaliados. Esse resultado pode indicar que a ervilhaca peluda neste experimento não apresentou bom potencial de resposta à inoculação.

O NT acumulado na planta apresentou respostas diferenciadas apenas na ervilhaca comum, onde a testemunha foi superior ao isolado B11 (Tabela 8). Esse resultado de contaminação das testemunhas com bactérias vindas do meio externo ao solo utilizado no experimento nos indicam que a ervilhaca deve ter uma grande diversidade de bactérias capazes de associar-se a elas na FBN, entretanto, sem garantia de eficiência no processo.

Tabela 8 - Massa seca de raiz (MSR) e Nitrogênio total (NT) em ervilhaca peluda e comum, influenciados pela inoculação com isolados nativos de rizóbios em substrato não esterilizado. Média de quatro repetições. Lages-SC.

Bact.	MSR (g)		NT (mg/PL)	
	Erv. Comum	Erv. Peluda	Erv. Comum	Erv. Peluda
B1	0,72 NS b	0,79 ns	2,31 NS ab	2,74 ns
B2	0,83 NS b	0,70	2,50 NS ab	2,38
B3	0,68 NS b	0,75	1,82 B ab	2,72 A
B4	0,82 NS b	0,71	2,29 NS ab	2,36
B5	0,66 NS b	0,78	1,08 B ab	2,57 A
B6	0,73 NS b	0,79	2,17 NS ab	2,52
B7	0,69 NS b	0,72	1,76 NS ab	2,35
B8	1,18 A a	0,80 B	2,09 NS ab	2,41
B9	0,72 NS b	0,82	2,39 NS ab	2,68
B10	0,65 NS b	0,81	1,26 B ab	2,35 A
B11	0,63 B b	0,83 A	1,11 B b	3,03 A
Test.	0,85 NS b	0,77	2,56 NS a	3,04
CV	1,80%		20,94%	

Letras maiúsculas referem-se a diferença entre ervilhacas para cada bactéria . Letras minúsculas referem-se a diferença entre as bactérias para cada ervilhaca. Test= testemunha. NS/ns= não significativo

Tabela 9 - Número de nódulo (NN), Massa seca de nódulo (MSN) e massa seca da parte aérea (MSPA) em ervilhaca peluda e comum, influenciados pela inoculação com isolados nativos de rizóbios em substrato não esterilizado. Média de quatro repetições. Lages-SC.

Bact.	NN		MSN (g)		MSPA (g)	
	Erv. Comum	Erv. Peluda	Erv. Comum	Erv. Peluda	Erv. Comum	Erv. Peluda
B1	3.57 AB ns	4.23 AB	0.0062 AB ns	0.0062 AB	0.35 AB	0.47 AB
B2	3.67 AB	4.10 AB	0.0063 AB	0.0062 AB	0.46 AB	0.38 AB
B3	3.30 B	4.71 A	0.0061 B	0.0065 A	0.39 AB	0.45 AB
B4	4.19 AB	4.06 AB	0.0062 AB	0.0062 AB	0.43 AB	0.34 AB
B5	4.26 AB	3.89 AB	0.0062 AB	0.0063 AB	0.14 B	0.49 A
B6	3.89 AB	4.61 AB	0.0062 AB	0.0063 AB	0.41 AB	0.42 AB
B7	4.05 AB	3.81 AB	0.0062 AB	0.0062 AB	0.29 AB	0.44 AB
B8	5.10 AB	4.64 AB	0.0063 AB	0.0063 AB	0.37 AB	0.51 AB
B9	3.50 AB	4.28 AB	0.0061 B	0.0066 A	0.45 AB	0.46 AB
B10	3.54 AB	4.52 AB	0.0061 AB	0.0062 AB	0.22 AB	0.41 AB
B11	3.07 B	4.20 A	0.0062 AB	0.0063 AB	0.16 B	0.55 A
Test.	4.19 AB	3.99 AB	0.0063 AB	0.0064 AB	0.54 AB	0.59 AB
CV	16,18%		12,96%		36,28%	

Letras maiúsculas referem-se a diferença entre ervilhacas para cada bactéria . Letras minúsculas referem-se a diferença entre as bactérias para cada ervilhaca. Test= testemunha. NS/ns= não significativo.

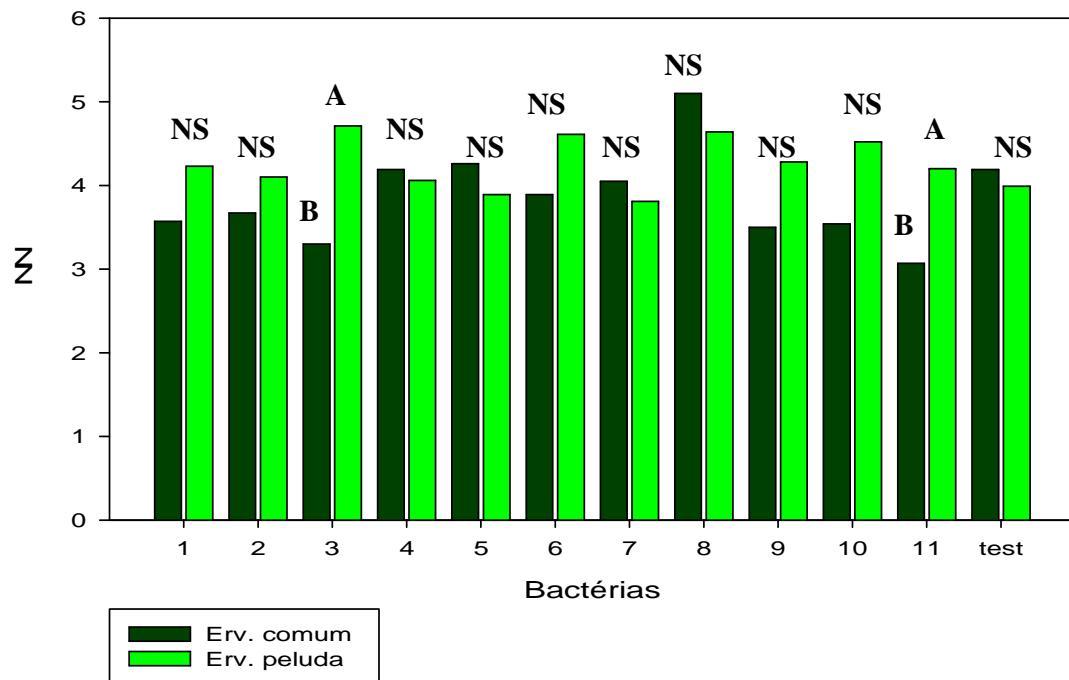


Figura 11 - Comparação entre as ervilhacas para o Número de Nódulos (NN) em substrato não estéril.

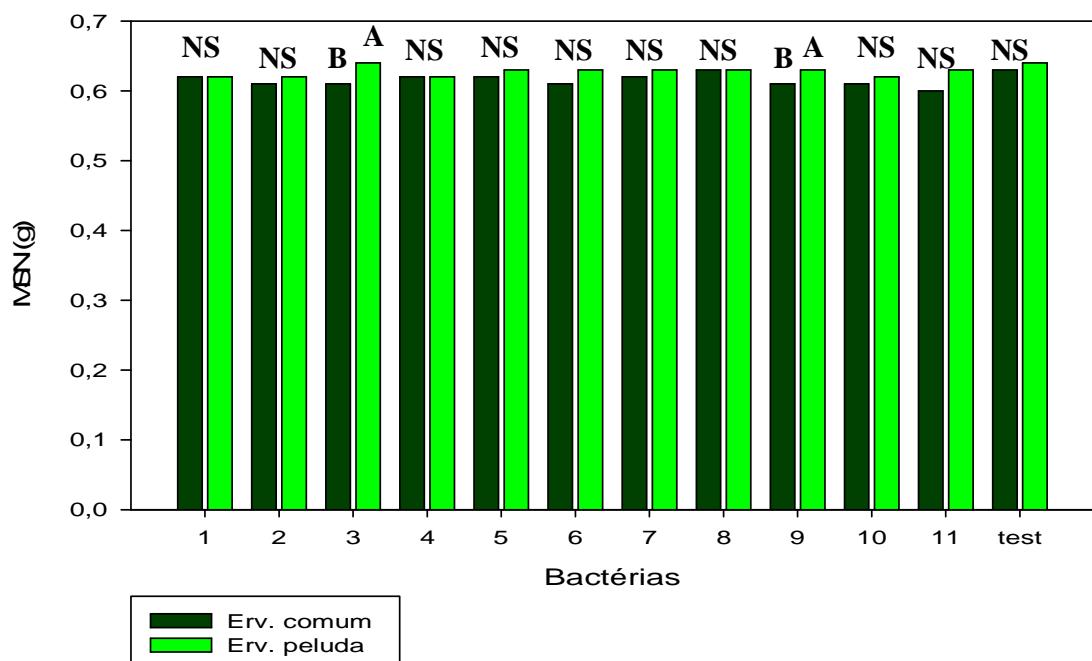


Figura 12 - Comparação entre as ervilhacas para o Massa Seca de Nódulos (MSN) em substrato não estéril.

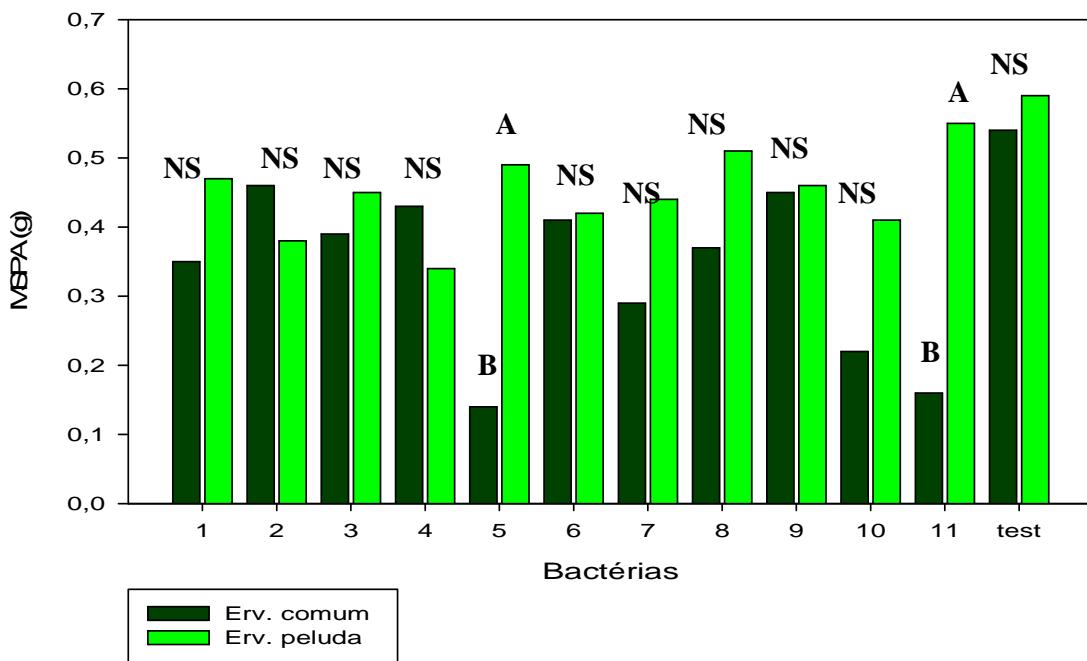


Figura 13 - Comparação entre as ervilhacas para a Massa seca de parte aérea (MSPA) em substrato não estéril.

4.2 SEGUNDA ÉPOCA

Na segunda época do experimento, aonde se conduziu a pesquisa somente com substrato não estéril, observou-se diferença apenas entre as ervilhacas comum e peluda (Tabela 8), onde a vica peluda foi superior para MSPA com os isolados B2, B4, B5, B11 e testemunha, para NT com os isolados B4, B5 e testemunha e para MSR com os isolados B5, B7 e testemunha, quando comparada à vica comum.

O solo utilizado no experimento recebeu todas as correções químicas e de acidez recomendadas. A ervilhaca comum é exigente em fertilidade e desenvolve-se bem em solos corrigidos ou já cultivados, com bons teores de cálcio, fósforo e sem problemas de acidez (SANTOS, 2010), e a variedade peluda consegue produzir grandes quantidades de massa, mesmo em solos de baixa fertilidade e com problemas de acidez (NETTO, 2003). Assim, as diferenças verificadas onde a peluda se sobressaiu a comum, tanto nos solos esterilizados como no não esterilizado, em princípio não resultaram dos tratamentos, mas do potencial das variedades.

A maior produção de MS da ervilhaca peluda pode estar associada à espécie, considerada mais rústica em relação a ervilhaca comum (CALEGARI et al., 1993). A

literatura considera a ervilhaca peluda como uma das melhores leguminosas para produção de massa seca, apresentando uma produção de 3-7 ton ha⁻¹ e a ervilhaca comum em torno de 3-4 ton ha⁻¹ (BORTOLONI, et al, 2000). Segundo Sullivan (2003) e Cutler et al, (2003) a ervilhaca peluda pode fixar acima de 200 kg N ha⁻¹, mas a média conhecida gira ao redor de 100 kg N ha⁻¹, e para Monegati (1991) a variedade comum pode chegar a 220 kg de N ha⁻¹.

Tabela 10 - Valores de Número de Nódulos (NN), Massa seca de nódulos (MSN), Massa seca de parte aérea (MSPA), nitrogênio total acumulado por planta (NT) e Massa seca de raiz (MSR) em ervilhaca peluda e comum, influenciados pela inoculação com isolados nativos de rizobios em solo não esterilizado. Médias de quatro repetições. Lages-2011.

Tratam.	NN	MSN(g)	MSR (g)	MSPA (g)	NT (mg/pl)
ERVILHACA COMUM	B1	10.41 Aa	1.16 ABa	0.61 Aa	1.18 ABa
	B2	9.56 Aa	1.31 ABa	0.62 Aa	1.27 Ba
	B3	11.22 Aa	0.96 ABa	0.62 Aa	1.13 ABa
	B4	10.09 Aa	1.18 ABa	0.63 Aa	1.17 Ba
	B5	9.72 Aa	1.00 Ba	0.63 Aa	1.15 Ba
	B6	12.03 Aa	1.02 ABa	0.62 Aa	1.15 ABa
	B7	9.09 Aa	1.09 Ba	0.62 Aa	1.20 ABa
	B8	11.92 Aa	1.24 ABa	0.62 Aa	1.31 ABa
	B9	13.12 Aa	1.12 ABa	0.62 Aa	1.45 ABa
	B10	8.06 Aa	1.01 ABa	0.62 Aa	1.21 ABa
	B11	11.61 Aa	1.18 ABa	0.61 Aa	1.19 Ba
	Test	9.87 Aa	1.04 Ba	0.62 Aa	1.24 Ba
ERVILHACA PELUDA	B1	11.71 Aa	1.29 ABa	0.62 Aa	1.33 ABa
	B2	10.44 Aa	1.27 ABa	0.63 Aa	1.56 Aa
	B3	8.99 Aa	1.25 ABa	0.63 Aa	1.29 ABa
	B4	9.77 Aa	1.36 ABa	0.63 Aa	1.53 Aa
	B5	5.29 Aa	1.42 Aa	0.61 Aa	1.51 Aa
	B6	7.52 Aa	1.39 ABa	0.61 Aa	1.11 ABa
	B7	9.57 Aa	1.52 Aa	0.62 Aa	1.41 ABa
	B8	7.72 Aa	1.47 ABa	0.61 Aa	1.37 ABa
	B9	8.60 Aa	1.41 ABa	0.62 Aa	1.20 ABa
	B10	6.62 Aa	1.36 ABa	0.62 Aa	1.30 ABa
	B11	12.35 Aa	1.39 ABa	0.63 Aa	1.56 Aa
	Test	9.60 Aa	1.64 Aa	0.63 Aa	1.63 Aa
CV		46.07%	20.64%	1.33%	14.72%
					20.50%

Letras maiúsculas referem-se a diferença entre as ervilhacas, letras minúsculas referem-se a diferença entre os isolados de bactérias. Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Weber et al (2005), concluíram que, quando se compara aspectos de fixação e conteúdo de nitrogênio da ervilhaca peluda, esta leguminosa tem um grande potencial, apresentando uma fixação de 66-67% e um conteúdo de 4% de nitrogênio, sendo considerada uma boa opção para se usar como adubo verde.

Aita et al. (2004), avaliando a estimativa da fixação biológica de nitrogênio em leguminosas para adubação verde usando variações na abundância natural em ^{15}N verificaram que na média dos três anos de seu trabalho, a contribuição da FBN na ervilhaca isolada foi de 78%, sendo que a FBN da leguminosa não foi afetada pela presença da aveia em nenhum dos consórcios avaliados. Embora a proporção do N acumulado pela ervilhaca corrobore os resultados de outros estudos, é referenciado que as gramíneas apresentam grande capacidade em competir pelo N mineral do solo estimulando a FBN da leguminosa, quando ambas são cultivadas em consórcio (PERIN, et al., 2004).

A ervilhaca além de servir como adubo verde liberando nitrogênio para o solo, proporciona uma excelente cobertura e melhora da estrutura deste. Os trabalhos de pesquisa realizados com esta espécie evidenciam que, além de propiciar a cobertura do solo, protegendo-o da erosão, ela fornece N ao milho em sucessão, podendo substituir parcial ou totalmente a adubação mineral nitrogenada da cultura (HEINRICHES et al, 2001).

Embora todos os trabalhos realizados com a ervilhaca como planta de cobertura de solo ou como fonte alternativa de nutrientes para as culturas subsequentes, praticamente não existem trabalhos com foco no processo da FBN e suas particularidades que detalhem as diferenças entre bactérias e genótipos da planta. Isso evidencia a necessidade de aprofundar estudos.

5 CONCLUSÕES

1. A ervilhaca peluda apresentou maior potencial para produção de matéria seca de parte aérea e de acúmulo de N do que a comum.
2. Nas condições de estudo, nenhuma das bactérias isoladas apresentaram eficiência superior à estirpe recomendada.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, JOSÉ ALAN DE ALMEIDA. **Dinâmica do nitrogênio sob sistema plantio direto e parâmetros para o manejo da adubação nitrogenada no milho.** Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS). 2009. 200p.

AITA, C.; BASSO, C.J.; CERETTA, C.A.; GONÇALVES, C.N. & DA ROS, C.O.C. **Plantas de cobertura de solo como fontes de nitrogênio ao milho.** R. Bras. Ci. Solo, 25:157-1165, 2001.

AITA, C.; CERETTA, C.A.; THOMAS, A.L.; PAVINATO, A. & BAYER, C. **Espécies de inverno como fonte de nitrogênio para o milho no sistema de cultivo mínimo e feijão em plantio direto.** R. Bras. Ci. Solo, 18:101-108, 1994.

AITA, C.; GIACOMINI, S.J. **Decomposição e liberação de nitrogênio de resíduos culturais de plantas de cobertura de solo solteiras e consorciadas.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, v.27, n.3, p.601-612, 2003.

AITA, C.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; JANTALIA, C.P. & GIACOMINI, S.J. Estimativa da fixação biológica de N em leguminosas para adubação verde usando variações na abundância natural em 15N. In: **FERTBIO-2004**, Lages. Resumo expandido. Lages, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2004. **CD-ROM**

ALCANTRA, P.B. & BUFARAH, G. **Plantas forrageiras: gramíneas e leguminosas.** São Paulo, Nobel, 1979. 150p.

AMADO, T. J. C.; MIELNICZUK, J.; FERNANDES, S. B. V. **Leguminosas e adubação mineral como fontes de nitrogênio para o milho em sistemas de preparo do solo.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, v. 24, n. 1, p. 179-189, 2000.

AMADO, T.J.C. et al. **Culturas de cobertura, acúmulo de nitrogênio total no solo e produtividade de milho.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, v.23, n.3, p.679-686, 1999.

AMADO, T.J.C. et al. Recomendação de adubação nitrogenada para o milho no RS e SC adaptada ao uso de culturas de cobertura do solo, sob sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.26, n.1, p.241-248, 2002.

ARAUJO, S.C. **A inoculação de leguminosas: Aumento da produtividade com a fixação biológica de nitrogênio.** Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, 2004. Disponível em: <<http://www.bioteecnologia.com.br>>. Acesso: 22 de maio de 2011.

BEUTLER, A. N.; ELTZ, F.L.F.; BRUM, A.C.R. e LOVATO, T. **FORNECIMENTO DE NITROGÊNIO POR PLANTAS DE COBERTURA DE INVERNO E DE VERÃO PARA O MILHO EM SISTEMA DE PLANTIO DIRETO.** Cienc. Rural v.27 n.4 Santa Maria out./dez. 1997.

BOLLIGER, A.; MAGID, J.; AMADO, T. J. C.; SKORA NETO, F.; RIBEIRO, M.F. S.; CALEGARI, A.; RALISCH, R.; NEERGAARD, A. 2006. Taking stock of the Brazilian “Zero-till revolution”: A review of landmark research and farmers’ practice. **Advances in Agronomy**, 91: 1-64.

BORKERT, C. M.; GAUDÊNCIO, C. A.; PEREIRA, J. E.; PEREIRA, L. R.; OLIVEIRA JUNIOR, A. Nutrientes minerais na biomassa da parte aérea em culturas de cobertura de solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 1, p. 143-153, 2003.

BORTOLINI, C.G.; SILVA, P.R.F. & ARGENTA, G. **Sistemas consorciados de aveia preta e ervilhaca comum como cobertura de solo e seus efeitos na cultura do milho em sucessão.** R. Bras. Ci. Solo, 24:897-903, 2000.

BARRADAS, C. A. A.; FREIRE, L. R.; ALMEIDA, D. L.; DE-POLLI, H. **Comportamento de adubos verdes de inverno na região serrana fluminense.** Pesq. agropec. bras. v.36 n.12 Brasília dez. 2001.

CABALLERO, R.; GOICOECHEA, E.L.; HERNAIZ, P.J. **Forage yields and quality of common vetch and oat sown at varying seeding rates and seeding rates of vetch.** Field Crops Research, v.41, p.135-140, 1995.

CALEGARI, A.; MONDARDO, A.; BULISANI, E. A.; WILDER, L. do P.; COSTA, M. B. B. da; ALCÂNTARA, P. B.; MIYASAKA, S.; AMADO, T. J. C. Adubação verde no sul do Brasil. Rio de Janeiro: **Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa**, 1993. 346 p.

CALEGARI. A. Adubação verde e rotação de culturas no sudoeste do Paraná. In: **Reunião de rotação de culturas**, 1, 1992. Ponta Grossa.

CHEN, W.M.; LAEVENS, S.; LEE, T.M.; COENYE, T.; DE-VOS, P.; MERGEAY, M.; VANDAMME, P. **Ralstonia taiwanensis sp. nov., isolated from root nodules of Mimosa species and sputum of a cystic fibrosis patient.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v.51, p.1729-1735, 2001.

COSTA, H. S., M. W. JOHNSON, D. E. ULLMAN, A. D. OMER, AND B. E. TABASHNIK. **Sweetpotato Whitefly (Homoptera: Aleyrodidae): Analysis of Biotypes and Distribution in Hawaii.** Environ. Entomol. 22: 16-20. 1993

CUTLER, S., M. SHEPHERD & G. GOODLASS. **A review of leguminous fertility-building crops, with particular reference to nitrogen fixation and utilization.** Written as part of DEFRA project OF0316 “The development of improved guidance on the use of fertility-building crops in organic farming”. Department for Environment, Food and Rural affairs. UK. 2003.

DA ROS, C. O. **Plantas de inverno para cobertura do solo e fornecimento de nitrogênio ao milho em plantio direto.** Santa Maria - RS. 85 p. Tese (Mestrado em

Agronomia) - Curso de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria, 1993.

DA ROS, C.O. & AITA, C. **Efeito de espécies de inverno na cobertura do solo e fornecimento de nitrogênio ao milho em plantio direto.** R. Bras. Ci. Solo, 20:135-140, 1996.

DERPSCH, R.; CALEGARI, A. **Plantas para adubação verde de inverno.** Londrina: Iapar, 1992. 80p. (Circular, 73).

DUKE, J.A. **Handbook of legumes of World Economic Importance.** Ed. Plenum Press. New York and London. 1983. 345p.

EINRICHES, R.; FANCELLI, A. L. **Influência do cultivo consorciado de aveia preta (*Avena strigosa* Schieb.) e ervilhaca (*Vicia sativa* L.) na produção de fitomassa e no aporte de nitrogênio.** Scientia Agricola, Piracicaba, v. 56, n. 1, p. 27-31, 1999.

FILHO, BEIJAMIM DIAS OZÓRIO. **Rizobios Eficientes em Lotus como promotores de crescimento em arroz irrigado.** Tese de doutorado apresentada como um dos requisitos para obtenção do grau em doutor em Ciencia do Solo. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.Faculdade de Agronomia. 2009.

FONTANELI, R.S.; SIMONETTO, C.A.; FONTANELI, R.S.; BARCELA, E. **Consorciação de aveia e azevém com leguminosas de estação fria, Passo Fundo, RS: 1989/90.** Boletim de Pesquisa. Faculdade de Agronomia, Universidade de Passo Fundo, v.14, n.11. p.80-94, 1991.

FONTANELI, R.S.; SANTOS, H.P. DOS; FONTANELI R.S. **Forrageiras para integração lavoura-pecuária-floresta na região sul-brasileira.** Passo Fundo : Embrapa Trigo, 2009. 340 p.

FRED, E. B.; BALDWIN, I. L. & McCOY, E. **Root nodule bacteria and leguminous plants.** Madison, WIS, scp. 1932. 343p.

GIACOMINI S. J.; AITA, C.; CHIAPINOTTO C.; HUBNER A. P.; MARQUES M. G.; CADORE, F. **Consorciação de plantas de cobertura antecedendo o milho em plantio direto. II - Nitrogênio acumulado pelo milho e produtividade de grãos.** Rev. Bras. Ciênc. Solo v.28 n.4 Viçosa jul./ago. 2004.

GILLER, K. E.; WILSON, K. J. Nitrogen fixation in tropical cropping systems. **CAB International**, The Netherlands, 1993.

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

HAAG, H.P. **Nutrição mineral de forrageiras no Brasil.** Campinas: Fundação Cargill, 1984. 152p.

HEATH, M.E.; METCALFE, D.S.; BARNES, R.F. **Forrages: the Science of grass land agriculture.** Ames, Iowa, The Iowa Satte University, 1973. 755p.

HEINRICHS, R., FANCELLI A. L. INFLUÊNCIA DO CULTIVO CONSORCIADO DE AVEIA PRETA (AVENA STRIGOSA SCHIEB.) E ERVILHACA COMUM (VICIA SATIVAL.) NA PRODUÇÃO DE FITOMASSA E NO APORTE DE NITROGÊNIO. Scientia Agricola, versão impressa ISSN 0103-9016. Sci. agric. v.56 n.1 Piracicaba 1999.

HEINRICHS, R. Ervilhaca e aveia preta cultivadas simultaneamente como adubo verde e sua influência no rendimento do milho. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, 1996. 65 p. (Tese de Mestrado)

HEINRICHS, R.; AITA, C.; AMADO, T.J.C. & FANCELLI, A.L. Cultivo consorciado de aveia e ervilhaca: relação C/N da fitomassa e produtividade do milho em sucessão. R. Bras. Ci. Solo, 25:331-340, 2001.

HEMRICHES, R., AITA, C., AMADO, T. J. C. Cobertura do solo e suprimento de nitrogênio ao milho através do cultivo consorciado de ervilhaca e aveia preta. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 1993. Goiânia, GO. Anais ... Goiânia, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1993, v 23, p. 113-114.

HEINZMANN, F.X. Resíduos culturais de inverno e assimilação de nitrogênio por culturas de inverno. Pesq. Agropec. Bras., 20:1021-1030, 1985.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; ARAUJO, R.S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. (Eds.) Biologia dos solos dos cerrados. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p. 189-294.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; CAMPO, R.J.; SUHET, A.R.; PERES, J.R.R. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAUJO, R.S.; HUNGRIA, M. (ed.). **Microrganismos de importância agrícola.** Brasília: EMBRAPA - SPI, 1994. p. 9-89.

IZAGUIRRE, P. & BEYHAUT, R. Las leguminosas en Uruguay y regiones vecinas. Parte 1 Papilionoideae. Montevideo, Uruguay: Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L, 1998. p.326.

JANNINK, J. L.; LIEBMAN, M.; MERRICK, L. C. Biomass production and nitrogen accumulation in pea, oat, and vetch green manure mixtures. Agronomy Journal, Madison, v. 88, n. 2, p. 231-240, 1996.

JESEN, H.L. The classification of the rhizobia. HALLSOWORTH, E.G., ed. Nutrition of the legumes. London, Butterworths, 1958. p 75-86.

LEWIS, G.; SCFRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. Legumes of the world. Plublished by the Royal Botanic Gardens, kew. 2006.

LIMA, L.A. e COLOZZA, M.T. Deficiencia nutricional em leguminosas para grãos e forragens. Botucatu-SP, 1983. 15p.

LITTLE, R.C.; FREUND, R.J.; SPECTOR, P.C. SAS system for linear models – SAS series in statistical applications. 3. ed., Cary, 1991, 329 p.

Littell JS (2006) Climate Impacts to Forest Ecosystem Processes: Douglas-fir Growth in Northwestern U.S. Mountain Landscapes and Area Burned by Wildfire in Western U.S.

Ecoprovinces. Ph.D. dissertation. University of Washington, Coll For Resources, Seattle, Washington, USA. 160 p.

MONEGAT, C. **Plantas de cobertura de solo: características e manejo em pequenas propriedades**. Chapecó: Ed. do Autor, 1991. 337p.

MORAES, Y.J.B. de. **Forrageiras: conceitos, formação e manejo**. Guaiabá Agropecuária, 1995. p 130-131.

MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O.; **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2^a edição atualizada e ampliada. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729p.

MORGANTE, P.G. Fixação biológica e assimilação de nitrogênio. Disponível em: <<http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp/FisioVegGrad/NetNitro.htm>>. Acesso: 08 junho. 2011.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOLVIN-MASSON, C. **Nodulation of legumes by members of beta sub-class of Proteobacteria**. Nature, v. 411, p. 948-950, 2001.

NEGRELLO, M. Inoculação de sementes de cornichão (*lotus corniculatus*) e ervilhaca (*vicia sativa*) na presença e ausência de calcário. **Rev. Acad., Curitiba**, v. 5, n. 4, p. 369-377, out./dez. 2007.

NETO, SANTO AUGUSTO PISINATTI. Ensaio de alternativas de safrinha e cobertura. 2003. Disponível em: <http://www.catpirassununga.com.br/portal/uploads/Experimento%202003.pdf>. Acesso em 10 de abril de 2011.

PERIN, A.; SANTOS, R.H.S.; URQUIAGA, S.; GUERRA, J.G.M. & CECON, P.R. Produção de fitomassa, acúmulo de nutrientes e fixação biológica de nitrogênio por adubos verdes em cultivo isolado e consorciado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 39: 35-40, 2004.

PUPO, N.I.H. **Manual de pastagens e forrageiras: formação, conservação, utilização**. Campinas, SP, Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1979.

RESSLER, C. **Isolation and indetification from commom vetch of the neurotoxin, β -Cyanol-L-alanine, a possible factor in neurolathyrism**. Journal of Biological Chemistry. 1962. 237p.

RESSLER, C., NIGAM, S.N., GIZA, Y.H. e NELSON, J. **Isolation and indentification from vetch of γ -L-glutamy- β -cyano-L-alanine, a bound form of the neurotoxin β -cyano-L-alanine**. Journal of the American Chemical Society. 1963. p 3311-3312.

ROCHA, GERARD LEME da. **Ecossistemas de Pastagens**. Piracicaba:FEALB, 1991. 391p.

ROSENGURTT, B. Estudios sobre praderas naturals del Uruguay. 2da. Contribución. La variabilidad de La composición de lás praderas. Revista AIA 3. 1939.

ROSWALL, T. Nitrogen losses from terrestrial ecosystems: global, regional na local considerations. In: INTERNATIONAL MEET. GLOBAL IMPACTS OF APPLIED MICROBIOLOGY BANKOK, 5., 1979. Proceedings... 1979. p17-26

ROY, D.W.; SABRI, M.I.; KAYTONN, R.J. and SPENCER, PETER, S. β -Cyanol-L-alanine Toxicity: Evidence for the involvement of an excitotoxic mechanism. *Natural toxins*. 1996. p 246-253.

SANTOS, Diego dos. Atributos físicos do solo e produtividade da soja sob plantas de cobertura. Cascavel, 2010. 78pg.

SALERNO, A.R. & TCACENCO, F. A. Características e técnicas de cultivo de forrageiras de estação fria no vale do Itajaí e Litoral de Santa Catarina. Florianópolis, EMPASC, 1986. 56p.

SCHULTZE, M..; KONDOROSI, E. Regulation of symbiotic root nodule development. *Annual Review of Genetics*, v. 32, p. 33-57, 1998.

SEYMOUR, M.; SIDDIQUE, K.; PRITCHARD, I.; BRANDON, N.; RIETHMULLER, G. e LATHAM, L. Common vetch production technology. *Bulletin* 4578. 2003. 37p.

SILVA, P. R. F. da; SILVA, A. A.; ARGENTA, G.; STRIEDER, M. L. e FORSTHOFER, E. L. Manejo da ervilhaca comum (*Vicia sativa*L.) para cultivo do milho em sucessão, sob adubação nitrogenada. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v.6, n.1, p.50-59, 2007.

SHIRASHI, A.; MATSUSHITA, N.; HOUGETSU, T. Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 33, p. 269-274, 2010.

SOUZA, DENNIS GÓSS DE. Bactérias Diazotróficas em Solos Reconstruídos após a Mineração de Carvão, na Bacia Carbonífera Catarnense. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Manejo do Solo como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre. Universidade do Estado de Santa Catarina-UDESC. Centro de Ciencias Agroveterinárias-CAV, 2011.

SULLIVAN, P. Overview of cover crops and green manures. Fundamentals of sustainable agriculture series. ATTRA. National Center for Appropriate Technology (NCAT), 2003. Acessado em 27 de julho de 2010. Internet: <http://attra.ncat.org/attra-pub/PDF/covercrop.pdf>

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. Análise de solo, plantas e outros materiais. Porto Alegre: Universidade federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p (Boletim técnico de Solos, 5).

TOMM, G. O. Wheat intercropped with forage legumes in southern Brazil. 1990.122 p. (Master of Science Thesis) - University of Saskatchewan, Saskatoon, Canadá, 1990.

TSAI, S.M.; BARAIBAR, A.V.L. & ROMANI, V.L.M. Efeito de fatores do solo. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. & NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, SP, 1992. p. 59-72.

WAGGER, M.G. **Cover crop management and nitrogen rate in relation to growth and yield of no-till corn.** Agron. J., 81:533-538, 1989.

WERNER, J.C. **Adubação de pastagens.** 1º Encontro de Atualização em Pastagens. NESTLE, São Paulo. 1977. p 43-63.

WEBER, M. A.; VINOTHER, M.; NEERGAARD, A.; AMADO, T. J. C.; LOVATO T.; Acosta, J. A. A.; Rossato, O. B. CAPACIDADE DE FIXAÇÃO SIMBIÓTICA E Liberação de nitrogênio pela ervilhaca (*vicia villosa*) medido através de marcação isotópica com ^{15}N . **XXX Congresso brasileiro de Ciência do Solo.** Recife, 2005.

WHYTE, R.O.; NILSON, G.; TRUMBLE, H.C. Las leguminosas em La agricultura. Rome, FAO, 1955. p.322.