

Bio. 277



UNIVERSIDADE EDUADO MONDLANE

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TRABALHO DE CULMINAÇÃO DE ESTUDOS

Tema:

Análise da Formação de Nódulos Radiculares e Fixação de Nitrogénio Em Seis Variedades de Feijão-nhamba (*Vigna unguiculata* (L) Walp.) Sob Stress Hídrico.



Autor: Rufino António Infante

Maputo, Dezembro 2008



UNIVERSIDADE EDUADO MONDLANE

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TRABALHO DE CULMINAÇÃO DE ESTUDOS

Tema:

Análise da Formação de Nódulos Radiculares e Fixação de Nitrogénio Em Seis Variedades de Feijão-nhemba (*Vigna unguiculata* (L) Walp.) Sob Stress Hídrico.



**Supervisores: Prof. Dr. Orlando Quilambo
dra. Célia Martins**

Autor: Rufino António Infante

Maputo, Dezembro 2008

Agradecimentos

À Deus por iluminar sempre o meu caminho e a ajudar a tomar as decisões mais correctas
A cúpula de Fisiologia Vegetal pela oportunidade de realizar este trabalho, pela valiosa orientação, confiança e incentivo.

A dr.^a Célia Martins na qual encontrei apoio, coragem, amizade e principalmente incentivo.

Ao meu pai, *António Infante* que sempre marcou presença sobretudo nos momentos difíceis da minha formação dando-me conforto e coragem.

À minha mãe, *Mequelina Saveca* que nas horas mais difíceis sempre encontrou a melhor solução e deu-me o seguinte conselho: "*Nada se Ganha sem Sacrificio*".

Às minhas irmãs *Inês e Herminia*, pelo carinho, amizade e sobretudo pela forte união que sempre almejamos.

Aos meus amigos: Orlanda, Luís, Nélio e Eduardo Peniel pelo seu apoio moral e material durante a minha formação

Ao meus irmãos e amigos do curso: Márcio, Cházia, Onésia, Jorfélia pelo apoio e pelos momentos que juntos compartilhamos.

Aos senhor Sítio e à dona Helena, que contribuíram de forma valiosa na etapa laboratorial deste trabalho, sempre se mostrando disponíveis e pacientes.

Aos meus amigos de longa data que sempre acreditaram em um dia sermos doutores.

Agradeço à todos que directa ou indirectamente me ajudaram em todas as vertentes durante a minha formação.

Dedicatória

Dedico este trabalho com toda a euforia, orgulho e prazer aos meus pais, *António Rufino Infante e Mequelina Paulo Saveca* pelo amor em todos os momentos da minha vida e às minhas amadas irmãs *Inês e Hermínia* pelo carinho e companhia.

Declaração de honra

Declaro, por minha honra, que o presente trabalho de culminação de curso é da minha autoria e nunca foi submetido para aquisição de qualquer outro grau académico, e por ser verdade vem por mim assinado.

Rufino António Infante
.....
(Rufino António Infante)

"Andei...

Por caminhos difíceis, eu sei.
Mas olhando o chão sob meus pés, vejo a vida correr.
E assim a cada passo que der
Tentarei fazer o melhor que puder.

Aprendi...

Não tanto quanto quis, mas vi que conhecendo
O universo ao meu redor e aprendo a me conhecer melhor;
Assim escutarei o tempo que me ensinará
A tomar a decisão certa a cada momento.

E partirei...

Em busca de muitos ideais,
Mas sei que hoje se encontram meu passado, presente e futuro.
Hoje sinto em mim a emoção da despedida.
Hoje é o ponto de chegada.
Mas, ao mesmo tempo, tempo de partida".
(Autor desconhecido)

Lista de Figuras	página
Figura -1 Localização geográfica da estufa do Departamento de Ciências Biológica, Universidade Eduardo Mondlane.....	4pp
Figura 2. Relação entre o peso fresco e o número de nódulos formados sob condições de stress hídrico.....	17pp
Figura 3. Relação entre a fixação de nitrogénio e o número de nódulos formados no stress hídrico.....	19pp

Lista de Tabelas	página
Tabela 1: Plano da colheita semanal de plantas.....	12pp
Tabela 2: Efeito de Stress hídrico sobre o número de nódulos das seis variedades de feijão nhemba.....	15pp
Tabela 3: Efeito de Stress hídrico sobre o peso fresco dos nódulos das seis variedades de feijão nhemba.....	16pp
Tabela 4: Efeito de stress hídrico na fixação de nitrogénio das seis variedades de feijão nhemba.....	18pp
Tabela 5: Efeito de stress hídrico na concentração de proteína (mg.g^{-1} do peso fresco) das seis variedades de feijão nhemba.....	20pp

Lista de Anexos	página
Anexo 1 Tabela 1. Características físico-químicas do solo usado na experiência.....	Ipp
Anexo 2 Determinação do conteúdo volumétrico da água no solo.....	Ipp
Anexo 3 Preparação da curva de calibração para determinação da concentração protéica.....	IIpp
Anexo 4: Valores de ANOVA I de número de nódulos das seis variedades sob stress hídrico.....	IIIpp
Anexo 5: Valores de ANOVA I de peso fresco de nódulos das seis variedades sob stress hídrico.....	Vpp
Anexo 6: Valores de ANOVA I de fixação de nitrogénio das seis variedades sob stress hídrico.....	IVpp
Anexo 7: Valores de ANOVA I de concentração de proteína das seis variedades sob stress hídrico.....	VIIIpp

RESUMO

Esta experiência foi conduzida na estufa do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Eduardo Mondlane (UEM) e teve como objectivo, analisar o efeito do stress hídrico na formação de nódulos radiculares e a fixação de nitrogénio em seis variedades (IT82E-18, IT82D-812, Massava-nhassenje, Namarua, Tete-2 e Timbawene moteado) de feijão nhemba (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). As plantas foram submetidas a dois tratamentos: controle, no qual plantas foram sempre mantidas irrigadas de três em três dias; e o tratamento de stress em que a irrigação foi suspensa por 15 dias.

Durante a experiência, foram realizadas três colheitas: na quarta, sétima e décima semanas. Determinou-se o número, o peso fresco dos nódulos, fixação de nitrogénio e a concentração da proteína.

Na quarta semana quase todas as variedades fixaram os nódulos, na sétima o número de nódulos fixados aumentou e na décima diminuiu ligeiramente nas condições de stress hídrico.

Foi encontrada uma relação positiva entre o número de nódulos e o peso fresco. Foi também encontrada uma relação positiva entre o número de nódulos formados e a fixação de nitrogénio.

Todas as seis variedades de feijão submetidas ao stress hídrico formaram nódulos, destacando-se a variedade Tete-2 que formou maior número de nódulos. A variedade Massava-nhassenje apresentou maior percentagem de fixação de nitrogénio nos nódulos e a variedade Namarua apresentou maior concentração de proteína em condições de stress hídrico.

Palavras-Chave: Feijão nhemba, fixação de nitrogénio, formação de nódulos radiculares, stress hídrico.

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 IMPORTÂNCIA DO ESTUDO	3
1.2 Revisão bibliográfica	4
1.2.1 Descrição botânica.....	4
1.2.2 Sistema de produção	5
1.3.1 Consociação e rotação.....	5
1.2.3 Principais Pragas, Doenças e Infestantes	5
1.2.4 Requisitos Ambientais	6
1.2.4.1 Clima.....	6
1.2.4.2 Solos.....	6
1.2.5 Regiões Agro-Climáticas de Cultivo de Feijão Nhemba em Moçambique	7
2 OBJECTIVOS	8
2.1 Objectivo Geral	8
2.2 Objectivos Específicos.....	8
3 HIPÓTESE:	8
4 ÁREA DE ESTUDO	9
5 MATERIAL E MÉTODOS	9
5.1 MATERIAL E EQUIPAMENTO EXPERIMENTAL.....	9
5.2 METODOLOGIA	10
5.2.1 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	10
5.2.2 DEPOIS DA SEMENTEIRA	11
5.2.2.1 Determinação de Número de Nódulos	11
5.2.2.2 Determinação da Fixação de Nitrogénio.....	11
5.2.2.3 Extracção e Determinação da Concentração de Proteínas.....	12
6 ANÁLISE DOS DADOS	13
7 RESULTADOS	14
7.1 Efeito do Stress Hídrico no Número de nódulos	14
7.2 Efeito do Stress Hídrico no Peso fresco dos Nódulos.....	15
7.3 Relação entre o Peso fresco e o Número de Nódulos em Stress Hídrico	16

Tema: Análise do Efeito do Stress Hídrico na Formação de Nódulos Radiculares e Fixação de Nitrogénio em seis variedades de Feijão Nhemba (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

7.4 Efeito do Stress Hídrico na Fixação de Nitrogénio	17
7.5 Relação entre a Fixação de Nitrogénio e o Número de Nódulos Formados no Stress Hídrico	19
7.6 Efeito do Stress Hídrico na Concentração de Proteína	19
8 DISCUSSÃO.....	21
9 CONCLUSÃO	26
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

1 INTRODUÇÃO

O feijão nhemba (*Vigna unguiculata* L. Walp) é uma dicotiledónia que pertence à família Leguminosae, subfamília papilionoideae, género *Vigna* (Libombo, 1990).

Esta leguminosa tem sua origem em África donde se expandiu para Índia, China, América Central e América do Norte. A sua distribuição no interior do continente africano ocorreu através da migração e para outros continentes a cultura dispersou-se através de estabelecimento de contactos comerciais (Libombo, 1990).

O feijão nhemba é considerado a principal fonte de proteínas para as populações pobres de muitos países tropicais e subtropicais (Araújo e Eugene 1988 citados por Italia, 1992).

Em África, é usado sob a forma de semente seca, a qual é utilizada na culinária de diversas formas (Rachie, 1985 citado por Italia, 1992). Do feijão nhemba aproveitam-se as folhas e as vagens verdes. É também cultivado com o fim de servir de alimentação para o gado, ou ainda como adubo verde (Rachie, 1985 citado por Itália, 1992).

As suas folhas secas, quando comparadas às de outros vegetais usadas na alimentação, retêm uma maior quantidade de vitaminas essenciais (Bittenbender e Barret, 1989 citados por Italia, 1992).

O feijão nhemba é uma espécie de grande valor genético e possui genes de resistência a stress, que lhe confere uma ampla adaptação edafoclimática, alto potencial produtivo e alta capacidade de obter nitrogénio em associação com bactérias do género *Bradyrhizobium* (Bezerra, 1997; Ehlers & Hall, 1997; Xavier, 2000 citados por Zillil *et al.*, 2006).

Segundo Heemeskerk (1988) citado por Italia (1992), o recenseamento agrícola de 1970 estimou a área total de feijão nhemba em Moçambique em 150000ha com uma produção média de 348kg/ha. A potencialidade de produção do feijão nhemba depende muito das condições solo/clima, bem como do sistema de cultivo a que está sujeito e da densidade de sementeira.

Em relação a humidade do solo, a cultura é muito resistente à seca, razoavelmente tolerante a humidade excessiva do solo, mas necessita de um certo grau de humidade durante a fase de floração e frutificação (Oliveira e Carvalho, 1988 em Araújo, 1998 citados por Italia, 1992).

No que se refere ao feijão-nhemba não há uma estimativa, em termos económicos, da sua contribuição na fixação biológica do nitrogénio. No entanto, sabe-se que é importante para manter a produtividade das lavouras de subsistência, em que a adubação nitrogenada mineral não ocorre (Martins *et al.*, 2003 citados por Zillil *et al.*, 2006). Em termos de quantidade de nitrogénio fixado, existem dados que indicam contribuições superiores a 100 kg/ha, embora esses valores sejam variáveis, especialmente em avaliações de campo (Wani *et al.*, 1995 citados por Zillil *et al.*, 2006).

A fixação biológica do nitrogénio atmosférico é um processo que ocorre como resultado da associação simbiótica entre as plantas leguminosas e bactérias específicas, denominadas *Rhizobium*, que ocorrem no solo, resultando no suprimento de nitrogénio para as plantas (Morgano *et al.*, 2006; Medeiros e Araujo, 1997).

Todos os organismos fixadores de nitrogénio, chamados de organismos diazotróficos, são procariotas e utilizam para a fixação a enzima conhecida como nitrogenase. Essa enzima é sensível ao oxigénio, que pode destruí-la irreversivelmente. Essa reacção é endergônica, isto é, a amónia é mais rica em energia que o nitrogénio atmosférico e para que a reacção ocorra é necessário fornecimento de energia, armazenada na forma de ATP (Silveira e Freitas, 2007).

A fixação de nitrogénio é um processo ecológica e economicamente vantajoso que pode substituir os fertilizantes nitrogenados (também importante para (*Vigna unguiculata*)). Para melhor estudar este sistema biológico e sua interacção com o meio é de fundamental importância conhecer melhor os nódulos e sua interacção com a planta e o meio (Date, 2000 citado por Costa *et al.*, 2006).

Segundo Rebah *et al.* (2006) a fixação biológica de azoto pelo *Rhizobium* representa cerca de 70-80% do azoto total acumulada pelas plantas leguminosas.

A quantificação do nitrogénio fixado é difícil tanto em termos económicos, quanto ecológicos, mas estima-se que o processo seja responsável por 45 % a 85% do nitrogénio utilizado pelas plantas. Cerca de 80 milhões de toneladas de nitrogénio são fixados mundialmente por ano, comparadas com cerca de 82 milhões de toneladas obtidas por fixação industrial (Tavares *et al.*, 2005).

Nas leguminosas, a nodulação e a actividade de nitrogenase são reduzidas pelo stress hídrico, resultando numa baixa fixação de nitrogénio com uma consequente redução da produção de grãos (Dakora e Atkins, 1990 citados por Ferreira, 1994).

Segundo Costa *et al.* (1996) citados por (Ferreira, 2005), o défice hídrico reduz o peso dos nódulos, o nitrogénio acumulado e a produção de matéria seca da parte aérea do feijão nhemba, principalmente quando a deficiência hídrica é imposta na segunda e quinta semanas após a sementeira. Esta redução pode estar associada ao facto do défice hídrico afectar vários processos fisiológicos relacionados com a assimilação de nitrato e fixação simbiótica de nitrogénio nas leguminosas, reduzindo o peso da matéria seca dos nódulos e da parte aérea das plantas.

O presente estudo teve como objectivo, analisar o efeito do stress hídrico na formação de nódulos radiculares e a fixação de nitrogénio em seis variedades (IT82E-18, IT82D-812, Massava-Nhassenje, Namarua, Tete 2 e Timbawene Moteado) de feijão nhemba (*Vigna unguiculata* (L.) Walp).

1.1 IMPORTÂNCIA DO ESTUDO

O feijão-nhemba (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é bastante cultivado, sendo considerado como uma das principais fontes de calorías e proteínas para a população. Devido a sua rusticidade e alta variabilidade genética adapta-se bem a diferentes condições ambientais, apresentando desenvolvimento satisfatório em condições de baixa fertilidade do solo e conseguindo produzir, em anos secos, mais do que outras espécies vegetais (Marin *et al.*, 1997).

Uma das vantagens da cultura do feijão-nhemba é que possui grande capacidade de se associar ou formar simbiose com organismos fixadores de nitrogénio atmosférico. Esses organismos são bactérias do género *Rhizobium*, encontradas no solo e quando ligadas às raízes das plantas, fixam nitrogénio que existe no ar em abundância e o transferem-no para a planta (Marin *et al.*, 1997).

O processo de fixação biológica do nitrogénio apresenta diversas vantagens, entre elas: aumento da produção vegetal, contribuição para a sustentabilidade dos sistemas agrícolas, recuperação de áreas degradadas e incremento da fertilidade e da matéria orgânica do

solo. Contudo, a principal vantagem a curto prazo pode estar associada à economia no uso de fertilizantes nitrogenados industrializados (Marin *et al.*, 1997).

Segundo Siteo (2005), Moçambique (um país tropical) tem, nestes últimos anos, registado uma precipitação baixa e irregular e as culturas (principalmente em áreas cuja irrigação depende da chuva) estão sujeitas ao stress hídrico afectando, como já foi referenciado, a produtividade e qualidade nutritiva destas.

A importância que o feijão nhemba assume em Moçambique, leva a que sejam feitos estudos no sentido de avaliar o comportamento das variedades cultivadas em condições de stress hídrico. Os resultados obtidos poderão ser de grande utilidade para melhor adequar o manejo da cultura em condições de stress hídrico; além de que podem servir de instrumento fundamental para explicar perdas de produção em condições de stress hídrico (Leite *et al.*, 1999).

O feijão nhemba é considerado espécie adaptada à seca, a sua capacidade de adaptação varia dentro da espécie (Turk e Hall, 1980; Ziska e Hall, 1982; Summerfield *et al.*, 1985). Portanto, para o seu manejo adequado, visando aumentar a produtividade, é importante conhecer a capacidade de resposta aos níveis de stress hídrico e com base nesse conhecimento, podem-se seleccionar variedades apropriadas à situação stress hídrico.

1.2 Revisão bibliográfica

1.2.1 Descrição botânica

O feijão nhemba é uma leguminosa anual e herbácea, pode ser erecta, semi-erecta, prostrada ou trepadeira. O crescimento varia de indeterminado a determinado. As plantas das variedades determinadas produzem um número limitado de nós e deixam de crescer após a emissão das gemas florais. Nas variedades indeterminadas, a planta continua a crescer e produz novos ramos e gemas florais por um período relativamente longo.

O feijão nhemba apresenta um sistema radicular com uma raiz principal profunda e raízes laterais numerosas, superficiais e bem noduladas. Os nódulos são grandes e globulares.

A inflorescência é uma racema composta de várias racemas simples, inseridos num pedúnculo sulcado. Cada racema simples tem 6 a 12 botões florais mas, somente o par mais baixo desenvolve-se, enquanto os restantes se degeneram para formarem néctar.

Estimativas indicam que menos de 20% das flores produzem vagem, percentagem que ainda pode ser menor com temperaturas extremamente altas, deficiência hídrica e um ataque de trips de botão. Os grãos variam muito em largura, peso, forma e cor (Rulkens, 1996).

1.2.2 Sistema de produção

1.3.1 Consociação e rotação

A consociação, consiste em cultivar conjuntamente plantas de diferentes famílias, com diferentes necessidades nutricionais e diferentes arquitecturas de raízes e área foliar, que se possam complementar enquanto que a rotação é alternância de diferentes espécies.

O feijão nhemba tem um efeito benéfico sobre as culturas subsequentes na rotação e também sobre as culturas associadas. Tem raízes profundas e fixa o nitrogénio atmosférico no solo e pode ser uma cultura precedente ao algodão e aos cereais.

Em África e em especial em Moçambique, o feijão nhemba é muitas vezes consociado com várias culturas (Milho, Mapira, Mexoeira, Amendoim e Mandioqueiras) com excepção das províncias de Nampula, Cabo Delgado e Niassa onde a monocultura também é frequente.

O crescimento prostrado do feijão nhemba tradicional apresenta uma grande vantagem dado que sufoca os infestantes, protege o solo do impacto das gotas de chuva, além de que os cereais aproveitam o nitrogénio nos nódulos radiculares especialmente no fim do plantio. (Rulkens, 1996; INE, 2003 e Heemsker, *et al.*, 1988).

1.2.3 Principais Pragas, Doenças e Infestantes

O feijão nhemba é uma fonte que alimenta uma série de diferentes insectos, sendo todas as partes da planta susceptíveis ao ataque. Por este facto, constitui a principal causa da limitação da produção, sendo que um tratamento contra insectos bem aplicado na época adequada pode permitir a duplicação da produção (Segeren, 1994). O combate a pragas e doenças deve ser feito em quantidade e momento propícios e obedecer certas regras de modo a não prejudicar a saúde do Homem e o meio ambiente (Segeren, 1994).

Em Moçambique as principais pragas são o gorgulho de caule (*Mecysolobus spp*), afídios (*Aphis craccivora*), tripses de botão (*Megalurofhrrips sjostedti*), percevejos, broca da vagem e os coleópteros, enquanto que as principais doenças são entre outras as seguintes: Aphidborne Mosaic Virus, Cowpea Golden Mosaic Virus. Para o seu combate pode-se usar Symbush 25 EC, Cipermetrina, Malatião, Basudine, Mancozeb WP 80% (Segeren, 1994).

No que se refere às infestantes, o feijão nhemba tem o poder de reprimir as infestantes até certo nível em relação a maior parte das culturas (Rulkens, 1996), como é o caso de *Alectra vogelii* e *Striga gesnerioides*. Por outro lado podem ser controladas com enxadas, através de 2 a 3 sachas/cultivo ou usando herbicidas selectivos.

1.2.4 Requisitos Ambientais

1.2.4.1 Clima

Esta cultura precisa de temperaturas elevadas sendo o óptimo de 20 a 35°C (Rulkens, 1996; Araújo e Watt, 1988), e tolera melhor o calor em relação à outras leguminosas. Altas temperaturas no período de floração prejudicam a floração enquanto que baixas temperaturas aumentam o ciclo de vida das plantas pela via do prolongamento de todas as fases do desenvolvimento. Temperaturas abaixo de 20 °C causam a redução do desenvolvimento das plantas, enquanto que o frio longo provoca uma produção demasiada e por conseguinte redução, do rendimento.

1.2.4.2 Solos

O feijão nhemba pode ser cultivado em quase todos os tipos de solos. Dependendo das cultivares, há aquelas que se adaptam à condições específicas do solo e outras que se adaptam à ampla faixa de variação (Araújo e Watt, 1988).

As cultivares erectas no geral são melhor adaptadas a solos de alta fertilidade e sem restrição de humidade, enquanto as prostradas geralmente se adaptam a solos de baixa fertilidade (Araújo e Watt, 1988).

O feijão nhemba, não se adapta bem a solos com excesso de humidade. Geralmente desenvolve-se em solos de razoável fertilidade. Os solos com baixa fertilidade, quando usados devem ser acompanhados de fertilizantes químicos e inorgânicos.

Os solos mais aptos para o cultivo do feijão nhemba, são os franco-arenosos em relação aos solos pesados (Rulkens, 1996). Esta cultura é mais tolerante a solos com pH baixo em relação a outras culturas (soja e feijão vulgar) e as vezes é cultivado em solos pobres e ácidos com vista a melhorá-los.

1.2.5 Regiões Agro-Climáticas de Cultivo de Feijão Nhemba em Moçambique

Segundo Heemeskerk *et al.* (1988), existem em Moçambique regiões agro-climáticas onde o feijão nhemba pode ser produzido. Tais regiões foram estabelecidas com base em critérios pedológicos, climáticos e de altitude.

Na zona norte do País o cultivo tem sido predominante nos solos francos arenosos das Províncias de Nampula, Cabo Delgado e Zambézia ou em solos pesados com uma certa altitude que incluem os distritos de Milange, Ribaué, Gurue e Angónia. Pode igualmente encontrar-se também em solos arenosos de baixa altitude com precipitação baixa e/ou irregular assim como em solos pesados da zona baixa com chuvas irregulares (Heemeskerk *et al.*, 1988).

Ao sul do país, em solos pesados, cultivam-se variedades insensíveis ao fotoperíodo, de ciclo curto e em regime de sequeiro. Geralmente o cultivo é feito em solos arenosos compreendendo a zona desde a Ponta de Ouro até ao Rio Save, abrangendo as zonas do interior de Inhambane, Gaza e Maputo mas também em solos pesados dos vales do Rio Maputo, Umbeluzi, Incomati, Limpopo (Heemeskerk *et al.*, 1988).

2 OBJECTIVOS

2.1 Objectivo Geral

- Analisar o efeito do stress hídrico na formação de nódulos radiculares e a fixação de nitrogénio em seis variedades (IT82E-18, IT82D-812, Massava-Nhassenje, Namarua, Tete 2 e Timbawene Moteado) de feijão nhemba (*Vigna unguiculata* (L.) Walp).

2.2 Objectivos Específicos

- Determinar e comparar o efeito do stress hídrico na formação de nódulos radiculares através da contagem do número de nódulos das seis variedades de feijão nhemba;
- Verificar o efeito do stress hídrico na fixação de nitrogénio através da observação visual dos nódulos das seis variedades de feijão nhemba;
- Determinar a concentração de proteínas nos nódulos radiculares através do método de Lowry das seis variedades de feijão nhemba sob stress hídrico.

3 HIPÓTESE:

HO: O stress hídrico induz a redução do número de nódulos radiculares e a fixação de nitrogénio nas seis variedades de feijão nhemba.

H1: O stress hídrico não induz a redução do número de nódulos radiculares e a fixação de nitrogénio nas seis variedades de feijão nhemba.

Tema: Análise do Efeito do Stress Hídrico na Formação de Nódulos Radiculares e Fixação de Nitrogénio em seis variedades de Feijão Nhemba (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

4 ÁREA DE ESTUDO

O presente estudo foi realizado na estufa e no laboratório de Fisiologia Vegetal ambos pertencentes ao Departamento de Ciências Biológicas, Campus Universitário da Universidade Eduardo Mondlane (fig.1) de Maio à Outubro de 2008.

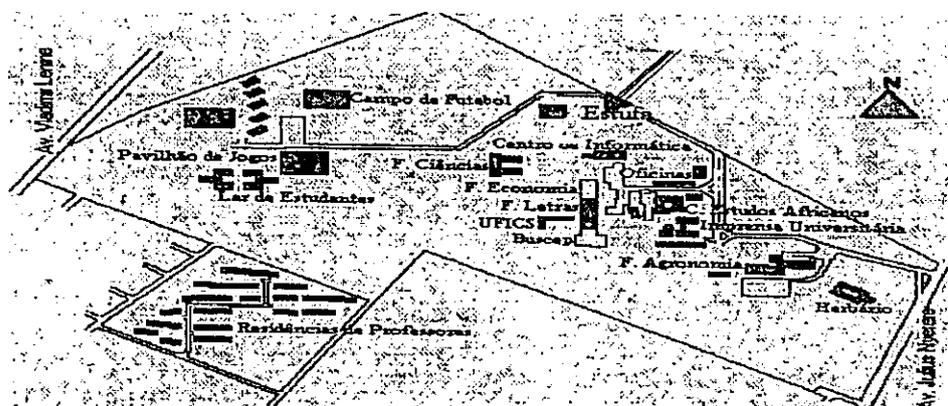


Figura -1 Localização geográfica da estufa do Departamento de Ciências Biológica, Universidade Eduardo Mondlane. Fonte: www.uem.mz

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 MATERIAL E EQUIPAMENTO EXPERIMENTAL

Sementes de seis variedades de feijão nhemba nomeadamente IT82E-18, IT82D-812, Massava-Nhassenje, Namarua, Tete-2, e Timbawene Moteado;

Balança;	Pás;	Polyvinylpoyrrolidone (PVP);
Vasos;	Placas de petri.	Erlenmeyer de 100ml;
Cartuchos;	Tubos de Eppendorf;	2 copos de 100ml;
Tesouras;	Micropipetas;	Balão volumétrico de 500ml;
Marcadores;	Pontas;	Centrifuga;
Contadores;	Luvas;	BSA (Albumina do Soro Bovino) em 1mg/ml em NaOH 3%
Provetas;	Seringa;	
Papel absorvente;	Almofariz;	
Bisturi;	Gelo;	
	Água destilada.	
	Lupa;	
	Quartzo;	

5.2 METODOLOGIA

5.2.1 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Foram enchidos 216 vasos, de cerca de 5 litros de capacidade, com 8.4 kg de solo colhido dentro do campus num local não cultivado (próximo ao campo de futebol, por fora da estufa).

As sementes das seis variedades: IT82E-18, IT82D-812, Massava-Nhassenje, Namarua, Tete-2, e Timbawene Moteado foram fornecidas pelo Banco de Germoplasma do IIAM (Instituto de Investigação Agrária de Moçambique).

A análise do solo usada no experimento (**anexo 1**) foi realizada no Laboratório de Solos da FAEF.

Os 216 vasos foram divididos em 5 grupos. Cada grupo continha as seis variedades agrupadas em dois tratamentos (controlo e stress).

O solo foi regado com 1.4 litros de água de modo a permitir uma distribuição regular da água pelo solo e um vaso adicional foi usado para determinação da capacidade de campo do solo.

Semeou-se 2 sementes em cada vaso (72 de cada variedade) pré-seleccionadas e embebidas em água durante 24 horas em placas de Petri.

Para a germinação e crescimento, os vasos foram regados (com água corrente) de 3 em 3 dias correspondente a 80% da capacidade de campo durante cerca de 4 semanas. Uma planta foi retirada de cada vaso (a menos vigorosa) para evitar a competição. Depois desse período de 4 semanas, as plantas foram submetidas a dois tratamentos: Controlo (água a 80% da capacidade de campo, de 3 em 3 dias) e Stress (até 20% da capacidade de campo, quando o conteúdo volumétrico atingisse cerca de 5% (**anexo 2**), para evitar que se atingisse o ponto de emurchecimento permanente - 3%).

O controlo da irrigação determinado pelos tratamentos foi feito através do método de pesagem e a quantidade de água consumida era repostada de modo a manter cada tratamento com o nível de água do solo previamente estabelecido.

5.2.2 DEPOIS DA SEMENTEIRA

As plantas foram colhidas após cada um dos três ciclos de stress: primeiro (quatro semanas); segundo (sete semanas) e terceiro (dez semanas) (tabela 1) e colocadas em baldes contendo água para evitar a danificação das raízes.

Tabela 1: Plano da colheita semanal de plantas

Depois da sementeira Colheita	Nome da variedade												Total de plantas
	IT82E-18		IT82D-812		Massava-Nhassenj e		Namarua		Teta-2		Timbawene Moteado		
	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	
4	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	72
7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	72
10	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	72

C-controle

S-stress

5.2.2.1 Determinação de Número de Nódulos

Para determinar o número de nódulos foram separados os nódulos das raízes com auxílio de um canivete e contou-se o número de nódulos por planta.

5.2.2.2 Determinação da Fixação de Nitrogénio

Para verificar a fixação de nitrogénio, os nódulos foram cortadas pelo meio com auxílio de um canivete para observação da cor interna. As colorações internas rosadas e avermelhadas indicavam uma fixação de nitrogénio.

5.2.2.3 Extracção e Determinação da Concentração de Proteínas

A – Extracção de proteína

Pesou-se 0.1 g dos nódulos fresco, adicionou-se uma ponta de colher de areia quartzo e triturou-se num almofariz. Em seguida, homogeneizou-se em 1 ml do tampão de extracção (50mM Tris-HCl pH 8.9) contendo 10mM β -mercaptoethanol. Transferiu-se o homogeneizado para um tubo de “Eppendorf” e incubou-se em gelo durante 15 minutos para em seguida centrifugar-se a 5000 rpm durante 30 minutos a 4 °C.

Transferiu-se o sobrenadante para um “Eppendorf” e conservou-se o extracto protéico.

A concentração da proteína foi determinada pelo método de Lowry como descrito a seguir.

B – Determinação da concentração de proteínas

A determinação do conteúdo protéico foi efectuada pelo método de Lowry modificado por Lebendiker (2002), em duplicado, usando albumina do soro bovino (BSA) como padrão.

Este método é usado para estimar a quantidade de proteínas em amostras biológicas. As proteínas são pre-tratadas com ião de cobre em solução alcalina, e a seguir, os aminoácidos aromáticos, contidos na amostra tratada, reduzem o ácido fosfomolibdatefosfotungstico presente no Reagente de Folin. O produto final da reacção é azul.

Para o efeito, preparou-se o reagente D pela mistura dos reagentes B e C (1.0ml cada), à qual foi adicionado o reagente A para completar um volume de 100ml.

Pipetou-se 0.3ml do extracto protéico para um tubo de ensaio e completou-se o volume de 0.5ml com água.

Adicionou-se 2.5 ml do reagente D, agitou-se vigorosamente e deixou-se incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Volvidos os 15 minutos, adicionou-se 0.25 ml do reagente Folin-Fenol e deixou-se ocorrer a reacção durante 30 minutos.

Procedeu-se à leitura da absorvância num espectrofotómetro a 650 nm.

Tema: Análise do Efeito do Stress Hídrico na Formação de Nódulos Radiculares e Fixação de Nitrogénio em seis variedades de Feijão Nhemba (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

A concentração de proteína foi determinada a partir da curva de calibração preparada conforme no anexo 3.

6 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados colhidos nas três colheitas foram analisados com auxílio do pacote estatístico "STATA" versão 10. Fez-se a ANOVA I para a comparação dos dois tratamentos (controle e stress) para seis variedades nas três colheitas, e o nível de significância foi baseado em $p \leq 0.05$. Fez-se o teste de regressão linear para analisar a correlação entre fixação de nitrogénio e o número de nódulos formados no controle e no stress hídrico nas seis variedades de feijão nhemba. Foi considerado como relação muito fraca-0 a 19%, fraca-20 a 39%, moderada- 40 a 69%, forte-70 a 89% e muito forte-90 a 100% (Fowler e Cohen, 1996).

7 RESULTADOS

7.1 Efeito do Stress Hídrico no Número de nódulos

O stress hídrico reduziu significativamente o número de nódulos nas seis variedades de feijão nhemba quando comparadas com as variedades submetidas à óptimas condições de irrigação (Tabela 2).

Nas variedades IT82E-18, IT82D-812 e Namarua o número de nódulos reduziu significativamente em 67%, 69% e 45%, respectivamente (ANOVA I, $p \leq 0.05$) ao longo da experiência no grupo submetido ao stress hídrico quando comparado ao controle (Tabela 2). Na variedade Massava-Nhassenje o número de nódulos reduziu significativamente em 56% e 55%, respectivamente (ANOVA I, $p \leq 0.05$) na quarta e décima semanas após a sementeira no grupo submetido ao stress hídrico quando comparado ao controle. Na variedade Tete-2 o número de nódulos reduziu significativamente em 74% e 26%, respectivamente (ANOVA I, $p \leq 0.05$) na quarta e sétima semanas após a sementeira no grupo submetido ao stress hídrico quando comparado ao controle. Na variedade Timbawene Moteado, o número de nódulos reduziu significativamente em 82% (ANOVA I, $p \leq 0.05$) na sétima semana após a sementeira no grupo controle quando comparado ao stress hídrico.

Nas variedades IT82E-18, IT82D-812 e Massava-Nhassenje houve um aumento significativo (ANOVA I, $p \leq 0.05$) de número de nódulos da quarta a sétima semanas e na décima semana uma redução em condições de stress hídrico enquanto que nas variedades Namarua, Tete-2 e Timbawene Moteado houve um aumento significativo (ANOVA I, $p \leq 0.05$) de número de nódulos ao longo da experiência em condições de stress hídrico.

Tema: Análise do Efeito do Stress Hídrico na Formação de Nódulos Radiculares e Fixação de Nitrogénio em seis variedades de Feijão Nhemba (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

Tabela 2: Efeito de Stress hídrico no número de nódulos das seis variedades de feijão nhemba. Os valores representam a média de seis plantas \pm desvio padrão.

Variedade	Semanas após a sementeira	Número de Nódulos	
		Controle	Stress
IT82E-18	4	10.1a \pm 9.1	1Ab \pm 1.5
	7	36.6a \pm 11.2	16.1Bb \pm 9.4
	10	40.1 a \pm 24.0	13.1Cb \pm 6.6
IT82D-812	4	5.8a \pm 4.9	1.8Ab \pm 2.5
	7	28.5a \pm 16.9	19.1Bb \pm 8.1
	10	39 a \pm 8.3	12.1Cb \pm 8.4
Massava-Nhassenje	4	9.1a \pm 3	4 Ab \pm 4.2
	7	19.6a \pm 9.5	20 Bb \pm 5.5
	10	35.6 a \pm 21.5	16 Cb \pm 7.3
Namarua	4	13.5 \pm 3.7	0 \pm 0
	7	33.3 a \pm 27.8	8.8 Bb \pm 6.5
	10	25.3 a \pm 10.6	14Cb \pm 6.2
Tete-2	4	16.6 a \pm 4.1	4.3Ab \pm 2.8
	7	32.5 a \pm 23.5	20.8b \pm 6.5
	10	18.3 a \pm 13.1	20.6Cb \pm 17.2
Timbawene Moteado	4	8.5 a \pm 6.8	6 Ab \pm 2.1
	7	3.6 a \pm 17.3	20Bb \pm 10
	10	23.8a \pm 10.6	21Cb \pm 2.5

Médias seguidas de letras iguais entre os tratamentos dentro da semana de colheita (letra minúscula) e entre as semanas de colheita dentro da variedade no tratamento stress hídrico (letra maiúscula) não diferem significativamente ao nível de significância $p=0.05$.

7.2 Efeito do Stress Hídrico no Peso fresco dos Nódulos

O stress hídrico reduziu de forma significativa (ANOVA I, $p \leq 0.05$) no peso fresco dos nódulos nas seis variedades de feijão nhemba quando comparadas com as variedades submetidas a óptimas condições de irrigação (Tabela 3).

Nas variedades IT82E-18, Namarua, Tete-2 e Timbawene Moteado verificou-se um aumento progressivo de peso fresco dos nódulos na quarta até a décima semanas sob condições de stress hídrico.

Nas variedades IT82D-812 e Massava-Nhassenje houve um aumento significativo (ANOVA I, $p \leq 0.05$) de peso na quarta a sétima semanas e uma redução na décima semana (Tabela 3) sob condições de stress hídrico.

Tema: Análise do Efeito do Stress Hídrico na Formação de Nódulos Radiculares e Fixação de Nitrogénio em seis variedades de Feijão Nhemba (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

Nas variedades IT82E-18, IT82D-812, Namarua, Tete-2 e Timbawene Moteado o peso fresco de nódulos reduziu de forma significativa (ANOVA I, $p \leq 0.05$) ao longo da experiência no grupo submetido ao stress hídrico quando comparado ao controle.

Na variedade Massava-Nhassenje o peso fresco dos nódulos aumentou de forma significativa na sétima semana e reduziu na quarta e décima semanas no grupo submetido ao condições de stress hídrico quando comparado ao controle.

Tabela 3: Efeito de Stress hídrico no peso fresco dos nódulos das seis variedades de feijão nhemba. Os valores representam a média das seis plantas \pm desvio padrão.

Variedade	Semanas após a sementeira	Peso fresco (g)	
		Controle	Stress
IT82E-18	4	0.021a \pm 0.02	0.003 Ab \pm 0.00
	7	0.442 a \pm 0.11	0.125Bb \pm 0.05
	10	0.641 a \pm 0.20	0.229Cb \pm 0.23
IT82D-812	4	0.019 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00
	7	0.399a \pm 0.28	0.188 Bb \pm 0.12
	10	0.762a \pm 0.38	0.097Cb \pm 0.04
Massava-Nhassenje	4	0.047 a \pm 0.01	0.017Ab \pm 0.02
	7	0.224 a \pm 0.07	0.33B b \pm 0.18
	10	0.748 a \pm 0.45	0.263Cb \pm 0.16
Namarua	4	0.026 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
	7	0.618a \pm 0.47	0.081Bb \pm 0.06
	10	0.851a \pm 0.41	0.191Cb \pm 0.07
Tete-2	4	0.065a \pm 0.02	0.008A b \pm 0.00
	7	0.48 a \pm 0.36	0.182Bb \pm 0.08
	10	0.33 a \pm 0.20	0.20 Cb \pm 0.08
Timbawene Moteado	4	0.031a \pm 0.02	0.027Ab \pm 0.01
	7	0.534a \pm 0.33	0.17 7Bb \pm 0.08
	10	0.412a \pm 0.20	0.33 Cb \pm 0.08

Médias seguidas de letras iguais entre os tratamentos dentro da semana de colheita (letra minúscula) e entre as semanas de colheita dentro da variedade no tratamento stress hídrico (letra maiúscula) não diferem significativamente ao nível de significância $p=0.05$.

7.3 Relação entre o Peso fresco e o Número de Nódulos em Stress Hídrico

Há uma relação entre o peso fresco dos nódulos e o número de nódulos em stress hídrico; a correlação é moderada positiva ($r^2 = 0.5292$) (figura 2).

Tema: Análise do Efeito do Stress Hídrico na Formação de Nódulos Radiculares e Fixação de Nitrogénio em seis variedades de Feijão Nhemba (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

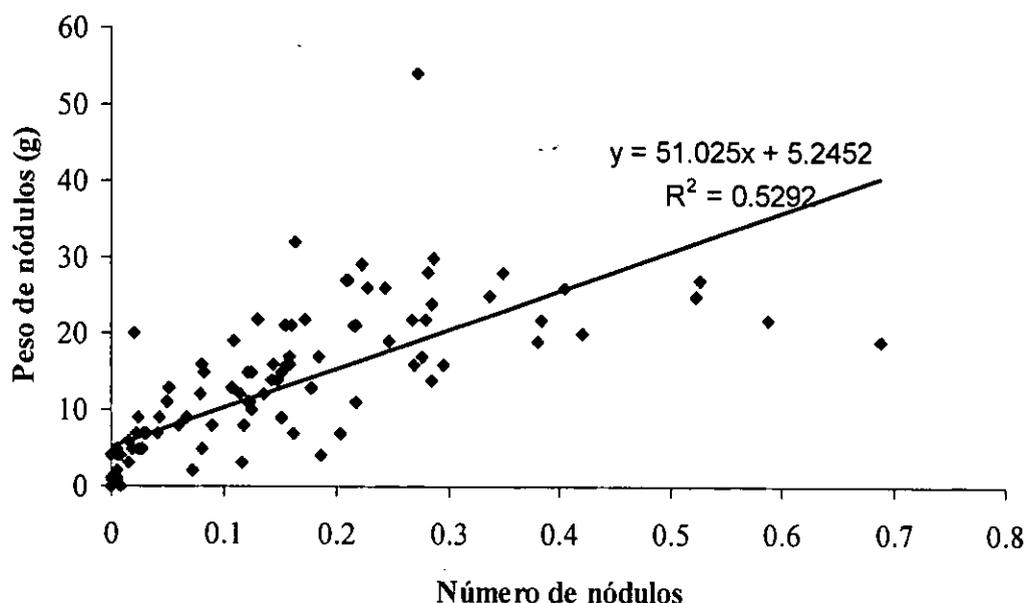


Figura 2. Relação entre o peso fresco e o número de nódulos formados sob condições de stress hídrico

7.4 Efeito do Stress Hídrico na Fixação de Nitrogénio

O stress hídrico afectou significativamente a fixação de nitrogénio nas seis variedades de feijão nhemba quando comparadas com as submetidas a óptimas condições de irrigação (ANOVA I, $p \leq 0.05$) (Tabela 4).

Todas as seis variedades: IT82E-18, IT82D-812, Massava-Nhassenje, Namarua, Tete-2, e Timbawene Moteado, aumentaram a percentagem de fixação de nitrogénio da quarta a sétima semanas e na décima semana a percentagem de fixação de nitrogénio baixou sob condições de stress hídrico.

Nas variedades IT82E-18, IT82D-812 e Tete-2 a fixação de nitrogénio reduziu de forma significativa (ANOVA I, $p \leq 0.05$) ao longo da experiência no grupo sob condições de stress hídrico quando comparado ao controle.

Na variedade Massava-Nhassenje a fixação de nitrogénio na quarta e décima semanas reduziu significativamente (ANOVA I, $p \leq 0.05$) e na sétima semana aumentou de forma significativa no grupo sob condições de stress hídrico quando comparado ao controle.

Tema: Análise do Efeito do Stress Hídrico na Formação de Nódulos Radiculares e Fixação de Nitrogénio em seis variedades de Feijão Nhemba (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

Na variedade Namarua a fixação de nitrogénio reduziu de forma significativa (ANOVA I, $p \leq 0.05$) na quarta semana e aumentou significativamente (ANOVA I, $p \leq 0.05$) na sétima e décima semanas no grupo sob condições de stress hídrico quando comparado ao controle.

Na variedade Timbawene Moteado a fixação de nitrogénio reduziu significativamente (ANOVA I, $p \leq 0.05$) na quarta e sétima semanas e manteve-se na décima semana no grupo sob condições de stress hídrico quando comparado ao controle.

Tabela 4: Efeito de stress hídrico na fixação de nitrogénio das seis variedades de feijão nhemba. Percentagem de nódulos que fixaram nitrogénio nas seis plantas.

Variedade	Semanas após a sementeira	Fixação de nitrogénio (%)	
		Controle	Stress
IT82E-18	4	21	0
	7	96	79
	10	96	75
IT82D-812	4	9	0
	7	100	89
	10	67	49
Massava-Nhassenje	4	40	29
	7	86	100
	10	95	52
Namarua	4	9	0
	7	98	100
	10	47	69
Tete-2	4	32	23
	7	95	84
	10	64	56
Timbawene Moteado	4	37	8
	7	95	87
	10	75	75

7.5 Relação entre a Fixação de Nitrogénio e o Número de Nódulos Formados no Stress Hídrico

A análise da regressão mostrou haver uma relação positiva forte ($r^2 = 0.8153$) entre a fixação de nitrogénio e o número de nódulos formados.

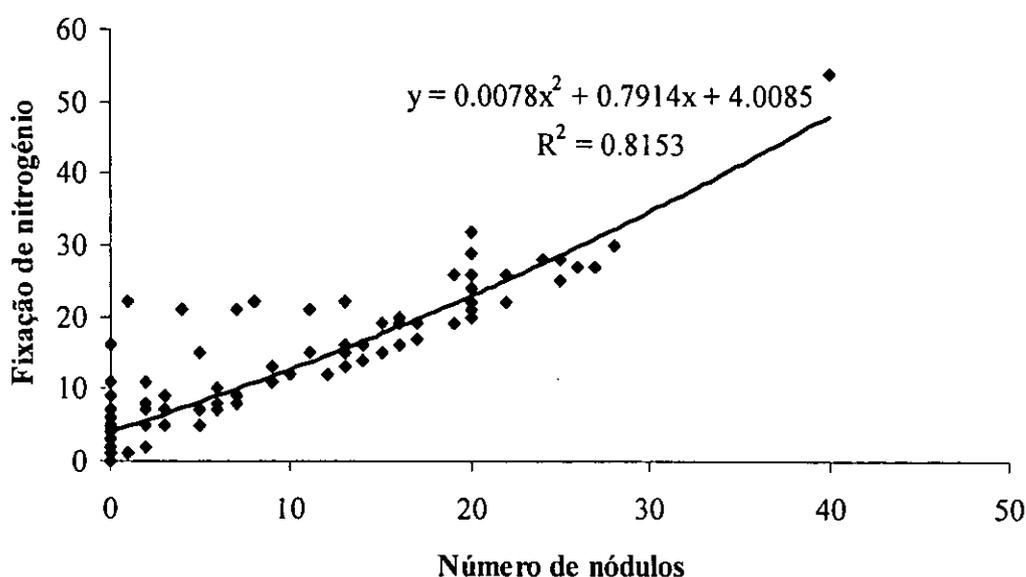


Figura 3. Relação entre a fixação de nitrogénio e o número de nódulos formados no stress hídrico.

7.6 Efeito do Stress Hídrico na Concentração de Proteína

As variedades IT82E-18 e IT82D-812 submetidas ao stress hídrico apresentaram um aumento significativo da concentração de proteína na quarta e sétima semanas (ANOVA, $p \leq 0.05$) e na décima semana houve uma redução de concentração de proteína (Tabela 5).

As variedades Massava-Nhassenje, Namarua, Tete-2, e Timbawene Moteado apresentaram um aumento significativo da concentração de proteína da quarta e décima semanas (ANOVA I, $p \leq 0.05$) sob condições de stress hídrico.

Na variedade IT82E-18 a concentração da proteína reduziu de forma significativa (ANOVA I, $p \leq 0.05$) ao longo da experiência no grupo sob stress hídrico quando comparado ao controle.

Tema: Análise do Efeito do Stress Hídrico na Formação de Nódulos Radiculares e Fixação de Nitrogénio em seis variedades de Feijão Nhemba (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

Na variedade IT82D-812 a concentração da proteína aumentou significativamente (ANOVA I, $p \leq 0.05$) na quarta e sétima semanas e reduziu na décima semana no grupo sob stress hídrico quando comparado ao controle.

Na variedade Massava-Nhassenje a concentração da proteína reduziu de forma significativa (ANOVA I, $p \leq 0.05$) na quarta semana e aumentou significativamente (ANOVA I, $p \leq 0.05$) na sétima e décima semanas no grupo sob stress hídrico quando comparado ao controle.

Nas variedades Namarua, Tete-2, e Timbawene Moteado a concentração de proteína reduziu na quarta e sétima semanas significativamente (ANOVA I, $p \leq 0.05$) e aumentou na décima semana de forma significativa (ANOVA I, $p \leq 0.05$) no grupo sob stress hídrico quando comparado ao controle.

Tabela 5: Efeito de stress hídrico na concentração de proteína (mg.g^{-1} do peso fresco) das seis variedades de feijão nhemba. Os valores representam a média das seis plantas \pm desvio padrão.

Variedade	Semanas após a sementeira	Concentração de proteína	
		Controle	Stress
IT82E-18	4	0.04 a \pm 0.06	0.00 b \pm 0.00
	7	0.73 a \pm 0.11	0.60Bb \pm 0.29
	10	0.84 a \pm 0.12	0.55C b \pm 0.35
IT82D-812	4	0.03 \pm 0.03	0.00b \pm 0.00
	7	0.54a \pm 0.44	0.63Bb \pm 0.56
	10	0.76a \pm 0.10	0.40 Cb \pm 0.50
Massava-Nhassenje	4	0.10a \pm 0.05	0.04Ab \pm 0.07
	7	0.61 a \pm 0.31	0.92Bb \pm 0.18
	10	0.86a \pm 0.48	1.00Cb \pm 0.17
Namarua	4	0.02 a \pm 0.03	0.00b \pm 0.00
	7	0.65a \pm 0.37	0.50Bb \pm 0.40
	10	0.82a \pm 0.13	0.92Cb \pm 0.40
Tete-2	4	0.10 a \pm 0.04	0.00 b \pm 0.02
	7	0.72a \pm 0.44	0.68Bb \pm 0.38
	10	0.63a \pm 0.32	0.78Cb \pm 0.39
Timbawene Moteado	4	0.058a \pm 0.06	0.07Ab \pm 0.06
	7	0.85 a \pm 0.18	0.70Bb \pm 0.44
	10	0.97a \pm 0.20	1.04Cb \pm 0.14

Médias seguidas de letras iguais entre os tratamentos dentro da semana de colheita (letra minúscula) e entre as semanas de colheita dentro da variedade no tratamento stress hídrico (letra maiúscula) não diferem significativamente ao nível de significância $p=0.05$.

8 DISCUSSÃO

No presente estudo o stress hídrico reduziu o número de nódulos formados em todas as variedades do feijão nhemba, comportamento esse já observado por Habish & Mahdi (1976), Summerfield *et al.* (1976) e Summerfield *et al.* (1977).

Segundo Mary *et al.* (1994); Leung & Bottomley (1994), o stress hídrico tem efeito negativo em diferentes etapas do processo de nodulação e na actividade nodular no feijão; baixa a sobrevivência e o crescimento do *Rhizobium* no solo (Saxena & Rewari, 1992).

O stress hídrico tem sido associado a uma maior acumulação de sais nos nódulos a uma aparente influência na resposta da actividade da redução de acetileno e aumentos na pressão de O₂ na rizosfera. Esta baixa resposta ao oxigénio implica um efeito deletério na barreira da difusão de oxigénio nos nódulos (Saxena & Rewari, 1992).

Quando o stress hídrico ocorre durante a fase vegetativa, há uma recuperação total do número de nódulos na fase reprodutiva. No entanto, quando ocorre no estágio reprodutivo, já não se verifica a recuperação do número de nódulos (Saxena & Rewari, 1992).

Neste estudo foi verificado que o número de nódulos era sempre menor nas plantas em stress hídrico do que nas do controlo, como consequência do efeito imediato do stress hídrico que é a limitação da difusão de CO₂ devido ao fechamento dos estomas, agravado pela diminuição da área foliar, conforme observações de Guerin *et al.*, (1990); alterações do metabolismo fotossintético que afectam, em particular, a partição de sacarose e amido Quick *et al.* (1989) e Vasseý & Sharkey (1989).

Após a sementeira, foi observado um aumento do número de nódulos na quarta e sétima semanas para todas as variedades e na décima semana uma redução. A redução do número de nódulos na décima semana pode ser resultante do facto de os nódulos terem começado a entrar em processo de senescência (degradação das proteínas, ácidos nucleicos e membranas) e em seguida decomposição. Resultados similares foram obtidos por Ferreira *et al.* (1994), que descreveram uma crescente formação de nódulos em feijão nhemba nos primeiros 15 dias, ocorrendo uma diminuição aos 56 dias após a emergência como resultado natural da fase reprodutiva. Entretanto, Vargas *et al.* (1994), avaliando a

Tema: Análise do Efeito do Stress Hídrico na Formação de Nódulos Radiculares e Fixação de Nitrogénio em seis variedades de Feijão Nhemba (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

formação de nódulos em feijão vulgar, ervilha e lentilha observaram que os nódulos formaram-se nestas espécies sete dias após a emergência.

Em todas as variedades submetidas ao stress hídrico verificou-se redução do peso fresco dos nódulos quando comparados ao controle. Resultados similares foram obtidos por (Diatloff 1967 citado por Coelho e De Nascimento, 1999) estudando a produção de nódulos em feijão nhemba sob flutuação de humidade, tendo verificado uma ausência de nódulos em condições de excessiva e seca. Este autor observou ainda a perda de nódulos com o decréscimo da humidade, o que foi atribuído, parcialmente, ao mecanismo de remoção dos nódulos que pode ser afectado pela presença de argila ou sua contracção.

Segundo Doku (1970) citado por Coelho e De Nascimento (1999) usando níveis de humidade desde valores mínimos até a capacidade de campo, verificaram que a melhor nodulação ocorria na capacidade de campo, como foi igualmente observado por De Polli *et al.* (1973) citados por Coelho e De Nascimento (1999).

Segundo Dobereiner *at al.* (1966) citado por Coelho e De Nascimento (1999), o peso da matéria seca dos nódulos é o parâmetro mais seguro para se avaliar a eficiência da simbiose. Neste trabalho foi também estudado o peso mas de matéria fresca produzida, tendo sido observado um aumento do peso fresco na quarta e sétima semanas para todas as variedades e na décima semana uma redução. Esta redução de peso pode ter provavelmente resultado da limitação de energia necessária tanto para o crescimento do tecido nodular quanto para a fixação de nitrogénio nos nódulos formados (Coelho e De Nascimento, 1999).

De acordo com Dobereiner (1966), uma vez formados os nódulos, a sua massa aumenta e conseqüentemente a eficiência na fixação de nitrogénio, causando uma correlação positiva entre o peso dos nódulos e a fixação de nitrogénio em leguminosas como foi descrito em feijão nhemba por Wadisirisuk e Weaver (1985). Estes resultados sugerem que as plantas com tamanho maior de nódulos, fixam mais nitrogénio, embora, de acordo com Hansen (1983), essa correlação não seja linear e, portanto, é necessário não só o número de nódulos, mas nódulos grandes com maior eficiência relativa. Esta constatação contrasta com os resultados encontrados neste estudo, pois a variedade Timbawene moteado apresentou baixa fixação de nitrogénio apesar do seu maior peso fresco de

nódulos em relação à variedade Massava-nhassenje que apresentou maior fixação de nitrogénio.

A fixação de nitrogénio é afectada pelo stress hídrico, pois tanto o estabelecimento como a actividade de *Rhizobium* são afectados (Serraje e Sinclair, 1997).

A baixa fixação de nitrogénio nas variedades de feijão nhemba em condições de stress hídrico pode também dever-se à incapacidade de usar de forma efectiva o nitrogénio do solo, dificuldade das raízes em fixar nitrogénio no solo, suplementação limitada de carbono que faz com que o nitrogénio se concentre mais nos tecidos da planta (Osman *et al.*, 1983, Witty *et al.*, 1983).

A fixação de nitrogénio nos nódulos é também afectada pela difusão de oxigénio na parte interna do nódulo, características fisiológicas que podem ser afectadas pela anatomia do nódulo e pela ligação entre a raiz e nódulo (Brown e Walsh, 1994 citados por Tajima *et al.* 2008).

Outra explicação alternativa para a baixa fixação de nitrogénio em stress hídrico é uma redução de carbono por bacterióides (Arrese-Igor *et al.*, 1999 citados por Ladrera *et al.* 2007). A principal fonte de carbono transportado de brotos para nódulos é Sacarose que pode ser hidrolizada pela Sacarose sintase (SS) ou invertase alcalino (AI) e estudos feitos com mutantes de *rug4* em ervilha (*Pisum sativum*) mostraram que a actividade de SS é essencial para o funcionamento dos nódulos (Gordon *et al.* 1999 citados por Ladrera *et al.*, 2007). A baixa actividade de SS resultou numa acumulação de Sacarose e uma concentração reduzida de ácidos orgânicos, principalmente malato, em nódulos de ervilha (Gálvez *et al.* 2005 citados por Ladrera *et al.* 2007), causando uma escassez de substrato para a respiração de bacterióides. Este facto resulta por uma acumulação passageira de oxigénio na região infectada, e conseqüente fechamento da barreira de difusão de oxigénio causando baixa fixação de nitrogénio (González *et al.* 2001 citados por Ladrera *et al.*, 2007).

Há dois mecanismos principais envolvidos na baixa fixação de nitrogénio no feijão vulgar e soja em condições stress hídrico: (1) uma influência negativa de transporte, conduzindo à uma acumulação de ureídeos em nódulos, (2) uma influência negativa de fluxo de carbono metabólico nos nódulos, resultando numa escassez de substrato de carbono para bacterióides (Ladrera *et al.*, 2007).

Segundo Serraje e Sinclair (2003) citando Vadez *et al.* (2000) pode haver duas possíveis origens da actividade de nódulo: (1) uma avaliação directa dentro do nódulo da acumulação de combinações de nitrogénio, presumivelmente ureídeos que falham ser exportados pelo xilema; e (2) uma avaliação indirecta das folhas, com várias combinações de prováveis candidatos inclusive asparagina (Asn) e ureídeos.

A baixa fixação de nitrogénio em stress hídrico pode estar relacionada com modificações nas actividades das enzimas como sacarose sintase e desidrogenase isocitrato e o conteúdo de malato nodular (Marino *et al.*, 2007).

A actividade de nitrogenase é afectada por: escassez de carbono, limitação de oxigénio, ou regulação de avaliação por acumulação de nitrogénio (Serraje *et al.*, 1999).

Os resultados de Sprent (1972) indicam que o estabelecimento e o funcionamento do *Rhizobium* em leguminosas são mais sensíveis ao stress hídrico em relação à outros processos da planta. Sinclair (1986) reportou que há uma variabilidade genética na sensibilidade de fixação de nitrogénio no stress hídrico no feijão nhemba.

A síntese de sacarose é essencial para a fixação de nitrogénio (Gordon *et al.*, 2002). Se a sua actividade for reduzida como resultado de mecanismos reguladores em resposta ao stress hídrico ou mudança nutricional. Estes processos podem afectar as funções dos nódulos como foi reportado no feijão-soja (Gordon *et al.*, 2002).

Todas as variedades que apresentaram maior fixação de nitrogénio em condições de stress hídrico apresentaram também maior concentração de proteína, o que é sustentado por Wadisirisuk e Weaver (1985), que referiram que as plantas com maior número de nódulos, fixam mais nitrogénio e apresentam maior concentração da proteína.

As variedades Namarua e Massava-nhassenje foram as que apresentaram uma elevada concentração de proteínas em condições de stress hídrico apesar de terem apresentado baixo número de nódulos. Este fenómeno pode ter sido originado pela activação de um grupo de genes que tem sido considerado como de adaptação ao stress hídrico. Estes genes codificam as proteínas hidrofóbicas denominadas LEA ("late embryogenesis abundant") envolvidas em várias respostas às condições hiperosmóticas (Dure, 1993).

Tema: Análise do Efeito do Stress Hídrico na Formação de Nódulos Radiculares e Fixação de Nitrogénio em seis variedades de Feijão Nhamba (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

As proteínas LEA têm como função a obtenção de iões (Bray, 1997; Dure, 1993; Zhu *et al.*, 1997), conservação de água para minimizar a perda de água, a estabilização de proteínas e a protecção de membranas (Close, 1997).

As evidências para este tipo de função derivaram dos perfis de expressão fortes, que exibem um carácter de moléculas protectoras e que permitem que as células sobrevivam à um stress hídrico no protoplasma (Ingram e Barteles, 1996).

Por outro lado as aquaporinas que são proteínas relacionadas com o controle dinâmico da permeabilidade da água na planta, células e órgãos, também ocorrem durante o desenvolvimento e em resposta ao stress hídrico. Tyerman *et al.* (2002) indicaram que elas facilitam a osmose, dando forma a poros de água - específicos como uma alternativa para realizar difusão através da bicamada lipídica, aumentando assim a permeabilidade de água na membrana (Schaffner, 1998; Kjellbom *et al.*, 1999).

9 CONCLUSÃO

- O stress hídrico não impediu a formação de nódulos nas seis variedades, sendo as variedades Timbawene Moteado e Tete-2 as que formaram maior número de nódulos.
- O stress hídrico reduziu a fixação de nitrogénio nas seis variedades, sendo a variedade Massava-Nhassenje a que apresentou maior fixação de nitrogénio.
- O stress hídrico reduziu a concentração de proteínas nas seis variedades, sendo as variedades Namarua e Massava-Nhassenje as que apresentaram maior concentração de proteínas.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Araújo, J. P. P e Watt, E. E. (1988) O caupi no Brasil. Brasília, IITA/Embrapa. 722pp.

Bolnet, H.J.e Jensen, S. (1996). Strategies for Engineering Water-Stress Tolerance in Plants. *Trends in Biotechnenology*, vol.14, 89-97pp.

Bray, E.A. (1997). Plant Responses to Water Deficit. *Trends Plant Science*, vol.2, 48-54pp.

Brown SM, Walsh KB. (1994). Anatomy of the legume nodule cortex with respect to nodule permeability. *Australian Journal of Plant Physiology* vol.21:49-68pp.

Close, T.J. (1997). Dehydrins: A Commonalty in the Response of Plants to Dehydration and Low Temperature. *Physiologia Plantarum*, vol.100, 291-296pp.

Coelho, K.J.F e De Nascimento R.(1999) Nodulação de Caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) Submetido ao Défice Hídrico Crescente no Solo. *Agropecuária Técnica*.vol.20 n.2 58-67pp.

Costa, J.V.T, Júnior, M.A.L, Ferreira, R.L.C, Stamford, N.P, Araújo, F.A.S, (2006) Desenvolvimento de Nódulos e Plantas de Feijão Nhemba (*Vigna unguiculata*) por Métodos Descritivos e não Descritivos.Pro-reitoria de pesquisa e pós-graduação. Federal Rural do Semi Árido (UFERSA) Brasil vol.19 nr. 4 350-359pp.

Da Silva, V.N, Da silva, L.D.S.F, Figueiredo, M.V.B, Carvalho, F.G, da silva, M.L.R.B e Da silva, A.J.N.(2007) Caracterização e Seleção de Populações Nativas de Rizobios de Solo da Região Semi Árida de Pernambuco. Pesquisa Agropec Trop, *Journal of Agricultural Science*. 37(1): 16-21pp.

Dobereiner, J. (1966) Evaluation of Nitrogen Fixation in Legumes by the Regression of Total Plants Nitrogen With Nodule Weight. *Nature* vol. 210. 850-852pp.

Tema: Análise do Efeito do Stress Hídrico na Formação de Nódulos Radiculares e Fixação de Nitrogénio em seis variedades de Feijão Nhemba (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

Dure, L. (1993). Structural Motifs in LEA proteins: Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress. *American Society of Plant Physiologists*, 91-103pp.

Ferreira, F.R.R. (2005) Efeito de Diferentes Níveis de Défice Hídrico Sobre o Rendimento das Culturas de Amendoim, Feijão nhemba e Milho em Cultivo Puro e Consociação. Tese de Licenciatura em Agronomia, orientação em Engenharia Rural. Universidade Eduardo Mondlane. Maputo. Moçambique. 61pp.

Ferreira, L.G.R, Mendes, P.F e Albuquerque, I.M.(1994) Fixação Simbiótica em *Vigna unguiculata* em Função do Défice Hídrico. *Ciências Agronómicas Brasil*. 16-23pp.

Fowler, J e Cohen, L.(1996) Practical Statistics for Field Biology. New York. 227pp.

Gordon, A.J; Skøt, L; James, C.L. e Minchin, F.R. (2002). Short-term Metabolic Responses of Soybean Root Nodules to Nitrate. *Journal of Experimental Botany* Vol. 53, No. 368, 423-428pp.

Guerin, V., J. C. Trinchant & J. Riguid (1990). Nitrogen Fixation (C₂H₂ reduction) by Broad Bean M.C12 fg.Og. L.) Nodules and Bacteroids Under Waterrestricted Conditions. *Plant Physiol*. 92 :. 595-601pp.

Habish, H.A. & A.A. Mahdi. (1976) Effect of soil Moisture on Nodulation of Cowpea and Hyacinth Bean. *J. Agric. Sci. Camb*. 86 : 553-560pp.

Hansen, A.P (1983) Respiration and Nitrogen Fixation of Hydroponically Cultured Phaseolus vulgaris L. and Supernodulation Mutante. *Growth, Mineral Composition and Effect of Sink Removal*. *Plant*, vol.189, 538-545pp.

Heemesker, W. Simango, Jr. Leonardo, A (1988) resultados de investigação de feijão nhemba (*Vigna unguiculata*). Documento de campo nº 2 INIA. Maputo

Tema: Análise do Efeito do Stress Hídrico na Formação de Nódulos Radiculares e Fixação de Nitrogénio em seis variedades de Feijão Nhemba (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

Ingram, J. e Barteles, D. (1996). The Molecular Basis of Dehydration Tolerance in Plants. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, vol.47, 377-403pp.

INE (2003). Censo Agro-Pecuário 1999-2000. 2pp

Italia, F.C.M. (1992) Densidade Óptima de Feijão nhemha (*Vigna unguiculata*) Walp em Cultivo Puro e Consociado Com o Milho. Tese de Licenciatura em Agronomia. Opção: Produção e Protecção Vegetal. Universidade Eduardo Mondlane- Maputo. Moçambique. 44pp.

Kjellbom, P.; Larsson, C.; Johansson, I.; Karlsson, M. e Johanson, U. (1999). Aquaporins And Water Homeostasis in Plants. *Trends in Plant Science*, vol.25, 308-314pp.

Ladrera, R.; Marino, D; Larrainzar, E; González, M; e Arrese-Igor, C. (2007) Reduced Carbon Availability to Bacteroids and Elevated Ureídeos in Nodules, But Not in Shoots, Are Involved in the Nitrogen Fixation Response to Early Drought in Soybean *Plant Physiology* 145:539-546pp.

Lebendiker, M. (2002). The Protein Purification Facility. *protocol Online*. http://www.protocol-online.org/cgi-bin/prot/view_cache.cgi?ID=3268. Acessado em 09/08/08

Leite, M.L.; Rodrigues, J.D.; Mischán, M.M.; Virgens, J.S. (1999) Efeitos do Déficit Hídrico sobre a Cultura do caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. *Rev. de Agricultura*. Piracicaba, vol.74, n.3, 351-370pp

Leung, K. e Bottomley, P.J. (1994). Growth and Nodulation Characteristics of Subclover (*Trifolium subterraneum* L.) and *Rhizobium leguminosarum* bv. Trifolii at Different Water Potentials. *Soil and Biology Biochemistry*, Oxford, vol.26, 805-812pp.

Libombo, M. (1990) A Importância dos Trips no Feijão Nhemba na Província de Maputo. Trabalho de Diploma. Universidade Eduardo Mondlane. Moçambique. 63pp

Tema: Análise do Efeito do Stress Hídrico na Formação de Nódulos Radiculares e Fixação de Nitrogénio em seis variedades de Feijão Nhamba (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

Medeiros, J.S. Araújo, F.F. (1997) Efeito de Extracto Radicular Sobre a Nodulação da *Vigna unguiculata* Departamento de Biologia, área de Genética, curso de Agronomia. Brasília 27(4):581-587pp.

Marin, V.A, Baldani, V.L, Teixeira, K.R.S, Baldani, J. I (1997) Fixação Biológica de Nitrogénio: Bactérias Fixadoras de Nitrogénio de Importância para a Agricultura Tropical *Embrapa Agrobiologia*, Rio de Janeiro, Brasil. 34pp.

Marino, D; Frendo, P; Ladrera, R; Zabalza, A; Puppo, A; Arrese-Igor, C e González, E.M (2007) Nitrogen Fixation Control under Drought Stress. Localized or Systemic. *Plant Physiology*. 143:1968-1974pp.

Mary, P.; Dupuy, N.; Dohlhem-Biremon, C.; Defives, C.e Tailliez, R. (1994). Differences Among *Rhizobium meliloti* and *Bradyrhizobium japonicum* Strains in Tolerance to Desiccation and Storage at Different Relative Humidities. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, vol.26, 1125-1132pp.

Morgano, L. B;Martins, L. M. V; Xavier, G. R.e Rumjanek, N. G (2006) Avaliação do Potencial de Estirpe de Rizóbio em Fixar Nitrogénio Associadas ao Feijão-Caupi em Petrolina. Universidade Estadual de Brasília. 4pp.

Osman, A. K., J. C. Wynne, G. H. Elkan, and T. J. Schneeweis, (1983): Effect of removal on symbiotic nitrogen fixation in peanut. *Peanut Sci.* vol.10, 107-110pp.

Quick, P.; Siegel G.; Neuhaus; Feil R. & Stritt M. (1989) Shor1-term water stress LEAdS to a stimulation of sucrose synthesis by activating sucrose phosphatesynthase. *Planta* 177:535-546pp.

Rebah, F.B. Prévost, Yezza, D.A. e Tyagi, R.D. (2006) Agro-Industrial Waste Materials and Wastewater Sludge for Rhizobial Inoculant Production: A review Vol.98, Issue 18, 3535-3546pp

Tema: Análise do Efeito do Stress Hídrico na Formação de Nódulos Radiculares e Fixação de Nitrogénio em seis variedades de Feijão Nhemba (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

Rulkens, T., (1996). Apontamentos de Disciplina de Produção Vegetal I. Feijões. Universidade Eduardo Mndlane.

Sambrook, J; Fritch, E.F; Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning a Laboratory Manual. New York, 2º edicao. USA. Cold Spring Harbor Laboratory. Protocolo. 472pp

Saxena, A.K.e Reweri, R.B. (1992). Differential Response of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) – *Rhizobium* Combinations to Saline Soil Conditions. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, vol. 13, 31-34pp.

Schaffner, A.R. (1998). Aquaporin Aunction, Structure, and Expression: Are There More Surprises to Surface in Water Relations? *Planta*, vol.25, 131-139pp.

Segeren, P. (1994) Pragas, Doenças, e Ervas Daninhas nas Culturas Alimentares em Moçambique, INIA.

Serraje, R. e Sinclair, T,R, (1997). Variation Among Soybean Cultivars in Dinitrogen Fixation Response to Drought. *Agronomy journal*, Madison, v 89, n.6, 963-969pp.

Serraje, R; Sinclair,T e Purcell, l (1999) Symbiotic N2 Fixation Response to Drought *Journal of Experimental Botany*, Vol 50, n.331,143-155pp.

Serraje, R. e Sinclair, T. R (2003) Evidence that Carbon Dioxide Enrichment Alleviates Ureideos-induced Decline of Nodule Nitrogenase Activity. *Annals of Botany*. Vol91. n.1. 85-89pp.

Silveira, A.P.D e Freitas, S.S. (2007) Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental Instituto Agronómico Secretaria de Agricultura e Abastecimento, Governo do Estado de São Paulo; Brasil. 312pp.

Tema: Análise do Efeito do Stress Hídrico na Formação de Nódulos Radiculares e Fixação de Nitrogénio em seis variedades de Feijão Nhamba (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

Sinclair, T.R., 1986. Water and nitrogen limitations in soybean grain production. Model development. *Field Crops Res.*, vol15: 125-141pp.

Sitoe, T. A. (2005). Agricultura Familiar em Moçambique- Estratégias de Desenvolvimento Sustentável. Disponível em: <http://www.sarpn.org.za/>. Acesso em: 26/05/08. 32pp.

Sprent, J.I., 1972. The effects of water stress on nitrogen fixing root nodules. *New Phytol.* Vol.71: 451-460pp.

Summerfiel, R.J.; Pate, J.S.; Roberts, E.H.; Wien, H.C. (1985) Cowpea Research, Production and Utilization. The Physiology Cowpea. 66-101pp.

Summerfield, R.J., P. A. Huxley, P. J. Dart & A.P. Hughes(1976). Some Effects of Environmental Stress on Seed Yield of Cowpea M9!15! unQuiculata (L.) Walp) CV. Prima. *Plant and Soil*, 44: 527-546pp.

Summerfield, R.J., Dart, P. J., Huxley, P.A., Eaglesham, A. R. J., Minchin, F. R. & Day, J. M. (1977) Nitrogen Nutrition of Cowpea (*Vigna unguiculata*) Effects of Applied Nitrogen and Symbiotic Nitrogen Fixation on Growth and Seed Yield. *Experimental Agric.*13, 129-142pp.

Tajima, R; Abe, J; New Lee, O; Morita, S e Lux, A.(2008). Developmental Changes in Peanut Root Structure During Root Growth and Root-structure Modification by Nodulation. *Annals of Botany*. Vol.1001 n. 4. 491-499pp.

Tavares, D.B; Cunha, J.C. e Sousa, C.A. (2005) Influência de Estirpes de Rizóbios de Leguminosas Tropicais em *Crotalaria spectabilis* cultivadas em Solos Ácidos da Zona da Mata. Universidade Federal Rural de Pernambuco-Brasil. 4pp.

Turk, K.J.; Hall, A.E. (1980) Influence of Droughth on Plant Growth and Relations with Seed Yield. *Agonomy Journal*, Droughth Adaptation of Cowpea. III. vol.72: 428-433pp.

Tema: Análise do Efeito do Stress Hídrico na Formação de Nódulos Radiculares e Fixação de Nitrogénio em seis variedades de Feijão Nhembá (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

Tyerman S.D.; Niemietz C.M.e Bramley H. (2002). Plant Aquaporins: Multifunctional Water and Solute Channels With Expanding Roles. *Plant, Cell and Environment*, vol.25, 173-194pp.

Vargas, M.A.T; Suhet, A.R; Mendes, I.C e Peres, J.R.R (1994) fixação Biológica de Nitrogénio em Solos Cerrados. *Embrapa*. 83pp.

Vassey, T.L. & Sharkey, T.D (1989). Mild Water Stress of Phaseolus Vulgaris Plants LEAdS to Reduced Starch Synthesis and Extractable Sucrose Phosphate Synthase Activity. *Plant Physiol*. 89:1066-1070pp.

Wadisirisuk, P e Weaver, R.W (1985) Importance of Bacteroid Number in Nodules and Effective Nodule Mass to Dinitrogen Fixation by Cowpeas. *Plant and soil*, vol. 87 223-231pp.

Witty, J. F., F. R. Minchin, and J. E. Sheehy, (1983): Carbon costs of nitrogenase activity in legume root determined using acetylene and oxygen. *J. Exp. Bot.* Vol.34, 951–963pp

Ziska, L.H.; Hall, A.E. (1982) Seed Yields and Water use of Cowpeas [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] Subjected to Planned-water Deficit Irrigation. *Irrigation Science*, vol.3: 1-9pp.

Zilli, J.E. Valicheski, R.R. Rumjanek; N.G. Araújo; J.L.S.Filho; F.R.F. Neves, M.C.P. (2006) Symbiotic Efficiency of Cowpea Bradyrhizobium Strains in Cerrado Soils. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília. vol.41 no.5

Zhu, J.K.; Hasegawa, P.M. e Bressan, R.A. (1997). Molecular Aspects of Osmotic Stress in Plants. *Critical Review of Plant Science*, vol.16, 253–277pp.

Internet:

<http://www.uem.mz> consultado no dia 23 de Maio de 2008

ANEXOS

10 ANEXO

Anexo 1

Tabela 1. Características físico-químicas do solo usado na experiência.

Parâmetro (unidade)	valor	
Areia (%)	93.20	
Argila (%)	5.30	
Lodo (%)	1.40	
pH (H ₂ O)	6.60	
pH (KCl)	5.60	
Condutividade eléctrica (ms/cm)	0.03	
Fósforo-bray (mg/100g)	0.29	
N total (%)	0.02	
Carbono (%)	0.20	
Matéria orgânica (%)	0.35	
Capacidade de troca catiónica (meq/100g)	Ca ²⁺	0.40
	Mg ²⁺	0.60
	K ⁺	0.08
	Na ⁺	0.02

Anexo 2

Determinação do conteúdo volumétrico da água no solo

O conteúdo volumétrico da água é igual à diferença entre a capacidade do campo e o ponto de emurchecimento permanente.

Capacidade do campo

É definido como o conteúdo de água saturado no solo em suas localizações naturais, após a água gravitacional passar através dele (Larcher, 1986, citado por Messa, 2005).

A capacidade de campo do solo usado foi determinada como a seguir:

Colocou-se o vaso vazio e calibrou-se a balança.

Encheu-se o vaso com solo e pesou-se (peso 2).

Adicionou-se água ao solo contido no vaso deixando a água escorrer e voltou-se a pesar (peso 3).

Finalmente, calculou-se a diferença (peso3- peso2).

Ponto de emurchecimento

É o ponto em que as plantas, mesmo a noite ou protegidas da evaporação, não recuperam mais, devido a seca que sofreram (Larcher, 1986, citado por Messa, 2005).

Para a determinação do ponto de emurchecimento permanente, primeiro semeou-se uma planta no vaso.

Determinou-se o peso do vaso mais a irrigação suficiente das planta, deixou-se crescer durante algum tempo.

Voltou a se deitar água quando a planta murchou e deixou-se crescer a planta sem deitar água até murchar e assim sucessivamente.

Quando murchou definitivamente obteve-se o ponto de emurchecimento permanente.

Resultado: conteúdo volumétrico da água = 1.391 litro

Anexo 3

Preparação da curva de calibração para determinação da concentração protéica

A curva padrão foi obtida a partir de quantidades conhecidas de albumina do soro bovino (BSA) a uma concentração de 1 mg/ml, em duplicado.

Em 6 tubos de ensaio foram pipetados os seguintes volumes de BSA: 0.0; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5ml e preencheu-se de 0.5ml para cada tubo com água

Em cada tubo, adicionou-se 2.5 ml do reagente D, agitou-se vigorosamente e deixou-se incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Adicionou-se 0.25 ml do reagente Folin-Fenol e deixou-se ocorrer a reacção durante 30 minutos.

Procedeu-se a leitura da absorvância num espectrofotômetro a 650 nm utilizando como branco o tubo 1 (0.0 ml de BSA).

Anexo 4: Valores de ANOVA I de número de nódulos das seis variedades sob stress hídrico.

Variedade IT82E-18

Number of obs = 18 Root MSE = 6.71152 R-squared= 0.5340 Adj R-squared = 0.4718

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob
Model	774.111111	2	387.055556	8.59	0.0033
semana	774.111111	2	387.055556	8.59	0.0033
Residual	675.666667	15	45.0444444		
Total	1449.77778	17	85.2810458		

Variedade IT82D-812

Number of obs =18 R-squared = 0.5595 Root MSE = 6.92098 Adj R-squared = 0.5007

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob
Model	912.444444	2	456.222222	9.52	0.0021
semana	912.444444	2	456.222222	9.52	0.0021
Residual	718.5	15	47.9		
Total	1630.94444	17	95.9379085		

Variedade Massava-Nhassenje

Number of obs =18 R-squared = 7.5294 Root MSE = 4.87650 Adj R-squared = 0.4001

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob
Model	814.666666	3	296.444444	7.32	0.0003
semana	814.666666	3	296.444444	7.32	0.0003
Residual	615.5	16	61.9		
Total	1730.966666	15	81.9877565		

Variedade Namarua

Number of obs = 18 Root MSE = 5.7665 R-squared= 0.4810 Adj R-squared = 0.3951

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob
Model	633.111111	3	564.034332	7.39	0.0032
semana	633.111111	3	564.034332	7.39	0.0032
Residual	357.555553	12	23.0333333		
Total	1229.88887	17	54.3567890		

Variedade Tete-2

Number of obs = 18 R-squared = 0.3345 Root MSE = 5.98764 Adj R-squared = 0.2007

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob
Model	923.666666	4	976.777777	4.22	0.0012
semana	923.666666	4	976.777777	4.22	0.0012
Residual	724.5	13	38.7		
Total	1872.86666	65	95.9876543		

Variedade Timbawene Moteado

Number of obs = 18 Root MSE = 6.34567 R-squared = 4.3567 Adj R-squared = 4.2345

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob
Model	567.555555	5	566.234567	7.39	0.0022
semana	567.555555	5	566.234567	7.39	0.0022
Residual	976.333337	15	45.021212		
Total	1449.77778	17	85.3456783		

Valores de ANOVA I de número de nódulos das seis variedades sob stress hídrico quando comparados ao controle.

Variedade IT82E-18

Number of obs = 36 R-squared = 0.2852 Root MSE = 16.2007 Adj R-squared = 0.2642

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob
Model	3560.11111	1	3560.11111	13.56	0.0008
tratamento	3560.11111	1	3560.11111	13.56	0.0008
Residual	8923.77778	34	262.464052		
Total	12483.8889	35	356.68254		

Variedade IT82D-812

Number of obs = 36 R-squared = 0.1877 Root MSE = 14.3295 Adj R-squared = 0.1638

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob
Model	1613.36111	1	1613.36111	7.86	0.0083
tratamento	1613.36111	1	1613.36111	7.86	0.0083
Residual	6981.38889	34	205.334967		
Total	8594.75	35	245.564286		

Anexo 5: Valores de ANOVA I de peso fresco de nódulos das seis variedades sob stress hídrico.

Variedade IT82E-18

Number of obs = 18 R-squared = 0.1491					
Root MSE = .280098 Adj R-squared = 0.1452					
Source	Partial SS	df	MS	F	Prob
Model	2.94280062	1	2.94280062	37.51	0.0000
semanal	2.94280062	1	2.94280062	37.51	0.0000
Residual	16.7893506	214	.078454909		
Total	19.7321512	215	.091777448		

Variedade IT82D-812

Number of obs = 18 R-squared = 0.5645					
Root MSE = 11.0877 Adj R-squared = 0.27772					
Source	Partial SS	df	MS	F	Prob
Model	1078.11111	2	539.022226	3.67	0.0232
semana	1078.11111	2	539.022226	3.67	0.0232
Residual	8737.5	15	765.833333		
Total	2655.61111	17	167.5678763		

Variedade Massava-Nhassenje

Number of obs = 18 R-squared = 0.3829					
Root MSE = 10.7626 Adj R-squared = 0.3006					
Source	Partial SS	df	MS	F	Prob
Model	1078.11111	2	539.055556	4.65	0.0268
semana	1078.11111	2	539.055556	4.65	0.0268
Residual	1737.5	15	115.833333		
Total	2815.61111	17	165.624183		

Variedade Namarua

Number of obs = 18 R-squared = 0.5436					
Root MSE = 9.23456 Adj R-squared = 0.6231					
Source	Partial SS	df	MS	F	Prob
Model	622	4	643	20.92	0.0083
semana	622	4	643	20.92	0.0083
Residual	654	16	34.5678678		
Total	1567	16	24.2345678		

Variedade Tete-2

Number of obs = 18 R-squared = 0.3829					
Root MSE = 10.7626 Adj R-squared = 0.3006					
Source	Partial SS	df	MS	F	Prob
Model	1124.22224	5	534.122223	2.81	0.0091
semana	1124.22224	5	534.122223	2.81	0.0091
Residual	1522.5	13	115.833333		
Total	1531.65555	17	165.624183		

Variedade Timbawene Moteado

Number of obs = 18 R-squared = 0.5886					
Root MSE = 6.27163 Adj R-squared = 0.5337					
Source	Partial SS	df	MS	F	Prob
Model	844	2	422	10.73	0.0013
semana	844	2	422	10.73	0.0013
Residual	590	15	39.3333333		
Total	1434	17	84.3529412		

Anexo 6: Valores de ANOVA I de fixação de nitrogénio das seis variedades sob stress hídrico.

Variedade IT82E-18

Number of obs = 18 R-squared = 0.3456					
Root MSE = 3.07665 Adj R-squared = 0.3452					
Source	Partial SS	df	MS	F	Prob
Model	652.645645	3	645.634344	4.34	0.0057
semana	652.645645	3	645.634344	4.34	0.0057
Residual	130.875686	15	34.734567		
Total	652.98231	19	87.1324254		

Variedade IT82D-812

Number of obs = 18 R-squared = 0.6362					
Root MSE = 5.89256 Adj R-squared = 0.5877					
Source	Partial SS	df	MS	F	Prob
Model	910.777778	2	455.388889	13.12	0.0005
semana	910.777778	2	455.388889	13.12	0.0005
Residual	520.833333	15	34.7222222		
Total	1431.61111	17	84.2124183		

Variedade Massava-Nhassenje

Number of obs = 18 Root MSE = 3.76543 R-squared = 0.6534 Adj R-squared = 0.5638

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob
Model	774.111111	2	387.055556	8.59	0.079
semana	774.111111	2	387.055556	8.59	0.079
Residual	675.666667	15	45.0444444		
Total	1449.77778	17	85.2810458		

Variedade Namarua

Number of obs = 18 R-squared = 0.4614

Root MSE = 5.28415 Adj R-squared = 0.3896

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob
Model	358.777778	2	179.388889	6.42	0.0037
semana	358.777778	2	179.388889	6.42	0.0037
Residual	418.833333	15	27.9222222		
Total	777.611111	17	45.7418301		

Variedade Tete-2

Number of obs = 18 R-squared = 0.7656

Root MSE = 6.56343 Adj R-squared = 0.7007

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob
Model	6534	23	765	6.02	0.0083
semana	6534	23	765	6.02	0.0083
Residual	5337	13	41.7564763		
Total	3487	64	75.9857665		

Variedade Timbawene Moteado**Variedade Tete-2**

Number of obs = 18 R-squared = 0.5346

Root MSE = 6.6523 Adj R-squared = 0.5322

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob
Model	8642	14	123.4566	8.45	0.0104
semana	8642	14	123.4566	8.45	0.0104
Residual	8742	16	92.0876533		
Total	87766	28	13.1320987		

Anexo 7: Valores de ANOVA I de concentração de proteína das seis variedades sob stress hídrico.

Variedade IT82E-18

Number of obs = 18 R-squared = 0.4897					
Root MSE = .304492 Adj R-squared = 0.4217					
Source	Partial SS	df	MS	F	Prob
Model	1.33476302	2	.667381511	7.20	0.0064
semana	1.33476302	2	.667381511	7.20	0.0064
Residual	1.3907313	15	.09271542		
Total	2.72549432	17	.160323195		

Variedade IT82D-812

Number of obs = 18 R-squared = 0.6345					
Root MSE = 5.35464 Adj R-squared = 0.6347					
Source	Partial SS	df	MS	F	Prob
Model	234.9477774	9	157.5678976	6.93	0.00233
semana	234.9477774	9	157.5678976	6.93	0.00233
Residual	871.8644324	19	27.97776557		
Total	765.39876	17	54.567876523		

Variedade Massava-Nhassenje

Number of obs = 18 R-squared = 0.9056					
Root MSE = .153595 Adj R-squared = 0.8930					
Source	Partial SS	df	MS	F	Prob
Model	3.39301068	2	1.69650534	71.91	0.0000
semana	3.39301068	2	1.69650534	71.91	0.0000
Residual	.353872666	15	.023591511		
Total	3.74688334	17	.220404902		

Variedade Namarua

Number of obs = 18 R-squared = 0.4456					
Root MSE = 5.34567 Adj R-squared = 0.4567					
Source	Partial SS	df	MS	F	Prob
Model	230.555558	2	424.333339	11.12	0.00052
semana	230.555558	2	424.333339	11.12	0.00052
Residual	520.833333	15	34.7222222		
Total	1563.677779	19	56.3456789		

Variedade Tete-2

Number of obs =	18	R-squared =	0.5678		
Root MSE	= 5.23456	Adj R-squared =	0.3456		
Source	Partial SS	df	MS	F	Prob
Model	543.9999996	8	231.5678904	7.34	0.00142
semana	543.9999996	8	231.5678904	7.34	0.00142
Residual	987.567899	13	27.9876547		
Total	765.349999	13	43.567890		

Variedade Timbawene Moteado

Number of obs =	18	R-squared =	0.3456		
Root MSE	= 5.87654	Adj R-squared =	0.3567		
Source	Partial SS	df	MS	F	Prob
Model	234.888884	4	189.3565656	6.53	0.0073
semana	234.888884	4	189.3565656	6.53	0.0073
Residual	871.864444	19	27.9777777		
Total	544.349999	17	54.567890		