

VARIABILIDADE GENÉTICA DA SIMBIOSE *Centrosema-Rhizobium*¹

ARYNO SERPA* e HELVÉCIO DE-POLLI*

SINOPSE.- Foi realizado em Itaguaí, RJ, um estudo em casa de vegetação, utilizando onze materiais de *Centrosema* sp. e três estirpes de *Rhizobium* sp., no sentido de selecionar combinações de maior eficiência quanto à fixação do N₂ atmosférico. Dos materiais testados, cinco eram filhas de duas plantas F₂, resultantes do cruzamento de linhagens de *C. pubescens*, três eram plantas F₂ do cruzamento interespecífico de *C. pubescens* x *C. virginianum*, e os demais eram a linhagem IPEACS 5.1/64, um cultivar australiano e o material original do trabalho de melhoramento (cultivar Deodoro).

Houve diferenças estatisticamente significativas, entre genótipos e entre estirpes, quanto ao número de nódulos, peso seco das plantas, peso seco dos nódulos, N percentual e N total das plantas.

O fato de terem sido utilizadas gerações F₂ e F₃, dos diferentes cruzamentos, permite esperar que, com a segregação das gerações seguintes, apareçam combinações gênicas com simbiose mais eficiente do que as observadas no presente trabalho.

Termos de indexação: *Rhizobium*, *Centrosema*, genética.

INTRODUÇÃO

A fixação do nitrogênio do ar atmosférico, através da simbiose leguminosa-*Rhizobium*, constitui caráter da mais alta importância do melhoramento de leguminosas para pastagens (Hutton 1964, Williams 1964, Serpa 1972a).

Bowen e Kennedy (1961) determinaram a natureza genética da nodulação em *Centrosema pubescens* Benth., verificando a existência de linhagens com nodulação abundante e de outras com pequeno número de nódulos. O número de nódulos, no entanto, é uma característica inexpressiva conforme tem sido evidenciado por Döbereiner *et al.* (1966) e Serpa (1972b). Os referidos autores observaram, respectivamente, maior relacionamento do N total da planta com o peso seco dos nódulos e o dimensionamento total dos folíolos. Além disso, Serpa e Cunha Filho (1970) demonstraram que o número de nódulos apresenta baixa herdabilidade total. Outros trabalhos, estabelecendo fatores mais intimamente correlacionados com o N total das plantas do que o número de nódulos, foram realizados por Souto e Döbereiner (1968) e Franco *et al.* (1973), que encontraram diferenças significativas entre linhagens de *C. pubescens*, em função da eficiência da simbiose.

O presente estudo foi executado como parte do programa de melhoramento de *Centrosema* sp., visando selecionar combinações entre genótipos da hospedeira com estirpes selecionadas, a fim de obter maior eficiência na fixação do N₂ atmosférico.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento, efetuado em casa de vegetação, foi delineado em blocos ao acaso com três repetições e constituído dos seguintes tratamentos: onze materiais de

Centrosema sp., três estirpes de *Rhizobium* sp. e duas épocas de coleta de dados.

As sementes usadas no experimento eram provenientes de três filhas da planta F₂ IPEACS 5.1/64 x 4.2/64 - 4; de duas plantas oriundas da progênie F₂ IPEACS 5.3/64 x 4.2/64 - 4; de duas plantas F₂ do híbrido interespecífico *C. pubescens* x *C. virginianum*; de uma planta F₂ do recíproco *C. virginianum* x *C. pubescens*; do cultivar importado da Austrália; da linhagem IPEACS 5.1/64 e do cultivar Deodoro, material que serve como termo de comparação no trabalho de melhoramento.

As estirpes testadas, tidas como as melhores para *C. pubescens*, isoladas pela Seção de Solos do Instituto de Pesquisas Agropecuárias do Centro-Sul (IPEACS), foram: C-100_a, C-101_a e CP-3.

O experimento foi instalado em 17.10.1973 e as coletas de dados, feitas 42 e 63 dias após o plantio, foram referentes às seguintes características: número de nódulos, peso seco das plantas, peso seco dos nódulos, percentagem de nitrogênio e nitrogênio total das plantas. O plantio foi efetuado em sacos de polietileno de 600 e 1.600 ml de capacidade, cheios com vermiculita esterilizada, respectivamente para as duas épocas em que a coleta de dados foi processada. Foram plantadas nove sementes por vaso de cada tratamento, escarificadas individualmente e desinfetadas durante um minuto em álcool e, por três minutos, em HgCl₂ acidificado 1/500, e lavadas com água esterilizada. Fez-se o destabe de modo a permanecerem três plantas por vaso. A inoculação foi efetuada na semana seguinte ao plantio com cultura desenvolvida em meio 79 semilíquido (Fred & Waksman 1928), com sete dias de incubação a 30°C, usando-se 1 ml por planta. As plantas foram molhadas com água destilada.

No período experimental foram realizadas duas adubações: no plantio e 44 dias após. As quantidades de nutrientes usadas na primeira adubação, por litro de substrato (vermiculita), foram: 175 mg de KH₂PO₄, 150 mg de CaCl₂.H₂O, 150 mg de MgSO₄.7H₂O, 15,8 mg de CuSO₄.5H₂O, 8,9 mg de ZnSO₄.7H₂O, 0,5 mg de

¹ Aceito para publicação em 12 de outubro de 1976.

* Pesquisador em Agricultura da Seção de Nutrição e Agrostologia, EMBRAPA/RJ, Km 47, Rio de Janeiro, RJ, ZC-26.

* Eng.º Agrônomo da Seção de Solos da EMBRAPA/RJ.

H₂BO₃, 20 mg de FeSO₄.7H₂O, 10 mg de MnSO₄.H₂O e 0,5 mg de Na₂MoO₄.2H₂O (com 20 mg de ácido cítrico para estabilização da solução de micronutrientes). A segunda adubação forneceu a cada vaso 87,5 mg de KH₂PO₄ e 75 mg de CaCl₂.H₂O.

As plantas, em cada colheita, foram retiradas dos vasos e lavadas sobre uma peneira. Os nódulos foram destacados, secados a 65°C, pesados e contados. As plantas sem os nódulos foram secadas a 65°C, pesadas, moídas e analisadas; o teor de N foi determinado pelo método de Kjeldahl.

Durante o experimento ocorreu um ataque de ácaros sem ter, no entanto, caráter seletivo. Todas as plantas foram atacadas, aparentemente com a mesma intensidade, e o agente etiológico foi identificado na primeira coleta, pela Seção de Entomologia do IPEACS, como *Tetranychus desertorum* (Banks, 1900). Na segunda coleta, apesar de continuar presente esta espécie, havia maior densidade populacional de *Mononychus planki* (Mc Gregor, 1950).

RESULTADOS

Os quadrados médios das diferentes fontes de variação, com os respectivos níveis de significância, resultantes da análise estatística dos dados coletados 42 e 63 dias após o plantio, são apresentados no Quadro 1. As características estudadas nas duas idades foram: número de nódulos (NN), peso seco dos nódulos (PSN), peso seco das plantas (PSP), N percentual (N%) e N total das plantas (NTP).

Os valores médios dos materiais hospedeiros e das três estirpes, quanto às características estudadas nas duas coletas, constituíram o Quadro 2. As estimativas da diferença mínima significativa (DMS) para cada caso, obtidas pelo teste de Tukey, foram incluídas neste Quadro com a finalidade de facilitar a identificação dos tratamentos e das estirpes que apresentaram diferenças significativas.

DISCUSSÃO

Verificou-se no Quadro 1 que, na primeira idade, os fatores NN, PSN e PSP foram melhor detectados pelos tratamentos da hospedeira ($P < 0,01$) do que através das estirpes ($P < 0,05$). Na segunda idade ocorreu o contrário.

O N% e NTP apresentaram o mesmo nível de significância na primeira coleta ($P < 0,01$) em relação aos materiais e às estirpes. Na segunda, no entanto, a determinação foi mais precisa por intermédio das estirpes ($P < 0,01$) do que pelos tratamentos de *Centrosema* sp. ($P < 0,05$).

Outra observação interessante, extraída do Quadro 1, refere-se ao fato de ter sido utilizado o delineamento em blocos ao acaso, em experimento conduzido em casa de vegetação, ao invés do inteiramente casualizado. Observa-se que houve, na idade inicial, significância entre blocos ao nível de $P < 0,01$ quanto às variáveis N% e NTP e, na idade final, a significância caiu para $P < 0,05$, mas em relação a NN, PSP e NTP. Tais resultados permitem concluir que a casa de vegetação não ofereceu condições homogêneas em seu interior, justificando o delineamento adotado.

O Quadro 1 estabelece ainda alta significância da interação estirpe x tratamento, do fator NN aos 63 dias, indicando que houve distribuição diferente, quanto ao NN das progênies, em função da estirpe testada, porém, como todas as demais interações não foram significativas, conclui-se que, para uma estirpe eficiente, a simbiose fica dependente da aptidão da planta quanto à fixação de N₂.

No Quadro 2 é mais uma vez verificado que o NN tem pouca importância na estimativa de NTP, comprovando trabalhos anteriores (Döbereiner *et al.* 1966, Serpa, 1972b). Apesar de ser a estirpe C 100, a que apresentou menor NN, 20,4% a menos que CP-3, ofereceu mais 138% de nitrogênio que a referida estirpe.

A variabilidade genética da nodulação tem sido estudada em diversas leguminosas forrageiras como *Trifolium subterraneum* (Nutmán 1967), *Glycine wightii* (Nicholas 1971) e *Desmodium intortum* (Hutton & Coote 1972). No presente trabalho o controle genético da simbiose *Centrosema* sp. x *Rhizobium* sp. é nitidamente caracterizado, no Quadro 2, pelos tratamentos A e F que, sendo oriundos da mesma planta mãe, apresentam NTP antagonicos. Situação semelhante verifica-se nos tratamentos I e L, ambos provenientes da planta IPEACS 5.3/64 x 4.2/64 - 4.

A inclusão do cultivar importado da Austrália no experimento serviu para evidenciar a superioridade dos genótipos selecionados no IPEACS quanto à velocidade inicial de crescimento, característica considerada por Williams (1964) com um dos pontos críticos da *C. pubescens*. Observa-se, aos 42 dias, que o NTP do tratamento B diferiu estatisticamente de E, F, G, H, I, J e L. Aos 63 dias, no entanto, a significância deixou de

QUADRO 1. Quadrados médios de NN, PSN, PSP, N% e NTP, em função das fontes de variação, referentes a duas épocas de coleta de dados

Época da coleta	Fontes de variação	GL	NN	PSN	PSP	N%	NTP
42 dias	Blocos	2	0,6	143,7	29,6	1,2**	25,4**
	Estirpes	2	7,5*	2273,7*	312,1*	0,6**	33,3**
	Tratamentos	10	14,6**	1909,3**	699,7**	0,3**	14,8**
	Est. x trat.	20	1,8	307,3	34,3	0,1	2,3
	Resíduo	64	2,1	490,8	79,3	0,1	3,3
63 dias	Blocos	2	11,0*	1254,5	13474,0*	0,04	1270,7*
	Estirpes	2	38,5**	32561,7**	52759,0**	0,92**	5498,3**
	Tratamentos	10	12,6**	13761,7**	7652,2*	0,48*	793,0*
	Est. x trat.	20	7,7**	9560,1	4505,4	0,17	282,4
	Resíduo	64	2,8	5505,1	2957,3	0,18	380,9

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

QUADRO 2. Médias das progênies e das estirpes, quanto às características. Estimativas das respectivas dms (relativas a três plantas)

Tratamentos	NN ^a		PSN (mg)		PSP (cg)		N%		NTP (mg)	
	42 d	63 d	42 d	63 d	42 d	63 d	42 d	63 d	42 d	63 d
Materiais:										
A — 5.1/64 x 4.2/64-4-6	5,6	8,5	22,2	156,9	24,4	107,2	1,87	2,46	4,51	28,03
B — Australiano	5,6	9,4	35,0	173,1	18,3	136,1	2,08	3,16	3,72	43,39
C — Cv x Cp — 10 ^b	7,5	10,8	39,5	208,9	34,4	145,6	1,62	2,95	5,54	44,88
D — Deodoro	7,1	10,7	35,3	186,1	23,9	133,9	2,11	3,10	5,02	41,97
E — 5.1/64 x 4.2/64-4-5	8,1	11,0	42,5	169,8	33,9	128,9	1,81	2,76	6,25	31,66
F — 5.1/64 x 4.2/64-4-10	8,6	11,5	59,5	228,4	43,9	198,3	1,60	2,50	6,92	56,59
G — Cp x Cv — 1++	8,0	10,8	50,3	211,6	34,4	147,2	1,70	3,01	5,91	50,36
H — 5.1/64	9,0	12,2	64,9	239,3	38,3	180,0	1,90	2,90	7,48	49,92
I — 5.3/64 x 4.2/64-4-8	8,2	11,4	52,0	228,5	34,4	172,8	1,74	2,96	5,90	50,94
J — Cp x Cv — 12++	9,5	11,3	71,7	216,2	48,9	163,9	1,62	1,71	8,18	44,30
L — 5.3/64 x 4.2/64-4-10	6,8	8,7	41,6	108,0	35,0	106,7	1,65	2,71	5,76	29,81
Estirpes:										
C — 100	7,3	9,8	50,8	220,9	36,4	179,1	1,90	2,95	6,89	51,94
C — 101 ^a	7,3	10,1	52,3	199,9	34,2	160,4	1,84	2,93	6,02	48,66
CP — 3	8,2	11,8	37,2	159,1	30,3	102,4	1,64	2,65	4,88	28,12
DMS — teste Tukey:										
Entre progênies:										
P = 0,05	1,6	1,9	24,7	82,5	10,0	64,5	0,33	0,62	2,04	21,86
P = 0,01	2,1	2,4	38,2	—	13,0	—	0,43	—	2,66	—
Entre estirpes:										
P = 0,05	0,8	0,9	11,5	38,4	4,6	28,2	0,15	0,22	0,95	10,11
P = 0,01	—	1,1	14,8	50,6	—	37,1	0,20	0,29	1,25	13,32

^a Transformado $\sqrt{x + 1}$.^b Cp = *C. pubescens*, Cv = *C. virginianum*.

existir em relação a todos os tratamentos citados. Embora o cultivar australiano se tenha recuperado, sua simbiose tardia, justificativa encontrada para a ocorrência, seria extremamente prejudicial em condições de campo, principalmente se estivessem estabelecendo pastagens consorciadas.

A especificidade da simbiose em *C. pubescens*, determinada por Bowen (1959), não constituiu obstáculo para o híbrido interespecífico *C. pubescens* x *C. virginianum*, bem como para o respectivo recíproco, uma vez que apresentaram simbiose eficiente com estirpes homólogas de *C. pubescens*.

Um resultado que despertou atenção, no Quadro 2, foi o relativo ao tratamento J que, apresentando-se como o melhor na fase inicial do experimento, diferindo estatisticamente dos tratamentos G e I quanto ao PSP e NTP, diminuiu de eficiência na segunda fase a ponto de tornar-se menor que os mesmos. Posteriormente, verificou-se que o tratamento J segregava plantas com folhas cotiledonares sem reentrância e que tais plantas definhavam, com o aumento da idade, até morrerem. Dessa maneira pode-se admitir que a menor eficiência do referido tratamento, aos 63 dias, tenha ocorrido pelo aparecimento de algumas dessas plantas. Tal caráter, que funciona como gene marcador, controlado geneticamente, está sendo objeto de estudos. Dessa maneira, uma vez comprovada sua semiletalidade, por ineficiência fisiológica, teremos oportunidade de selecionar progênies isentas do fator, aumentando o número de plantas sobreviventes e, conseqüentemente, fixando mais N₂.

A significância estatística entre estirpes de *Rhizobium* sp. reflete a importância que a seleção de estirpes pode ter no aumento da eficiência da simbiose. A dificuldade do trabalho, conforme Nutman (1970), reside na com-

plexidade das técnicas que a seleção e competição de estirpes exigem. Em vista disso, os materiais testados da hospedeira podem ser de grande utilidade, quando se comparar a eficiência de novas estirpes com a de outras anteriormente estudadas.

O uso de gerações F₂ e F₃, dos diversos cruzamentos de *Centrosema* sp., além dos comentários feitos anteriormente, permite esperar, através da segregação, o aparecimento de genótipos mais eficientes que os atualmente existentes.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos suportam as seguintes conclusões:

- 1) comprovou-se que é de natureza genética a simbiose *Centrosema-Rhizobium*;
- 2) foi constatada a ineficiência do número de nódulos como indicador de estirpes melhores;
- 3) o genótipo testado da hospedeira poderá ser um valioso auxiliar na seleção de novas estirpes;
- 4) o híbrido *C. pubescens* x *C. virginianum*, bem como seu recíproco, apresentou simbiose eficiente com estirpes homólogas de *C. pubescens*;
- 5) os materiais selecionados no IPEACS evidenciaram superioridade, quanto à velocidade inicial de crescimento, em relação ao cultivar testemunha (Deodoro) e ao cultivar importado da Austrália;
- 6) admitiu-se a probabilidade de serem segregadas combinações gênicas mais eficientes, quanto à fixação do N₂ atmosférico, que as existentes;

7) para uma estirpe eficiente, a simbiose ficaria dependente da aptidão genética da planta para fixação de N_2 , uma vez que não houve interação estirpe x cultivar.

AGRADECIMENTOS

Os autores expressam sua gratidão aos Engenheiros Agrônomos Avílio A. Franco, pelas críticas e sugestões oferecidas na discussão do presente trabalho, e Deosdedes Francisco Barcellos, pela identificação dos ácaros.

REFERÊNCIAS

- Bowen G.D. 1959. Specificity and nitrogen fixation in the *Rhizobium* symbiosis of *Centrosema pubescens* Benth. Qd. J. agric. Sci. 16:267-282.
- Bowen G.D. & Kennedy M.M. 1961. Heritable variation in nodulation of *Centrosema pubescens* Benth. Qd. J. agric. Sci. 18:161-170.
- Döbereiner J., Arruda N.B.de & Penteadó A.de F. 1966. Avaliação de fixação de nitrogênio em leguminosas pela regressão do N total das plantas sobre o peso dos nódulos. Pesq. agropec. bras. 1:233-237.
- Franco A.A., Serpa A. & Souto S.M. 1973. Simbiose de estirpes homólogas com linhagens de *Centrosema pubescens*. Pesq. agropec. bras., Sér. Zootec., 8:13-17.
- Fred E.B. & Waksman S. 1928. Laboratory manual of general microbiology. McGraw-Hill, New York.
- Hutton E.M. 1964. Plant and breeding genetics, p. 79-92. In Some concepts and methods in sub-tropical pastures research. Commonw. Bur. Past. Fld Crops, Bull. 47.
- Hutton E.M. & Coote J.N. 1972. Genetic variation in nodulating ability in Greenleaf Desmodium. J. Inst. Aust. Agric. Sci. 38:68-69.
- Nicholas D.B. 1971. Genotypic variation in *Glycine wittii*. J. Aust. Inst. Agric. Sci. 37:69-70.
- Nutman P.S. 1967. Varietal differences in the nodulation of subterranean clover. Aust. J. agric. Res. 18:381-425.
- Nutman P.S. 1970. Genetics of legume nodulation. Anais Sem. Metodologia e Planejamento Pesq. Leg. Tropicais, Inst. Pesq. Agropec. Centro-Sul, Rio de Janeiro, p. 122-132.
- Serpa A. 1972a. Seleção de fatores essenciais em leguminosas tropicais para pastagens. IX Reun. Soc. Bras. Zootec., Viçosa, Minas Gerais. (Mimeo.)
- Serpa A. 1972b. Seleção precoce para nitrogênio total em *Centrosema pubescens*. Pesq. agropec. bras., Sér. Zootec., 7:29-31.
- Serpa A. & Cunha Filho L.A. 1970. Variação hereditária e ambiente dos caracteres, número de nódulos e comprimento da raiz principal em *Centrosema pubescens* Benth. Anais V Reun. Lat.-Am. Rhizobium, Inst. Pesq. Agropec. Centro-Sul, Rio de Janeiro, p. 1-10.
- Souto S.M. & Döbereiner J. 1968. Diferenças entre linhagens de *Centrosema pubescens* Benth. na nodulação e fixação de N atmosférico. II Sem. Rhizobium, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.
- Williams R.J. 1964. Plant and introduction, p. 60-78. In Some concepts and methods in sub-tropical pasture research. Commonw. Bur. Past. Fld Crops, Bull. 47.

ABSTRACT.- Serpa, A.; De-Polli, H. [Genetic variation in *Centrosema-Rhizobium* symbiosis]. Variabilidade genética da simbiose *Centrosema-Rhizobium*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Zootecnia* (1976) 11, 29-32 [Pt, en] EMBRAPA/RJ, Km 47, Rio de Janeiro, RJ, ZC-26, Brazil.

A greenhouse study carried out with 11 *Centrosema* sp. genotypes and three *Rhizobium* sp. strains, for the purpose of obtaining more efficient genetic combinations in the fixation of N_2 . Five of the progenies studied came from two F_1 plants, and three were F_2 plants of interspecific hybridization *C. pubescens* x *C. virginianum*. IPEACS line 5.1/64, one Australian cultivar and the common material of *C. pubescens* were also included.

Statistical differences were obtained, between genotypes and between strains in nodule number, the dry weight of nodules and the dry weight of plants, per cent N and total N per plant.

The study permitted an analysis of the segregation of genetic combinations, between host and strain with highest N_2 fixation.

Index terms: *Rhizobium*, *Centrosema*, genetic.