

# SELEÇÃO DE ESTIRPES DE RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM PARA INOCULAÇÃO DA CULTURA DE ERVILHA-VAGEM NA REGIÃO SERRANA DO RIO DE JANEIRO<sup>1</sup>

MAURO DA CONCEIÇÃO<sup>2</sup>, NEWTON N.C. PEREIRA<sup>3</sup>, HELVÉCIO DE-POLLI, AVÍLIO A. FRANCO<sup>4</sup> e JOHANNA DÖBEREINER<sup>5</sup>

RESUMO - Foram realizados dois experimentos de vaso e um de campo para estudar a possibilidade da substituição da adubação nitrogenada na cultura da ervilha-vagem (*Pisum sativum* L.) pela inoculação com *Rhizobium*. A eficiência das estirpes de *Rhizobium* variou com a sua origem, e todas as estirpes isoladas de solo de uma localidade de Teresópolis, RJ, foram iguais ou superiores a duas das estirpes usadas em inoculante comercial no Rio Grande do Sul. Todas as três estirpes isoladas de outra localidade de Teresópolis produziram nódulos ineficientes quando avaliados pela regressão do nitrogênio da planta sobre o peso de nódulos e pela atividade específica da nitrogenase ( $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{h/g}$  nódulos). O nitrogênio da planta e a produção de vagem com as melhores estirpes de *Rhizobium* em todos os três experimentos foram iguais ou superiores à aplicação de 100 kg/ha de N.

Termos para indexação: fixação, inoculantes.

## SELECTION OF RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM STRAINS FOR THE INOCULATION OF PEAS ON THE RIO DE JANEIRO HILL FARMS

ABSTRACT - In two greenhouse and one field experiments the inoculation of peas (*Pisum sativum* L.) was studied in comparison with nitrogen fertilizer. The efficiency of the *Rhizobium* strains varied with their origin and all strains isolated from one local soil in Teresópolis, RJ proved to be equal or superior to two of the strains used in commercial inoculation in Rio Grande do Sul. All three strains isolated from another Teresópolis local produced inefficient nodules as evaluated by the regression of plant N over nodule weight and by the specific nitrogenase activity ( $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{h/g}$  nodules). Plant nitrogen and pod yields with the best *Rhizobium* strains in all three experiments were equal or superior to the application of 100 kg/ha N.

Index terms: fixation, inoculants.

## INTRODUÇÃO

Entre as leguminosas cultivadas no Estado do Rio de Janeiro, a ervilha vagem tem-se mostrado relativamente promissora e de grande interesse econômico para o estado, principalmente nos municípios serranos de Teresópolis, Nova Friburgo e Sumidouro, onde as condições climáticas são favoráveis ao cultivo dessa leguminosa temperada. Segundo dados de comercialização da ervilha, na CEASA-RJ, em 1976 e 1977, foi comercializado um total geral de 1.384.882 e 1.068.595 kg/ano

de vagens, respectivamente, além da comercialização feita no interior do estado.

Sabemos que no uso racional de leguminosas é necessário observar o processo de nodulação. Há vários fatores que podem influenciar na simbiose *Rhizobium* x planta. Num mesmo grupo de inoculação cruzada, uma estirpe de *Rhizobium* pode apresentar vários graus de eficácia, dependendo da espécie de leguminosa. Para uma mesma espécie a eficiência pode depender ainda da cultivar. Burton (1965) e Döbereiner et al. (1966b), trabalhando com 25 cultivares de soja inoculadas com uma mesma estirpe, em condições de campo, verificaram grande variação de nodulação e ainda interação cultivar com o local. Souto et al. (1972) verificaram que a cultivar nativa de *Stylosanthes gracilis*, IRI 1022, não permite infecção e nodulação pelas seis estirpes estudadas, normalmente eficazes nas leguminosas não específicas, e que as estirpes específicas para esta variedade, obtidas do solo, além de produzirem muitos nódulos, apresentaram elevada eficiência nodular. Não houve infor-

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 20 de abril de 1980.

<sup>2</sup> Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup>, Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos (SNLCS) - EMBRAPA, Rua Jardim Botânico, 1024 - ZC-20, CEP 20.000 - Rio de Janeiro, RJ

<sup>3</sup> Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup>, Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER), Av. Delfim Moreira 584/3<sup>o</sup> andar, CEP 29.950 - Teresópolis, RJ.

<sup>4</sup> Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup>, M.Sc., SNLCS-EMBRAPA.

<sup>5</sup> Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup>, D.Sc., SNLCS-EMBRAPA.

mação sobre a necessidade e eficiência da inoculação da ervilha na região Centro-Sul, e é hábito dos hortigranjeiros da região utilizar adubos nitrogenados.

O presente trabalho foi conduzido com a finalidade de selecionar estirpes de *Rhizobium leguminosarum*, oriundas da região agrícola de Teresópolis, RJ, ou provenientes do Rio Grande do Sul, com vistas a oferecer condições de produção de inoculante eficiente para substituir a adubação nitrogenada para a cultura da ervilha-vagem desta região no Estado do Rio de Janeiro.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos em casa de vegetação, no km 47, Seropédica, RJ, e um de campo, na região de plantio da ervilha, em Teresópolis, RJ.

#### Experimento I

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com cinco repetições, estudando-se doze estirpes de *Rhizobium leguminosarum*, sendo nove isoladas de amostras oriundas de solos da região agrícola de Teresópolis e três procedentes do Instituto de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul (IPAGRO).

Utilizaram-se vasos-de-leonard, esterilizados, com vermiculita e areia de praia lavada, na proporção de 2:1 respectivamente. A solução nutritiva usada foi a de Norris, modificada (Guzman & Döbereiner 1968). Foram utilizadas doze estirpes de *Rhizobium*, sendo Br 601, Br 602 e Br 603 isoladas de solo da localidade A; Br 604, Br 605 e Br 606; da localidade B; Br 607, Br 608 e Br 609, da localidade C, todas de Teresópolis, RJ, e três estirpes enviadas pelo Dr. João Kolling, do Instituto de Pesquisas Agronômicas (IPAGRO) (R 335, R 337 e R 374) e que são usadas pelos fabricantes de inoculantes. Foram ainda incluídos quatro controles sem inoculação, sendo um sem nitrogênio e três com os seguintes níveis de nitrogênio: 20, 40 e 60 ppm N, na forma de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Todas as estirpes foram testadas quanto à pureza, antes de se iniciar a inoculação. As estirpes com a sigla Br foram isoladas de nódulos provenientes de plantas crescidas asépticamente em vasos de Leonard inoculadas com solo.

A cultivar de ervilha utilizada foi a Gigante, a mais plantada na região. Antes do plantio, as sementes foram esterilizadas com álcool 95%GL por um minuto e solução acidificada de  $\text{HgCl}_2$  1:1.000 durante três minutos e, posteriormente, lavadas seis a oito vezes com água esterilizada.

O plantio foi feito com cinco sementes por vaso; no desbaste, aos seis dias após o plantio deixaram-se duas plantas. As plantas foram inoculadas usando-se duas a três gotas de cultura líquida por planta. As adições de nitrogênio foram feitas na mesma época da inoculação, e as ir-

rigações feitas com água deionizada, quando julgadas necessárias.

A colheita desse experimento foi efetuada no início da floração, 60 dias após o plantio. Primeiramente, foi determinada a atividade da nitrogenase das raízes com nódulos empregando-se o método de redução do acetileno (Dart et al. 1972). Posteriormente os nódulos foram destacados; nódulos e plantas foram, então, secados em estufa a 65°C e pesados. O teor de nitrogênio das plantas foi determinado pelo método de Kjeldahl (semi-micro).

#### Experimento II

Este experimento visou confirmar em vasos com solo, a eficiência das melhores estirpes selecionadas no experimento I.

Foi um experimento com delineamento em blocos ao acaso com cinco repetições e sete tratamentos, cinco estirpes de *Rhizobium* e duas testemunhas. Todas as estirpes pré-selecionadas foram da localidade A (Br 601, Br 602 e Br 603), além de duas do Rio Grande do Sul (R 337 e R 374). Utilizaram-se vasos de plástico, com 2 kg de solo Latossolo Vermelho-Amarelo, colhido em área recém-desmatada da propriedade do Sr. Ari Silva, em Teresópolis, RJ. Os vasos foram postos dentro de vasos maiores e porosos, com areia de rio para refrigeração (Döbereiner & Pimenta 1964), onde a temperatura não foi superior a 30°C durante o ciclo da planta.

A análise do solo revelou: pH 5,1; 1 ppm de P; 88 ppm de K; 3,5 mE de  $\text{Ca}^{++}$  e 0,9 mE de  $\text{Mg}^{++}$  e 0,1 mE de  $\text{Al}^{+++}$ /100 cc de terra. Fez-se a seguinte adubação básica (ppm): 40 de P; 50 de K; 15 de Mg; 0,08 de B; 4,02 de Cu; 5,18 de Fe; 0,20 de Mo e 2,43 de Zn.

Os tratamentos testemunhas não foram inoculados e um deles recebeu 50 ppm N em forma de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

O plantio foi efetuado com cinco sementes por vaso. Seis dias após o plantio, efetuou-se o desbaste deixando-se duas plantas por vaso. Depois, realizaram-se a inoculação e a adição de nitrogênio, da mesma forma que no experimento anterior.

A colheita foi feita no início da floração, ocorrida aos 45 dias após o plantio, e foram feitas as mesmas determinações como no experimento I.

#### Experimento III

A finalidade deste experimento foi estudar, em campo, na região produtora, o comportamento de duas estirpes de *R. leguminosarum* que se destacaram nos experimentos anteriores. O solo foi o mesmo utilizado no experimento II.

O esquema experimental adotado foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições, e os seguintes tratamentos: duas estirpes de *Rhizobium* (Br 603 e R 337) e testemunhas com e sem adubação nitrogenada. Foi utilizado inoculante em turfa e sementes peletizadas com calcário.

As parcelas eram constituídas de quatro fileiras de plantas, de 4 m de comprimento cada, espaçadas de 1 m com 2-3 plantas/cova, espaçadas de 20 cm. A cultivar de ervilha usada foi a Gigante. As adubações fosfatadas e potássicas foram realizadas nos sulcos previamente abertos,

na base de 200 kg/ha de  $P_2O_5$ , aplicados sob a forma de superfosfato simples, e de 100 kg/ha de  $K_2O$ , na forma de KCl. Nas parcelas com adubação nitrogenada, aplicaram-se duas vezes, 50 kg/ha de N em cobertura sob a forma de nitrocálcio, tendo sido a primeira aplicação feita após a emergência das plantas, e a segunda, 45 dias após o plantio.

Na época da floração, foram colhidas cinco plantas de cada parcela para determinação da atividade da nitrogenase nos nódulos. O teste de redução de acetileno (Dart et al. 1972) foi realizado no campo, e as amostras foram conduzidas em "vacutainer" para análises cromatográfica no laboratório. Foi determinado ainda peso seco e teor de N nas plantas. Posteriormente foram tomados dados referentes a produção total e ao peso verde de 100 vagens, para cada parcela.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do primeiro experimento (Tabela 1) mostram que a ervilha, sob condições controladas, pode obter todo o nitrogênio, necessário ao seu desenvolvimento normal, da simbiose com *Rhizobium*. Na verdade esta leguminosa mostrou eficiência muito baixa na assimilação do N mineral, e as plantas inoculadas com as melhores estirpes de *Rhizobium* incorporaram três vezes mais N que as adubadas com 60 ppm de N mineral.

Houve grande diferença significativa em todos os parâmetros (Tabela 1) entre os inoculantes. As

TABELA 1. Efeito da inoculação de estirpes de *Rhizobium leguminosarum* em ervilha (*Pisum sativum* L.) provenientes de três localidades de Teresópolis, RJ e do Rio Grande do Sul, em experimento de casa de vegetação, com vasos Leonard (Experimento I).

Tratamentos	Planta		Nódulos secos (mg/pl)	Nitrogenase	
	Peso seco (g/pl.)	N-total (mg/pl)		umol $C_2H_4$ /h planta	umol $C_2H_4$ /h g nódulos
Inoculado (sem N)					
Estirpes <sup>a</sup>	Procedência				
Br 601	Localidade A				
Br 602	"				
Br 603	"				
Br 604	Localidade B				
Br 605	"				
Br 606	"				
Br 607	Localidade C				
Br 608	"				
Br 609	"				
R 335	IPAGRO, RS				
R 337	"				
R 374	Austrália (S.U. 391)				
Não inoculado					
	0 ppm de N				
	20 ppm de N				
	40 ppm de N				
	60 ppm de N				
	F	7,09**	11,29**	2,60*	12,44**
	DMS (5%)	0,90	29,4	81	3,43

<sup>a</sup> Br é a sigla usada pelo Programa Fixação Biológica de Nitrogênio, EMBRAPA, km 47, e R a sigla usada pelo IPAGRO, RS.

melhores estirpes de *Rhizobium* foram as três isoladas de solo da localidade A e duas provenientes do Rio Grande do Sul. Uma das estirpes do Rio Grande do Sul (R 335) foi pouco efetiva, confirmando a necessidade da seleção de estirpes adaptadas às condições locais (Vincent 1970). As estirpes da localidade C foram intermediárias, e as da localidade B, as piores.

Quando o comportamento das diversas estirpes é observado pela regressão (Fig. 1) do N total fixado sobre o peso dos nódulos (Döbereiner et al. (1966a), verifica-se que os pontos das estirpes da localidade B não se enquadram na regressão indicando eficiência nodular muito baixa. Esta é confirmada pelas medidas da atividade específica (umol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/g de nódulos) que também é muito baixa e, aproximadamente, um terço das estirpes da localidade A. Mostra isso que determinações de peso de nódulos não são suficientes para avaliar o desempenho da simbiose. No caso das estirpes Br 604, Br 605 e Br 606 da localidade B, houve relativamente muitos nódulos, mas com baixa eficiência. Já a estirpe R 335 do Rio Grande do Sul produziu nódulos mais eficientes, mas em pouca

quantidade. Isto indica problemas de infecção e iniciação dos nódulos nesta estirpe.

A ocorrência espontânea de estirpes de *Rhizobium* ineficientes no solo da localidade B indica sérios problemas e ressalta a necessidade de estudos mais aprimorados com estirpes marcadas para verificar a possibilidade de substituir as estirpes locais por outras mais eficientes. É possível que tais estirpes ineficientes tenham-se multiplicado em resposta ao uso contínuo da adubação nitrogenada. A ocorrência espontânea de *Rhizobium leguminosarum* em Teresópolis, provavelmente, deveu-se à sua introdução através das sementes dos agricultores, pois em solos sob mata natural não se obteve isolamento positivo.

No segundo experimento (Tabela 2), confirmou-se, em condições já mais naturais, a elevada eficiência das estirpes de *Rhizobium* selecionadas. Verifica-se que no solo usado, que é deficiente em N, a aplicação de 50 ppm de N (equivalente a 100 kg/ha) não foi suficiente, pois as plantas inoculadas incorporaram significativamente mais N que as adubadas. A atividade específica dos nódulos foi mais alta ainda que no experimento I, confirmando desempenho excelente da simbiose no solo usado.

O terceiro experimento confirmou, sob condições de campo, a possibilidade de substituição da adubação com 100 kg/ha de N pela inoculação da ervilha-vagem. Nos tratamentos inoculados, peso das plantas, N total incorporado e produção de vagem foram significativamente maiores que na testemunha e equivalentes à quantidade apresentada pelas parcelas com adubação. A adubação nitrogenada diminuiu o peso de 100 vagens. Consultando o mercado no dia 27.2.80 obteve-se o preço de Cr\$ 20,00/pacote de inoculante suficiente para o plantio de um ha enquanto 100 kg de N estavam ao custo de Cr\$ 3.962,00. Acrescentando-se mais Cr\$ 450,00 para adubação em cobertura (3 dias/homem/ha segundo Regina 1969), a prática da inoculação proporcionou uma economia de Cr\$ 4.412,00/ha em relação à adubação nitrogenada. Vale lembrar que, sendo a produção industrial de adubo nitrogenado baseada em matéria-prima importada, a inoculação contribui também para a economia de divisas do País. (Tabela 3).

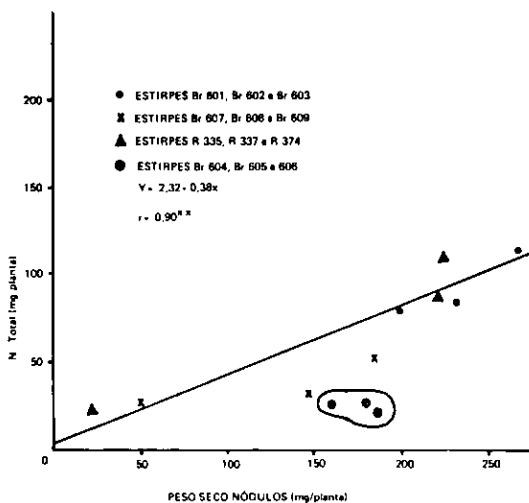


FIG. 1. É feita da origem das estirpes na eficiência nodular de ervilha inoculada com *Rhizobium leguminosarum*. Os pontos circundados são das estirpes Br 604, Br 605 e Br 606 e não foram incluídos no cálculo da regressão.

TABELA 2. Efeito da inoculação de estirpes de *Rhizobium leguminosarum* em ervilha-vagem (*Pisum sativum* L.) provenientes da localidade A-Teresópolis, RJ, e do Rio Grande do Sul, em experimento de casa de vegetação.

Tratamentos		Planta		Nódulos secos (mg/pl)	Nitrogenase	
		Peso seco (g/pl.)	N-total (mg/pl)		umol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /h planta	umol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /h g nódulos
Inoculado (sem N)						
Estirpes <sup>a</sup>	Procedência					
Br 601	Localidade A	2,43	59	76	6,63	88
Br 602	"	2,28	62	61	6,79	111
Br 603	"	2,86	65	84	8,05	96
R 337	IPAGRO, RS	3,30	73	83	9,53	114
R 374	Austrália (S.U. 391)	3,07	73	78	7,37	94
Não inoculado						
0 ppm de N		1,24	25	0	0	
50 ppm de N		2,78	48	0	0	
F		7,69**	6,53**	0,66 <sup>b</sup>	0,34 <sup>b</sup>	
DMS (5%)		0,72	19	34	6,08	

<sup>a</sup> Br é a sigla usada pelo Programa Fixação Biológica de Nitrogênio, EMBRAPA, km 47, e R a sigla usada pelo IPAGRO, RS.

<sup>b</sup> As testemunhas não foram incluídas na análise estatística.

TABELA 3. Efeito de inoculação de estirpes de *Rhizobium leguminosarum* em ervilha-vagem (*Pisum sativum* L.) provenientes da localidade A-Teresópolis, RJ, e do Rio Grande do Sul, em experimento de campo.

Tratamentos		Peso planta seca <sup>a</sup> (g/pl)	N total <sup>a</sup> (mg/pl)	Nitrogenase <sup>a</sup> (umoles C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /h planta)	Produção (kg vagens/ha)	Peso verde 100 vagens (g)
Inoculado (sem N)						
Estirpes <sup>b</sup>	Procedência					
Br 603	Localidade A	7,60	249	4,29	10.238	850
R 337	IPAGRO, RS	7,30	234	3,50	10.081	825
Não inoculado						
0 kg/ha de N		3,40	99	0	7.281	868
100 kg/ha de N		7,90	291	0	10.143	691
F		5,37*	7,18**	2,53 <sup>c</sup>	10,77**	11,52**
DMS (5%)		2,90	99	1,58	1.400	75

<sup>a</sup> Analisado no período da floração.

<sup>b</sup> Br é a sigla usada pelo Programa Fixação Biológica de Nitrogênio, EMBRAPA, km 47, e R a sigla usada pelo IPAGRO, RS.

<sup>c</sup> As testemunhas não foram incluídas na análise estatística.

### CONCLUSÕES

1. As estirpes de *Rhizobium* Br 603, de Teresópolis, e R 337, do Rio Grande do Sul, são igualmente eficientes, provando, através do seu desempenho, que podem ser incluídas na recomendação do uso de inoculantes para ervilha-vagem.

2. Numa das localidades de Teresópolis há predominância de *Rhizobium* ineficiente.

3. É possível a substituição da adubação com 100 kg/ha de N pela inoculação de ervilha-vagem com aumento da rentabilidade econômica da cultura.

### AGRADECIMENTOS

Ficamos gratos aos fazendeiros Ari Silva, Ge-túlio Mendes e Ataíde Lopes pela colaboração prestada.

### REFERÊNCIAS

- BURTON, J.C. The *Rhizobium*-legume association. In: GILMON, C.N. & ALLEN, O.N. Microbiology and soil fertility. Corvallis, Oregon State University Press, 1965. 164p.
- DART, P.J.; DAY, J.M. & HARRIS, D. Assay of nitrogenase activity by acetylene reduction. In: Use of isotopes for study of fertilizer utilization by legume crops. Vienna. s.ed., 1972. p.85-100. (Tech. Rep. Intern. Atomic Energy Agency, 149).
- DÖBEREINER, J.; ARRUDA, N.B. & PENTEADO, A. F. de. Avaliação da fixação do nitrogênio em leguminosas pela regressão do nitrogênio total das plantas sobre o peso dos nódulos. *Pesq. agropec. bras.*, 1:233-7, 1966a.
- DÖBEREINER, J.; ARRUDA, N.B. & PENTEADO, A. F. de. Especificidade hospedeira, em variedades de soja, na simbiose com *Rhizobium*. *Pesq. agropec. bras.*, 1:207-10, 1966b.
- DÖBEREINER, J. & PIMENTA, T.G. A simple method to lower the soil temperature in greenhouse experiments. *Soil Biol. Int. News Bull*, (2):30-3, 1964.
- GUZMÁN, I. & DÖBEREINER, J. Effectiveness and efficiency in the symbiosis of four cross-inoculated tropical legumes. In: IV REUN. LAT.-AM. INOC. LEGUM., 4, Porto Alegre, 1968.
- SOUTO, S.M.; CÓSER, A.C. & DÖBEREINER, J. Especificidade de uma variedade nativa de alfafa do nordeste (*Stylosanthes gracilis*) na simbiose com *Rhizobium* sp. *Pesq. agropec. bras.*, 7:1-5, 1972.
- VINCENT, J.M. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. Oxford, 1970. 159p. (IBP Handbook, 15).