

SELEÇÃO DE RIZÓBIO PARA TREVO-BRANCO EM SOLO ÁCIDO¹

EDEMAR BROSE²

RESUMO – Um experimento em casa de vegetação, num solo HAPLOHUMOX, foi conduzido com o objetivo de selecionar 16 estirpes de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* quanto à eficiência em fixar N₂ no trevo-branco (*trifolium repens*, L.) em solo ácido (pH 5,2). A produção de matéria seca (MS) e N total no tecido da parte aérea foram avaliadas em três cortes, e no último corte foi feita a avaliação da nodulação. A estirpe EEL 13882, tolerante a acidez e Al, foi superior à SEMIA 235 em 16,7% e à SEMIA 265 em 21,8% apenas no N total. A estirpe EEL 16882, tolerante a acidez mas susceptível a Al, se igualou às testemunhas SEMIA 222, 235 e 265. O peso de nódulos frescos não apresentou correlação com a produção de MS e N total.

Termos para indexação: nitrogênio, alumínio, pH.

RHIZOBIA SELECTION FOR WHITE CLOVER IN ACID SOIL

ABSTRACT – A green house trial was conducted in a HAPLOHUMOX soil with the aim of selecting 16 *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* strains efficient in fixing N₂ symbiotically in white clover (*Trifolium repens* L.) in acid soils (pH 5.2). Dry matter (DM) and total N (TN) were evaluated in three cuts and fresh nodules weight on the third cut. The strain EEL 13882, acid and Al-tolerant, showed the best performance in terms of TN, superating the strain SEMIA in 16.7% and the SEMIA 265 in 21.5%. The strain EEL 16882, acid-tolerant but Al-sensible, equalized with the strains recommended for inoculant production (SEMIA 222, 235 and 265) in both parameters (DM and TN). The fresh nodules weight was not correlated to the DM and TN.

Index terms: nitrogen, aluminium, pH

INTRODUÇÃO

Na exploração pecuária, especialmente em campo nativo, a predominância dos solos é de pH baixo e associado com níveis tóxicos de Al. Estes são fatores que não limitam apenas o desenvolvimento da planta mas também a nodulação da leguminosa, e, conseqüentemente, a fixação simbiótica do N₂ (Freire, 1976; Döbereiner, 1966). O Al e pH não causam somente um efeito direto sobre a nodulação pela limitação nutricional da planta, mas causa também o efeito direto do pH sobre a bactéria. A variabilidade de tolerância ou suscetibilidade entre as estirpes de rizóbio é bem maior do que na leguminosa hospedeira. Por exemplo, valores de pH entre 5,0 e 5,5 geralmente

não afetam significativamente o desenvolvimento radicular da planta, mas podem afetar o crescimento de rizóbios em solução nutritiva (Wood et al., 1984; Munns, 1968; Keyser & Munns, 1979). Por outro lado, em condições de laboratório com meios nutritivos, tem sido mostrado que algumas estirpes de rizóbio para trevos podem tolerar valores de pH 4,5 em presença de Al (50 µM) (Brose, 1984 e Thornton & Davey, 1983).

Segundo Wood & Cooper (1988), o pH limitante para a estirpe HP3 foi 4,8 a 5,0, e para a BEL 1192 foi 4,4 a 4,6, ambas para trevo. No entanto, quando foram adicionados 50 µM de Al, houve uma inibição na multiplicação destas duas estirpes na faixa de pH 4,5 a 5,6. Uma seleção prévia de estirpes de rizóbio, a nível de laboratório, para tolerância à acidez, tem demonstrado boa correlação em termos de tolerância destas mesmas estirpes também em solo ácido (Thornton & Davey, 1984). Jones & Morley (1981) verificaram o efeito do pH na preferência de duas estirpes de

¹ Aceito para publicação em 15 de setembro de 1993.

Trabalho conduzido na Estação Experimental da EMPASC em Lages, financiado pela EMBRAPA.

² Eng.-Agr., M.Sc., Estação Experimental da EMPASC, Caixa Postal 181, CEP 88500 Lages, SC.

R. trifolii sobre o trevo-branco, encontrando que uma estirpe-CP3B - produziu 86% do número de nódulos em pH 5, e outra - R4 -, apenas 16%, ao passo que em pH 7 a R4 produziu 66% dos nódulos na planta de trevo-branco.

O objetivo deste experimento foi comparar a eficiência de estirpes selecionadas em laboratório para tolerância a Al e baixo pH com a de estirpes recomendadas para produção de inoculantes para trevo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram testadas 16 estirpes de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* em trevo-branco cv Ladino Regal, em casa de vegetação, num solo da unidade de mapeamento Vacaria, latossolo bruno distrófico (HAPLOHUMOX). As origens das estirpes de rizóbio usadas neste experimento estão na Tabela 1. O solo teve um pH original de 4,8 com uma concentração de 4,2 meq de Al/100 g de solo, 1 ppm de P e 6% de matéria orgânica. Foi feita uma correção do pH com adição de CaCO₃+MgCO₃ (3:1) equivalente a 7 t/ha. A adubação de P, K, S e Mo foi de 198, 400, 140 e 1,36 mg/2 kg de solo, respectivamente. No final do experimento os resultados da análise química do solo foram os seguintes: pH 5,2, P 6,0 ppm, K 358 ppm e Al 0,5 meq/100 g.

As sementes foram desinfetadas com hipoclorito de sódio e semeadas diretamente nos vasos. Quatro dias após, foi feito um desbaste prévio e inoculação com 3 ml da suspensão bacteriana (em torno de 10⁷ células por ml). A suspensão bacteriana foi desenvolvida no meio líquido padrão de manitol com extrato de levedura, segundo descrito por Vincent (1975). Duas semanas

após a inoculação, foi feito um segundo desbaste, deixando-se 6 plantas por vaso. Além das 16 estirpes, foram acrescentadas duas testemunhas sem inoculação (com e sem N). O N foi aplicado na fórmula de NH₄NO₃ na concentração de 375 mg de N/vaso da seguinte forma: 50 mg/vaso até o primeiro corte, 150 mg/vaso até o segundo corte, e 175 mg/vaso até o terceiro corte. Estas quantidades de N foram distribuídas parceladamente em porções de 25 mg/vaso durante a execução do experimento. O delineamento experimental foi de blocos completamente casualizados, com quatro repetições.

Os parâmetros avaliados foram produção de matéria seca e N total no tecido da parte aérea em três cortes, efetuados com os seguintes intervalos: 56, 85 e 116 dias após a semeadura. No último corte foi feita também a avaliação do peso de nódulos frescos por vaso.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da produção de matéria seca e o peso de nódulos estão na Tabela 2 e os teores de N total no tecido da parte aérea, na Tabela 3. No primeiro corte, não houve diferença significativa entre as estirpes, tanto na produção de matéria seca como no N total da parte aérea. Esta falta de resposta inicial, especialmente quando se trata de experimentos em vasos, é comum, devido à alta mineralização da matéria orgânica existente no solo e à baixa exigência inicial da planta em N. No caso deste solo utilizado, continha um teor de 6% de matéria orgânica. Também esta provável influência do N mineralizado pode ser comprovada comparando-se as duas testemunhas com e

TABELA 1. Relação das origens de estirpes de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*.

Estirpes	Local/Origem
EEL 62, 63, 785, 882, 1085, 6782, 7782, 7786, 9382, 9682, 13882, 16882.	Isolamentos nativos do Planalto de Santa Catarina, Estação Experimental da EMPASC em Lages, SC.
SEMIA 222	Estirpe recebida do IPAGRO, R.S. Originária da Austrália, TAI. (Recomendada para produção de inoculantes).
SEMIA 235	Estirpe recebida do IPAGRO, R.S. Originária da N. Zelândia, UNZ 29. (Recomendada para produção de inoculantes.).
SEMIA 265	Estirpe recebida do IPAGRO, R.S. Originária do Uruguai, U 26. (Recomendada para produção de inoculantes).
NZP 582	Estirpe recebida da Nova Zelândia

TABELA 2. Produção de Matéria Seca da parte aérea (em três cortes) e peso de nódulos (no último corte) de trevo-branco inoculado com estirpes de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* em vasos com solo Vacaria e pH 5.2. Médias de 4 repetições.

Estirpes	1º Corte	2º Corte	3º Corte	Soma	Peso de nódulos
					frescos
-----mg/vaso-----					
EEL63	2,25a	3,12bc	3,38bc	8,79bc	0,60abc
EEL 7786	2,50a	3,06bc	2,60c	8,16c	0,70a
EEL 62	2,38a	3,30ab	3,81bc	9,48b	0,49bcde
NZP 582	2,41a	2,94bc	3,19cd	8,52bc	0,63ab
SEMIA 222	2,02a	3,34ab	3,79bc	9,16bc	0,48bcde
EEL 9682	2,47a	3,00bc	3,56bcd	9,03bc	0,36e
EEL 7782	2,79a	3,03bc	3,70bcd	9,52b	0,38de
SEMIA 265	2,61a	3,06bc	3,63bcd	9,30bc	0,60abc
EEL 785	2,40a	3,22ab	3,36cd	8,98bc	0,50bcde
EEL 1085	2,22a	3,15ab	3,31cd	8,67bc	0,62ab
EEL 13882	2,20a	3,22ab	4,13b	9,56b	0,54abcd
EEL 6782	2,56a	3,13abc	3,80bc	9,50b	0,54abcde
EEL 9382	2,74a	2,34d	2,04f	7,11d	0,38de
EEL 882	2,28a	3,06bc	3,05de	8,39bc	0,42cde
SEMIA 235	2,14a	3,16abc	3,42cd	8,72bc	0,45bcde
EEL 16882	2,15a	3,13abc	3,84bc	9,12bc	0,46bcde
TEST.	2,66a	2,66cd	3,23cd	8,54bc	0,53bcde
TEST. + N(*)	2,32a	3,62a	4,88a	10,83a	0,07f

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

(*) Total de N aplicado em mg/vaso: 1º corte = 50; 2º corte = 150; 3º corte = 175.

TABELA 3. Nitrogênio total no tecido da parte aérea de trevo-branco inoculado com estirpes de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* em vasos com solo Vacaria com pH 5,2. Médias de 4 repetições.

Estirpes	1º Corte	2º Corte	3º Corte	Soma
				mg/vaso
EEL63	80,4a	81,2ef	139,4cdef	301,0de
EEL 7786	87,3a	96,0cde	105,6f	288,9e
EEL 62	83,8a	104,3bcde	177,4b	365,6bc
NZP 582	85,4a	82,6ef	124,6ef	292,6e
SEMIA 222	69,2a	111,1bcd	168,3bc	348,6bcd
EEL 9682	87,5a	98,4cde	139,6cdef	325,5cde
EEL 7782	97,9a	116,7bc	155,9bcde	370,6bc
SEMIA 265	84,5a	93,0cde	139,6cde	317,1cde
EEL 785	87,7a	101,1cde	130,5def	319,5cde
EEL 1085	79,1a	104,0bcde	134,7cdef	317,8cde
EEL 13882	81,1a	127,1b	179,2b	385,4b
EEL 6782	96,3a	99,0cde	155,5bcde	350,9bcd
EEL 9382	80,3a	61,0f	70,4g	211,8f
EEL 882	84,5a	97,2cde	120,4f	297,6de
SEMIA 235	78,6a	114,5bc	139,2cdef	330,3cde
EEL 16882	71,9a	99,2cde	162,0bcd	333,1cde
TEST.	97,9a	86,9de	125,7ef	310,5de
TEST. + N(*)	91,4a	148,5a	217,4a	457,3a

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

(*) Total de N aplicado em mg/vaso: 1º corte = 50; 2º corte = 150; 3º corte = 175.

sem N no primeiro corte, não ocorrendo diferenças entre elas. Do segundo corte em diante, começou a haver diferenças entre as estirpes bacterianas. Esta resposta diferencial entre os tratamentos somente a partir do segundo corte, com experimentos em vaso, também já foi encontrado por Kolling & Scholles (1980).

A estirpe EEL (13882, comparada com as três estirpes testemunhas (SEMIA 222, 235 e 265), foi estatisticamente superior à SEMIA 235 (16,7%) e à SEMIA 265 (21,5%) apenas no N total (com base na soma dos três cortes). Com relação à produção de MS, a EEL 13882 também foi superior, embora não tendo diferido estatisticamente das testemunhas. A EEL 16882, embora tendo-se igualado às testemunhas anteriormente citadas, foi uma estirpe eficiente em solução nutritiva, porém suscetível a Al (50 μ M), mas tolerante a pH 4,5-4,7 (Brose, 1984), assim como as estirpes padrões também foram suscetíveis a Al e a baixo pH nestas mesmas condições. Por outro lado, a estirpe EEL 13882 tem-se mostrado eficiente e tolerante a Al e baixo pH nos testes de laboratório (Brose, 1984 e Brose & Schaffarth, 1989). Maiores diferenças entre as estirpes suscetíveis e tolerantes seriam de se supor, caso o Al estivesse numa concentração maior, pois o solo usado estava com um pH de 5,2 e 0,5 meq de Al/100g, dando uma saturação de Al de apenas 4,8%, o que certamente foi muito baixo para causar um efeito maior entre as estirpes bacterianas.

Segundo vários pesquisadores, as estirpes de rizóbio, que são tolerantes à acidez nos meios de cultura em laboratório, geralmente têm dado respostas encorajadoras quando inoculadas em solos ácidos. Estas estirpes tem apresentado maior sobrevivência e melhor nodulação da planta hospedeira em comparação com estirpes suscetíveis (Keyser et al., 1979; Lowendorf et al., 1981; Hartel & Alexander, 1983; Hartel et al., 1983; Thornton & Davey, 1983). Bopaiiah & Rai (1979), em trabalhos de seleção de estirpes de rizóbio tolerantes a acidez para *Vigna sinensis*, encontraram que a estirpe 12, mais tolerante em pH 5,0 em solução nutritiva, produziu a melhor nodulação e crescimento da planta em experimento de vasos com solo ácido. Esta mesma estirpe também apresentou maior capacidade de sobrevivência e

crescimento em condições ácidas e alcalinas em laboratório. Resultados semelhantes também foram encontrados em Lie (1971), onde uma única estirpe de rizóbio, a 313, caracterizada como tolerante a baixo pH, foi capaz de nodular bem e fixar N₂ em ervilha num pH 4,6.

A estirpe NZP 582, recomendada para produção de inoculantes na Nova Zelândia em 1979, não foi a melhor, em comparação com isolamentos da nossa região. Na opinião de muitos pesquisadores, citados por Lie (1971), as variações ambientais explicam, muitas vezes, as falhas que ocorrem na introdução de estirpes de outras regiões ou países.

O peso de nódulos frescos (Tabela 2) não apresentou nenhuma correlação com a produção de matéria seca ou N total da parte aérea. Por exemplo, a estirpe EEL 7786, apresentou o maior peso de nódulos, porém a menor produção de matéria seca, contrastando com a EEL 7782, que teve menor peso de nódulos e alto rendimento de matéria seca e acúmulo de N total. Isto indica que a EEL 7786 foi uma estirpe ineficiente nestas condições, o que é comprovado também com o menor teor de N total no tecido (Tabela 3). A ocorrência de nodulação na testemunha sem inoculação indica que o solo possui estirpes aptas a nodular o trevo-branco com relativa abundância, porém menos eficiente do que as outras estirpes introduzidas.

Uma estirpe bacteriana poderá ser eficiente em fixar N₂ simbioticamente, mas ter baixa capacidade de sobrevivência e competição com as populações saprofíticas do solo, em condições normais de campo. Desta forma, as melhores estirpes serão objeto de estudos posteriores em condições de campo com uma porcentagem de saturação do Al mais elevada, a fim de avaliar o efeito dos fatores citados, na sua sobrevivência.

CONCLUSÕES

1. A estirpe EEL 13882, tolerante à acidez e Al, foi mais eficiente em fixar o N₂ simbioticamente do que as estirpes SEMIA 235 e 265, mas não diferiu da SEMIA 222.

2. O peso de nódulos não apresentou correlações com a produção de matéria seca e N total no tecido da parte aérea.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao pesquisador Luis Carlos Greiner pelas análises estatísticas realizadas.

REFERÊNCIAS

- BOPALIAH, B. M.; RAI, P. V. Growth and nodulation of cowpea *Vigna sinensis* (Torner) Savi inoculated with acid tolerant strains of *Rhizobium*. *Mysore Journal of Agriculture Science*. v.13, p.329-332, 1979.
- BROSE, E. Seleção de estirpes de *Rhizobium trifolii* tolerantes a baixo pH e P e alto Al e Mn para trevo-branco. In: REUNIÃO LATINO-AMERICANA SOBRE RHIZOBIUM, 12., 1984, Campinas: [s.n.], 1984. p.79-90.
- BROSE, E.; SCHAFFARTH, E. Nodulação de trevo-branco inoculado com duas estirpes de *Rhizobium trifolii* sob diferentes níveis de Al e Mn em solução nutritiva. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.24, n.6, p.693-698, 1989.
- DÓBEREINER, J. Manganese toxicity effects on nodulation and nitrogen fixation of beans (*Phaseolus vulgaris* L.), in acid soils. *Plant and Soil*, v.14, p.153-166, 1966.
- FREIRE, J. R. J. Comportamento da soja e do seu rizóbio ao Al e Mn nos solos do Rio Grande do Sul. *Ciência e Cultura*, v.28, n.2, p.169-170, 1976.
- HARTEL, P. G.; ALEXANDER, M. Growth and survival of cowpea rhizobia in acid, aluminium-rich soils. *Soil Science Society of America Journal*, v.47, p.502-506, 1983.
- HARTEL, P. G.; WHELAN, A. M.; ALEXANDER, M. Nodulation of cowpea rhizobia in acid, aluminium-rich soils. *Soil Science Society of America Journal*, v.47, p.514-517, 1983.
- JONES, D. G.; MORLEY, S. J. Effect of pH on host plant preference for strains of *Rhizobium trifolii* using fluorescent enzyme linked immuno sorbent assay for strain identification. *Annals of Applied Biology*, v.97, n.2, p.183-190, 1981.
- KEYSER, H. H.; MUNNS, D. N. Tolerance of rhizobia to acidity, aluminium and phosphate. *Soil Science Society of America Proceedings*, v.43, p.519-523, 1979.
- KEYSER, H. H.; MUNNS, D. N.; HOHENBERG, J. S. Acid tolerance of rhizobia in culture and in symbiosis with cowpea. *Soil Science Society of America Journal*. v.43, p.719-722, 1979.
- KOLLING, J.; SCHOLLES, D. Peletização e inoculação convencional de alfafa em diferentes níveis de calcário. *Agronomia Sulriograndense*, v.16, n.2, p.313-321, 1980.
- LIE, T. A. Symbiotic nitrogen fixation under stress conditions. *Plant and Soil*, p.117-127, 1971. Volume Especial.
- LOWENDORF, H. S.; BAYA, A. M.; ALEXANDER, M. Survival of *Rhizobium* in acid soils. *Applied and Environmental Microbiology*, v.42, p.951-957, 1981.
- MUNNS, D. N. Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture. V. acid sensitive steps. *Plant and Soil*, v.26, n.1, p.129-146, 1968.
- THORNTON, F. C.; DAVEY, C. B. Response of the clover *Rhizobium* symbiosis to soil acidity and *Rhizobium* strain. *Agronomy Journal*, v.75, n.3, p.557-560, 1983.
- THORNTON, F. C.; DAVEY, C. B. Saprophytic competence of acid tolerant strains of *Rhizobium trifolii* in acid soil. *Plant and Soil*, v.80, n.3, p.337-344, 1984.
- VINCENT, J. M. *Manual práctico de rizobiología*. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 1975. 200p.
- WOOD, M.; COOPER, J. E. Acidity aluminum and multiplication of *Rhizobium trifolii* possible mechanisms of aluminum toxicity. *Soil Biology and Biochemistry*, v.20, n.1, p.95-100, 1988.
- WOOD, M.; COOPER, J. E.; HOLDING, A. J. Aluminium toxicity and nodulation of *Trifolium repens*. *Plant and Soil*, v.78, p.381-391, 1984.