

SELEÇÃO DE RIZÓBIO TOLERANTE A Al E A BAIXO pH¹

EDEMAR BROSE²

RESUMO - Foram testadas, em condições de laboratório, 35 estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* para trevo-vermelho quanto à tolerância a Al e a baixo pH. Em casa de vegetação, dez estirpes foram testadas num Latossolo Bruno Distrófico (solo Vacaria) com dois níveis de pH (6,0 e 5,0). O efeito do Al sobre o crescimento do rizóbio foi maior do que o pH já a partir do primeiro nível (75 µM), não havendo quase diferença com 150 µM de Al. O número total de nódulos, na média geral, foi reduzido em 70%, e o número de nódulos grandes, em 50%, quando o pH baixou de 6,5 para 4,7. Seis estirpes superaram as duas testemunhas SEMIA 235 e 265 em 22 a 43% na produção de matéria seca (MS) em solução nutritiva com pH 4,7 + Al. No solo com pH 6,0, a testemunha SEMIA 235 foi superada em 10% no N total pela EEL 7782. Em pH 5,0, as estirpes EEL 8186 e 1285 superaram a testemunha em 34% e 37% na produção de MS e 37% e 39% no N total, respectivamente.

Termos para indexação: rizóbios, nodulação, pH, alumínio.

RHIZOBIA SELECTION FOR Al AND LOW pH TOLERANCE

ABSTRACT - Under laboratory conditions, 35 *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strains were tested as to their tolerance to Al and to low pH. In glasshouse, ten strains were tested in a Brown Latosol Dystrophic soil in two pH levels (6.0 and 5.0). Rhizobia growth was more limited by Al than by the low pH, but the Al-tolerant strains did not differ between the 75 and 150 µM of Al in the pH 4.5. When the pH was reduced from 6.5 to 4.7, the total number of nodules reduced in 70% and the large nodules in 50%. The dry matter (DM) yield, as general mean, was slightly higher in the pH 6.5. In nutrient solution, with pH 4.7 + Al, six strains were 22 to 43% higher than the controls SEMIA 222 and 235 on DM yield. In soil, the strain EEL 7882 was superior in 6% on DM and in 10% on TN to the control SEMIA 235. In the pH 5.0 the strain EEL 1285 and EEL 8186 were higher in 34% and 37% on DM, and in 37% and 39% on TN than the control, respectively.

Index terms: Rhizobia, nodulation, pH, aluminum.

INTRODUÇÃO

Nas condições de campo onde o pH não é satisfatoriamente corrigido, a busca de estirpes de rizóbio eficientes e tolerantes a Al e a baixo pH torna-se relevante.

O efeito prejudicial da acidez no solo sobre a simbiose *Rhizobium/leguminosa* tem sido atribuído ao efeito direto do pH ou à concentração de íon H⁺ e a efeitos indiretos do Al

ou Mn e deficiências de Ca, P e Mo (Lie 1971, Munns 1977, Andrew 1978). No entanto, trabalhos em laboratório têm demonstrado que o efeito do Al, dependendo da suscetibilidade do rizóbio, pode ter um efeito direto maior sobre a bactéria do que sobre a planta (Brose & Schaffrath 1989, Carvalho et al. 1982, Wood et al. 1984). Este problema, no entanto, poderia ser superado pela obtenção de uma estirpe bacteriana eficiente em fixar o N₂ com tolerância a pH e Al.

Thornton & Davey (1984), em trabalhos de pesquisa, encontraram que em solos ácidos havia maiores populações de estirpes bacterianas tolerantes à acidez para trevo, do que as estirpes suscetíveis. Da mesma forma, Lind-

¹ Aceito para publicação em 8 de novembro de 1990. Trabalho conduzido na Estação Experimental da EMPASC em Lages, financiado pela EMBRAPA e convênio FINEP (PADCT)/EMPASC.

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

trom & Myllyniemi (1987) comprovaram que estirpes pré-selecionadas em meios ácidos, quando testados em solo com pH 4,1, apresentaram maior rendimento da planta. Segundo Munns (1977), em geral as exigências em pH para o crescimento do rizóbio coincidem com as da planta hospedeira. Esta afirmação comprova os resultados obtidos em testes com estirpes de rizóbio representativas de sete gêneros de leguminosas forrageiras em meios de cultura com baixo pH em nosso laboratório, sendo que do total das estirpes de rizóbio dos gêneros *Adesmia*, *Desmodium*, *Lathyrus* e *Lotus* testadas em pH 4,5, 80 a 89% cresceram neste meio, ao passo que as dos gêneros *Medicago*, *Trifolium* e *Vicia*, apenas de 30 a 40% do total das estirpes testadas foram tolerantes ao mesmo pH (Brose 1987). Desta forma, nas espécies mais suscetíveis, torna-se ainda mais importante a seleção de estirpes bacterianas tolerantes, uma vez que a probabilidade de insucesso destas estirpes em condições adversas do solo são bem maiores.

Este trabalho teve como objetivo selecionar estirpes de rizóbio mais eficientes e tolerantes a Al e baixo pH para trevo-vermelho. Esta seleção foi feita em laboratório e casa de vegetação para posterior seleção em condições de campo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos dois experimentos para avaliar a eficiência de fixação simbiótica do N₂ por estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* em trevo-vermelho, em condições de baixo pH.

Experimento 1

Foram testadas, em laboratório, 40 estirpes de rizóbio para trevo-vermelho. Trinta e cinco estirpes foram de isolamentos locais (15 destas foram isoladas diretamente em meio acidificado para pH 4,6 e outros 20 cm pH neutro) e cinco estirpes foram introduzidas de outros locais. As origens das estirpes utilizadas encontram-se na Tabela 1. Estas estirpes foram testadas em plantas desenvolvidas em tubos de ensaio 25 x 200 mm, contendo solução nutritiva estéril, para avaliar a capacidade de nodulação e o po-

tencial de fixação simbiótica do N₂. A solução nutritiva utilizada para a planta foi a seguinte (em gramas por litro de solução): K₂HPO₄ 0,5, Na₂HPO₄ 0,15, CaCl₂ 0,10, MgSO₄ 0,12 e 1 ml/l de uma solução de H₃BO₃ 2,86 MnSO₄ 2,08, ZnSO₄ 0,22, CuSO₄ 0,08 e Na₂MoO₄ 0,11. O Fe foi adicionado na forma de FeNaEDTA numa concentração de 0,13 mM. As sementes foram desinfetadas com hipoclorito de sódio a 1,7% do p.a. do Cl e pré-germinadas em placas estéreis. Com três dias de idade foram transplantadas para os tubos, deixando-se duas plantas por tubo. A inoculação foi feita seis dias após o transplante, pipetando-se 0,5 ml por tubo de uma suspensão bacteriana na concentração de 10⁶ a 10⁷ células/ml de suspensão. Foram usadas seis repetições por tratamento. A avaliação da nodulação e o peso de matéria seca da parte aérea foi feita 45 dias após a inoculação.

As 40 estirpes foram testadas também em meio líquido com pH 4,8 e 4,5 e três níveis de Al (0, 75 e 150 µM), segundo Keyser & Munns (1979). O Al foi adicionado ao meio depois de autoclavado na forma de Al₂(SO₄)₃ · 12H₂O, fazendo-o passar por um filtro bacteriológico milipore. Uma gota da suspensão bacteriana na concentração ao redor de dez células/ml foi adicionado em cada tubo de 20 x 100 mm contendo 5 ml do meio acima descrito. A avaliação do crescimento das estirpes foi feita visualmente pela turbidez do meio, cinco a seis dias após a inoculação. Foram usadas duas repetições por cada tratamento.

Numa segunda etapa, foram selecionadas as 27 melhores estirpes e testadas novamente em plantas desenvolvidas em solução nutritiva estéril, com os seguintes tratamentos: pH 6,5; pH 4,7 e pH 4,7 + Al (50 µM). A solução nutritiva usada para a planta foi segundo descrito por Cooper et al. (1983), como segue: MgSO₄ 0,8 mM, CaCl₂ 0,5 mM, KCl 0,1 mM, FeEDTA 20 µM, NaH₂PO₄ 10 µM, H₃BO₃ 35 µM, MnCl₂ 10 µM, ZnCl₂ 0,8 µM, Na₂MoO₄ 0,5 µM, CuSO₄ 0,3 µM e AlK (SO₄)₂ zero ou 50 µM. O Al foi aplicado separadamente depois de o meio ter sido autoclavado, passando-o por um filtro bacteriológico milipore. A desinfecção das sementes, o transplante e a inoculação foram feitos conforme descrito acima. A solução nutritiva foi renovada semanalmente com o pH ajustado. A avaliação do comprimento das raízes, da nodulação (total e nódulos grandes) e peso de matéria seca da parte aérea foi feita 60 dias após a inoculação.

Experimento 2

A partir do experimento 1 foram selecionadas dez estirpes (EEL 1285, 1385, 1387, 7882, 7886, 8186, 12086, 12186, SEMIA 235 e SEMIA 265) e testadas em casa de vegetação num solo da unidade de mapeamento Vacaria em dois níveis de pH (6,0 e 5,0). Para a correção do pH do solo foi usado $\text{CaCO}_3 + \text{MgCO}_3$ na proporção de 3:1. Para atingir o pH 5,0 foi aplicado o equivalente a 3 t/ha, e para o pH 6,0, 10 t/ha. Com esta correção do pH, o teor de Al baixou de 4,2 meq/100 g para 1,8 meq/100 g (22,5% de saturação do Al) no pH 5 e para zero meq/100 g no pH 6. O solo recebeu também uma adubação no equivalente a mg do elemento/vaso com 1 kg de solo dos seguintes corretivos: P (Na_2HPO_4) 150, K (KCl) 200, S (K_2SO_4) 65 e Mo (Na_2MoO_4) 1.

As estirpes SEMIA 235 e 265 foram usadas como testemunhas. Além das estirpes, foram acrescentados mais dois tratamentos sem inoculação, uma sem N e outra com N na forma de MH_4NO_3 . O N foi aplicado numa concentração total de 225 mg/vaso, iniciando-se a aplicação 50 dias após a instalação do experimento e parcelados em 25 mg/vaso a cada semana.

As sementes de trevo-vermelho foram desinfetadas com hipoclorito de sódio a 1,7% do p.a. do Cl e pré-germinadas em placas-de-petri estéreis. Após três dias foram transplantadas de quatro a cinco plântulas por vaso, com solo, e no dia seguinte foi feita a inoculação, na proporção de 3 ml/vaso da suspensão bacteriana na concentração de 10^6 a 10^7 células/ml.

O delineamento experimental foi um fatorial de 2 x 12 (pH X estirpes bacterianas) com cinco blocos completamente casualizados com sorteios sistemáticos a cada dois ou três dias.

Os parâmetros avaliados foram peso de matéria seca (MS) e N total no tecido da parte aérea, em três cortes (53, 73 e 119 dias após o transplante). No último corte foi feita também a avaliação do peso de nódulos frescos.

RESULTADOS**Experimento 1**

Os resultados da infectividade e eficiência de fixação do N_2 , através da produção de MS em solução nutritiva com pH 6,5 das 40 estir-

TABELA 1. Origem de estirpes de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*.

Estirpes	Origens
EEL 287, 787, 887, 1087, 1287 1387, 9786, 10286, 103,86, 12086, 12186, 12986, 13286,	Isolamento da região do Planalto de Santa Catarina, em pH 4,6.
EEL 1285, 1385, 8084, 3184, 3683 3783, 7382, 7482, 7882, 7982, 7986, 8086, 8186, 11882, 11982, 17682, 17782, 17982, 18082, 18182	Isolamento da região do Planalto de Santa Catarina, em pH 7,0.
SEMIA 2010	Recebida do Instituto de Pesquisas Agronômicas, RS e isolada no mesmo local.
SEMIA 251	Recebida do Instituto de Pesquisas Agronômicas, RS. Originária dos E.U.A. como USDA 2048.
SEMIA 222	Recebida do Instituto de Pesquisas Agronômicas, RS. Originária da Austrália como TA1.
SEMIA 235	Recebida do Instituto de Pesquisas Agronômicas, RS. Originária da Nova Zelândia como UNZ 29.
SEMIA 265	Recebida do Instituto de Pesquisas Agronômicas, RS. Originária do Uruguai como U 26.

pes de rizóbio, estão representados na Fig. 1. Deste total de estirpes, cinco apresentaram um baixo número de nódulos pequenos (com exceção da SEMIA 2010) e fixação de N₂ nula. Embora a estirpe SEMIA 2010 tenha apresentado grande número de nódulos, estes foram

de tamanho pequeno e completamente ineficientes. Trinta e cinco estirpes foram aptas a fixar N₂; no entanto, não houve uma relação com o número total de nódulos ou nódulos grandes com a produção de MS (Fig. 1). No geral, as estirpes menos eficientes tiveram a

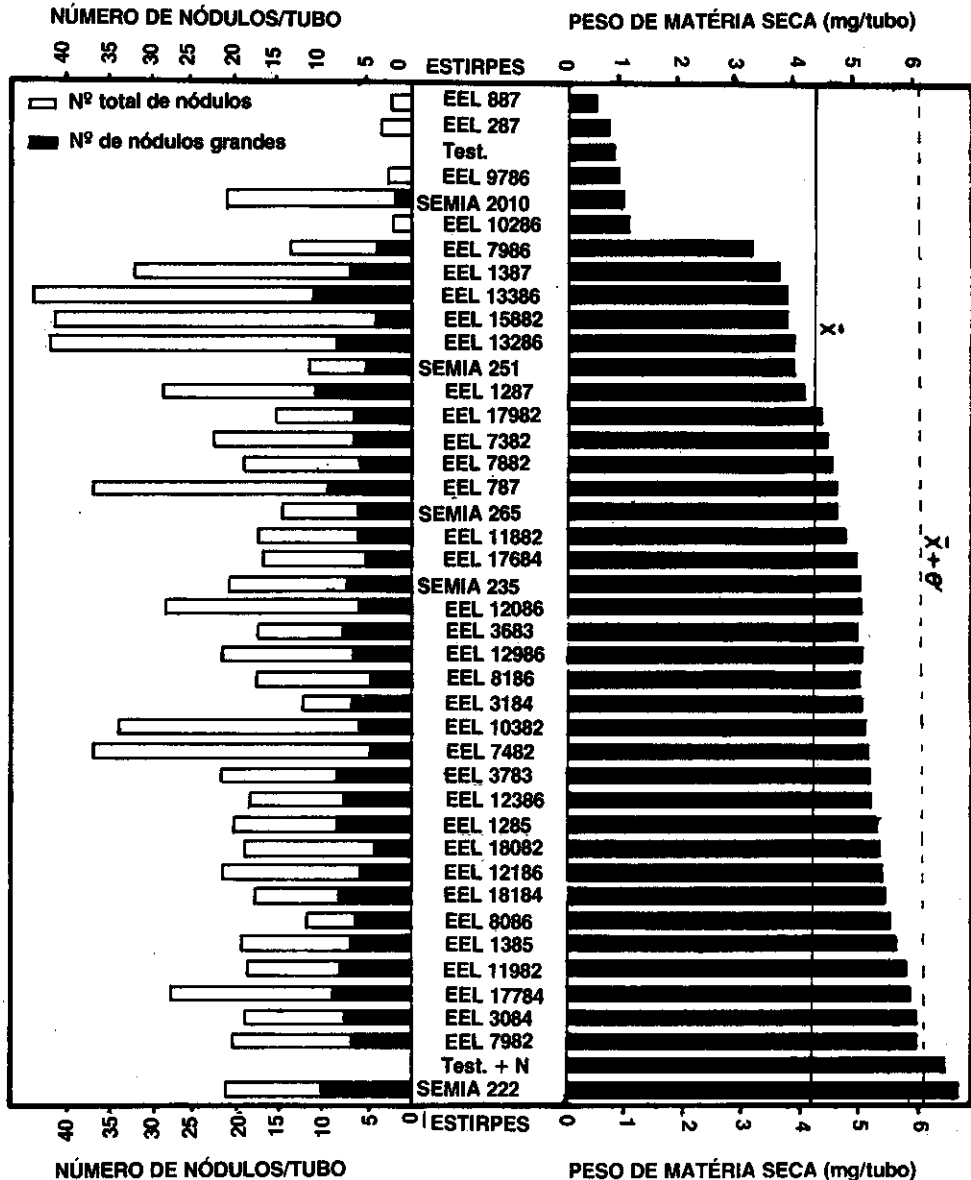


FIG. 1. Peso de matéria seca e número de nódulos de trevo-vermelho inoculados com estirpes de rizóbio em tubos de 25 x 200 mm com solução nutritiva estéril. Médias de seis repetições.

tendência de apresentarem uma maior proporção de nódulos pequenos por tubo em relação a nódulos grandes, se comparadas com as mais eficientes.

Na Tabela 2 estão os resultados do crescimento das estirpes em meio líquido nos pH 4,8 e 4,5 com os três níveis de Al (0, 75 e 150 μ M). Os resultados mostram que o maior efeito sobre o crescimento das estirpes foi do Al a partir do primeiro nível (75 μ M), não havendo, quase, diferença na concentração de 150 μ M. A limitação de crescimento das estirpes bacterianas, em decorrência do efeito do pH, foi na ordem de 47 a 50%; e em decorrência do Al (comparando o nível 0 μ M com 75 μ M), a limitação foi na ordem de 70 a 75% do total das estirpes testadas (Tabela 2). Nenhuma das estirpes introduzidas de outros locais cresceu na presença do Al.

Na Tabela 3 acham-se os resultados do número total, por tubo, de nódulos, e de nódulos grandes, por tubo, de trevo-vermelho, infectados com 27 estirpes de rizóbio nos tratamentos pH 6,5, pH 4,7 e pH 4,7+Al, em solução nutritiva. Na Tabela 4 estão os resultados do comprimento de raízes e do peso de MS nos mesmos tratamentos.

O número de nódulos baixou significativamente no pH mais baixo (4,7) em comparação com o pH 6,5 (Tabela 3). Comparando-se, no entanto, o tratamento pH 4,7+Al com o mesmo pH sem Al, não houve diferença no número total de nódulos e nódulos grandes, com exceção de duas estirpes bacterianas, a EEL 11982 e a SEMIA 265. Na média geral dos tratamentos de pH 6,5, pH 4,7 e pH 4,7+Al, o número total de nódulos foi, respectivamente, 11,8, 3,6 e 3,5; e o número de nódulos grandes foi, respectivamente, 5,4, 2,7 e 2,6. Isto representou uma redução de 70% no número total de nódulos e 50% no número de nódulos grandes quando o pH baixou para 4,7. Descontando-se o número de nódulos grandes (5,4) do total de nódulos (11,8) no pH 6,5, dá um valor médio de 6,4 nódulos pequenos neste pH. O mesmo cálculo feito entre o número de nódulos grandes (2,7) com o total de nódulos (3,6) no pH 4,7 dá um total médio de nódulos

pequenos de 0,9 neste pH. Isto indica que ao baixar o pH para 4,7 a redução de nódulos pequenos foi muito maior (-86%) do que de nódulos grandes (-50%).

O efeito na redução do sistema radicular foi significativo nos dois tratamentos com pH baixo, se comparado com o pH 6,5; porém o tratamento com Al não diferiu do tratamento sem Al no pH baixo (Tabela 4). Além do menor comprimento da raiz principal, apresentado na Tabela 4, foi observado também que no pH 4,7 sem e com Al houve um sintoma idêntico de encurtamento e engrossamento das raízes secundárias, acompanhado de manchas escuras como sintoma de necrose do tecido na extremidade da maioria destas raízes. Estes sintomas observados coincidem com a descrição característica de sintomas de toxidez de Al. Tal similaridade não seria de se esperar, no tratamento sem Al. As trocas das soluções foram feitas semanalmente, acompanhadas da medição do pH da solução dos tubos, e foi constatado que após uma semana o tratamento ajustado para pH 6,5 baixou para 4,8 a 5,3, e do pH 4,7 baixou para 4,0 a 4,2. Este baixamento do pH certamente foi causado pelas trocas metabólicas no sistema radicular da planta e por um baixo poder tampão do meio.

As diferenças da produção de Ms, na média geral, foram significativas entre os tratamentos. A maior produção ocorreu no tratamento pH 6,5, porém diferindo pouco dos outros dois (Tabela 4). O segundo tratamento com maior produção de MS foi o de pH 4,7+Al. De acordo com os resultados constantes nas Tabelas 3 e 4, observa-se que o efeito maior do pH se deu no número de nódulos e no comprimento de raízes. A produção de MS apresentou respostas mais variadas como decorrente ou da nodulação ou da eficiência na fixação do N₂ pelas estirpes bacterianas. Tomando-se por base os índices do coeficiente de correlação entre o número de nódulos e a produção de MS (Tabela 5), observou-se que houve correlação significativa entre estes dois parâmetros no pH ácido.

Numa comparação mais detalhada entre as estirpes, baseada na variação do número de

TABELA 2. Crescimento de estirpes de rizóbio de trevo-vermelho repicados em meio de cultura líquido segundo Keyser & Munns (1979), em dois níveis de pH (4,8 e 4,5) e três níveis de Al (0, 75 e 150 µM).

Estirpes	Al:	pH 4,8						pH 4,5					
		0 µM		75 µM		150 µM		0 µM		75 µM		150 µM	
EEL 887	++	(A)	++	(A)	++	(A)	++	(A)	++	(A)	++	(A)	
EEL 287	++	(A)	++	(A)	++	(A)	++	(A)	++	(A)	++	(A)	
SEMIA 2010	+=	(A)	---		---		---		---		---		
EEL 10286	++	(L)	++	(L)	++	(L)	++	(L)	++	(L)	++	(L)	
EEL 7986	++	(A)	---		---		++	(A)	---		---		
EEL 1387	+ -	(A)	+ -	(A)	---		+ -	(A)	---		---		
EEL 13386	---		---		---		---		---		---		
EEL 15882	++	(A)	---		---		+ -	(A)	---		---		
EEL 13286	+ -	(A)	---		---		---		---		---		
SEMIA 251	++	(A)	---		---		---		---		---		
EEL 1287	++	(A)	+ -	(A)	+ -	(A)	+ -	(A)	---		---		
EEL 17982	+=	(A)	---		---		---		---		---		
EEL 7382	+ -	(A)	---		---		+ -	(A)	---		---		
EEL 7882	++	(A)	++	(A)	++	(A)	---		---		---		
EEL 787	---		---		---		---		---		---		
SEMIA 265	++	(A)	---		---		---		---		---		
EEL 11882	+ -	(A)	---		---		---		---		---		
EEL 17684	+ -	(A)	---		---		---		---		---		
SEMIA 235	---		---		---		---		---		---		
EEL 12086	++	(A)	---		---		---		---		---		
EEL 3683	+ -	(A)	+ -	(A)	---		---		---		---		
EEL 12986	++		---		---		---		---		---		
EEL 8186	---		---		---		---		---		---		
EEL 3184	++	(A)	---		---		---		---		---		
EEL 10382	+ -	(A)	---		---		---		---		---		
EEL 7482	---		---		---		---		---		---		
EEL 3783	++	(A)	++	(A)	++	(A)	++	(A)	+ -	(A)	---		
EEL 12386	++	(A)	---		---		++	(A)	---		---		
EEL 1285	++	(A)	++	(A)	++	(A)	+ -	(A)	+=	(A)	---		
EEL 18082	+=	(A)	---		---		---		---		---		
EEL 12186	++	(L)	++	(L)	++	(L)	++	(L)	++	(L)	++	(L)	
EEL 18184	+ -	(A)	---		---		---		---		---		
EEL 8086	+ -	(A)	---		---		+=	(A)	---		---		
EEL 1385	++	(A)	---		---		++	(A)	---		---		
EEL 11982	+ -	(A)	---		---		+ -	(A)	---		---		
EEL 17784	++	(A)	---		---		++	(A)	---		---		
EEL 3084	+ -	(A)	---		---		---		---		---		
EEL 7982	+ -	(A)	---		---		+ -	(A)	---		---		
SEMIA 222	+ -	(A)	---		---		---		---		---		
% estirpes crescidas			87		26		21		45		13		10

++ crescimento pleno; + - crescimento regular; += crescimento mínimo; --- sem crescimento; A reação ácida do meio; L reação alcalina do meio.

nódulos grandes e produção de MS nos tratamentos de pH e Al, observa-se o seguinte: (a) com as estirpes EEL 11982, 3084, 7482, 12986, 3683 e SEMIA 222 houve uma redução no número de nódulos e produção de MS nos dois tratamentos com pH ácido, comparadas com o pH 6,5; (b) com as estirpes EEL 13286 e 15882 não houve muita redução no

número de nódulos grandes, mas a produção de MS foi baixa nos três tratamentos e (c) com as estirpes EEL 12086, 8186, 7882, 7886, 18184 e 12186 houve a melhor produção de MS no tratamento pH 4,7+Al, 22 a 43% acima das duas melhores testemunhas, SEMIA 222 e 235; entretanto o número de nódulos grandes não foi o maior em todas.

TABELA 3. Número médio de nódulos (total e nódulos grandes) de trevo-vermelho infectados com 27 estirpes de rizóbio em solução nutritiva com pH 6,5, pH 4,7 e pH 4,7+Al (50 µM). Médias de 6 repetições.

Estirpes	Nº total de nódulos/tubo			Nº de nódulos grandes/tubo		
	pH 6,5	pH 4,7	pH 4,7+Al	pH 6,5	pH 4,7	pH 4,7+Al
EEL 8086	10,4 A	6,2 B	3,5 B	3,5 A	3,3 A	1,0 B
EEL 1385	10,9 A	3,3 B	3,4 B	3,5 A	1,8 A	2,1 A
EEL 11982	11,2 A	4,8 B	1,8 C	5,0 A	2,5 B	1,8 B
EEL 17784	9,3 A	2,1 B	2,4 B	4,0 A	1,2 B	0,1 B
SEMIA 265	7,9 A	3,5 B	1,3 A	3,9 A	1,2 B	0,0 B
SEMIA 235	10,4 A	3,0 B	2,7 B	6,0 A	2,7 B	1,7 B
SEMIA 222	8,3 A	2,4 B	3,2 B	4,7 A	1,8 B	2,2 AB
EEL 3084	10,0 A	2,2 B	3,1 B	5,9 A	1,2 B	2,6 B
EEL 7982	14,4 A	2,9 B	2,7 B	5,7 A	2,8 B	2,0 B
EEL 1387	14,1 A	5,4 B	4,7 B	9,4 A	4,9 B	3,2 B
EEL 15882	10,4 A	3,2 B	4,2 B	4,4 A	1,6 B	1,8 B
EEL 13286	17,5 A	5,4 B	4,2 B	10,8 A	4,8 B	3,9 B
EEL 1285	9,1 A	5,6 AB	3,9 B	4,7 A	3,0 A	2,4 A
EEL 3783	10,3 A	2,2 B	4,2 B	4,0 A	2,2 A	3,6 A
EEL 12386	12,8 A	3,9 B	5,9 B	5,8 A	3,9 AB	2,6 B
EEL 7482	12,8 A	1,8 B	1,7 B	7,6 A	1,6 B	1,8 B
EEL 8186	9,4 A	3,3 B	5,7 AB	5,2 A	2,7 A	4,2 A
EEL 12986	16,9 A	3,4 B	2,8 B	6,4 A	3,4 B	2,8 B
EEL 3683	13,8 A	3,6 B	3,2 B	5,7 A	3,2 A	3,2 A
EEL 12086	14,9 A	4,3 B	4,8 B	7,7 A	3,7 B	4,4 B
EEL 787	17,2 A	3,5 B	3,2 B	9,5 A	2,6 B	2,9 B
EEL 7882	12,8 A	5,6 B	5,2 B	4,6 A	3,5 A	4,0 A
EEL 7886	8,9 A	4,0 B	3,8 B	3,8 A	3,7 A	3,8 A
EEL 15982	9,7 A	3,8 B	3,4 B	4,0 A	3,2 A	3,4 A
EEL 1387	12,7 A	3,5 C	7,6 B	5,6 AB	3,5 B	7,0 A
EEL 18184	10,5 A	3,3 B	3,7 B	4,5 A	2,4 A	3,3 A
EEL 12186	14,8 A	3,8 B	3,8 B	3,9 A	2,4 A	3,8 A
Test.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Test. + N	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade na comparação dos três tratamentos. As testemunhas não entraram no cálculo estatístico.

Experimento 2

Os resultados da produção de MS, da nodulação e do N total no tecido da parte aérea de trevo-vermelho testadas em casa de vegetação, com dez estirpes de rizóbio, estão respectivamente nas Tabelas 6, 7 e 8. A produção

de MS e do N total foram avaliados em três cortes, e o peso de nódulos frescos, no último corte.

No primeiro corte não houve diferença significativa entre as estirpes de rizóbio, tanto na produção de MS como no N total (Tabelas 6

TABELA 4. Comprimento médio de raízes e peso de matéria seca da parte aérea de trevo-vermelho infectado com 27 estirpes de rizóbio em solução nutritiva com pH 6,5, pH 4,7 e pH 4,7 + Al (μM). Médias de 6 repetições.

Estirpes	Comprimento de raiz			Peso de matéria seca		
	pH 6,5	pH 4,7	pH 4,7+Al	pH 6,5	pH 4,7	pH 4,7+Al
	cm/planta			mg/tubo		
EEL 8086	12,9 A	7,7 B	8,7 B	23,4 A	24,6 A	27,0 A
EEL 1385	13,5 A	9,4 B	9,2 B	24,6 A	25,6 A	29,4 A
EEL 11982	10,8 A	8,3 B	8,0 B	31,8 A	29,9 A	20,2 B
EEL 17784	11,8 A	8,8 A	7,9 B	26,8 A	15,9 B	26,1 A
SEMIA 265	13,1 A	8,7 B	8,8 B	25,0 A	20,5 AB	15,5 B
SEMIA 235	11,6 A	9,8 AB	8,6 B	27,6 A	23,6 A	25,1 A
SEMIA 222	10,1 A	8,0 A	8,9 A	28,1 A	19,5 B	24,1 AB
EEL 3084	12,4 A	8,3 B	8,6 B	27,1 A	24,8 A	24,6 A
EEL 7982	12,9 A	8,7 B	8,2 B	25,1 A	25,6 A	20,4 A
EEL 1387	11,7 A	9,3 B	8,9 B	28,0 A	26,3 A	25,3 A
EEL 15882	12,5 A	8,7 B	9,1 B	22,4 A	17,3 A	19,3 A
EEL 13286	11,7 A	9,9 AB	8,8 B	19,6 A	21,7 A	19,4 A
EEL 1285	13,3 A	8,3 B	9,2 B	31,2 A	32,0 A	29,5 A
EEL 3783	12,2 A	10,7 A	8,5 B	32,3 A	24,3 B	26,8 AB
EEL 12386	12,3 A	8,7 B	9,7 B	27,0 A	22,8 B	22,9 AB
EEL 7482	11,6 A	8,4 B	9,7 AB	28,6 A	14,3 B	19,0 B
EEL 8186	10,7 A	8,9 A	9,8 A	31,6 A	18,9 B	30,0 A
EEL 12986	12,2 A	8,5 B	9,6 B	26,6 A	19,1 A	20,6 A
EEL 3683	11,7 A	6,1 B	8,9 B	29,0 A	22,2 A	24,1 A
EEL 12086	10,8 A	9,0 AB	8,7 B	32,8 A	25,7 A	32,0 A
EEL 787	11,8 A	8,8 B	9,4 B	24,4 A	23,4 A	27,6 A
EEL 7882	11,7 A	8,4 B	10,1 AB	23,0 B	27,9 AB	31,7 A
EEL 7886	11,2 A	8,3 A	8,7 A	34,5 A	29,3 A	30,2 A
EEL 15982	10,1 A	8,1 A	9,7 A	23,7 A	22,5 A	25,6 A
EEL 1387	9,1 A	9,4 A	9,4 A	24,7 A	22,8 A	28,5 A
EEL 18184	11,5 A	8,2 B	8,2 B	28,9 AB	24,1 B	32,2 A
EEL 12186	12,3 A	8,3 B	8,7 B	30,4 AB	26,1 B	35,2 A
Test.	13,3 A	10,5 B	11,7 AB	6,1 A	6,7 A	6,4 A
Test. + N	8,3 A	10,1 A	9,6 A	31,9 A	37,4 A	38,5 A
Médias	11,7 A	8,8 B	9,1 B	26,8 A	23,2 C	25,4 B
Desvio padrão	1,2	0,9	0,7	5,2	5,6	6,3

As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade nos tratamentos de pH e Al.

e 8). Nos cortes seguintes já foi possível detectar diferenças significativas entre as estirpes.

Na comparação entre os níveis de pH, a média da produção de MS e acúmulo de N total foi maior no pH 6; no entanto, o maior peso de nódulos foi no pH 5 (Tabela 7). A menor nodulação ocorrida no pH 6,0 foi causada, talvez, por uma maior mineralização do N, inibindo, desta forma, a nodulação.

TABELA 5. Coeficientes de correlação entre o número de nódulos e comprimento de raízes com produção de matéria seca de trevo-vermelho em solução nutritiva com pH 6,5; pH 4,7 e pH 4,7+AI. Vinte e sete pares de observações.

Interações	pH 6,5	pH 4,7	pH 4,7 + AI
M.S. x nº nódulos totais	-0,277	0,576 **	0,551 **
M.S. x nº nódulos grandes	-0,203	0,290	0,521 **
M.S. x comprimento da raiz	-0,129	-0,018	0,060

M.S. = produção de matéria seca.

** = correlação significativa ao nível de 1%.

As estirpes SEMIA 235 e 265, recomendadas para produção de inoculantes comerciais, apresentaram bom rendimento de MS no pH 6, na soma de três cortes. Apenas a estirpe EEL 7882 superou em 11% a SEMIA 265, e em 6% a SEMIA 235. No pH 5, entretanto, a SEMIA 235 apresentou o menor rendimento de MS e, da mesma forma, a estirpe EEL 7882 baixou o rendimento, e ambas foram superadas por outras duas estirpes, a EEL 1285 e 8186 (Tabela 5). Em relação ao N total acumulado no tecido da parte aérea, os resultados foram semelhantes aos da produção de MS na soma dos três cortes, ou seja, no pH 6 a estirpe EEL 7882 foi a melhor, e no pH 5 as estirpes EEL 1285 e 8186 foram as melhores. Neste último pH, a estirpe EEL 1285 apresentou um rendimento de MS de 10% e 34% superior às testemunhas SEMIA 265 e 235, respectivamente, e a EEL 81 86 foi, respectivamente, superior a estas testemunhas em 13% e 38%.

No peso de nódulos frescos (Tabela 6), não foram constatadas diferenças significativas entre as estirpes.

TABELA 6. Produção de matéria seca de trevo-vermelho infestado com 10 estirpes de rizóbio em solo com dois níveis de pH (6 e 5). Médias de 5 repetições.

Estirpes	1º corte		2º corte		3º corte		Soma	
	pH6	pH5	pH6	pH5	pH6	pH5	pH6	pH5
	----- g/vaso -----							
EEL 12186	0,64 a	0,80 a	1,43 bc	1,36 bcde	4,44 b	3,65 b	6,51 bc	5,81 bc
EEL 1387	0,91 a	0,93 a	1,58 abc	1,31 bcde	4,53 b	3,54 b	7,02 abc	5,79 bc
SEMIA 265	0,84 a	0,92 a	1,51 abc	1,50 abcd	4,74 abc	4,19 ab	7,09 abc	6,62 abc
SEMIA 235	0,80 a	0,69 a	1,63 ab	1,24 de	4,97 abc	3,50 b	7,39 abc	5,43 c
EEL 7886	0,78 a	0,86 a	1,53 abc	1,28 cde	4,21 bc	3,72 b	6,52 bc	5,86 bc
EEL 12086	0,65 a	0,85 a	1,38 bc	1,56 abc	4,37 bc	4,22 ab	6,40 c	6,63 abc
EEL 7882	1,04 a	0,88 a	1,65 ab	1,57 ab	5,15 ab	4,47 ab	7,85 ab	6,92 ab
EEL 1385	0,94 a	0,77 a	1,62 ab	1,30 cde	4,78 abc	3,73 b	7,34 abc	5,80 bc
EEL 1285	1,03 a	1,08 a	1,52 abc	1,70 a	4,63 bc	4,48 ab	7,04 abc	7,27 a
EEL 8186	0,74 a	1,00 a	1,40 bc	1,67 a	4,67 bc	4,80 a	6,75 bc	7,47 a
Test.	0,46 a	0,71 a	1,33 c	1,16 e	4,09 c	1,88 c	6,07 c	3,75 d
Test. + N	0,90 a	0,60 a	1,77 a	1,36 bcde	5,66 a	4,37 ab	8,33 a	6,33 abc
Médias	0,81 A	0,84 A	1,53 A	1,42 B	4,69 A	3,86 B	6,98 A	6,14 B

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

A nodulação idêntica na testemunha sem inoculação e sem N indicou que o solo já continha estirpes nativas; no entanto, estas estirpes foram de eficiência bem inferior, tomando-se por base a produção de MS e N total (Tabelas 5 e 7).

DISCUSSÃO

A falta de correlação entre o número de nódulos (totais ou nódulos grandes) com a produção de matéria seca no pH neutro, foi observada nos dois testes (Fig. 1 e Tabela 5), bem como em outros testes realizados nestas condições de pH, o que indica que quando não houve nenhum fator limitante para a planta e bactéria, o que determinou a variação na produção de matéria seca foi unicamente a eficiência da estirpe. No entanto, quando o pH e o Al se tornaram fatores limitantes, o número de nódulos passou a ser importante (Tabela 5). Esta correlação positiva nestas condições está aliada às afirmações já feitas por Vincent

(1965), Munns (1968) e Munns & Keyser (1981), de que o pH e Al causam efeito danoso ao crescimento do rizóbio e limitam a formação do nódulo. Desta forma, quando o número de nódulos passa a ser inferior ao número capaz de fornecer a quantidade de N exigido pela planta, este passa a ser o fator mais limitante, por mais eficiente que seja a estirpe bacteriana.

Com relação à tolerância das estirpes ao pH e Al, verificou-se que as estirpes que foram tolerantes a Al no pH 4,5 toleraram até ao nível máximo usado (150 μ M) neste trabalho (Tabela 2), cujos níveis estão superiores aos já reportados por alguns pesquisadores (Keyser & Munns 1979, Munns & Keyser 1981, Wood et al. 1984).

Por outro lado, também já tem sido demonstrado, por outros pesquisadores (De Manzi et al. 1984), que algumas estirpes chegam a tolerar níveis de até 19 ppm de Al (próximo de 600 μ M) em meio solidificado com ágar.

O uso de meios sintéticos em laboratório apresentam uma dificuldade de manter um bom tamponamento do meio, alterando facilmente o pH deste meio, devido à decomposição seletiva de alguns substratos pelo rizóbio (Munro 1970). No entanto, as experiências em nosso laboratório têm demonstrado que as maiores dificuldades têm sido com o Al, no sentido de se estabelecer um limite de concentração deste elemento que fosse ideal, ao passo que na comparação entre as diferentes estirpes bacterianas quanto à tolerância ou suscetibilidade a pH e Al, as mesmas têm apresentado grande estabilidade, mesmo em diferentes meios, como, por exemplo, meios com alto nível de P (meio segundo Vincent 1975) ou baixo P com presença de glutamato (meio de Keyser & Munns 1979); isto é, as estirpes bacterianas que foram suscetíveis a Al mantiveram esta característica em todos os testes em pH abaixo de 4,7, nos dois meios, o mesmo acontecendo com as tolerantes. As respostas diferentes na capacidade de tolerância das estirpes, acima já referidas e em função dos resultados também encontrados por John-

TABELA 7. Peso de nódulos de trevo-vermelho infectado com 10 estirpes de rizóbio em solo com dois níveis de pH (6 e 5). Médias de 5 repetições.

Estirpes	g/vaso	
	pH 6	pH 5
EEL 12186	0,17 b	0,25 b
EEL 1387	0,28 ab	0,42 a
SEMIA 265	0,25 ab	0,40 ab
SEMIA 235	0,23 ab	0,45 a
EEL 7886	0,22 ab	0,40 ab
EEL 12086	0,23 ab	0,37 ab
EEL 7882	0,26 ab	0,37 ab
EEL 1385	0,22 ab	0,52 a
EEL 1285	0,25 ab	0,46 a
EEL 8186	0,21 ab	0,49 a
Test.	0,35 a	0,41 a
Test. + N	0,22 ab	0,00 c
Médias	0,24 B	0,38 A

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 8. Nitrogênio total acumulado no tecido da parte aérea de trevo-vermelho inoculado com 10 estirpes de rizóbio em solo com dois níveis de pH (6 e 5). Médias de 5 repetições.

Estirpes	1º corte		2º corte		3º corte		Soma	
	pH6	pH5	pH6	pH5	pH6	pH5	pH6	pH5
	----- mg/vaso -----							
EEL 12186	25,2 a	31,2 a	48,0 a	43,6 bcd	128,6 b	111,4 b	201,8 cd	186,4 cd
EEL 1387	35,2 a	33,8 a	50,4 a	43,2 bcd	126,2 b	110,2 b	211,8 bcd	187,2 cd
SEMIA 265	34,0 a	35,6 a	48,6 a	52,8 ab	143,0 ab	135,0 ab	225,6 abcd	223,4 abc
SEMIA 235	30,8 a	27,8 a	57,8 a	36,4 d	146,6 ab	114,4 b	235,2 abc	178,6 cd
EEL 7886	29,6 a	31,2 a	53,0 a	42,0 cd	125,0 b	120,2 b	209,0 bcd	193,4 bcd
EEL 12086	26,8 a	33,4 a	49,8 a	54,4 a	124,6 b	144,6 ab	201,0 cd	232,4 ab
EEL 7882	39,4 a	30,4 a	56,2 a	51,2 abc	162,8 a	143,4 ab	259,0 a	225,0 abc
EEL 1285	34,4 a	40,4 a	50,0 a	58,4 a	143,4 ab	144,4 ab	227,8 abcd	243,2 a
EEL 8186	26,4 a	33,6 a	50,0 a	50,4 abc	142,2 ab	160,6 a	219,4 abcd	244,6 a
Test.	19,4 a	29,6 a	51,0 a	35,2 d	120,4 b	55,4 c	190,8 d	120,2 e
Test. + N	36,4 a	24,6 a	54,0 a	53,6 a	164,6 a	129,8 ab	255,0 ab	208,0 abcd
Médias	32,1 A	31,9 A	52,0 A	47,0 B	139,6 A	124,0 B	226,8 A	202,6 B

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

son & Wood (1987), indicam que o valor absoluto do Al poderá ser diferente para cada tipo de meio a ser usado, isto é, a concentração do Al limitante para uma estirpe de rizóbio num meio poderá não ser limitante em outro, e desta forma, diferentes concentrações do Al talvez devam ser estabelecidas em função de cada meio.

Com relação à produção de MS apresentada na Tabela 4, as estirpes EEL 11982, 1285, 12386, 8186, 12086, 7886 e 12186 foram de 13% (EEL 12186) a 28% (EEL 7882) superiores à média das três testemunhas SEMIA 222, 235 e 265 no pH 6,5. Estas mesmas estirpes variaram de -18% (EEL 11982) a +43% (EEL 12186) em relação à média das duas melhores testemunhas (SEMIA 235 e 222) no pH 4,7+Al. Estes resultados indicam que o pH e o Al produziram um efeito seletivo sobre estas estirpes. Resultados semelhantes ocorreram também no solo (Tabelas 6 e 8) entre as estirpes EEL 7882, 1285 e 8186, sendo que a primeira estirpe foi a melhor no pH 6, e as duas últimas foram as melhores no pH 5. No caso da estirpe SEMIA 235, que apresentou a me-

nor produção de MS e N total no pH 5,0, embora a nodulação tenha sido igual à da testemunha sem inoculação, é possível que neste tratamento esta estirpe tenha sofrido uma competição com as estirpes nativas que foram ineficientes, uma vez que esta estirpe mostrou-se suscetível a baixo pH (Tabela 2). Por exemplo, Jones & Morley (1981), ao estudarem o efeito do pH na preferência de duas estirpes de rizóbio para trevo-branco, encontraram que a estirpe CP3B produziu 86% do número de nódulos no pH 5, e a R4 apenas 16%, porém no pH 7 a R4 aumentou para 66% na formação dos nódulos. Quanto a este efeito do pH sobre a competição e sobrevivência das estirpes, será objeto de próximos estudos.

CONCLUSÕES

1. As estirpes EEL 287, 887, 10286 e 12186 foram tolerantes a Al no pH 4,5 em solução nutritiva.
2. As estirpes EEL 1285 e 8186 foram as mais eficientes em solo com pH 5.

3. A correlação entre o número de nódulos e produção de matéria seca somente foi significativa no pH ácido, com ou sem Al em solução nutritiva.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Luis Carlos Greiner pelas análises estatísticas realizadas.

REFERÊNCIAS

- ANDREW, C.S. Legumes and acid soils. In: DÖBEREINER, J.; BURRIS, R.H.; HOLLAENDER, A.; FRANCO, A.A.; NEYRA, C.A.; SOTT, D.B. (eds.). **Limitations and potentials for nitrogen fixation in the tropics**. New York: Plenum Press, 1978. p.135-60.
- BROSE, E. SCHAFFRATH, 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.
- BROSE, E. **Seleção de estirpes de rizóbios tolerantes a baixo pH para leguminosas forrageiras**. Florianópolis: DID/EMPASC, 1987. 4p. (Pesquisa em Andamento, 76).
- CARVALHO, M.M. de; EDWARDS, D.G.; ASHER, C.J.; ANDREW, C.S. Effects of aluminium on nodulation of two *Stylosanthes* species grown in nutrient solution. **Plant and Soil**, v.64, p.141-152, 1982.
- COOPER, J.E.; WOOD, M.; HOLDING, A.J. The influence of soil acidity factors on rhizobia. In: JONES, D.G.; DAIRE, D.S. (eds.). **Temperate legumes: physiology, genetics and nodulation**. Pitman: [s.n.] 1983. p.319-335.
- DE MANZI, J.M.; SIM, N.; CARTWRIGHT, P.M. Cowpea rhizobia: variation in acid tolerance and the effects of aluminium and manganese ions. **Tropical Grain Legume Bulletin**, v.27, p.17-20, 1984.
- JOHNSON, A.C.; WOOD, M. Deionized distilled water as a medium for aluminium toxicity studies of *Rhizobium*. **Letters in Applied Microbiology**, v.4, p.137-139, 1987.
- 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.183-90, 1981.
- KEYSER, H.H.; MUNNS, D.N. Tolerance of rhizobia to acidity, aluminum, and phosphate. **Soil Science Society of America Journal**, v.43, p.519-523, 1979.
- LIE, T.A. Symbiotic nitrogen fixation under stress conditions. **Plant and Soil**, p.117-127, 1971. Volume especial.
- LINDSTROM, K.; MYLLYNIEMI, H. Sensitivity of red clover rhizobia to soil acidity factors in pure culture and in symbiosis. **Plant and Soil**, v.98, n.3, p.353-362, 1987.
- MUNNS, D.N. Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture I. Acid-sensitive steps. **Plant and Soil**, v.28, p.129-146, 1968.
- MUNNS, D.N. Soil acidity and related factors. In: VINCENT, J.M.; WITNEY, A.S.; BOSE, J. (eds.). **Exploiting the legume-Rhizobium symbiosis in tropical agriculture**. [S.L.]: University of Hawaii College of Tropical Agriculture, 1977. p.211-236.
- MUNNS, D.N.; KEYSER, H.H. Response of *Rhizobium* strains to acid and aluminium stress. **Soil Biology and Biochemistry**, v.13, p.115-118, 1981.
- MUNRO, A.L.S. Measurement and control of pH values. **Methods in Microbiology**, v.2, p.39-91, 1970.
- 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. Environmental factors in the fixation of nitrogen by the legumes. In: BARTHOLOMEW, W.V.; CLARKE, F.E. (eds.). **Soil nitrogen**. [S.L.]: American Society of Agronomy, 1965. p.384-435.
- VINCENT, J.M. **Manual práctico de rizobiología**. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 1975. 200p.
- WOOD, M.; COOPER, J.E.; HOLDING, A.J. Aluminium toxicity and nodulation of *Trifolium repens*. **Plant and Soil**, v.78, p.381-391, 1984.