

AVALIAÇÃO DE RIZÓBIO EM CORNICHÃO EM SOLO ÁCIDO

EDEMAR BROSE²

RESUMO - Foram testadas 16 estirpes de *Rhizobium loti* em cornichão, (*Lotus corniculatus* L.) cv. São Gabriel, em casa de vegetação, num solo da unidade de mapeamento Vacaria (Haplohumox). O solo, após a calagem, mostrava pH de 5,1, 6,5 ppm de P e 0,9 meq/100 g de Al. Em laboratório, 14 estirpes foram testadas quanto ao crescimento em meio líquido, sob dois níveis de pH (4,9 e 4,5) e cinco níveis de Al (0, 50, 100, 150 e 300 μ). As estirpes EEL 3484, EEL 11184 e EEL 17384 foram as mais susceptíveis ao Al nos pHs 4,9 e 4,5. Estas três estirpes também foram as menos eficientes no solo em casa de vegetação, tanto em produção de matéria seca como em N total no tecido da parte aérea. As estirpes EEL 13484, EEL 13584 e EEL 17384 foram as de melhor desempenho em produção de matéria seca, embora não tendo diferido estatisticamente das testemunhas SEMIA 806 e SEMIA 816.

Termos para indexação: *Rhizobium loti*, *Lotus corniculatus*, pH, Al.

EVALUATION OF RHIZOBIUM ON BIRDSFOOT TREFOIL IN ACID SOIL

ABSTRACT - Sixteen strains of *Rhizobium loti* were tested on birds foot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) cv. São Gabriel in a greenhouse with a Haplohumox soil (Vacaria unit). After liming, the soil showed pH 5.1, P 6.5 ppm and Al lowered to 0.9 meq/100 g. In the laboratory, 14 strains were tested for their growth ability on two levels of pH (4.9 and 4.5) and five levels of Al (0, 50, 100, 150 and 300 μ). The strains recommended for inoculant production, SEMIA 806 and SEMIA 816, were used as controls. The strains EEL 3484, EEL 11184 and EEL 17384 were the most susceptible to Al at pH 4.9 and 4.5 and were associated with low dry matter yield and total plant N in the greenhouse experiment. The strains EEL 13484, EEL 13584 and EEL 17384 had the best performance in terms of dry matter (DM) production as compared to the controls SEMIA 806 and SEMIA 816, although the differences observed were not statistically significant.

Index terms: *Rhizobium loti*, *Lotus corniculatus*, pH, Al.

INTRODUÇÃO

Numa pastagem de gramíneas, sempre é desejável a consorciação com uma leguminosa, visando melhorar a qualidade da pastagem e aproveitar a fixação do N₂ pela leguminosa. O cornichão tem sido uma das leguminosas mais utilizadas para esta finalidade, mas nem sempre é cultivado nas condições ideais de pH e fertilidade. Tem sido observado que o cornichão apresenta melhor nodulação em níveis mais

baixos de calagem que o trevo-branco (Greenwood 1961), e ainda utiliza o fosfato com maior eficiência (Brock 1973 e Gibson et al. 1975).

Para garantir boa resposta da planta em níveis mais baixos de fertilidade e pH, é preciso assegurar boa nodulação da leguminosa, utilizando-se estirpes de rizóbio mais tolerantes ao Al e pH baixo. Estirpes de rizóbio, em laboratório, apresentam variabilidade muito grande com relação à tolerância a pH e Al (Wood & Cooper 1985, Thornton & Davey 1983, Keyser et al. 1979 e Munns et al. 1979), e as estirpes tolerantes nestas condições de laboratório têm dado melhores respostas em nodulação também em condições de campo em solos mais ácidos (Lewendorf et al. 1981, Hartel & Alexander 1983 e Hartel et al. 1983). Wood & Cooper (1985), em trabalhos de seleção de oito estirpes de rizóbio

¹ Aceito para publicação em 3 de janeiro de 1992
Trabalho conduzido na Estação Experimental da EMPASC em Lages, financiado pela EMBRAPA e Convênio FINEP (PADCT)/EMPASC.

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

01

para trevo e nove para *Lotus*, em condições de laboratório, constataram que as estirpes de rizóbio para *Lotus* foram mais tolerantes ao Al do que as de trevo.

Por outro lado, Wood et al. (1985) constataram que as populações de rizóbio para trevo-branco, nos solos da Irlanda do Norte, foram maiores (tanto em número de nódulos como em locais) do que para *L. pedunculatus*. Observações feitas na região do Planalto de Santa Catarina mostraram que, de um total de 31 amostras de solos coletadas em 8 municípios, 21 apresentaram rizóbio de trevo-vermelho, enquanto que somente duas amostras continham rizóbio de cornichão (dados não publicados). As espécies de trevo (principalmente trevo-branco) são muito mais amplamente cultivadas nesta região do que o cornichão, o que provavelmente explica a baixa população de rizóbio para o cornichão.

O objetivo deste trabalho foi comparar estirpes nativas no Planalto Central de Santa Catarina, com as recomendadas para produção de inoculantes para cornichão.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram testadas 16 estirpes de *Rhizobium loti* para cornichão, cv. São Gabriel, em vasos com 2 kg de um solo da unidade de mapeamento Vacaria (Haplohumox), em condições de casa de vegetação. As 12 estirpes bacterianas com a sinonímia EEL são isolamentos locais a partir de nódulos provindos da região do Planalto do Estado de Santa Catarina, as estirpes SEMIA 806, SEMIA 808 (= USDA 3072 A) e SEMIA 816 foram recebidas do Laboratório de Microbiologia do Solo do IPAGRO, do Rio Grande do Sul, RS, e a USDA 3471 foi recebida dos Estados Unidos. As estirpes SEMIA 806 e SEMIA 816 foram utilizadas como testemunhas neste trabalho, por serem recomendadas oficialmente para o *L. corniculatus*.

Estas estirpes também foram testadas quanto à capacidade de crescerem em meio líquido, segundo Keyser et al. (1979), nos níveis de 0, 50, 100, 150 e 300 μ de Al, em dois níveis de pH (4,5 e 4,9). O P do meio foi usado na concentração de 10 μ , e para o tamponamento deste meio foi adicionado, separadamente, o glutamato de sódio a 1,8 g/l, após ter sido autoclavado. As estirpes bacterianas, após terem sido desenvolvidas

em meio de agar-manitol com extrato de levedura segundo Vincent (1975), foram suspensas em água estéril a uma concentração de 10^8 a 10^9 células/ml adicionando-se uma gota em 5 ml do meio acima descrito em cada um dos tratamentos. Após cinco dias de incubação, foi feita observação visual da turbidez do meio para avaliar o crescimento das estirpes.

No solo, foi feita uma correção da acidez pela adição do equivalente a 6 t/ha de CaCO_3 + MgCO_3 na proporção de 3:1 e uma adubação (em mg/vaso) de 198 de P (Na_2HPO_4), 400 de K (KCl), 130 de S (K_2SO_4) e 1,36 de Mo (Na_2MoO_4). As condições originais de fertilidade do solo eram de pH 4,8 e 1 ppm de P, 4,2 meq/100 g de Al e 5% de matéria orgânica. No final do experimento, o solo estava com um pH de 5,1, P em torno de 6,5 ppm, e o Al, com 0,9 meq/100 g.

Além das 16 estirpes bacterianas, foram adicionados mais dois tratamentos sem inoculação; um, sem N mineral, e outro, com adição de 425 mg de N/vaso, na forma de NH_4NO_3 . Este N foi parcelado em quantidades de 25 mg/vaso a intervalos de uma semana, aplicados a partir de 25 dias após a instalação do experimento.

O delineamento experimental foi de blocos completamente casualizados com quatro repetições. As variáveis observadas foram produção de matéria seca (MS) e N total no tecido da parte aérea em três cortes realizados aos 87, 120 e 151 dias após o transplante. Após o primeiro corte, foi adicionada mais uma adubação de 120 mg/vaso de K e 49 mg/vaso de P. No último corte, foi avaliado também o peso de nódulos frescos por vaso. As plantas foram cortadas a uma altura de 3 a 4 cm acima da superfície do solo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da produção de matéria seca (MS) e da nodulação estão na Tabela 1, e os dos teores de N total, na Tabela 2.

No primeiro corte, não houve diferença significativa entre as estirpes com base na produção de MS, assim como no terceiro corte as diferenças foram mínimas. No primeiro corte, a baixa variação entre as estirpes deveu-se, possivelmente, à mineralização do N orgânico do solo, a qual sempre ocorre em vasos nas condições de casa de vegetação (Kolling & Scholles 1980). Após o esgotamento do N mineralizado no solo, observou-se uma diferença nítida entre as estirpes no segundo corte (120 dias após plantio).

TABELA 1. Produção de matéria seca de *Lotus corniculatus* em 3 cortes e peso de nódulos frescos no último corte, inoculado com 16 estirpes de *Rhizobium loti*. Médias de 4 repetições.

Estirpes	Produção de MS (g/vaso)				Peso de Nod. (g/vaso)
	1º Corte	2º Corte	3º Corte	Soma	
EEL 3484	3,51 a	1,52 fg	4,72 cd	9,75 de	2,37 bcd
EEL 7784	3,18 a	2,22 def	4,95 abc	11,36 bcd	3,10 ab
EEL 11184	3,28 a	1,37 fg	5,27 bc	9,88 de	2,48 abcd
EEL 11284	3,19 a	2,96 bcd	6,33 abc	12,48 bcd	3,68 a
EEL 11384	2,96 a	1,83 efg	5,34 abc	10,12 cde	2,58 abcd
EEL 13484	3,24 a	3,39 b	6,95 ab	13,58 ab	2,44 abcd
EEL 13384	2,94 a	2,98 bcd	6,06 abc	11,98 bcd	2,46 abcd
EEL 13584	3,58 a	3,45 b	6,38 ab	13,41 ab	2,58 abcd
EEL 17384	3,24 a	3,31 b	6,48 ab	13,03 ab	2,24 bcd
EEL 17584	3,17 a	3,12 b	6,40 b	12,68 b	1,99 bcd
EEL 2085	3,54 a	3,07 bc	6,09 abc	12,70 b	2,07 bcd
SEMIA 806	3,30 a	3,00 bcd	5,84 abc	12,14 bcd	2,83 abc
SEMIA 808	3,06 a	2,38 cde	5,71 abc	11,14 bcd	2,96 ab
SEMIA 816	3,80 a	3,28 b	6,22 abc	13,30 ab	2,34 bcd
EEL 51 (= USDA 3471)	3,32 a	3,04 bcd	6,17 abc	12,53 bc	2,24 bcd
EEL 3686	3,75 a	1,64 efg	5,73 abc	11,12 bcd	1,54 cd
Test.	3,44 a	1,23 g	3,75 d	8,43 e	1,96 bcd
Test. + N*	4,24 a	4,20 a	6,92 a	15,36 a	1,33 d
Coefficiente de variação (%)	19,76	20,88	16,35	13,34	33,20

* Aplicação de N no 1º corte = 175 mg/vaso; no 2º corte = 100 mg/vaso e no 3º corte = 150 mg/vaso.

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

As estirpes EEL 3484, EEL 11184 e EEL 11384 apresentaram produções de MS e N total (Tabelas 1 e 2) menores do que as duas melhores - EEL 13484 e EEL 13584 -, acusando uma redução média de 117% em termos de MS produzida no segundo corte. Com base no N total, esta diferença foi de 131%. A pouca diferença entre as estirpes na produção de MS e N total no terceiro corte pode ser atribuída a uma provável contaminação dos vasos, que facilmente ocorre com o passar do tempo pelas intensas manipulações destes na casa de vegetação.

As três estirpes menos eficientes (EEL 3484, EEL 11184 e EEL 11384) coincidiram também em maior suscetibilidade ao AI (Tabela 3). A EEL 3484 cresceu razoavelmente até 100 µ de AI, e as outras duas não cresceram em presença do AI. As demais estirpes não tiveram problemas em crescer na presença do AI até 150 ou

300 µ, com exceção da SEMIA 808 no pH 4,5. As estirpes EEL 13484 e EEL 17384, embora tendo apresentado as maiores produções de MS, não diferiram estatisticamente das duas testemunhas SEMIA 806 e SEMIA 816 (Tabela 1); entretanto, poderão ser estirpes recomendadas para testes de comprovação no campo em condições mais ácidas, porque apresentam tolerância a pH. Quanto ao N total no tecido da parte aérea, estas mesmas estirpes também não foram significativamente diferentes na soma de três cortes (Tabela 2). A estirpe USDA 3471, importada dos Estados Unidos, embora não tenha proporcionado uma boa produção de MS, igualou-se às melhores estirpes em teores de N total no tecido (Tabelas 1 e 2).

Na comparação da produção de matéria seca entre os três cortes (Tabela 1), observa-se que houve aumento em mais de 100% do segundo

TABELA 2. Nitrogênio total no tecido da parte aérea de *Lotus corniculatus* em 3 cortes inoculados com estirpes de *Rhizobium loti*. Médias de 3 repetições.

Estirpes	1º corte	2º corte	3º corte	Soma
EEL 3484	105 bc	47 g	181 bc	322 de
EEL 7784	93 bc	81 ef	228 ab	402 bcd
EEL 11184	91 c	45 g	205 abc	341 cde
EEL 11284	106 bc	118 bc	244 ab	466 ab
EEL 11384	97 bc	74 de	237 ab	417 bcd
EEL 13484	100 bc	123 abc	253 a	476 ab
EEL 13384	102 bc	119 bc	228 ab	448 abc
EEL 13584	104 bc	133 ab	228 ab	466 ab
EEL 17384	99 bc	131 ab	239 ab	467 ab
EEL 17584	90 c	117 bc	224 ab	431 abc
EEL 2085	110 bc	120 bc	227 ab	457 ab
SEMIA 806	99 bc	114 bcd	249 ab	453 ab
SEMIA 808	107 bc	95 cde	212 abc	413 bcd
SEMIA 816	121 ab	125 abc	219 ab	465 ab
EEL 51 (= USDA 3471)	117 abc	135 ab	216 ab	468 ab
EEL 3686	112 bc	60 fg	222 ab	385 bcd
Test.	103 bc	41 c	141 c	285 e
Test. + N*	140 a	154 a	233 ab	526 a
Coef. de variação (%)	15,79	20,81	21,25	14,16

* Aplicação de N no 1º corte = 175 mg/vaso; no 2º corte = 100 mg/vaso e no 3º corte = 150 mg/vaso.

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

para o terceiro corte, mesmo tendo sido suplementado com P e K logo após o primeiro corte. Em algumas estirpes, houve diminuição na produção de MS em relação ao primeiro corte, recuperando-se significativamente até o terceiro corte, por duas possíveis razões: (a) a tendência na diminuição da produção de MS do primeiro para o segundo corte teria sido causada pelo esgotamento do N mineralizado do solo, e o estabelecimento da nodulação e fixação do N₂ ainda não estaria ocorrendo plenamente, dado o efeito prejudicial do N inicial; (b) associado a este fator, a temperatura também pode ter influenciado. As temperaturas médias nos meses de setembro (primeiro corte), outubro (segundo corte) e novembro (terceiro corte) foram, respectivamente, de 13,3, 15,4 e 17,0°C. Com o aumento da temperatura, o acúmulo de reservas da planta nos meses anteriores propiciou um crescimento mais acelerado da planta no último período.

No peso de nódulos não houve uma variação muito grande entre as estirpes, e também não se observou correlação com a produção de MS. O coeficiente de correlação entre o peso dos nódulos frescos com a produção de MS no terceiro corte, excluindo as duas testemunhas sem inoculação, foi de $r = 0,021$.

TABELA 3. Crescimento de estirpes de *Rhizobium loti* em meio líquido com dois níveis de pH (4,9 e 4,5) e 5 níveis de Al (0, 50, 100, 150 e 300 μ).

Estirpes	pH 4,9					pH 4,5					
	Al (μ M)	0	50	100	150	300	0	50	100	150	300
EEL 3484		+	+	±	-	-	+	±	±	-	-
EEL 7784		+	+	+	+	+	±	±	±	±	±
EEL 11184		+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
EEL 11284		+	+	±	±	±	+	+	+	+	±
EEL 11384		+	+	±	±	-	+	-	-	-	-
EEL 13384		+	+	+	+	+	+	+	+	±	-
EEL 13484		+	+	+	+	+	+	+	+	±	-
EEL 17384		+	+	+	+	+	+	+	+	+	±
EEL 17584		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
EEL 2085		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
SEMIA 806		+	+	+	+	+	+	+	+	+	±
SEMIA 816		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
USDA 3471		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SEMIA 808		+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

* Crescimento pleno: ± crescimento fraco: - sem crescimento.

Os resultados do crescimento das estirpes no meio líquido, apresentados na Tabela 3, não coincidem com observações feitas em outros trabalhos que mostraram que concentrações bem inferiores de Al têm sido limitantes para *Rhizobium phaseoli* (Karanja & Wood 1988), para *R. trifolii* (Wood & Cooper 1984) e *Rhizobium* para *Lotus* (Wood & Cooper 1985). Por outro lado, há trabalhos que demonstram tolerância de estirpes para até 19 ppm de Al (aproximadamente 600 µ) em meio solidificado com ágar (De Manzi et al. 1984). Resultados às vezes controversos podem estar relacionados a pequenas alterações que ocorrem no meio, especialmente quando se trata de meios com baixo poder tamponante. Pequenas alterações no meio pelo metabolismo bacteriano podem causar grandes alterações do pH. A maioria dos pesquisadores têm utilizado arabinose e galactose nas concentrações de 0,3 g/l, ao passo que no nosso meio foi utilizado apenas o manitol na concentração de 10 g/l.

CONCLUSÕES

1. As estirpes EEL 13484, EEL 13584, EEL 17384, de melhor produção de MS e N total, não foram estatisticamente superiores às estirpes SEMIA 806 e SEMIA 816.

2. As estirpes mais susceptíveis a Al (EEL 3484, EEL 11184 e EEL 11384) apresentaram a menor produção de MS e N total no tecido da parte aérea.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Luis Carlos Greiner, pelas análises estatísticas realizadas, e à EMBRAPA e FINEP (PADCT), pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- BROCK, J.L. Growth and nitrogen fixation of pure stands of three pasture legumes with high/low phosphate. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, v.16, p.483-491, 1973.
- 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.
- GIBSON, D.I.; HAYES, P.; LAIDLAW, A.S. The influence of phosphate and lime on the growth and N fixation of *Lotus uliginosus* and *Trifolium repens* under greenhouse conditions. *Journal of the British Grassland Society*, v.30, 295-301, 1975.
- GREENWOOD, R.M. Pasture establishment on a podsolized soil in Northland. III. Studies on rhizobia populations and the effect of inoculation. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, v.4, p.375-389, 1961.
- 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 and survival of cowpea rhizobia in acid, aluminium-rich soils. *Soil Science Society of America Journal*, v.47, p.514-517, 1983.
- KARANJA, N.K.; WOOD, M. Selecting *Rhizobium phaseoli* strains for use with beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Kenya: Ineffectiveness and tolerance of acidity and aluminium. *Plant and Soil*, v.112, n.1, p.7-13, 1988.
- 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.
- 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.; KEYSER, H.H.; FOGUE, V.W.; HOHENBERG, J.S.; RIGHETTI, T.L.; LAUTER, D.L.; ZAROUG, M.G.; CLARKIN, K.L.; WHITACRE, K.W. Tolerance of soil acidity in symbiosis of mung bean with rhizobia. *Agronomy Journal*, v.71, p.256-260, 1979.

- THORNTON, F.C.; DAVEY, C.B. Response of the clover *Rhizobium* symbiosis to soil acidity and *Rhizobium* strains. *Agronomy Journal*, v.75, p.557-560, 1983.
- VINCENT, J.M. **Manual práctico de rizobiología.** Buenos Aires: Hemisfério Sur, 1975. 200p.
- WOOD, M.; COOPER, J.E. Aluminium toxicity and multiplication of *Rhizobium trifolii* in a defined growth medium. *Soil biology and Biochemistry*, v.16, n.6, p.571-576, 1984.
- WOOD, M.; COOPER, J.E. Screening clover and *Lotus* rhizobia for tolerance of acidity and aluminium. *Soil Biology and Biochemistry*, v.17, n.4, p.493-497, 1985.
- WOOD, M.; COOPER, J.E.; CAMPBELL, D.S. A survey of clover and *Lotus* rhizobia in Northern Ireland pasture soils. *Journal of Soil Science*, v.36, p.357-365, 1985.