

# Eficiência simbiótica de estirpes de rizóbios em *Lotus-serrano* e *adésmia* cultivados em solo de arrozeira

Antônio Luiz Tramontin<sup>1</sup>, Júlio Cesar Pires Santos<sup>2</sup>, Romano Valisceski<sup>3</sup> e Murilo Dalla Costa<sup>4</sup>

**Resumo** – Objetivou-se avaliar a eficiência simbiótica de estirpes de rizóbios na fixação biológica de nitrogênio em *Lotus uliginosus* e *Adesmia latifolia* cultivados em solo de arrozeira. Conduziram-se dois experimentos em casa de vegetação na Estação Experimental de Lages. No experimento 1, *L. uliginosus* cv. SCS313 Serrano foi inoculado com as estirpes de rizóbios EEL13702, EEL8Ce1 e EEL4284, e no experimento 2, *A. latifolia* foi inoculada com as estirpes de rizóbios EEL1811, EEL3111 e Semia 6438. Avaliaram-se número e biomassa seca de nódulos radiculares e biomassa seca e acúmulo de nitrogênio na parte aérea. Além disso, conduziu-se experimento no campo em solo de arroz irrigado para avaliar a eficiência simbiótica em *L. uliginosus* inoculado com as mesmas estirpes bacterianas testadas em casa de vegetação. Os resultados indicam a existência de estirpes nativas de rizóbios em solo de arrozeira do Alto Vale do Itajaí com capacidade de nodular ambas as espécies avaliadas. *L. uliginosus* demonstrou capacidade de adaptação e potencial de produção forrageira em condições de solo de arrozeira.

**Termos para indexação:** Bactérias diazotróficas; fixação biológica de nitrogênio; *Lotus uliginosus*, *Adesmia latifolia*.

## Symbiotic efficiency of rhizobia strains in *Lotus uliginosus* and *Adesmia latifolia* cultivated in irrigated rice soil

**Abstract** - This study aimed to assess the efficiency of biological nitrogen fixation in *Lotus uliginosus* and *Adesmia latifolia* cultivated in irrigated rice soil. Two experiments were conducted in a greenhouse at Lages Experimental Station of EPAGRI. In experiment 1, *L. uliginosus* cv. SCS313 Serrano was inoculated with rhizobia strains EEL13702, EEL8Ce1 and EEL4284 and in experiment 2, *Adesmia latifolia* was inoculated with rhizobia strains EEL1811, EEL3111 and Semia 6438. Number and dry weight of root nodules were evaluated together with dry biomass and nitrogen accumulation in plant shoots. In addition, a field experiment was conducted in an irrigated rice soil to evaluate the symbiotic efficiency in *L. uliginosus* inoculated with the same rhizobia strains tested in the greenhouse. The results indicate the existence of native rhizobia strains of nodular capability in irrigated rice soil in the region of Alto Vale do Itajaí in both plant species evaluated. *L. uliginosus* showed adaptability and forage production potential in irrigated rice soil conditions.

**Index terms:** Diazotrophic bacteria; biological nitrogen fixation; *Lotus uliginosus*, *Adesmia latifolia*.

Na região do Alto Vale do Itajaí, em Santa Catarina, o arroz irrigado é cultivado no sistema pré-germinado e, atualmente, a cultura vem sendo prejudicada pelo ataque de nematoides-das-galhas (*Meloidogyne* sp.). Duas das consequências desses ataques são o aumento dos custos de produção e a redução na produtividade das áreas.

Espécies forrageiras cultivadas entre cultivos de arroz irrigado podem apresentar imunidade ao nematoide-das-galhas (NEGRETTI et al., 2014). Assim, sistemas de integração lavoura-pecuária podem ser uma alternativa para reduzir

a infestação e o dano desse fitopatógeno. Porém, poucos estudos têm sido realizados sobre plantas forrageiras adaptadas a solos alagados. Nesse sentido, *Lotus uliginosus* Schkuhr e *Adesmia latifolia* (Spreng.) Vog são espécies leguminosas promissoras que, potencialmente, podem ser aproveitadas para as áreas com plantio de arroz, uma vez que são adaptadas a condições de solo com alta umidade ou inundados (JAMES & CRAWFORD, 1998; SCHEFFER-BASSO et al., 2009).

*Lotus uliginosus* é uma espécie perene rizomata de ciclo hibernar que

apresenta tolerância a solos ácidos e deficientes em fósforo. O cultivar Maku foi desenvolvido na Nova Zelândia e introduzido no sul do Brasil pela Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária (Empasc). Seu cultivo foi restringido pela baixa capacidade de produção de sementes, mas essa limitação foi superada com o lançamento do cultivar SCS313 Serrano, desenvolvido pela Epagri/Estação Experimental de Lages (ROSA et al., 2008; HANISCH et al., 2012).

O gênero *Adesmia*, de origem sul-americana, tem recebido atenção pelo potencial forrageiro, pois, assim como

Recebido em 23/5/2014. Aceito para publicação em 7/4/2016.

<sup>1</sup> Biólogo, Instituto Federal Catarinense/Campus Rio do Sul, Estrada do Redentor, 5665, Bairro Canta Galo, Rio do Sul, SC, fone: (47) 3531-3700, e-mail: toninhotramontin@yahoo.com.br.

<sup>2</sup> Engenheiro-agrônomo, Dr., Udesc, Biologia do solo, Lages, SC, e-mail: bijagica@gmail.com.

<sup>3</sup> Engenheiro-agrônomo, Dr., Instituto Federal Catarinense/Campus Rio do Sul, Gênese e morfologia do solo, Rio do Sul, SC, e-mail: romano@ifc-riodosul.edu.com.br.

<sup>4</sup> Engenheiro-agrônomo, Dr., Epagri/Estação Experimental de Lages, Laboratório de Biotecnologia, C.P. 181, Lages, SC, e-mail: murilodc@epagri.sc.gov.br.

outros gêneros de *Fabaceae*, forma nódulos radiculares em simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico (SCHEFFER-BASSO et al., 2001). A espécie *Adesmia latifolia* apresenta folhas maiores que outras espécies do gênero e tem ciclo hiberno-primaveril e porte rasteiro com intenso desenvolvimento de estolões. Em termos nutritivos, possui valor semelhante a espécies leguminosas já cultivadas e comercializadas (SCHEFFER-BASSO et al., 2005; SCHEFFER-BASSO et al., 2009), podendo, dessa forma, representar ganho na qualidade nutricional das pastagens.

Até o momento, foram desenvolvidos poucos estudos com essas espécies leguminosas visando avaliar seu desenvolvimento em solos inundados ou com elevada umidade, bem como na seleção de estirpes de rizóbios eficientes na fixação biológica de nitrogênio. Nesse sentido, o trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência simbiótica de estirpes de rizóbios no crescimento e na fixação biológica de nitrogênio em lótu-serrano (*Lotus uliginosus*) cv. Serrano e *Adesmia latifolia* em condições de cultivo em casa de vegetação e, no campo, em solo de arrozeira.

Foram conduzidos dois experimentos em casa de vegetação na Epagri/Estação Experimental de Lages. No primeiro experimento, sementes de lótu-serrano foram inoculadas com as estirpes de rizóbios EEL13702, EEL8Ce1 e EEL4284 (BROSE, 1992). No segundo experimento, sementes de *Adesmia latifolia* foram inoculadas com as estirpes EEL1811, EEL3111 e Semia 6438, esta última uma estirpe recomendada para a produção de inoculantes comerciais pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2011). As estirpes de rizóbios utilizadas foram originárias de trabalhos de pesquisa do Laboratório de Biotecnologia da Epagri/Estação Experimental de Lages na década de 80 e isoladas de plantas hospedeiras no Planalto Sul Catarinense. Para ambos os experimentos, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo cada unidade experimental constituída por uma planta cultivada em vaso contendo 5L de mistura de solo e vermiculita (4:1, v/v). O solo utilizado para preenchimento dos vasos foi coletado em uma área

de arrozeira localizada no município de Mirim Doce, SC, na mesma propriedade rural onde foi estabelecido o experimento de campo, na camada superficial de até 20cm, com os seguintes atributos físico-químicos: argila, 430g.kg<sup>-1</sup>; matéria orgânica, 31g.kg<sup>-1</sup>; pH<sub>H<sub>2</sub>O(1:1)</sub> 4,8; Ca, 4,32cmol<sub>c</sub>.dm<sup>-3</sup>; Mg, 3,76cmol<sub>c</sub>.dm<sup>-3</sup>; Al, 2,68cmol<sub>c</sub>.dm<sup>-3</sup>; CTC, 10,92cmol<sub>c</sub>.dm<sup>-3</sup>; P, 3,6mg.dm<sup>-3</sup>; K, 61mg.dm<sup>-3</sup>.

A semeadura foi realizada no dia 1º de setembro de 2012, utilizando-se dez sementes de lótu-serrano por vaso e quatro sementes de *Adesmia latifolia* por vaso. Nessa espécie foi realizado condicionamento osmótico das sementes para promoção de germinação uniforme conforme descrito por Suñé et al. (2002). O raleamento foi realizado 40 dias após a semeadura, deixando-se apenas a planta mais vigorosa por vaso. Para a produção dos inoculantes, as estirpes de rizóbios foram multiplicadas em meio levedura-manitol (VINCENT, 1970) após incubação por 72 horas a 28°C sob agitação constante a 60rpm, quando todas atingiram a concentração mínima de 10<sup>8</sup> células por mililitro. A inoculação foi realizada no dia da semeadura, aplicando-se sobre as sementes 2ml de suspensão bacteriana de cada estirpe. Como controle, foi utilizado um tratamento sem inoculação e sem adubação nitrogenada para cada espécie vegetal. Durante o período experimental, os vasos foram mantidos sobre prato com água, proporcionando umidade além da capacidade de campo, embora sem lâmina superficial de água. Não foram realizadas correções de níveis de nutrientes no substrato utilizado. A coleta das plantas foi realizada 130 dias após a semeadura. Em cada unidade experimental foram avaliados o número e biomassa da matéria seca de nódulos radiculares, a biomassa da matéria seca e a concentração de nitrogênio e nitrogênio total acumulado na parte aérea. A parte aérea das plantas e os nódulos radiculares foram mantidos em estufa com circulação forçada de ar a 68°C por três dias antes da determinação da biomassa da matéria seca. Após, a parte aérea de cada planta foi triturada em moinho de faca tipo Willey e utilizada para a determinação do teor de nitrogênio conforme a metodologia descrita por Tedesco et al. (1995).

Em experimento em campo no município de Mirim Doce, SC, avaliou-se o desempenho de lótu-serrano cultivado sobre solo de arrozeira e inoculado com as estirpes de rizóbios EEL13702, EEL8Ce1 e EEL4284. As unidades experimentais foram formadas por parcelas de 4 x 2m. Como controle, utilizaram-se parcelas semeadas com lótu-serrano sem inoculação e parcelas sem semeadura, com crescimento de vegetação espontânea preexistente na área. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso com quatro repetições. O preparo da área e a semeadura foram realizados em julho de 2012, utilizando-se densidade de 40kg.ha<sup>-1</sup> de sementes por parcela. Durante o período de desenvolvimento inicial das plantas, em função das condições de estiagem, foi necessária uma irrigação por aspersão aplicando-se lâmina de 1,5mm. Após 240 dias da semeadura, foi avaliada a produção de biomassa seca total da parte aérea das parcelas e o nitrogênio total acumulado na parte aérea. Isso foi feito por meio de coleta ao acaso de uma amostra de 0,25m<sup>2</sup> por parcela, tendo o corte sido efetuado manualmente 3cm acima do solo.

Nessa mesma área se instalou, em iguais condições, o experimento com adésmia, levando-se ao campo as mudas produzidas em casa de vegetação. Apesar de o estabelecimento inicial ter sido bom, as plantas não se desenvolveram, motivo pelo qual os resultados não serão apresentados. Atribuímos o insucesso do estabelecimento da adésmia às temperaturas muito altas do verão da região ou à compactação superficial do solo, características das áreas de arrozadeiras.

Os dados foram submetidos à análise de variância. Os testes de normalidade de Shapiro-Wilk e de homogeneidade de variâncias Bartlett foram aplicados aos dados e, em caso de não atendimento dessas pressuposições, empregou-se transformação de Box-Cox. Quando se detectou efeito significativo dos tratamentos, aplicou-se o teste de separação de médias (Tukey, p ≤ 0,05). Todas as análises foram realizadas empregando-se o programa estatístico R versão 3.2.1 (R Core Team, 2015).

Em lótu-serrano cultivado em casa de vegetação, foram detectadas dife- ▶

renças entre os tratamentos de inoculação somente para biomassa seca da parte aérea (Tabela 1). Em todos os tratamentos testados observou-se a presença de mais de 400 nódulos por planta, e nenhuma das estirpes testadas se mostrou mais eficiente que o controle na fixação biológica de nitrogênio, indicando a presença de rizóbios nativos no solo com capacidade de nodulação e eficientes na fixação biológica de nitrogênio. Como o solo utilizado no experimento não foi esterilizado e não foi realizada a caracterização genética das estirpes presentes nos nódulos das plantas, não é possível afirmar que as estirpes, nativas ou inoculadas, foram eficientes na nodulação de *Lotus uliginosus*. No entanto, considerando-se o número médio de nódulos no tratamento sem inoculação, observa-se que não houve aumento na formação de nódulos quando do uso das estirpes inoculadas. Isso pode ser resultante da baixa competitividade das estirpes bacterianas inoculadas, associado ou não a altas populações de rizóbios nativos nodulíferos no lótu. Estudos já mostraram resultados semelhantes entre estirpes nativas e selecionadas (BROSE, 1992; GIONGO, 2003; FONTOURA, 2007). Outro fator que pode ter contribuído para o baixo desempenho dos isolados testados é o fato de eles serem oriundos de regiões de altitude próxima aos 1.000m, em clima relativamente mais frio e com condições edafoclimáticas diferentes daquelas do Alto Vale do Itajaí.

Em *Adesmia latifolia*, a formação de nódulos foi observada principalmente em raízes de ordem primária. Nessa forrageira, a estirpe EEL1811 foi mais eficiente na nodulação e acúmulo de matéria seca de nódulos e acúmulo de nitrogênio do que as estirpes nativas (Tabela 2). Plantas inoculadas com EEL1811 apresentaram maior massa de nitrogênio total acumulado na parte aérea do que as inoculadas com Semia 6438. Esse fato indica que esse isolado pode ser usado em avaliações em condições de campo futuramente, uma vez que foi superior a uma das estirpes recomendadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2011).

A floração do lótu-serrano foi profusa, iniciando-se 150 dias após a seme-

adura. Todos os tratamentos com implantação com essa forrageira tiveram, aos 240 dias após semeadura, uma produção de massa de matéria seca da parte aérea acima de 4.500kg.ha<sup>-1</sup>. Esses resultados são superiores aos registrados por Flaresso & Almeida (1992) em outro tipo de solo, também do Alto Vale do Itajaí, que obtiveram 2.828kg.ha<sup>-1</sup> de massa de matéria seca. Quanto ao acúmulo total de nitrogênio na parte aérea, não se observaram diferenças entre as estirpes testadas e o controle sem inoculação, corroborando os resultados obtidos em casa de vegetação (Tabela 3). Estudos futuros mais aprofundados, com maior número de avaliações,

podem indicar a capacidade de reciclagem de nitrogênio por essa leguminosa, além do potencial na produção forrageira e na redução da infestação dos solos por nematoides-das-galhas.

Conclui-se que estirpes nativas de rizóbios do solo de área de arrozeira formaram nódulos e contribuíram na fixação biológica de nitrogênio em *Lotus uliginosus* cv. Serrano. Em *Adesmia latifolia*, a estirpe de rizóbio EEL1811 apresentou a maior eficiência simbiótica e pode ser avaliada em condições adequadas de campo e clima quanto à capacidade de fixação biológica de nitrogênio. *Lotus uliginosus* cv. Serrano é uma leguminosa forrageira com poten-

Tabela 1. Número (NND) e massa seca de nódulos (MSN), massa seca (MSPA), teor de nitrogênio (N%) e nitrogênio total acumulado na parte aérea (NT) em *Lotus uliginosus* cv. Serrano inoculado com estirpes de rizóbios

| Tratamento | NND  | MSN<br>(g.planta <sup>-1</sup> ) | N<br>(%) | MSPA<br>(g.planta <sup>-1</sup> ) | NT<br>(mg.planta <sup>-1</sup> ) |
|------------|------|----------------------------------|----------|-----------------------------------|----------------------------------|
| EEL4284    | 469  | 1,815                            | 2,9      | 17,2ab                            | 0,499                            |
| EEL8Ce1    | 611  | 1,657                            | 2,5      | 15,1b                             | 0,373                            |
| EEL13702   | 589  | 1,765                            | 2,6      | 22,3ab                            | 0,588                            |
| Controle   | 445  | 1,759                            | 2,3      | 24,6a                             | 0,551                            |
| CV %       | 43,8 | 7,2                              | 15,2     | 26,1                              | 23,8                             |

Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente (Tukey, p ≤ 0,05; n = 5).

Tabela 2. Número (NND) e massa seca de nódulos (MSN), massa seca (MSPA), teor de nitrogênio (N%) e nitrogênio total acumulado na parte aérea (NT) em *Adesmia latifolia* inoculada com diferentes estirpes de rizóbios

| Tratamento | NND   | MSN<br>(g.planta <sup>-1</sup> ) | N<br>(%) | MSPA<br>(g.planta <sup>-1</sup> ) | NT<br>(mg.planta <sup>-1</sup> ) |
|------------|-------|----------------------------------|----------|-----------------------------------|----------------------------------|
| Semia 6438 | 431ab | 1,637ab                          | 2,2      | 12,4                              | 0,268b                           |
| EEL3111    | 515ab | 1,685ab                          | 2,5      | 14,5                              | 0,358ab                          |
| EEL1811    | 776a  | 1,864a                           | 2,6      | 19,3                              | 0,499a                           |
| Controle   | 29,8b | 0,906b                           | 2,2      | 12,2                              | 0,245b                           |
| CV %       | 72,4  | 29,7                             | 18,2     | 38,3                              | 35,8                             |

Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente (Tukey, p ≤ 0,05; n = 5).

Tabela 3. Massa seca (MSPA), teor de nitrogênio (N) e nitrogênio total acumulado na parte aérea (NT) de parcelas cultivadas com *Lotus uliginosus* cv. Serrano inoculado com estirpes de rizóbios em solo de arrozeira no município de Mirim Doce, SC

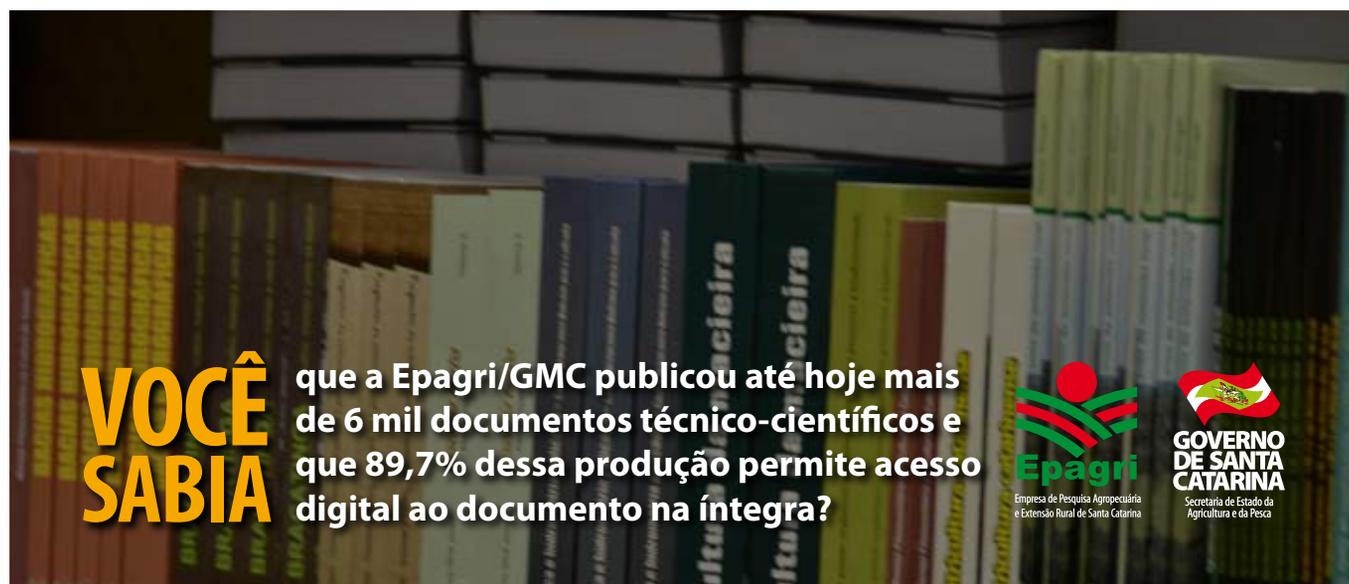
| Tratamento           | MSPA<br>(g.m <sup>-2</sup> ) | N<br>(%)          | NT<br>(mg.m <sup>-2</sup> ) |
|----------------------|------------------------------|-------------------|-----------------------------|
| EEL13702             | 475 <sup>ns</sup>            | 2,5 <sup>ns</sup> | 11,7 <sup>ns</sup>          |
| EEL4284              | 530                          | 1,9               | 9,9                         |
| EEL8Ce1              | 405                          | 1,9               | 7,8                         |
| Controle             | 550                          | 2,0               | 10,8                        |
| Vegetação espontânea | 405                          | 1,8               | 7,3                         |
| CV %                 | 32,8                         | 20,2              | 46,5                        |

<sup>ns</sup> não significativo (p ≤ 0,05); n = 5.

cial para avaliação em sistemas de integração lavoura-pecuária em áreas de arrozeira.

## Referências

1. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 13, de 24 de março de 2011. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 25 de março de 2011.
2. BROSE, E. Seleção de rizóbio para *Lotus pedunculatus* em solo ácido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.27, n.3, p. 409-415, 1992.
3. FLARESSO, J.A.; ALMEIDA, E.X. Introdução e avaliação de forrageiras temperadas no Alto Vale do Itajaí, Santa Catarina. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.21, n.2, p.309-319, 1992.
4. FONTOURA, R.A. **Seleção de rizóbios nativos, de solos do Rio Grande do Sul para *Lotus glaber* e *Lotus subbiflorus***. 2007. 83f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2007.
5. GIONGO, A. **Diversidade de rizóbios nativos que nodulam feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em área de campo nativo, com adubação mineral e adubação orgânica**. 2003. 79f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2003.
6. HANISCH, A.L.; FLARESSO, J.A.; CORDOVA, U.A.; STEINWANDTER, E.; ALMEIDA, E.X. Pastagens para produção de leite em Santa Catarina. In: CORDOVA, U.A. (Org.). **Produção de leite à base de pasto em Santa Catarina**. Florianópolis: Epagri, 2012, p.115-176.
7. JAMES, E.K.; CRAWFORD, R.M.M. Effect of oxygen availability on nitrogen fixation by two *Lotus* species under flooded conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, n. 320, p. 599-609, 1998.
8. NEGRETTI, R.R.D.; MANICA-BERTO, R.; AGOSTINETTO, D.; THÜRMER, L.; GOMES, C.B. Host suitability of weeds and forage species to root-knot nematode *Meloidogyne graminicola* as a function of irrigation management. **Planta Daninha**, v.32, n.3, p.555-561, 2014.
9. R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>.
10. ROSA, J.L.; CORDOVA, U.A.; PRESTES, N.E. **Forrageiras de clima temperado para o estado de Santa Catarina**. Florianópolis: Epagri, 2008. 64p. (Epagri. Boletim Técnico, 141).
11. SCHEFFER-BASSO, S.M.; BARÉA, K.; JACQUES, A.V.A. *Paspalum* e *Adesmia*: importantes forrageiras dos Campos Sulinos. In: PILLAR, V.D.P.; MÜLLER, S.C.; CASTILHOS, Z.M.D.S.; JACQUES, A.V.A. (Eds.). **Campos Sulinos: Conservação e uso sustentável da biodiversidade**. Brasília: MMA, 2009, p.163-174.
12. SCHEFFER-BASSO, S.M.; VENDRUSCOLO, M.C.; CECCHETTI, D. Desempenho de leguminosas nativas (*Adesmia*) e exóticas (*Lotus*, *Trifolium*) em função do estágio fenológico no primeiro corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.34, n.6, p.1871-1880, 2005.
13. SCHEFFER-BASSO, S.M.; VOSS, M.; JACQUES, A.V.A. Nodulação e fixação biológica de nitrogênio de *Adesmia latifolia* e *Lotus corniculatus* em vasos de Leonard. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.3, p.687-693, 2001.
14. SUÑÉ, A.D.; FRANKE, L.B.; SAMPAIO, T.G. Efeitos do condicionamento osmótico na qualidade fisiológica de sementes de *Adesmia latifolia* (Spreng.) Vog. **Revista Brasileira de Sementes**, v.24, n.1, p.18-23, 2002.
15. TEDESCO, M.J. et al. **Análise de solo, planta e outros materiais**. 2.ed., Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS. 1995. 174p.
16. VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970. 164p. ■



**VOCÊ SABIA** que a Epagri/GMC publicou até hoje mais de 6 mil documentos técnico-científicos e que 89,7% dessa produção permite acesso digital ao documento na íntegra?

