



Avaliação da fixação biológica de nitrogênio em alfafa inoculada com estirpes comerciais de *Sinorhizobium meliloti*

Patrícia Perondi Anchão Oliveira¹
Siu Mui Tsai²

Introdução

Um dos fatores mais importantes no melhoramento genético de leguminosas é a manutenção ou o incremento da eficiência da fixação biológica de nitrogênio. Quando esse processo está efetivo, a fertilização nitrogenada pode ser dispensada, o que constitui uma das grandes vantagens das leguminosas em relação às gramíneas. Oliveira et al. (2004) concluíram que a adubação nitrogenada em alfafa não é necessária, desde que as sementes da cultura tenham sido inoculadas efetivamente com o *Sinorhizobium meliloti*, uma vez que esta bactéria não existe nos solos brasileiros (Xavier et al., 2005). Na presença de adubação nitrogenada, ocorre alta concentração de N mineral disponível para

assimilação da planta, o que afeta a formação de nódulos no sistema radicular. Isto prejudica o processo natural de absorção de nitrogênio e ocasiona retrocesso nos programas de melhoramento que visam à viabilidade econômica da cultura (Oliveira et al., 2003).

A associação alfafa-*Sinorhizobium meliloti*, que regula indiretamente a qualidade da fitomassa produzida, é uma das mais efetivas interações entre bactérias fixadoras de N e leguminosas. Admite-se a média de 450 kg/ha por ano de nitrogênio como o potencial de fixação biológica desse nutriente pela alfafa (Fishbeck et al., 1987). Entretanto, existem registros de variações entre 120 e 250 kg/ha por ano em diferentes regiões dos

¹ Pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste, Rod. Washington Luiz, km 234, Caixa Postal 339, CEP: 13560-970, São Carlos, SP. Endereço eletrônico: ppaolive@cnpse.embrapa.br

² Engenheira Agrônoma, Mestre em Ciências, Doutora em Agronomia, Professora Titular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, da Universidade de São Paulo - Piracicaba, SP. Endereço eletrônico: tsai@cena.usp.br

Estados Unidos da América, onde se realizaram até sete cortes anuais de forragem (Racca et al., 1998). Nas condições brasileiras, a fixação biológica de N pode ser responsável pela introdução de até 900 kg/ha de N por ano no sistema (Oliveira et al., 1999b). No Brasil, mais de 80% do nitrogênio contido na parte aérea de plantas de alfafa cultivadas sob irrigação é originado do processo de fixação biológica (Oliveira et al., 2004).

Além disso, a fixação biológica de N correlaciona-se positivamente com a produção de forragem e com a eficiência de uso da água, ou seja, quanto melhor funcionar o processo de fixação biológica mais produtiva será a cultivar e tanto maior será a economia de água de irrigação que poderá ser conseguida com determinada cultivar de alfafa (Oliveira et al., 2003). Dessa forma, a eficiência da fixação biológica de N torna-se um dos fatores mais importantes nos programas de melhoramento genético da alfafa.

Além dos fatores edafoclimáticos, o potencial de fixação biológica de N pode ser influenciado pela estirpe de *Sinorhizobium meliloti* empregada, pela cultivar de alfafa avaliada e pela interação entre esses dois fatores. Com o objetivo de estudar esses fatores e suas interações, foi realizado um experimento em que foram testadas cultivares de alfafa cujas sementes foram inoculadas ou não com estirpes distintas de rizóbio.

Material e métodos

O experimento foi desenvolvido em vasos de Leonard, na casa de vegetação da Faculdade de Engenharia de Alimentos e

Zootecnia da Universidade de São Paulo, em Pirassununga, SP. Foram avaliados 20 tratamentos, resultantes da combinação de dois fatores: cinco cultivares de alfafa (ABT 805, Crioula Chapecó, Crioula Itapuã, Crioula Chilena e Crioula RS) cujas sementes foram inoculadas com três estirpes de *Sinorhizobium meliloti* (SEMIA 116, SEMIA 134 e SEMIA 135) ou mantidas em solução nutritiva sem N (testemunha). As estirpes foram obtidas da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio Grande do Sul. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições de cada tratamento, em esquema fatorial completo.

Os vasos de Leonard eram constituídos por dois recipientes interligados entre si; a parte superior recebeu vermiculita e a parte inferior, solução nutritiva completa sem N (modificada de Johnson et al., 1957). Os vasos foram previamente autoclavados e foram reabastecidos com solução nutritiva sempre que necessário. Na Figura 1, encontra-se vista geral dos vasos utilizados.

Em 19/08/2005, as sementes foram desinfetadas com álcool 70° GL e secadas em lotes separados por cultivar. Em seguida, aquelas cujos tratamentos previam inoculação foram misturadas com inoculante líquido (meio YM à base de extrato de levedura-manitol), que continha a estirpe da bactéria específica de cada tratamento na concentração de 1×10^9 UFC. Foram semeadas cinco sementes em cada vaso. Na primeira semana após a emergência, foi realizado desbaste, deixando-se três plantas por vaso. A colheita foi realizada em 4/11/2005, quando as plantas apresentavam cerca de 10% de hastes florescidas.



Figura 1. Vista geral do experimento com vasos de Leonard.

Foram avaliadas as seguintes variáveis: número de nódulos de rizóbio, número de hastes, número de hastes florescidas, teor de N na forragem e teor de matéria seca na forragem, nas raízes e nos nódulos. As amostras da planta e dos nódulos coletadas nos vasos foram secadas em estufa de circulação forçada de ar a 65°C, até peso constante. O teor de nitrogênio foi determinado pelo método do microkjeldahl.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e foi aplicado o teste de Tukey para a comparação entre as médias.

Resultados e discussão

Não houve interação entre as cultivares de alfafa e as estirpes de *Sinorhizobium meliloti* no que se refere à produção de matéria seca da parte aérea, à produção de matéria seca de raízes, ao número de hastes, ao número de nódulos, à quantidade de matéria seca de nódulos, ao número de hastes e ao teor de nitrogênio na parte aérea da planta (Tabela 1). Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira et al. (1999a).

Quanto à produção de matéria seca da parte aérea, ao número de hastes, ao número de nódulos, à quantidade de matéria seca de nódulos e ao teor de nitrogênio na parte aérea das plantas, não houve diferença entre as estirpes avaliadas, mas todas elas apresentaram resultado superior ao do tratamento com ausência de inoculação (Tabela 1). Oliveira et al. (1999a) encontraram maior número de nódulos quando usaram a estirpe SEMIA 116 e maior teor de N na parte aérea das plantas com a estirpe SEMIA 135, quando avaliaram a alfafa Crioula Chilena.

A produção de matéria seca da parte aérea foi muito afetada pela ausência da inoculação. Quando as sementes foram inoculadas, a média de produção variou de 1,54 a 1,79 g de matéria seca por vaso, enquanto na ausência da inoculação as plantas produziram em média apenas 0,30 g/vaso. O número de hastes nas plantas de sementes inoculadas foi em média de 7,5 hastes/vaso, enquanto as não inoculadas

Tabela 1. Produção de matéria seca da parte aérea e das raízes, número de hastes, número de nódulos, quantidade de matéria seca de nódulos e teor de nitrogênio da parte aérea de plantas de alfafa na presença ou na ausência de inoculação com diferentes estirpes de *Sinorhizobium meliloti*.

| Estirpe | Cultivar de alfafa | | | | | Média por estirpe |
|---|--------------------|------------------|-----------------|----------------|------------|-------------------|
| | ABT 805 | Crioula Chap ecó | Crioula Chilena | Crioula Itapuã | Crioula RS | |
| ----- Produção de matéria seca da parte aérea ^{1,2} (grama/vaso)----- | | | | | | |
| SEMIA 116 | 2,14 | 2,52 | 0,82 | 1,80 | 1,20 | 1,69 a |
| SEMIA 134 | 1,46 | 2,30 | 1,16 | 1,86 | 2,20 | 1,79 a |
| SEMIA 135 | 0,76 | 1,20 | 0,96 | 3,02 | 1,78 | 1,54 a |
| Sem inoculação | 0,22 | 0,38 | 0,32 | 0,30 | 0,26 | 0,30 b |
| ----- Produção de matéria seca das raízes ² (grama/vaso) ----- | | | | | | |
| SEMIA 116 | 2,20 | 3,10 | 1,14 | 1,78 | 1,90 | 2,02 ab |
| SEMIA 134 | 2,34 | 2,70 | 1,90 | 2,38 | 2,72 | 2,41 a |
| SEMIA 135 | 1,12 | 2,00 | 1,14 | 3,20 | 2,02 | 1,90 ab |
| Sem inoculação | 1,06 | 0,94 | 0,90 | 1,16 | 1,00 | 1,01 b |
| ----- Número de hastes ² (número/vaso) ----- | | | | | | |
| SEMIA 116 | 6,80 | 9,26 | 8,00 | 6,26 | 6,36 | 7,34 a |
| SEMIA 134 | 6,40 | 7,40 | 8,00 | 7,06 | 8,50 | 7,47 a |
| SEMIA 135 | 5,60 | 5,80 | 6,88 | 9,28 | 10,1 | 7,53 a |
| Sem inoculação | 4,40 | 5,00 | 5,56 | 5,80 | 5,20 | 5,19 b |
| ----- Número de nódulos ^{1,2} (número/vaso) ----- | | | | | | |
| SEMIA 116 | 197,2 | 198,6 | 79,8 | 137,5 | 195,75 | 161,76 a |
| SEMIA 134 | 115,4 | 222,2 | 166,6 | 146,2 | 115,86 | 153,26 a |
| SEMIA 135 | 160,4 | 149,3 | 175,8 | 142,1 | 349,3 | 195,37 a |
| Sem inoculação | 0,40 | 7,2 | 0,6 | 0,8 | 0,8 | 1,96 b |
| ----- Quantidade de matéria seca de nódulos ^{1,2} (miligrama/vaso) ----- | | | | | | |
| SEMIA 116 | 152,7 | 134,1 | 49,6 | 75,9 | 150,1 | 112,5 a |
| SEMIA 134 | 58,0 | 227,7 | 86,8 | 130,9 | 135,3 | 127,8 a |
| SEMIA 135 | 51,9 | 106,9 | 71,9 | 164,7 | 234,0 | 125,9 a |
| Sem inoculação | 0,1 | 4,28 | 0,0 | 12,6 | 9,6 | 5,3 b |
| Média por cultivar | 65,7 BC | 118,3 AB | 52,1 C | 96,0 AB | 132,3 A | |
| ----- Teor de N ² (g/kg) ----- | | | | | | |
| SEMIA 116 | 21,7 | 18,4 | 21,0 | 18,6 | 18,0 | 19,5 a |
| SEMIA 134 | 18,7 | 20,1 | 24,0 | 17,1 | 20,1 | 20,0 a |
| SEMIA 135 | 16,6 | 17,0 | 18,6 | 23,8 | 21,7 | 19,5 a |
| Sem inoculação | 13,1 | 14,7 | 11,3 | 12,3 | 10,1 | 12,3 b |

¹ Variável transformada = log (variável + 1).

² Os coeficientes de variação foram: da produção de matéria seca da parte aérea, 65,5%; da produção de matéria seca das raízes, 77,5%; do número de hastes, 37,9%; do número de nódulos, 26,8%; da quantidade de matéria seca de nódulos, 37,2%; e do teor de N, 28,7%.

apresentaram somente 5,2 hastes/vaso. O mesmo ocorreu com o número de nódulos e a quantidade de matéria seca de nódulos, que foram irrisórios na ausência de inoculação.

O teor de N na forragem foi reduzido praticamente pela metade quando se suprimiu a inoculação das sementes. Nas plantas de alfafa cujas sementes foram inoculadas, a média do teor de N variou entre 19,5 e 20,0 g/kg, e nas não inoculadas o teor foi de apenas 12,3 g/kg. Em algumas combinações, o teor de N chegou a 24 g/kg, valor ainda inferior ao limite de N recomendado (26 a 35 g/kg) para alfafa por Moreira et al. (2006).

A ausência de inoculação afetou mais a produção de parte aérea do que a de raízes. Não houve diferença entre as estirpes quanto à produção de matéria seca de raízes e somente a estirpe SEMIA 134 foi superior à testemunha (sem inoculação).

Houve diferença entre as cultivares apenas na quantidade de matéria seca de nódulos. Como o número de nódulos foi estatisticamente igual entre as cultivares, aquelas que apresentaram maior quantidade de matéria seca de nódulos também apresentaram os nódulos mais pesados. A cultivar Crioula RS apresentou a maior quantidade de matéria seca de nódulos e, conseqüentemente, nódulos mais pesados do que a ABT 805. As cultivares Crioula RS, Chapecó e Itapuã apresentaram maior quantidade de matéria seca de nódulos do que a Crioula Chilena.

Conclusões

Nas condições testadas, as estirpes de *Sinorhizobium meliloti* SEMIA 116, SEMIA 134 e SEMIA 135 foram efetivas na inoculação das sementes das cultivares de alfafa ABT 805, Crioula Chilena, Crioula Chapecó, Crioula Itapuã e Crioula RS.

Não houve interação entre cultivares de alfafa e estirpes de *Sinorhizobium meliloti* quanto à eficiência da fixação biológica de nitrogênio, ou seja, não houve superioridade de nenhuma combinação entre cultivar de alfafa e estirpe de rizóbio

Referências bibliográficas

FISHBECK, K. A.; HEICHEL, G. H.; VANCE, C. P. Dry matter, nitrogen distribution and nitrogen fixation in contrasting alfalfa symbiosis. **Crop Science**, v. 27, p. 1205-1209, 1987.

JOHNSON, C. M.; STOUT, P. R.; BROYER, T. C.; CARLTON, A. B. Comparative chlorine requirement of different plant species. **Plant and Soil**, v. 8, n. 3, p. 337-53, 1957.

MOREIRA, A.; BERNARDI, A. C. C.; RASSINI, J. B.; FERREIRA, R. de P.; OLIVEIRA, P. P. A. **Fertilidade do solo e nutrição mineral da alfafa cultivada nos trópicos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. (Embrapa Pecuária Sudeste. Documentos, "no prelo").

OLIVEIRA, P. P. A.; TSAI, S. M.; CORSI, M.; DÍAZ, M. del P. Interação entre cultivares, estirpes comerciais de *Rhizobium meliloti* e fungicidas no incremento da produção de alfafa. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 34, n. 3, p. 425-31, 1999a.

OLIVEIRA, W. S.; OLIVEIRA, P. P. A.; CORSI, M.; TRIVELIN, P. C. O.; TSAI, S. M. Disponibilidade hídrica relacionada ao conteúdo de nitrogênio e produtividade da alfafa (*Medicago sativa* L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, 2003.

OLIVEIRA, W. S.; OLIVEIRA, P. P. A.; CORSI, M.; DUARTE, F. R. E.; TSAI, S. M. Alfalfa yield and quality as function of nitrogen fertilization and symbiosis with *Sinorhizobium meliloti*. **Scientia Agricola**, v. 71, n. 4, p. 443-438. 2004.

OLIVEIRA, W. S.; OLIVEIRA, P. P. A.; TSAI, S. M. Associações simbióticas com a microbiota do solo. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 16., 1999, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1999b. p. 117-132.

RACCA, R.; BASIGALUP, D.; BRENZONI, E.; BRUNO, O.; CASTELL, D.; COLLINO, D.; DARDANELLI, M.; DIAZ ZORITA, J.; DUHALDE, N.; GONZALEZ, W.; HANSEN, N.; HEINZ, F.; LAICH, A.; LOPEZ, O.; PERALTA, A.; PERTICARI, A.; QUADRELLI, E.; RIVERO, N.; ROMERO E SERENO, R. Alfalfa symbiotic dinitrogen fixation in the Argentine Pampean region. In: NORTH AMERICAN ALFALFA IMPROVEMENT CONFERENCE, 36., 1998, Bozeman. **Proceedings...** Montana: NAAIC, 1998. p. 71.

XAVIER, D. F.; GOMES, F. T.; LÉDO, F. J. da S.; PEREIRA, A. V. Eficiência de inoculantes de rizóbio na nodulação de alfafa em solo de cerrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 3, p. 781-85, 2005.

Comunicado Técnico, 70

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Pecuária Sudeste

Endereço: Rod. Washington Luiz, km 234

Fone: (16) 3361-5611

Fax: (16) 3361-5754

Endereço eletrônico: sac@cppse.embrapa.br

1ª edição on line (2006)

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Comitê de publicações

Presidente: Alberto C. de Campos Bernardi.

Secretário-Executivo: Edison Beno Pott

Membros: Carlos Eduardo Silva Santos, Odo Primavesi, Maria Cristina Campanelli Brito, Sônia Borges de Alencar.

Expediente

Revisão de texto: Edison Beno Pott

Editoração eletrônica: Maria Cristina Campanelli Brito.