

ESTUDO SÔBRE A INFLUÊNCIA DE NITRATOS DO SOLO E MODO DE INOCULAÇÃO DAS SEMENTES NA NODULAÇÃO EM ALFAFA (*MEDICAGO SATIVA* L.) ⁽¹⁾.

ELI SIDNEY LOPES, *engenheiro-agrônomo, Seção de Fertilidade do Solo*, DONALD O. NORRIS ⁽²⁾, *D. Sc. (agric), Division of Tropical Pasture, C.S.I.R.O., Brisbane, Australia*, DEANE F. WEBER, *Ph. D (bacteriologia), Instituto de Pesquisas IRI*

SINOPSE

Um experimento foi conduzido em solo do Centro de Nutrição Animal de Nova Odessa, com o objetivo de comparar a eficiência, na fixação de nitrogênio, de quatro estirpes de *Rhizobium*, previamente selecionadas em vasos de Leonard, em culturas de alfafa.

A inoculação foi feita pela maneira normalmente recomendada e por "pelleting", ou seja, revestimento, das sementes inoculadas, com uma camada de calcário aderida com goma arábica.

Matéria orgânica com alta relação C:N foi incorporada em alguns tratamentos, com a finalidade de reduzir o nível de NO₃, que quando em altos níveis inibe a nodulação.

Provavelmente a simbiose especializada dessa leguminosa e as condições de acidez local não permitiram que se formassem nódulos nos tratamentos não inoculados.

A inoculação realizada pelo método convencional não foi suficiente para promover boa nodulação.

A inoculação com "pelleting" mostrou-se altamente eficiente, provocando boa nodulação e propiciando altas produções, tanto nos tratamentos que receberam como nos que não receberam matéria orgânica. As diferenças de peso entre os tratamentos testemunhas e inoculação com "pelleting" foram maiores onde houve incorporação de matéria orgânica.

⁽¹⁾ Trabalho aprovado no X Congresso Brasileiro e II Congresso Latino-Americano de Ciência do Solo, realizado em Piracicaba, em 1965. Recebido para publicação em 13 de novembro de 1968.

⁽²⁾ Consultor, em Bacteriologia de leguminosas, ao Instituto de Pesquisas IRI, no período de janeiro de 1964 a fevereiro de 1965.

1 — INTRODUÇÃO

A seleção de estirpes de *Rhizobium*, em casa de vegetação, utilizando a técnica dos vasos de Leonard, modificada por Norris (7), tem-se mostrado satisfatória.

A importância desta seleção pode ser compreendida pela observação de dados da literatura, onde foram verificadas diferentes produções para uma mesma leguminosa, quando inoculadas com diferentes estirpes (2, 6).

A seleção, em condições de campo, pode ser prejudicada pela presença de altos teores de nitratos no solo, que agem como inibidores de nodulação (8). Griffith e Manning (3) relataram dados de grande acúmulo de nitratos, em solos africanos, nas estações chuvosas. Verdade (9) fez observações semelhantes, para as condições do Estado de São Paulo, em Latossolo Roxo. A incorporação de matéria orgânica com alta relação C:N tem sido indicada para a redução dos teores de nitratos, quando se deseja testar estirpes de *Rhizobium* em condições de campo (6).

A técnica, desenvolvida por Loneragan e outros (4), de inoculação e posterior cobertura das sementes com calcário ("pelleting"), é recomendada para o plantio de leguminosas, principalmente para as de maior exigência em calcário, quando cultivadas em solos ácidos. Esta técnica, além de propiciar o cálcio necessário à nodulação, protege e preserva as bactérias na semente assim inoculada. Experimentos em larga escala, realizados no Uruguai, com sementes de trevo branco e trevo subterrâneo inoculadas por esse processo, mostraram ótimos resultados (5).

No presente ensaio, em caráter preliminar, procurou-se observar o comportamento de quatro estirpes de *Rhizobium*, previamente selecionadas em vasos de Leonard. Bagacilho de cana foi incorporado em alguns tratamentos, com a finalidade de reduzir o nível de nitratos do solo. Foi também objetivo de nosso trabalho, estudar o comportamento das estirpes, quando se fez a inoculação pelo processo convencional e com "pelleting".

2 — MATERIAIS E MÉTODOS

O ensaio foi instalado no Centro de Nutrição Animal de Nova Odessa, em solo Podzólico Vermelho Amarelo — var. Laras, com pH 5,0. A área vinha sendo mantida com vegetação natural durante alguns anos, e casualmente era permitido o pas-

toreio. As leguminosas que ocorriam naturalmente eram pouco numerosas, dos gêneros *Desmodium*, *Cassia* e *Zornia*, na maioria noduladas.

No terreno, arado e gradeado, a seguinte mistura de adubos foi aplicada a lanço, dois meses antes do plantio: superfosfato, 250,0 kg/ha; cloreto de potássio, 40,0 kg/ha; sulfato de magnésio, 20,0 kg/ha; molibdato de sódio, 0,50 kg/ha. Após a distribuição, o adubo foi incorporado ao solo, através de gradagem do terreno.

O delineamento experimental foi o de parcelas subdivididas, com quatro blocos de 7,0 x 34,0 m, perfazendo uma área total de 952 m². Em quatro parcelas, escolhidas ao acaso, houve incorporação de bagacilho de cana, e os quatro restantes foram mantidos em condições normais de cultivo. O bagacilho foi distribuído em camada uniforme, de 5 cm de altura, em terreno bem nivelado. Logo a seguir foi incorporado, utilizando-se grade de discos.

Em cada parcela havia subparcelas, destinadas ao tratamento "estirpes". Essas estirpes foram selecionadas em teste prévio, em vasos de Leonard. A seleção foi feita entre 17 estirpes isoladas de alfafa, tendo sido escolhidas as quatro mais eficientes, originárias dos seguintes locais:

SFS-150 — Estados Unidos (=3DO 10), USDA Beltsville, Maryland, introduzida em 1950; SFS-156^a — Isolamento local feito em 1954; SFS-157 — Isolamento local feito em 1955; SFS-215-Austrália (=CB-61), CSIRO Brisbane, Queensland, introduzida em 1964.

Em cada subparcela os seguintes tratamentos de inoculação foram estudados:

NI = não inoculado; P = inoculação comum; P+P = "pelle-ting".

A unidade experimental, parcela de uma subparcela, consistia de quatro linhas com 2 m de comprimento, espaçadas de 60 cm. Cada linha recebeu 1,5 g de sementes.

A inoculação comum foi feita pelo umedecimento das sementes com uma solução de açúcar a 10% e adicionamento do inoculante na razão de 1% do peso das sementes. Essas inoculações foram feitas seis dias antes do plantio, e as sementes guardadas em refrigeradores.

Para o preparo do "pelleting" adicionou-se uma solução a 45% de goma arábica pura às sementes (1 cc/10 g de sementes), tendo-se em seguida adicionado o inoculante (turfa) e agitado para provocar uniformização. As sementes assim inoculadas foram misturadas com calcário e agitadas cuidadosamente até obter perfeita cobertura. A quantidade de calcário utilizada foi de 60% do peso das sementes. O "pelleting" foi feito 14 dias antes do plantio, e as sementes conservadas em sacos de papel, à temperatura ambiente, até o plantio. Máxima atenção foi dada às operações de inoculação, visando evitar contaminações entre as estirpes.

A sementeira foi feita manualmente, a 9 de novembro de 1964, em sulcos de 3 cm de profundidade. Antes do plantio fez-se necessário uma capina, que praticamente se limitou às parcelas onde não houve incorporação do bagacilho, pois onde este foi incorporado, apesar de ter havido boa germinação de ervas más, estas eram raquíticas, e poucas se desenvolveram.

Plantou-se inicialmente as sementes não inoculadas, e, somente após a cobertura destas, passou-se aos tratamentos que receberam a inoculação. O plantio das sementes inoculadas foi feito de maneira que somente após terminado o de uma estirpe passava-se ao de outra. Estes cuidados foram necessários para evitar possíveis contaminações.

Em virtude de leve declividade do terreno foram construídos cordões de proteção entre as parcelas. Apesar de fortes chuvas terem ocorrido, os cordões resistiram a contento.

Semanalmente, a partir da data de plantio, foram feitas amostragens de solo, em cada uma das parcelas, para determinações de nitratos. Cada amostra de uma parcela era constituída de seis subamostras, tiradas a 20 cm de profundidade.

A amostragem de plantas para observações da nodulação foi feita no início da floração. Colheram-se em cada canteiro, cinco plantas da zona central de cada uma das linhas-bordaduras. As plantas foram removidas cuidadosamente, cortadas pouco acima do colo, e as raízes transportadas para o laboratório, onde após cuidadosa lavagem se fizeram as observações da nodulação.

Nova adubação foi feita em cobertura, 88 dias após o plantio, usando-se a mesma mistura da adubação básica inicial.

A colheita foi feita a 25 de fevereiro de 1965. Foram colhidas as duas linhas centrais, cortando-se as plantas rente ao solo.

3 — RESULTADOS E DISCUSSÃO

A germinação foi ótima, sendo que as plantas emergiram mais facilmente nas parcelas onde o bagacilho havia sido incorporado. Ocorreram falhas, principalmente nos tratamentos NI e P, que podem ser atribuídas à falta de nódulos nos tratamentos não inoculados e fraco estabelecimento da simbiose nos de inoculação normal.

Decorrido um mês após a germinação, notava-se diferença na coloração das plantas entre as parcelas. Nas parcelas onde o bagacilho foi incorporado, as plantas mostravam coloração verde generalizada. Uma semana após, notava-se verde mais intenso em alguns tratamentos de inoculação com “pelleting”, mesmo nas áreas sem incorporação de bagacilho.

3.1 — NODULAÇÃO

Usando a técnica descrita anteriormente para a amostragem, fêz-se a contagem das plantas noduladas e do número de nódulos por planta.

3.1.1 — PLANTAS NODULADAS

O quadro 1 mostra os dados da porcentagem de plantas noduladas.

QUADRO 1. — Porcentagem de plantas noduladas obtidas em ensaio de inoculação de alfafa com 4 estirpes de *Rhizobium*, no Centro de Nutrição Animal de Nova Odessa. Bagacilho de cana foi incorporado com o fim de diminuir os efeitos inibidores na nodulação pelos nitratos

Tratamento	Com incorporação de bagacilho				Sem incorporação de bagacilho			
	SFS-150	SFS-156	SFS-157	SFS-215	SFS-150	SFS-156	SFS-157	SFS-215
Não inoculado .	0	0	2	0	0	0	0	10
Inoc. comum ..	0	0	7	2	5	7	10	7
“Pelleting”	72	87	87	80	83	75	80	95

A análise estatística destes dados revelou diferenças significativas ao nível de 1%, entre os inoculantes (3).

O processo normal de inoculação não diferiu do tratamento não inoculado. Entretanto o número de plantas noduladas, quando se fez o "pelleting", foi superior ao dos tratamentos não inoculado e de inoculação normal.

Não houve diferenças significativas entre o número de plantas noduladas das parcelas com e sem incorporação de bagacilho.

3.1.2 — NÓDULOS POR PLANTA

O número médio de nódulos por planta (quadro 2) diferiu com os tratamentos de inoculação e de incorporação de bagacilho.

QUADRO 2. — Número médio de nódulos por planta obtidos em ensaio de inoculação de alfafa com 4 estirpes de *Rhizobium*. O bagacilho de cana incorporado ao solo teve a finalidade de diminuir os níveis de nitrato do solo devido ao efeito inibidor da nodulação. Experimento conduzido no Centro de Nutrição Animal de Nova Odessa

Tratamento	Com incorporação de bagacilho				Sem incorporação de bagacilho			
	SFS-150	SFS-156	SFS-157	SFS-215	SFS-150	SFS-156	SFS-157	SFS-215
Não inoculado .	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,40
Inoc. comum ..	0,00	0,00	0,15	0,02	0,07	0,10	0,15	0,10
"Pelleting"	2,00	2,50	2,80	2,20	3,20	3,90	3,70	4,10

O "pelleting" foi superior aos tratamentos não inoculados e com inoculação comum, e não houve diferenças significativas entre os dois últimos tratamentos.

Não foram observadas diferenças significativas no número de nódulos entre as parcelas com e sem incorporação de baga-

(3) Os autores agradecem ao Eng.º-Agr.º Toshio Igue, da Seção de Técnica Experimental, do Instituto Agronômico, Campinas, pela análise dos dados.

cilhos, para os tratamentos NI e P. Entretanto para o tratamento "pelleting" houve diferenças significativas ao nível de 1%, em que foi maior o número de nódulos das parcelas onde não se fez a incorporação.

Desde que a incorporação foi feita com finalidade de diminuir a ação inibidora da nodulação pelos íons nitratos do solo, esse resultado surpreendeu a princípio. Entretanto, se se considerar que o nível de nitratos do solo não era elevado, a situação se esclarece, pois em pequenas doses esse íon estimula a nodulação (1). O quadro 3 apresenta os dados da análise de nitratos do solo, em duas amostras.

QUADRO 3. — Teores de nitratos (p.p.m.) obtidos em duas amostragens no experimento de inoculação de alfafa, conduzido no Centro de Nutrição Animal de Nova Odessa. Bagacilho de cana foi incorporado com o fim de diminuir os teores de nitratos. As amostras de cada parcela eram compostas de 6 subamostras

Data da Amostragem	Com incorporação de bagacilho				Sem incorporação de bagacilho			
9/11/64	0,45	0,55	0,30	0,33	14,45	8,49	7,95	9,48
17/11/64	0,50	0,37	0,41	0,37	7,20	7,86	6,33	5,01

3.2 — PRODUÇÃO

Diferenças de produção foram verificadas entre os tratamentos de inoculação. As análises estatísticas dos dados de produção total das 4 estirpes confirmaram essas diferenças, sendo que não foram encontradas diferenças entre os tratamentos NI e P, ao passo que o tratamento "pelleting" diferiu significativamente, ao nível de 1%, de NI e P. Os dados de produção podem ser observados no quadro 4.

Entre os tratamentos que envolvem incorporação de bagacilho e estirpes não foram constatadas diferenças de produção.

Observou-se interação significativa ao nível de 5% para inoculação x incorporação de bagacilho. Onde este não foi

QUADRO 4. — Pêso sêco, em gramas, da produção total obtida em experimento de inoculação de alfafa com 4 estirpes de *Rhizobium* conduzido no Centro de Nutrição Animal de Nova Odessa. Bagacilho de cana foi incorporado com o fim de diminuir os níveis de nitratos do solo

Tratamento	Com incorporação de bagacilho	Sem incorporação de bagacilho
Não inoculado	1.717	3.176
Inoc. comum	2.185	2.752
“Pelleting”	5.681	5.241

incorporado o tratamento não inoculado foi significativamente superior em produção, ao nível de 1%, ao mesmo tratamento, porém em presença do bagacilho. Para os tratamentos de inoculação normal e “pelleting” a produção das parcelas com ou sem incorporação não diferiu estatisticamente.

Como não houve nodulação nos tratamentos não inoculados, admite-se que a diferença de produção entre as parcelas com e sem incorporação de bagacilho seja atribuída em parte à falta de nitrogênio provocada pela incorporação de matéria orgânica com alta relação C/N. Com a inoculação normal, apesar da simbiose pouco eficiente que se estabeleceu, essa diferença não foi verificada. Por outro lado, tendo o “pelleting” promovido boa nodulação, tanto nos tratamentos onde houve ou não incorporação, não se constataram diferenças de produção para êsse tratamento de inoculação. Entretanto a produção devida ao tratamento “pelleting” foi significativamente maior que NI e P.

3.3 — EFEITO DAS ESTIRPES

Onde houve bom estabelecimento da simbiose (tratamento “pelleting”) tôdas as estirpes mostraram-se eficientes, não se verificando diferenças com relação ao número de plantas noduladas, número médio de nódulos por planta e produção.

Convém notar que as estirpes SFS-150, SFS-156 e SFS-157 estavam conservadas em meios de cultura, na coleção do Instituto Agrônomo, por cerca de dez anos, e mesmo assim mostraram-se eficientes.

4 — CONCLUSÕES

Da observação dos dados dêste ensaio podem-se tirar as seguintes conclusões:

1 — As estirpes utilizadas no experimento foram eficientes, quanto à fixação de nitrogênio, não ocorrendo diferenças significativas entre elas, confirmando ser criteriosa a seleção prévia em vasos de Leonard.

2 — O número médio de nódulos por planta foi maior em condições normais de cultivo, sem incorporação de bagacilho, evidenciando que o teor de nitratos do solo nas condições do experimento não inibiu a nodulação.

3 — O “pelleting”, confirmando dados de literatura (4, 5), foi altamente eficiente, promovendo boa nodulação, que correspondeu às mais altas produções.

4 — A inoculação pelo processo comum não foi eficiente, promovendo nodulação e produção semelhantes aos tratamentos sem inoculação.

STUDY ON THE INFLUENCE OF THE SOIL NITRATES AND METHODS OF SEED INOCULATION ON THE NODULE FORMATION OF ALFAFA (*MEDICAGO SATIVA* L.)

SUMMARY

A field trial to test the efficiency of previously selected strains of alfalfa rhizobia was conducted at the Centro de Nutrição Animal de Nova Odessa.

Four strains which had been tested previously in the greenhouse using the Leonard jar technique were employed in the study.

The field trial was conducted under mulch and no mulch treatment. The mulch treatment was used to immobilize nitrate nitrogen which is inhibitory to nodulation at high levels.

Inoculation was by conventional peat methods of application and by pelleting with inoculum and lime.

Natural nodulation for this specialized legume was found to be practically nil.

In this acid soil, normal inoculation method were not sufficient in supplying nodules to the plants, with resulting nitrogen fixation. Nodulation under pelleting was good to excellent and gave evidence of nitrogen fixation under both, mulch and no mulch treatment, with differences in yield being greater between the check and inoculation plus pelleting treatment where mulch has been used.

LITERATURA CITADA

1. EZEDINA, F. O. C. Effects of inoculation with local isolates of cowpea *Rhizobium* and application of nitrate-nitrogen on the development of cowpeas. *Trop. Agriculture, Trin.* 51:243-249, 1964.
2. GOMES DA SILVA, J. Estudos sôbre inoculação de sementes de leguminosas realizados pelo Instituto Agronômico de São Paulo. *Anais da Terceira Reunião Brasileira de Ciência de Solo.* Recife-Brasil, 1:297-300, 1951.
3. GRIFFITH, G. & MANNING, H. L. A note on nitrate accumulation in a Uganda soil. *Trop. Agriculture, Trin.* 26:108-110, 1949.
4. LONERAGAN, J. F., MEYER, D., FAWCETT, R. G. & ANDERSON, A. J. Lime pelleted clover seeds for nodulation on acid soils. *J. Aust. Inst. Agric. Sci.* 21:264-265, 1955.
5. MURGUIA, J. L. & DATE, S. A. The use of pellets in the over-sowing of pasture legumes. Trabalho apresentado no IX Congresso Internacional de Pastagens. São Paulo, Brasil. 1:279-282, 1965.
6. NORRIS, D. O. Legume Bacteriology. In: Some concepts and methods in sub-tropical pasture research. *Com. Agric. Bur. (England).* Bull. 47:102-117, 1964.
7. ————. Technique used in work with *Rhizobium*. In: Some concepts and methods in sub-tropical pasture research. *Com. Agric. Bur. (England)* Bull. 47:186-198, 1964.
8. THORNTON, H. G. & NICOL, H. Reduction of nodule numbers and growth, produced by the addition of sodium nitrate to lucerne in sand culture. *J. Agric. Sci.* 26:173-188, 1936.
9. VERDADE, F. C. Estudo da variabilidade dos nitratos num solo tipo terra roxa-misturada. *Bragantia* 11:269-276, 1951.