

ESPECIFICIDADE DE UMA VARIEDADE NATIVA DE "ALFAFA DO NORDESTE" (*Stylosanthes gracilis*) NA SIMBIOSE COM *Rhizobium* sp.¹

SEBASTIÃO MANHÃES SOUTO², ANTONIO CARLOS CÓSER³ e JOHANNA DÖBEREINER⁴

SINOPSE.— Foram feitos três experimentos de casa de vegetação com a finalidade de esclarecer dificuldades surgidas na inoculação da variedade de Alfafa do Nordeste (*Stylosanthes gracilis* H.B.K.) mais recomendada para as regiões do Brasil Central, a variedade IRI 1022.

No primeiro experimento foram comparadas três variedades inoculadas com seis estirpes de *Rhizobium*. Enquanto as variedades FAO 13381 e Deodoro II apresentaram simbiose eficaz com duas das estirpes locais e principalmente com a estirpe CB-756, estirpe esta recomendada na Austrália para inoculação de *Stylosanthes gracilis*, a variedade IRI 1022 apresentou simbiose menos eficaz com as estirpes locais e não produziu um só nódulo com a estirpe CB-756.

No segundo experimento foram testadas 24 estirpes de *Rhizobium* do grupo "Cowpea", provenientes de oito espécies forrageiras, na variedade IRI 1022. Apenas as três estirpes homólogas e uma de cada de *Centrosema pubescens* e *Calopogonium muconoides* produziram nódulos nesta variedade, não sendo nenhuma estirpe altamente eficaz.

No terceiro experimento foram comparadas seis estirpes homólogas locais com inoculantes de solo proveniente de cinco séries de solos. Enquanto dois solos não produziram nódulos, o *Rhizobium* proveniente dos três outros foi mais eficaz que as estirpes puras.

A eficiência nodular avaliada pela regressão do N total nas plantas sobre o peso dos nódulos variou com as variedades de *Stylosanthes* e com os inoculantes. Com as estirpes puras foi quatro vezes maior nas variedades FAO 13381 e Deodoro II do que na variedade IRI 1022. Na variedade IRI 1022 a eficiência nodular foi triplicada pelos inoculantes de solo.

INTRODUÇÃO

A importância da Alfafa do Nordeste como forrageira já foi realçada nos trabalhos de Stonard (1968), na Austrália, confirmando as observações feitas em nossa região. Nos solos sob vegetação de cerrado do Brasil Central, a Alfafa do Nordeste parece ser a leguminosa forrageira mais promissora, devido à sua grande capacidade de resistência à seca.

No uso racional de leguminosas é necessário que o processo de nodulação seja eficiente. Portanto, é preciso examinar, além de outros pontos importantes, a compatibilidade do *Rhizobium* em associação simbiótica com a leguminosa hospedeira.

Além da estirpe de *Rhizobium*, fatores ligados à afinidade genética *Rhizobium*/planta influenciam uma simbiose eficiente (Loneragan *et al.* 1955, Freire 1961, Souto & Döbereiner 1968).

Norris (1965) classificou a espécie *Stylosanthes gracilis* H.B.K. no grupo de leguminosas de inoculação cruzada "Cowpea", recomendando, entretanto, em trabalho mais recente (Norris 1967), um inoculante específico para uma variedade que chama "Oxley Fine Stem Stylo".

Em experimentos anteriores, entretanto (Franco & Döbereiner 1969), verificou-se efeito significativo, mas negativo, da inoculação do *Stylosanthes gracilis*, variedade IRI 1022, com uma mistura de estirpes de *Rhizobium* comumente usada para inoculação das leguminosas do grupo "Cowpea".

A finalidade do presente trabalho foi, portanto, esclarecer as dificuldades surgidas na inoculação de variedades de Alfafa do Nordeste (*Stylosanthes gracilis*).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram feitos três experimentos, em casa de vegetação, sob condições controladas.

Experimento I

O delineamento experimental do primeiro foi o de blocos ao acaso em três repetições, estudando-se seis espécies de *Rhizobium* e três variedades de *Stylosanthes gracilis*, que foram combinados de acordo com ensaio fatorial 6 × 3, obtendo-se assim dezoito diferentes tratamentos.

Usaram-se vasos Leonard com 1,7 kg de areia esterilizada.

A solução nutritiva foi a de Norris, modificada, com a seguinte composição para 40 litros de água fervida:

KCl	5,96 g
K ₂ HPO ₄	2,00 g
KH ₂ PO ₄	12,00 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	19,72 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O a 5% em solução de ácido cítrico a 5%	40,00 ml
Solução de micronutrientes	20,00 ml

¹ Recebido 11 jan. 1971, aceito 30 abr. 1971.

² Eng.º Agrônomo do Setor de Nutrição Animal e Agrostologia do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Centro-Sul (IPEACS), Km 47, Campo Grande, CB, ZC-26.

³ Quartanista de 1970 da Escola de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq.), Km 47, Campo Grande, GB, ZC-26.

⁴ Eng.º Agrônomo do Setor de Solos do IPEACS e bolsista do CNPq.

No momento do uso, foram adicionados 13,76 g de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

A composição da solução de micronutrientes era a seguinte:

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,15 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,44 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,40 g
$(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,02 g
H_3BO_3	2,86 g
H_2O	1000 ml

As sementes das variedades de *Stylosanthes gracilis* foram cedidas pelo Setor de Nutrição Animal e Agrotologia do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Centro-Sul (IPEACS) e as estirpes de *Rhizobium* selecionadas para este trabalho foram isoladas de nódulos espontâneos em *Stylosanthes gracilis* colhidos na região, com exceção da estirpe CB-756 que é proveniente da Austrália e foi enviada por D.O. Norris. Trata-se da estirpe usada nos inoculantes comerciais da Austrália para leguminosas tropicais (Summer Legumes), incluindo *Stylosanthes gracilis*. As sementes foram escarificadas com H_2SO_4 concentrado durante 1 minuto.

A semeadura foi efetuada no dia 22 de junho de 1969 e a colheita deste experimento foi realizada 60 dias após o plantio.

Determinamos a posição, número e peso seco dos nódulos. O material planta passou por um período de secagem em estufa a 65°C e posteriormente foi pesado e o nitrogênio determinado pelo método semimicro de Kjeldahl.

Experimento II

O segundo experimento foi montado com esquema de blocos ao acaso com três repetições, incluindo 24 estirpes de *Rhizobium* provenientes das oito leguminosas mais usadas como forrageiras, sendo três de cada uma delas.

A variedade de *Stylosanthes gracilis* foi a IRI 1022.

Este experimento foi feito também em vasos de Leonard, sendo plantado em 5.10.69 e colhido em 10.12.69, da mesma maneira que o anterior. A solução nutritiva usada foi a mesma do Experimento I.

Experimento III

O terceiro experimento foi conduzido em esquema de blocos ao acaso com quatro repetições e 12 tratamentos de inoculação, tendo estes seis estirpes puras, cinco inoculantes de solo (1 g/vaso) e uma testemunha.

Foram usadas latas de óleo perfuradas e preenchidas com 1,7 kg de areia de praia, previamente esterilizadas. Também neste experimento usou-se *Stylosanthes gracilis* variedade IRI 1022.

Os tratamentos com estirpes puras foram inoculados colocando-se duas gotas/planta de culturas líquidas.

Foi usada a seguinte solução nutritiva: KH_2PO_4 , a 35 g/l; 10 ml/lata de areia; solução de elementos menores: 2 ml/lata de areia; a solução de elementos menores tinha a seguinte composição:

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	150,000 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	15,800 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,908 g
H_3BO_3	1,000 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,500 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20,000 g
Ácido cítrico	20,000 g
Água destilada, q.s.	1.000 ml

O plantio foi feito em 20.6.69 e a colheita 65 dias após.

As determinações foram feitas da mesma forma que nos experimentos anteriores.

Os inoculantes de solo foram colhidos nas cinco séries dos solos representativos da área do IPEACS pesados úmidos e colocados sobre as sementes (1 g/vaso).

QUADRO 1. Competição de seis estirpes de *Rhizobium* em três variedades de *Stylosanthes gracilis* (média de 3 repetições)

<i>Stylosanthes gracilis</i>	Trat. inoculação	Plantas			Nódulos		
		Peso seco (g/pote)	% N	N total (mg/pote)	Número (n.º/pote)	Peso seco (mg/pote)	Peso médio (mg/nódulo)
Variedade Deodoro II	S-1b	0,3	1,04	4	0	0,0	0,00
	S-6	0,7	1,47	11	16	7,5	0,28
	CB-756	1,1	2,20	24	42	13,7	0,33
	S-2	1,0	1,68	18	18	8,4	0,47
	S-3	0,7	1,29	9	8	3,6	0,45
	S-1c	0,3	0,83	3	0	0,0	0,00
	Médias	0,7	1,41	11	14	5,5	0,25
Variedade IRI-1022	S-1b	0,2	0,79	2	0	0,0	0,00
	S-6	0,5	1,05	6	16	10,7	0,67
	CB-756	0,4	0,93	4	0	0,0	0,00
	S-2	0,5	1,27	7	33	14,4	0,43
	S-3	0,4	1,36	5	10	4,0	0,40
	S-1c	0,3	0,73	2	0	0,0	0,00
	Médias	0,4	1,02	4	10	4,8	0,25
Variedade FAO	S-1b	0,3	0,83	3	0	0,0	0,00
	S-6	1,3	2,11	28	53	23,3	0,44
	CB-756	1,4	2,29	32	62	15,8	0,25
	S-2	1,4	2,04	29	55	22,8	0,27
	S-3	1,0	1,50	15	39	18,2	0,47
	S-1c	0,3	0,81	3	0	0,0	0,00
	Médias	0,9	1,59	18	39	13,3	0,24

QUADRO 2. Análise da variância, relativa aos dados apresentados no Quadro 1

Fontes de variação	G.L.	Plantas			Nódulos	
		Pêso seco	% N	N total	Pêso seco	N.º de nódulos
Total	68	—	—	—	—	—
Repetições	2	3,66*	2,71	2,89	—	—
Varietades	3	45,33**	21,14**	46,47**	282,61**	152,51**
Estirpes	5	29,00**	21,85**	27,84**	276,71**	101,87**
Var. x Est.	10	4,66*	4,28*	6,42*	55,50**	27,35**
Erro	34	—	—	—	—	—

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do Experimento I são apresentados no Quadro 1 e a sua análise estatística no Quadro 2. Observam-se diferenças altamente significativas entre estirpes de *Rhizobium* e entre variedades e ainda significância da interação em tôdas as observações feitas. A variedade FAO 13381 foi a que melhor nodulou e, portanto, produziu mais. As estirpes S-1b e S-1c não produziram nódulos nesta variedade assim como também nas demais. Mas as três outras estirpes locais, e principalmente a CB-756, foram altamente eficazes, destacando-se esta última como a melhor. A variedade Deodoro II produziu apenas 64% do nitrogênio total da variedade FAO-13381, mas a eficácia das estirpes de *Rhizobium* usadas seguiu a mesma seqüência. Muito menos eficaz ainda foi a simbiose da variedade IRI 1022, que produziu apenas 22% de nitrogênio total da variedade FAO 13381. Apesar de das estirpes locais na variedade IRI 1022 produzirem pêso de nódulos equivalente ao da variedade Deodoro II, a sua fixação de nitrogênio foi deficiente. A estirpe CB-756, que nas outras variedades foi a mais eficaz, nesta variedade não produziu nenhum nódulo.

Esta aparente especificidade da variedade IRI 1022 surpreende, uma vez que esta variedade é nativa, sendo originária da coleção de variedades de Matão (Instituto de Pesquisas IRI), e está sendo plantada como a mais promissora nos solos de cerrado do Brasil Central (Lobato 1968) onde ela apresenta boa nodulação espontânea.

Com o intuito de pesquisar maior número de estirpes de procedências diversas foi feito o Experimento II, no qual três estirpes de *Rhizobium* isoladas de cada uma das 8 espécies forrageiras foram testadas. Os resultados deste experimento podem ser apreciados no Quadro 3. Confirmam eles mais claramente ainda a extrema especificidade de variedade IRI 1022 que, com exceção de duas estirpes, uma de *Calopogonium mucunoides* (CM-7) e uma de *Centrosema pubescens* (C-29), somente nodulou com as três estirpes homólogas. Tôdas as estirpes usadas são eficazes nas espécies do grupo "Cowpea" representando elas o grupo mais eficaz nas diversas espécies de nossa coleção.

Por outro lado, observamos em outros experimentos (Döbereiner 1970) que as estirpes isoladas de *Stylosanthes gracilis*, apesar de não serem muito eficazes na variedade IRI 1022, colocaram-se entre as mais eficazes em outras espécies (*Pueraria javanica*, *Glycine javanica*, *Indigofera hirsuta*).

A necessidade urgente de se obterem estirpes para inoculantes altamente eficazes para a variedade IRI 1022 levou ao Experimento III em que, além das estirpes homólogas usadas nos experimentos anteriores, foram

QUADRO 3. Nodulação de *Stylosanthes gracilis*, variedade IRI 1022, com 24 estirpes de *Rhizobium* provenientes de oito espécies forrageiras (média de 3 repetições)

Espécie original	Estirpes	N.º de nódulos p/vaso	Pêso seco de nódulos (mg/vaso)
<i>Stylosanthes gracilis</i>	S-6	16	3,1
	S-2	19	4,0
	S-3	29	7,0
<i>Calopogonium mucunoides</i>	C-100	0	0,0
	C-101	0	0,0
	C-29	6	1,7
	CM-7	29	2,0
	CM-3	0	0,0
	CM-1a	0	0,0
<i>Glycine javanica</i>			
<i>Dolichos lab-lab</i>	3 estirpes		
<i>Pueraria javanica</i>	de cada	0	0
<i>Phaseolus atropurpureus</i>			
<i>Indigofera hirsuta</i>			

usadas novas estirpes e ainda solos colhidos em áreas representativas das cinco séries de solos da região. Nos Quadros 4 e 5 são apresentados os resultados que confirmam em primeiro lugar a incapacidade de produzir nódulos, nesta variedade, da estirpe CB-756, e análise estatística do 3.º experimento, respectivamente. Novamente se observa produção de quantidade e pêso razoável de nódulos com as restantes estirpes puras, mas fixação de nitrogênio deficiente. Dois dos solos usados não continham *Rhizobium* capaz de nodular o *Stylosanthes gracilis* mas, com a inoculação dos três outros, observa-se nodulação abundante e fixação de nitrogênio considerável. Com um dos solos, o da série Guandu, o nitrogênio fixado foi equivalente ao observado com a variedade FAO 13381 no Experimento I.

Na discussão acima referimo-nos a uma fixação deficiente com pêso de nódulos considerável. Estas interações podem ser melhor observadas calculando-se as regressões do N total nas plantas sobre o pêso dos nódulos, nos quais o coeficiente de regressão *b* representa a eficiência nodular. Em numerosos experimentos com outras espécies forrageiras (Döbereiner *et al.* 1966, Souto & Döbereiner 1969, Guzmán & Döbereiner 1969, Döbereiner 1969), regressões altamente significativas foram obtidas cujo "slope" não foi afetado nem pela variedade, nem pela estirpe de *Rhizobium*. A eficiência nodular naqueles experimentos foi de 0,2 a 0,3g de N/g de nódulos secos com *Centrosema pubescens*, *Pueraria javanica*, *Dolichos lab-lab* e *Calopogonium mucunoides*

QUADRO 4. Nodulação e fixação de N de *Stylosanthes gracilis*, variedade IRI 1022, inoculado com estirpes puras ou inoculantes de solo (1g/vaso) (média de 4 repetições)

Tratamento de inoculação	Plantas			Nódulos		
	Peso seco (g/pote)	% N	N total (mg/pote)	Número/pote	Peso seco (mg/pote)	Peso médio (mg/nódulo)
S-2	0,5	1,74	9	94	19,4	0,2
S-6	0,5	1,82	9	80	15,5	0,2
CB.756-JF*	0,1	1,03	1	0	0,0	0,0
S-3	0,4	1,43	5	20	6,5	0,3
S-5	0,5	1,82	8	64	16,9	0,3
S-4	0,6	1,51	9	48	13,8	0,3
Solo Itaguaí	0,6	1,95	12	45	12,3	0,3
Solo Guandu	1,3	2,20	29	121	32,7	0,3
Solo Seropédica	0,8	1,82	16	82	21,6	0,3
Solo Piranema	0,2	1,05	1	0	0,0	0,0
Solo Ecologia	0,1	1,22	2	1	0,0	0,0
Testemunha	0,2	1,21	3	0	0,0	0,0

* Estirpe da coleção de J. R. Jardim Freire, Pôrto Alegre, proveniente originalmente da Austrália.

QUADRO 5. Análise de variância

Fontes de variação	G.L.	Plantas			Nódulos	
		Peso seco	% N	N total	Número	Peso seco
Total	47	—	—	—	—	—
Repetições	3	3,00*	—	1,17	—	8,77**
Inoculantes	11	3,46**	—	5,58**	10,36**	15,40**
Erro	33	—	—	—	—	—

e de 0,5 a 0,6 g de N/g de nódulos secos com *Glycine javanica*, *Phaseolus atropurpureus* e *Indigofera hirsuta* (Döbereiner 1969). Muito diferente parece esta situação no *Stylosanthes gracilis*. Souto e Döbereiner (1969) observaram, num experimento onde *Pueraria javanica*

deu uma correlação de $r = 0,95$, que não houve tal correlação entre peso de nódulos e N na planta, no *Stylosanthes gracilis*. Aquêl experimento incluía sete variedades de *Stylosanthes*. Se calcularmos as regressões separadamente para cada variedade, como na Fig. 1 do Experimento I dêste trabalho, observamos eficiência nodular de 0,36 g de N/g de nódulos secos na variedade IRI 1022, mas uma eficiência quatro vezes maior ($b = 1,53$) na variedade Deodoro II.

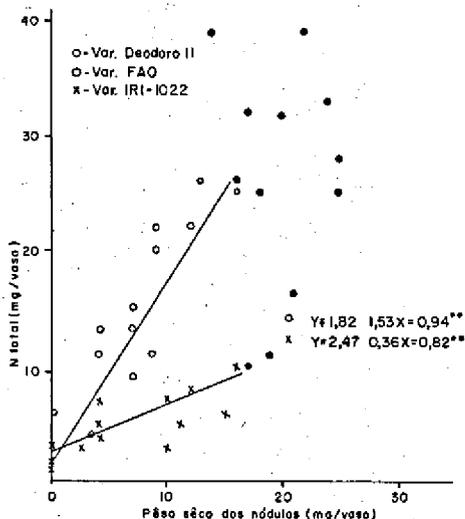


FIG. 1. Regressão do N total sobre o peso de nódulos em três variedades de *Stylosanthes gracilis* inoculados com diferentes estirpes de Rhizobium.

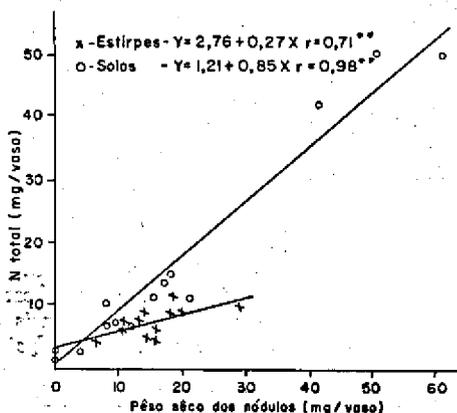


FIG. 2. Regressão do N total sobre o peso de nódulos usando-se estirpes puras e inoculações de solo em *Stylosanthes gracilis* variedade IRI 1022.

Na variedade FAO 13381, entretanto, a eficiência nodular variou com fatores não controlados neste experimento, não dependendo o N fixado do tecido nodular.

Na Fig. 2, por outro lado, observa-se que as estirpes puras, na variedade IRI 1022, mostraram eficiência nodular semelhante à obtida na Fig. 1 (0,27 g de N/g de nódulos secos), mas não o *Rhizobium* proveniente dos solos inoculados. Com êste, a eficiência nodular foi 0,85. Estas variações explicam no *Stylosanthes* as dificuldades de se encontrarem regressões do N total sobre o peso de nódulos, fato êste que não foi observado com as outras leguminosas forrageiras.

CONCLUSÕES

A pronunciada especificidade da variedade IRI 1022, que não permite infecção e nodulação pelas estirpes do grupo "Cowpea", normalmente eficazes nas leguminosas não específicas, explica o insucesso da inoculação com estas estirpes. Torna-se necessária a seleção de estirpes específicas para esta variedade que não somente produzem muitos nódulos mas ainda apresentam elevada eficiência nodular.

A redução significativa da produção com inoculação observada anteriormente, provavelmente se deve a uma competição na rizosfera das estirpes inoculadas e incapazes de formar nódulos com estirpes mais eficazes do solo.

REFERÊNCIAS

- Döbereiner, J., Arruda, N.B. & Penteado, A.de F. 1966. Avaliação da fixação de nitrogênio em leguminosas, pela regressão do nitrogênio total nas plantas sobre o peso dos nódulos. Pesq. agropec. bras. 1:233-237.
- Döbereiner, J. 1969. Estudos sobre a simbiose de leguminosas forrageiras tropicais. I Enc. Téc. Região Centro-Sul, Discuss. Problem. relac. Legum. forr., Nova Odessa, SP.
- Döbereiner, J. 1970. (Dados ainda não publicados)
- Franco, A.A. & Döbereiner, J. 1969. Eficácia da nodulação natural de cinco leguminosas forrageiras tropicais. XII Congr. bras. Ci. Solo, Curitiba.
- Freire, J.R.J. 1961. Bull. Anual Serv. Fitopat. Secret. Agric. Rio Grande do Sul, p. 13-18.
- Guzmán, I. & Döbereiner, J. 1969. Effectiveness and efficiency in the symbiosis of four cross-inoculated tropical legumes. Revta lat-amer. Micr. Parasitol. 11:137-140.
- Lobato, E. 1968. (Comunicação pessoal)
- Loneragan, J.F., Meyer, D., Faucett, R.G. & Anderson, A.J. 1955. Lime pelleted, clover seeds for nodulation on acid soils. J. aust. Inst. agric. Sci. 21:264-270.
- Norris, D.O. 1965. Rhizobium relationships in legumes. Anais IX Congr. int. Pastagens, S. Paulo, Vol. 2, p. 1087-1092.
- Norris, D.O. 1967. The intelligent use of inoculants and lime pelleting for tropical legumes. Trop. Grasslands 1:107-121.
- Souto, S.M. & Döbereiner, J. 1968. Diferenças entre linhagens de *Centrosema pubescens* Benth. na nodulação e fixação de N atmosférico. II Semin. Rizobiologia, Pôrto Alegre, RS.
- Souto, S.M. & Döbereiner, J. 1969. Efeito da temperatura do solo na fixação de nitrogênio em alfafa do Nordeste (*Stylosanthes gracilis* H.B.K.) e Kudzu Tropical (*Pueraria javanica* (Roxb.) Benth.). I Enc. Téc. Região Centro-Sul, Discuss. Problem. relac. Legum. forr., Nova Odessa, SP.

ABSTRACT.- Souto, S.M., Cóser, A.C. & Döbereiner, J. 1972. *Host plant specificity of a native variety of Stylosanthes gracilis*. Pesq. agropec. bras., Sér. Zootec. 7:1-5 (Inst. Pesq. Agropec. Centro-Sul, Km 47, Rio de Janeiro, GB, ZC-26, Brazil)

In three greenhouse experiments nodulation difficulties of the variety IRI-1022 of *Stylosanthes gracilis* (H.B.K.) were studied. This variety is one of the most promising in the winter-dry regions of Central Brazil.

In the first experiment six *Rhizobium* strains were compared on three varieties of *S. gracilis*. The varieties FAO 13381 and Deodoro II showed effective symbiosis with two local strains and with the Australian CB-756, but variety IRI-1022 showed poor N-fixation with the two local strains and did not form one nodule with strain CB-756.

In a second experiment 24 strains of the "cow pea" group isolated from 8 different species, were tested on the variety IRI-1022. Only the three homologous strains and one strain from *Centrosema pubescens* and one from *Calopogonium mucunoides* were able to produce nodules on this variety but none was highly effective.

In the third experiment six homologous local strains were compared with soil inoculant obtained in five soil series. Two soils did not produce nodules but the three other soils produced more effective symbiosis than the pure strains.

Nodule efficiency was evaluated by the regression of total plant nitrogen on nodule weight. In *S. gracilis* it varied with variety and with the inoculant. With pure strains nodule efficiency was four times higher with the variety Deodoro II than with the variety IRI-1022. Nodule efficiency in variety IRI-1022 was three times greater with soil inoculants.