

# INOCULAÇÃO COM *RHIZOBIUM*, APLICAÇÃO DE MOLIBDÊNIO E SECAGEM DAS SEMENTES TRATADAS DE TREVO BRANCO

BINNECK Eliseu; BARROS Antonio Carlos S. A.; VAHL Ledemar C.

UFPEL/FAEM, Cx. Postal 354, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: eliseu@ufpel.tche.br - acbarros@ufpel.tche.br  
(Recebido para publicação em 17/11/99)

## RESUMO

Três experimentos foram conduzidos em casa de vegetação na EMBRAPA/CPACT, em solo Podzólico Vermelho Amarelado (PVA), em Pelotas (RS), com o objetivo de estudar a influência da inoculação das sementes com *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* em turfa, aplicação de molibdênio e posterior secagem das sementes tratadas, de trevo branco (*Trifolium repens* L.), na nodulação, crescimento e acúmulo de nitrogênio. O Mo aplicado via semente no momento da inoculação, na forma de molibdato de sódio, proporcionou aumentos significativos na nodulação e fixação biológica de nitrogênio quando as sementes não foram secadas posteriormente ou quando foram secas a 11°C por 24 horas. A temperatura de 30°C, por 24 horas, na secagem das sementes tratadas, reduziu a nodulação e o acúmulo de nitrogênio.

Palavras-chave: inoculação com *Rhizobium*, trevo branco, micronutrientes, tratamento de sementes.

## ABSTRACT

MOLYBDENUM TREATMENT, *RHIZOBIUM* INOCULATION AND TREATED SEEDS DRYING ON WHITE CLOVER. Three greenhouse experiments were carried out at the Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (EMBRAPA/CPACT), in Pelotas, State of Rio Grande do Sul, Brazil, with the objective of testing the response of sodium molybdate treatment and seed inoculation with *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* and different drying treatment of the seeds of white clover (*Trifolium repens* L.) on nodulation, shoot dry matter weight and nitrogen content. The molybdenum used as sodium molybdate on seed treatment, provided significant increases on nodulation and nitrogen fixation when seeds were not dried after or when were dried at 11°C per 24 hours. The temperature of 30°C for 24 hours, used on treated seeds drying, perform a significant decrease on nodulation and nitrogen fixation.

Key words: *Rhizobium* inoculation, white clover, micronutrients, seed treatment.

## INTRODUÇÃO

O trevo branco destaca-se, entre as leguminosas forrageiras de clima temperado, pela sua grande eficiência na fixação biológica de N<sub>2</sub> atmosférico. Dentre os fatores nutricionais, para a eficiente fixação do nitrogênio, destaca-se o molibdênio, que faz parte da molécula da nitrogenase (componente I ou Mo-Fe proteína), desempenhando um papel importante na regulação dessa enzima (MENGEL & KIRKBY, 1978; MARECKOVÁ, 1983; SALISBURY & ROSS, 1991). O molibdênio também faz parte da enzima nitrato-redutase, que catalisa a redução de íons nitrato possibilitando a sua incorporação em compostos orgânicos, nas raízes e na parte aérea da planta (MALAVOLTA, 1980; SALISBURY & ROSS, 1991).

SFREDO *et al.* (1997), estudando a resposta da soja a micronutrientes no Paraná, ressaltam que em anos anteriores a 1981 não eram obtidas respostas na produção dessa cultura à aplicação de Mo, devido provavelmente à boa disponibilidade natural desse micronutriente nos solos utilizados, e explica que a resposta atual à aplicação de Mo deve estar ocorrendo pela maior extração deste micronutriente com o aumento da produtividade das lavouras, que dessa forma esgotam as reservas de micronutrientes.

No entanto, a aplicação uniforme no solo, das pequenas doses necessárias para correção de deficiências de molibdênio, geralmente entre 50 e 500g de molibdênio por hectare, é uma operação difícil quando utilizadas fontes inorgânicas com altas concentrações. Segundo VIDOR & PERES (1988) e SANTOS (1991), o método mais adequado para aplicação de molibdênio é através da aplicação nas sementes, facilitando a distribuição das pequenas quantidades exigidas pelas plantas, de modo uniforme, sem haver toxicidade ao inoculante quando a peletização com Mo é feita imediatamente antes da semeadura. Normalmente são recomendadas doses entre 10 e 100 g/ha de Mo para este método de aplicação.

Todavia, PUPO (1979) destaca que a prática de embeber as sementes inoculadas em solução de sais de micronutrientes é totalmente contra-indicada por matar o inoculante. Ainda, segundo VINCENT (1975), PUPO (1979) e CARAMBULA (1982), a inoculação das sementes deve ser feita imediatamente antes da semeadura. No caso de a semeadura ser feita mais tarde, até 24 horas após a inoculação, as sementes devem secar a sombra.

Sabe-se que, para viabilizar a semeadura mecanizada, as sementes devem estar secas, pois a utilização de sementes inoculadas úmidas dificulta este processo pela aglomeração das sementes nos componentes das máquinas, ocasionando apreciável perda de precisão na semeadura, além da grande perda de inoculante. No entanto, em intervalo de tempo pequeno, que é necessário para garantir a viabilidade do *Rhizobium*, a secagem a sombra torna-se ineficiente em muitos casos, principalmente em regiões com alta umidade relativa do ar.

Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito do molibdênio em trevo branco a partir da sua aplicação via sementes, no ato da inoculação, bem como buscar uma maneira eficaz para conciliar a inoculação e a aplicação de molibdênio na semente preparando-a adequadamente para a semeadura mecanizada.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Três experimentos foram conduzidos sob condições de casa de vegetação na EMBRAPA/CPACT de Pelotas (RS), utilizando-se um solo Podzólico Vermelho Amarelado, coletado do horizonte "B" no Centro Agropecuário da Palma,

da Universidade Federal de Pelotas, cuja análise química indicou 7,6g.kg<sup>-1</sup> de M.O.; pH 5,1 em água; 9 mmol<sub>c</sub>.L<sup>-1</sup> de Al<sup>3+</sup> trocável; 47 mmol<sub>c</sub>.L<sup>-1</sup> de Ca<sup>+</sup> + Mg<sup>2+</sup>; 0,8mg.kg<sup>-1</sup> de P e 38mg.kg<sup>-1</sup> de K<sup>+</sup>. Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Fitotecnia e no Laboratório de Química do Departamento de Solos, da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM) - UFPEL.

Nos três experimentos, foram estudadas sementes de trevo branco (*Trifolium repens* L.), cultivar Zapicán, adquiridas no comércio.

#### Experimento 1

Foi utilizado o molibdato de sódio (Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O) como fonte de molibdênio, aplicado via sementes, e *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* - inoculante comercial dentro do prazo de validade (Geratec, Rio Grande do Sul, BR) para a inoculação das sementes, com o objetivo de estudar o efeito do molibdênio na matéria seca da parte aérea, nodulação e teor de nitrogênio.

Os tratamentos foram duas doses de molibdênio (0 e 40mg de Mo.g<sup>-1</sup> de semente) e duas doses de inoculante (0 e 20mg de inoculante com turfa.g<sup>-1</sup> de sementes). O inoculante e o molibdato de sódio foram aplicados às sementes através de uma solução de água destilada e goma arábica pura (sem aditivos) a 32%. A semeadura foi feita imediatamente após o tratamento das sementes. O delineamento experimental foi um fatorial 2 x 2, em blocos ao acaso com cinco repetições.

A adubação do solo foi feita mediante a aplicação de P (8,25g de hiperfosfato por vaso) e K (0,725g de KCl por vaso) misturados e homogeneizados em cada unidade experimental. O controle de umidade do solo foi feito através do conhecimento do peso volumétrico e umidade gravimétrica inicial, mantendo constantemente 80% de sua capacidade de campo. Cada unidade experimental, na casa de vegetação, foi constituída por um vaso de plástico, com 3,63kg (3 L) de solo, na qual foram semeadas 30 sementes. Dez dias após a semeadura, efetuou-se o desbaste, deixando 15 plantas por vaso.

Quarenta dias após a semeadura, as plantas de cada vaso foram cortadas ao nível do solo e secadas em estufa a 65°C com circulação forçada de ar, por 72 horas, pesadas e moídas para a determinação da produção de matéria seca e teor de nitrogênio. Cinco sistemas radiculares completos foram coletados ao acaso de cada vaso, submetidos a jato d'água de baixa pressão, acondicionados em saquinhos de papel e levados ao laboratório para avaliação da nodulação num escore de um a quatro, conforme o número, tamanho e posição dos nódulos (VINCENT, 1975). O teor de nitrogênio foi determinado pelo método semimicro-Kjeldahl, segundo BREMNER & EDWARDS (1965).

#### Experimento 2

Foram avaliados os efeitos de duas condições de secagem das sementes inoculadas, na matéria seca da parte aérea, nodulação e teor de nitrogênio.

Os tratamentos foram constituídos por duas doses de inoculante (0 e 20mg de inoculante com turfa por 1g de sementes) e duas condições de secagem das sementes inoculadas, por 24 horas, (estufa a 30°C, com circulação forçada de ar, e câmara seca a 11°C, com 50% de umidade relativa do ar). A inoculação das sementes foi feita com uma solução de água destilada e goma arábica pura a 32%. O delineamento experimental foi um fatorial 2 x 2, em blocos ao acaso com cinco repetições.

A adubação e o controle de umidade do solo e a inoculação das sementes, foram feitos conforme descrito para o experimento 1. Cada unidade experimental, na casa de vegetação, foi constituída por um de vaso plástico, com 3,63kg (3 L) de solo, na qual foram semeadas 30 sementes. Dez dias após a semeadura, efetuou-se o desbaste, deixando 15 plantas por vaso.

As determinações de nodulação, teor total de nitrogênio e matéria seca foram feitas conforme a metodologia descrita para o experimento 1.

#### Experimento 3

Foram avaliados os efeitos do molibdato de sódio, aplicado nas sementes juntamente com o inoculante, e das condições de secagem das sementes após o tratamento.

Os tratamentos constaram de duas doses de molibdato de sódio (0 e 100mg.g<sup>-1</sup> de sementes) e duas condições de secagem das sementes inoculadas (estufa a 30°C e câmara seca a 11°C). O inoculante foi aplicado em todos os tratamentos na dose de 20 mg.g<sup>-1</sup> de sementes. O inoculante e o molibdato de sódio foram aplicados às sementes através de uma solução de goma arábica pura (sem aditivos) a 32%. O delineamento experimental foi um fatorial 2 x 2, em blocos ao acaso com cinco repetições.

A secagem foi feita durante 24 horas sob duas condições: em estufa (30°C) com circulação de ar, e em câmara seca (11°C) com 50% de umidade relativa do ar.

Cada unidade experimental foi constituída por um vaso de plástico, com 3,63kg (3 L) de solo, o qual recebeu 30 sementes. Dez dias após a semeadura, efetuou-se o desbaste, sobrando 15 plantas por vaso. Os parâmetros avaliados foram matéria seca da parte aérea, nodulação e teor de nitrogênio, conforme a metodologia descrita para o experimento 1.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Experimento 1

Na Tabela 1 são apresentados os resultados médios de nodulação, teor de nitrogênio da parte aérea e matéria seca da parte aérea, em resposta à inoculação e à aplicação de molibdênio. É possível notar que a inoculação influenciou na nodulação e proporcionou aumento de 0,54% no teor de nitrogênio da parte aérea das plantas. O inoculante causou aumento significativo também na matéria seca, na ordem de 26% em relação à testemunha sem inoculante. A maior incorporação de nitrogênio nos tratamentos onde a nodulação foi superior, confirma o processo biológico de fixação de nitrogênio pelas plantas, descrito por SALISBURY & ROSS (1991), já que o solo utilizado no experimento apresentava baixo conteúdo de nitrogênio (7,6g.kg<sup>-1</sup> de matéria orgânica) e nenhuma forma de adubação nitrogenada foi realizada.

A interação entre inoculante e molibdênio, significativa para nodulação e nitrogênio, indica que o molibdênio teve efeito apenas quando aplicado juntamente com o inoculante. O Mo proporcionou aumento significativo no teor de nitrogênio da parte aérea (Tabela 1). Para as respostas ao Mo, também foi observado aumentou no tamanho e diminuição no número de nódulos.

Essa resposta ao Mo na nodulação e na fixação de N<sub>2</sub>, evidencia que sua principal atuação foi no processo de fixação simbiótica do nitrogênio, participando ativamente como cofator

integrante da enzima nitrogenase, que catalisa a redução do N<sub>2</sub> no bacterióide (SALISBURY & ROSS, 1991; MARECKOVÁ, 1983; CRUSH, 1987).

O aumento na matéria seca da parte aérea, nos

tratamentos com inoculante, parece estar associado à maior fixação de N<sub>2</sub>, conforme indicam os maiores teores de nitrogênio e a presença dos nódulos, possibilitando maior incorporação de compostos orgânicos na planta (Tabela 1).

TABELA 1. Efeito da inoculação e aplicação de molibdênio na nodulação, fixação biológica de nitrogênio e produção de matéria seca em trevo branco. Experimento 1<sup>(1)</sup>

Molibdênio	Nodulação <sup>(2)</sup>		Nitrogênio (%)		Matéria seca (mg/planta)		
	S/Inoc.	C/Inoc.	S/Inoc.	C/Inoc.	S/Inoc.	C/Inoc.	Média
Sem Mo	1,00aB	3,30bA	1,21aB	1,58bA	24,27	32,27	28,27a
Com Mo	1,00aB	3,80aA	1,14aB	1,85aA	28,00	33,87	30,93a
Média					26,13B	33,07A	
C.V.(%)	4,5		6,7		7,2		

<sup>(1)</sup>Em cada parâmetro avaliado, médias seguidas da mesma letra minúscula (dentro da mesma coluna) e maiúscula (dentro da mesma linha), não são significativamente diferentes ( $P = 0,05$ ), usando o teste de múltipla comparação de Duncan.

<sup>(2)</sup>Médias dos valores de nodulação determinados pela avaliação de número, posição e tamanho dos nódulos nas raízes primária e secundárias (escore de 1 a 4).

#### Experimento 2

Na Tabela 2 são apresentados os dados médios de nodulação, teor de nitrogênio da parte aérea e matéria seca, em resposta à inoculação e à temperatura de secagem das sementes inoculadas. Pode-se constatar que a nodulação somente ocorreu na presença do inoculante. A interação significativa entre inoculante e temperatura, para todos os parâmetros avaliados, indica que a temperatura teve efeito apenas no inoculante. Dessa forma, a secagem das sementes inoculadas sob temperatura de 30°C ocasionou perdas significativas na nodulação, no teor de nitrogênio e na matéria seca. Esses resultados concordam com IPAGRO (1983), VINCENT (1975) e PUPO (1979), que observam a necessidade da secagem das sementes inoculadas em ambiente protegido do calor.

O inoculante teve efeito significativo, aumentando os teores de nitrogênio e matéria seca, apenas quando as sementes inoculadas foram secadas sob condições de baixa temperatura (11°C), no entanto, houve nodulação maior nos tratamentos com inoculante, mesmo com secagem das sementes sob temperatura de 30°C. Nos tratamentos com temperatura alta (30°C), mesmo havendo nodulação, não houve aumento significativo no teor total de nitrogênio da parte aérea das plantas.

Houve relação direta entre teor de nitrogênio e matéria seca. Pode-se inferir que o aumento na matéria seca da parte aérea, nos tratamentos com inoculante, parece estar intimamente associado com maior fixação biológica de N<sub>2</sub>, conforme indicam os maiores teores totais de nitrogênio, possibilitando maior incorporação de compostos orgânicos na planta. Essa constatação já foi feita no experimento 1, no presente trabalho, e é abordada por BAKER & WILLIAMS (1987).

TABELA 2. Efeito da temperatura de secagem das sementes inoculadas na efetividade do inoculante, avaliado através: nodulação, fixação biológica de nitrogênio e produção de matéria seca em trevo branco. Experimento 2<sup>(1)</sup>

Temperatura (°C)	Nodulação <sup>(2)</sup>		Nitrogênio (%)		Matéria seca (mg/planta)	
	S/Inoc.	C/ Inoc.	S/ Inoc.	C/ Inoc.	S/ Inoc.	C/ Inoc.
11	1,0aB	3,3aA	1,21aB	1,58aA	24,27aB	32,27aA
30	1,0aB	2,4bA	1,08aA	1,18bA	27,98aA	26,40bA
C.V.(%)	4,7		3,2		6,4	

<sup>(1)</sup>Em cada parâmetro avaliado, médias seguidas da mesma letra minúscula (dentro da mesma coluna) e maiúscula (dentro da mesma linha), não são significativamente diferentes ( $P = 0,05$ ), usando o teste de múltipla comparação de Duncan.

<sup>(2)</sup>Médias dos valores de nodulação determinados pela avaliação de número, posição e tamanho dos nódulos nas raízes primária e secundárias (escore de 1 a 4).

## Experimento 3

Os dados médios de nodulação, teor de nitrogênio e matéria seca, referentes ao experimento 3, são apresentados na Tabela 3. A temperatura alta (30°C) na secagem das sementes inoculadas ocasionou diminuição na nodulação e no teor de nitrogênio, independente da aplicação de molibdênio, e na matéria seca, quando o nutriente foi adicionado nas sementes na ocasião da inoculação.

A interação entre molibdênio e temperatura, para nodulação, teor de nitrogênio e matéria seca, indica também que o molibdênio teve efeito positivo, quando as sementes tratadas secaram sob condições de temperatura baixa (11°C), e negativo, quando as sementes foram secadas sob condições

de temperatura alta (30°C) (Tabela 3). Esses resultados evidenciam efeito de toxicidade no *Rhizobium*, exercido pelo molibdato de sódio quando adicionado à goma arábica com o inoculante, nesta temperatura, provavelmente diminuindo sensivelmente a capacidade infectiva daquelas bactérias ou diminuindo o número de bactérias vivas. Tal fato causaria a redução na formação dos nódulos e a na fixação de N<sub>2</sub> atmosférico, como foi constatado.

Dessa forma, pode-se observar que na secagem das sementes inoculadas, usando temperatura alta (30°C), o dano causado à viabilidade do *Rhizobium* pela temperatura é acentuado pelo efeito do molibdato de sódio quando esse sal é adicionado ao inoculante.

TABELA 3. Efeito do molibdênio e da temperatura de secagem das sementes, na nodulação, fixação biológica de nitrogênio e produção de matéria seca em trevo branco. Experimento 3<sup>(1)</sup>

Temperatura (°C)	Nodulação <sup>(2)</sup>		Nitrogênio (%)		Matéria seca (mg/planta)	
	S/Mo	C/Mo	S/Mo	C/Mo	S/Mo	C/Mo
11	2,2aB	2,4aA	1,39aB	1,47aA	28,27aB	30,93aA
30	1,7bA	1,3bB	1,13bA	1,02bB	29,33aA	26,20bB
C.V.(%)	5,4		5,6		8,2	

<sup>(1)</sup>Em cada parâmetro avaliado, médias seguidas da mesma letra minúscula (dentro da mesma coluna) e maiúscula (dentro da mesma linha), não são significativamente diferentes ( $P = 0,05$ ), usando o teste de múltipla comparação de Duncan.

<sup>(2)</sup>Médias dos valores de nodulação determinados pela avaliação de número, posição e tamanho dos nódulos nas raízes primária e secundárias (escore de 1 a 4).

## CONCLUSÕES

O Mo aplicado via semente, no momento da inoculação, na forma de molibdato de sódio, proporciona aumentos significativos na fixação biológica de nitrogênio em trevo branco.

A secagem a 11°C e umidade relativa de 50% é melhor do que a 30°C quanto à sobrevivência do *Rhizobium*.

A temperatura de 30°C, por 24 horas, na secagem das sementes tratadas, reduz a nodulação e o acúmulo de nitrogênio.

A adição de molibdato de sódio acentua o efeito da secagem das sementes a 30°C sobre a sobrevivência do *Rhizobium*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKER, M.J. & WILLIAMS, W.M. **White clover**. CAB International. Palmerston North, 1987.
- BREMNER, J.M. & EDWARDS, A.P. Determination and isotoperation analysis of different forms of nitrogen in soils; I. Apparatus and procedures for distillation and determination for ammonium. **Soil Sci. Soc. Am. Proc.**, Madison, **29**:504-507, 1965.
- CARAMBULA, M. **Producción y manejo de pasturas sembradas**. Montevideú, Agropecuária Hemisfério Sur, 1982. 464p.
- CRUSH, J.R. Nitrogen fixation. In: BAKER, M.J. & WILLIAMS, W.M. (eds.). **White clover**. Palmerston North, CAB International, 1987. p. 185-200.
- SANTOS, O.S. Molibdênio. In: (Ed.) FERREIRA, M. E.; CRUZ, C. P. **Simpósio sobre micronutrientes na agricultura**, Piracicaba, POTAFOS/CNPq, p.191-217, 1991.
- INSTITUTO DE PESQUISAS AGRONÔMICAS - IPAGRO. **Fixação biológica do nitrogênio pela simbiose entre *Rhizobium* e leguminosas**. Porto Alegre, Secretaria da Agricultura, 1983. p.5-52. (Boletim Técnico, 11).
- MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo, Editora Agronômica Ceres, 1980. 251p.
- MARECKOVÁ, H. Bacteria for nitrogen fixation. In: REHM, H.-J. & REED, G. (eds.) **Biotechnology**. Florida, Deerfield Beach, 1983. v.3, p. 217-232.
- MENGEL, K. & KIRKBY, E.A. **Principles of plant nutrition**. Berne, International Potash Institute, 1978. 593p.
- PUPO, N. I. H. **Manual de pastagens e forrageiras: formação, conservação, utilização**. Campinas, Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1979. 343p.
- SALISBURY, F. B. & ROSS, C. W. **Plant physiology**. 4.ed. Belmont, Wadsworth Publishing Company, 1991. 682p.
- SFREDO, G.J.; BORKERT, A.L.; NEPOMUCENO, A.L. & OLIVEIRA, M.C.N. Eficácia de produtos contendo micronutrientes, aplicados via sementes, sobre produtividade e teores de proteína da soja. **R. bras. Ci. Solo**, **21**:41-45, 1997.
- VIDOR, C. & PERES, J.R.R. Nutrição de plantas com molibdênio e cobalto. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO, **17.**, Londrina, 1986. Enxofre e micronutrientes na agricultura brasileira. Anais... Londrina, EMBRAPA-CNPSo/IAPAR/SBCS, 1988. p.179-203.
- VINCENT, J. M. **Manual practico de rizobiologia**. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 1975. 200p.