

SEÇÃO III - BIOLOGIA DO SOLO

AVALIAÇÃO DE ESTIRPES DE RIZÓBIO PARA A PRODUÇÃO DE INOCULANTES PARA TREVO VERMELHO⁽¹⁾

N. SANTILLANA⁽²⁾, J. R. J. FREIRE⁽³⁾, E. L. S. de SÁ⁽³⁾ & M. SATO⁽⁴⁾

RESUMO

No Setor de Microbiologia do Solo, Departamento de Solos, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, de janeiro de 1994 a março de 1995, quatro estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii foram avaliadas para recomendação para a produção de inoculantes de trevo vermelho (*Trifolium pratense*). Em experimentos de casa de vegetação, as quatro estirpes apresentaram igual eficiência na fixação do nitrogênio. Contudo, em experimento de mistura de pares de estirpes, a estirpe SEMIA 222 foi mais competitiva na formação de nódulos. Em meio levedura manitol sacarose, a taxa de crescimento foi maior para as estirpes SEMIA 222, T107 e T154 do que a estirpe SEMIA 235. O tempo de geração da estirpe 222 foi mais baixo, seguido da T107 e T154, e maior para a estirpe 235. Em inoculante com veículo de turfa esterilizada, avaliado até seis meses de armazenamento, as estirpes 222 e T154 apresentaram boa sobrevivência, enquanto em inoculante com a mistura das estirpes, a T154 dominou a população. As duas estirpes apresentaram similar sobrevivência nas sementes tratadas por inoculação simples e por peletização.

Termos de indexação: *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii, seleção de estirpes, *Trifolium pratense*.

⁽¹⁾ Parte da Tese de Mestrado do primeiro autor, apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Realizada com recursos da CAPES. Recebido para publicação em dezembro de 1996 e aprovado em abril de 1998.

⁽²⁾ Bióloga, Universidade San Cristóbal de Huamanga. Casilla 1 Ayacucho Perú.

⁽³⁾ Professor do Departamento de Solos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS. Caixa Postal 776, CEP 90001-970 Porto Alegre (RS). Bolsista do CNPq.

⁽⁴⁾ Bióloga-Microbióloga, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. CEP 90001-970 Porto Alegre (RS).

SUMMARY: EVALUATION OF STRAINS OF RHIZOBIA FOR PRODUCTION OF INOCULANTS FOR RED CLOVER

Four strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* were screened for their use in inoculants for red clover (*Trifolium pratense*) in the Soil Microbiology Sector, Department of Soils, University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, from January 1994 to March 1995. In greenhouse experiments, all four strains presented similar efficiency in nitrogen fixation. However, when mixed strains were used, the strain SEMIA 222 was more effective in nodule formation. In a yeast manitol sucrose medium, growth rate was higher for strains SEMIA 222, T107 and T154, than for strain SEMIA 235. Generation time was lower for strain 222, followed by T107 and T154, and highest for 235. Strains 222 and T154 survived well in an inoculant with sterilized peat carrier evaluated at six months of storage, though the latter dominated the population in an inoculant with mixed strains. These two strains survived in a similar manner in inoculated seed.

Index terms: *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, selection of strains, *Trifolium pratense*.

INTRODUÇÃO

Os benefícios da fixação biológica do nitrogênio na agricultura estão amplamente documentados, sendo possível melhorar a produtividade e a qualidade protéica do trevo (*Trifolium* spp), leguminosa forrageira utilizada para pastagem, quando estabelecida uma simbiose planta-rizóbio eficiente. Entretanto, para atingir resultados práticos de uma eficiente fixação de N₂ necessita-se de estirpes de rizóbio previamente selecionadas, além de outros fatores, como hospedeiro e condições ambientais apropriadas. Para Brockwell et al. (1982) e Thompson (1988), características desejáveis numa estirpe devem incluir, dentre outras, habilidade para fixar N₂, competitividade por sítios de nodulação, apropriada capacidade de multiplicar-se em meio líquido e adequada sobrevivência em turfa e sobre a semente.

Por outro lado, diferenças nessas características entre estirpes de *Rhizobium* têm sido relatadas, indicando variabilidade dentro do gênero, o que permite selecionar, dentre estirpes eficientes, as mais recomendadas para a produção de inoculantes.

A pesquisa foi realizada com os objetivos específicos de avaliar quatro estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, SEMIA 222, SEMIA 235, T107 e T154, em relação à eficiência na fixação de N₂, capacidade competitiva por sítios de nodulação, multiplicação em meio líquido, sobrevivência em turfa esterilizada e em sementes, para recomendação para a produção de inoculantes para trevo vermelho (*Trifolium pratense*).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados seis experimentos com os objetivos supracitados. As estirpes SEMIA 222

(= TA 1, SU 329, NA 14) e SEMIA 235 (= CB 1444, SU 495, NA 21, UN2-29), de origem australiana, foram obtidas da coleção de culturas de rizóbio do Centro de Fixação Biológica do Nitrogênio da Fundação de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), da Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Rio Grande do Sul. Essas estirpes foram selecionadas no Centro e são por este recomendadas para produção de inoculantes. As estirpes T107 e T154 foram isoladas e selecionadas no Peru, provenientes da coleção de culturas do Laboratório de Rhizobiologia da Universidade Nacional de San Cristóbal de Huamanga - Peru.

A eficiência na fixação de N₂ foi determinada em casa de vegetação, utilizando-se trevo vermelho (*Trifolium pratense*), var. Quiñequeli, com oito sementes pré-germinadas por vaso "Leonard", contendo areia + carvão vegetal e solução nutritiva de SPECHT (Sato, 1990), deixando-se três plantas por vaso. A inoculação das plantas foi realizada, utilizando-se 1 mL de suspensão bacteriana por vaso. Foram incluídos dois tratamentos-controle: uma testemunha, com 100 mg L⁻¹ de nitrogênio sob a forma de nitrato de potássio, dividido em duas épocas, e um controle absoluto sem adição de nitrogênio. O delineamento experimental foi completamente casualizado com quatro repetições. Na colheita, 60 dias após a inoculação, avaliaram-se o rendimento de matéria seca da parte aérea, a massa seca de nódulos, o teor e conteúdo de nitrogênio na parte aérea, determinando-se a eficiência relativa das estirpes na fixação de nitrogênio.

A capacidade competitiva das estirpes foi avaliada por meio do experimento semelhante ao anterior, com oito tratamentos de mistura das estirpes duas a duas, na proporção de 1:1 (v/v). A ocupação nodular pelas estirpes foi determinada por meio da tipificação por sorroaglutinação (Somasegaran & Hoben, 1985).

A cinética de crescimento das quatro estirpes foi avaliada em frascos tipo erlenmeyer de 250 mL de capacidade, que continham 50 mL de meio levedura manitol (Sylvester-Bradley et al., 1987), modificado pela adição de 5 g de manitol e 5 g de sacarose (LMS), inoculados pela adição de 1 mL de suspensões equalizadas (por turbidimetria) e incubados em agitador orbital a 180 rpm e 28°C. A concentração celular foi determinada por plaqueamento pelo método de gotas (Somasegaran & Hoben, 1985), com amostragens em intervalos de 12 até 120 h. O tempo de geração e a taxa de crescimento foram determinados conforme Neidhardt et al. (1990).

Nos ensaios de fermentação, foram usadas as estirpes SEMIA 222 e T154 (destacadas no experimento anterior). Empregou-se o método indicado por Somasegaran & Hoben (1985), em que frascos tipo erlenmeyer de dois litros que contendo 600 mL de meio LMS, foram inoculados com 6 mL de suspensão bacteriana com, aproximadamente, $2,3 \times 10^9$ ufc mL⁻¹. A temperatura de incubação foi mantida entre 24 e 26°C, sendo a aeração fornecida por um compressor de ar para aquário (super II Vigor). A concentração celular foi determinada em amostragens a 24, 48, 72 e 96 h de crescimento.

A sobrevivência das estirpes em inoculante foi avaliada, usando-se as estirpes SEMIA 222 e T154, com crescimento em caldo por 60 h e impregnação da turfa, já processada (García-Blásquez, 1993) e autoclavada, por três dias. No primeiro dia, em bandejas e, após, por dois dias consecutivos, em sacos de polipropileno (120 x 200 mm, 0,035 mm de espessura) a 121°C por uma hora. O caldo foi incorporado nos sacos com pipeta esterilizada, os quais foram selados com fita adesiva. O experimento constituiu-se de três tratamentos: as estirpes isoladamente e mistura destas na proporção 1:1. Os sacos inoculados foram mantidos a 28°C, durante duas semanas, para maturação e, posteriormente, armazenados sob refrigeração a 4°C. A sobrevivência das estirpes foi avaliada pelo método de contagem de células viáveis em placas de Petri (Somasegaran & Hoben, 1985) em amostragens aos 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias de armazenamento. Nos tratamentos de mistura, as estirpes foram identificadas por soro aglutinação.

Avaliou-se a sobrevivência das estirpes SEMIA 222 e T154 quando inoculadas às sementes de trevo vermelho, isoladamente e misturadas. Para tanto 50 g de sementes foram inoculadas com ou sem peletização. Para a inoculação sem peletização utilizou-se uma solução açucarada (50 g L⁻¹) e com peletização uma solução de goma arábica (400 g L⁻¹) e carbonato de cálcio comercial. As sementes foram armazenadas em sacos de polietileno em temperatura variando entre 24 e 28°C. A sobrevivência foi avaliada pelo método do número mais provável (NMP) (Sylvester-Bradley et al., 1987), sendo as amostragens para a inoculação simples realizadas aos 0, 3 e 7 dias, e aos 0, 3, 7, 14, 21 e 30 dias, para a inoculação com peletização.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram observadas diferenças na eficiência da fixação de N₂, medida através do N total acumulado nas plantas, entre as quatro estirpes, quando inoculadas em trevo vermelho, var. Quiñeque (Quadro 1). Brose (1994), avaliando 16 estirpes de *R. leguminosarum* bv. trifolii em trevo branco, observou que o isolado EEL 13882 foi superior no conteúdo de N total acumulado em relação à estirpe SEMIA 235, mas não superou ao da estirpe SEMIA 222. Neste trabalho, resultados obtidos com a estirpe SEMIA 235 mostraram valores menores quanto à porcentagem de N na matéria seca e quanto à massa seca de nódulos em relação ao tratamento inoculado com a estirpe T107. O comportamento das estirpes SEMIA 235 e SEMIA 222 já havia sido observado em trabalhos anteriores por Freire (1992) e Mendes et al. (1974) e confirmam os resultados deste trabalho.

O nitrogênio total apresentou alta correlação com o rendimento da matéria seca da parte aérea ($r = 0,98$), concordando com os resultados obtidos por outros pesquisadores (Gonzales, 1984; Barbo, 1985). Porém, não foi observada correlação significativa entre a massa seca de nódulos e aqueles parâmetros. Somasegaran & Hoben (1985) relataram que o valor da matéria seca de nódulos mostrou-se, geralmente, proporcional à eficiência de fixação de nitrogênio. Entretanto, os resultados obtidos neste trabalho não permitiram observar tal fato, o que também foi relatado por outros pesquisadores (Gonzales, 1984; Barbo, 1985; Andrade, 1986).

No experimento sobre capacidade competitiva, os valores médios de produção de matéria seca e porcentagem de nitrogênio (Quadro 2) revelaram que todos os tratamentos inoculados com as misturas das estirpes avaliadas não diferiram entre si. O tratamento inoculado com a mistura SEMIA 222 + SEMIA 235 apresentou valores de N-total acumulado significativamente inferiores aos dos outros tratamentos, com exceção das misturas das estirpes SEMIA 235 + T107 e T107 + T154.

A análise sorológica dos nódulos (Quadro 3) mostrou que a estirpe SEMIA 222 apresentou maior ocorrência nos nódulos, cerca de 60%, quando misturada com as estirpes T107 e T154, isoladas no Peru, e com a estirpe SEMIA 235, isolada na Austrália, demonstrando boa capacidade competitiva em relação a essas estirpes. No tratamento inoculado com a mistura das estirpes SEMIA 235 + T154, a maior ocorrência nos nódulos foi da estirpe T154, indicando que os bons resultados obtidos neste tratamento foram devidos à predominância desta estirpe, de maior eficiência na fixação.

No estudo da cinética de crescimento, as estirpes SEMIA 222 e T154, após 60 h de incubação, atingiram a maior concentração celular, mantendo-se até o final do experimento, enquanto as estirpes

Quadro 1. Rendimento de matéria seca, percentagem e nitrogênio total acumulado na parte aérea, massa seca de nódulos e eficiência relativa de fixação de nitrogênio (Efr) em plantas de trevo vermelho, var. Quiñequeli, inoculadas com quatro estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Média de quatro repetições⁽¹⁾

Tratamento	Matéria seca	N na matéria seca		Massa seca de nódulo	Efr ⁽⁴⁾
	mg vaso ⁻¹	dag kg ⁻¹	mg vaso ⁻¹		%
SEMIA 222	190 a	3,49 bc	6,65 a	8 ab	93
SEMIA 235	158 a	3,36 c	5,34 a	5 b	75
T107	177 a	3,85 b	6,85 a	10 a	96
T154	166 a	3,71 bc	6,22 a	7 ab	87
T + N ⁽²⁾	165 a	4,35 a	7,14 a	0 c	100
T - N ⁽³⁾	16 b	1,22 d	0,19 b	0 c	3

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5%. Dados foram transformados para $\sqrt{x+0,5}$. ⁽²⁾ T + N Com N mineral e não inoculado. ⁽³⁾ T - N Sem N mineral e não inoculado.

$$\text{EFR} = \frac{\text{N acumulado planta inoculada}}{\text{N acumulado em T+N}}$$

Quadro 2. Rendimento de matéria seca, percentagem de N no tecido, nitrogênio total acumulado na parte aérea, número de nódulos e eficiência relativa de fixação de nitrogênio em plantas de trevo vermelho, var. Quiñequeli, inoculadas com misturas estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Média de quatro repetições⁽¹⁾

Tratamento	Matéria seca	N na matéria seca		Número de nódulo	Efr ⁽⁴⁾
	mg vaso ⁻¹	dag kg ⁻¹	mg vaso ⁻¹		%
SEMIA 222 + 235	96 a	3,72 b	3,58 d	57 b	49
SEMIA 222 + T107	162 a	3,72 b	6,15 abc	91 a	84
SEMIA 222 + T154	148 a	3,99 b	5,88 ab	86 a	80
SEMIA 235 + T107	123 a	3,89 b	4,77 bcd	89 a	65
SEMIA 235 + T154	162 a	3,99 b	6,50 ab	94 a	88
T107 + T154	105 a	3,90 b	4,10 cd	59 b	56
T + N ⁽²⁾	166 a	4,43 a	7,36 a	0 c	100
T - N ⁽³⁾	20 b	1,31 c	0,27 e	0 c	4

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5%. Dados foram transformados para $\sqrt{x+0,5}$. ⁽²⁾ T + N Com N mineral e não inoculado. ⁽³⁾ T - N Sem N mineral e não inoculado.

$$\text{EFR} = \frac{\text{N acumulado planta inoculada}}{\text{N acumulado em T+N}}$$

Quadro 3. Ocorrência das estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* em nódulos de trevo vermelho, variedade Quiñequeli, em resposta à inoculação com a mistura (1:1) das estirpes SEMIA 222, SEMIA 235, T107 e T154

Mistura de Estirpes	Sorogrupos			
	SEMIA 222	SEMIA 235	T107	T154
	%			
SEMIA 222 + 235	53	47	-	-
SEMIA 222 + T107	56	-	44	-
SEMIA 222 + T154	60	-	-	40
SEMIA 235 + T107	-	55	45	-
SEMIA 235 + T154	-	32	-	68
T107 + T154	-	-	63	37

SEMIA 235 e T107 apresentaram um declínio marcado a partir das 60 até 120 h (Quadro 4). O tempo de geração foi menor para a estirpe SEMIA 222 (2,20 h), mediano para T107 e T154 (3,00 e 3,08 h) e maior para SEMIA 235 (4,26 h). A taxa de crescimento foi maior para a estirpe SEMIA 222 (0,31 h⁻¹). A estirpe SEMIA 235 foi a que apresentou menor taxa de crescimento (0,18 h⁻¹). Essas características são muito importantes quando se trata da seleção de estirpes para a produção de inoculantes, pois estirpes com menor tempo de geração e maior taxa de crescimento asseguram menor tempo de permanência no fermentador, o que evita problemas de contaminação e otimiza o processo de produção.

Com base nos resultados obtidos nos experimentos de competitividade e cinética de crescimento, foram selecionadas as estirpes SEMIA 222 e T154 para multiplicação em fermentador. Verificou-se que a estirpe SEMIA 222 apresentou a maior concentração celular em relação a T154 (Quadro 5).

No estudo da sobrevivência em turfa esterilizada, observou-se (Quadro 6) aumento acentuado do número inicial de células até os trinta dias e ligeiro declínio até 180 dias. A redução foi mais pronunciada no tratamento com a mistura das estirpes, enquanto os tratamentos com as estirpes individuais apresentaram maior sobrevivência. Essas observações concordam com os resultados obtidos por Thompson (1980) e Garcia-Blásquez (1993). A concentração encontrada esteve acima do mínimo exigido pela legislação atualmente vigente no Brasil, isto é, 1×10^7 bactérias/grama no final do prazo de validade. Essa alta sobrevivência no inoculante deve-se ao emprego de suporte esterilizado e ao armazenamento a 4°C.

O monitoramento do desenvolvimento da mistura das estirpes SEMIA 222 e T154, no inoculante, tipificadas por soroaglutinação, mostrou que a estirpe T154 dominou a concentração celular sobre a estirpe SEMIA 222. Essa menor colonização da estirpe SEMIA 222, provavelmente, deve-se a algum efeito antagônico ou, então, à menor capacidade intrínseca para sobreviver na turfa. A predominância de uma estirpe de *Bradyrhizobium japonicum* em inoculantes turfosos foi, também, observada por Frankenberg et al. (1995). Segundo esses resultados, trabalhando com inoculantes preparados com mais de uma estirpe, torna-se possível conhecer a habilidade de colonização do suporte e a sobrevivência de cada estirpe com vistas em evitar problemas devidos à competição entre estirpes.

Quadro 4. Número de ufc mL⁻¹ de estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* em meio de cultura levedura-manitol sacarose, durante 120 h de incubação. Média de quatro repetições⁽¹⁾

Estirpe	Tempo (h)					
	24	48	60	72	96	120
	x 10 ⁴		x 10 ⁸		x 10 ⁹	
SEMIA 222	0,3 c	2,6 d	2,0 a	2,3 a	1,9 a	1,8 a
SEMIA 235	66,1 a	4,5 c	1,2 c	0,9 b	0,4 b	0,1 c
T107	8,9 b	13,5 a	1,6 b	0,8 b	0,1 c	0,6 b
T154	6,2 b	7,1 b	2,2 a	2,5 a	2,2 a	2,1 a

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5%. Dados foram transformados para log X.

Quadro 5. Número de ufc mL⁻¹ de estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* SEMIA 222 e T154, multiplicadas em fermentador, em meio de cultura levedura-manitol sacarose, durante 96 h de incubação. Média de quatro repetições⁽¹⁾

Estirpe	Tempo (h)			
	24	48	72	96
	x 10 ⁹			
SEMIA 222	1,5 a	2,2 a	2,6 a	1,8 a
T154	1,1 b	1,9 b	2,3 a	1,4 b

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5%. Dados foram transformados para log X.

Quadro 6. Sobrevivência das estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* SEMIA 222 e T154, individualmente e em mistura, em inoculantes à base de turfa esterilizada armazenadas a 4°C durante 180 dias. Média de três repetições⁽¹⁾

Estirpe	Tempo (dia)					
	30	60	90	120	150	180
	x 10 ⁹ ufc g ⁻¹					
SEMIA 222	3,2 a	2,0 ab	1,5 ab	1,5 b	1,5 a	1,5 a
T154	3,1 a	2,3 a	1,1 b	2,2 a	1,9 a	1,6 a
Mistura	2,8 a	1,5 b	1,6 a	1,4 b	1,4 a	0,7 b

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5%. Dados foram transformados para log X.

Quadro 7. Sobrevivência de duas estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii em sementes de trevo vermelho, var. Quiñequeli, tratadas com inoculação com ou sem peletização, avaliadas em diferentes períodos de amostragem. Média de três repetições⁽¹⁾

Método de Inoculação	Estirpe	Períodos de amostragem (dia)					
		0	3	7	14	21	30
		nº de rizóbios/semente					
Sem peletização	SEMIA 222	13.804 aA	5.623 aAB	562 bB	0	0	0
	T154	13.996 aA	3.630 bB	891 cB	0	0	0
	Mistura (1:1)	13.804 aA	5.754 aAB	891 bB	0	0	0
Com peletização	SEMIA 222	13.804 aA	13.804 aA	6.025 abA	1.659 bc	562 c	562 c
	T154	14.125 aA	13.804 aA	13.804 aA	13.804 a	891 b	562 b
	Mistura (1:1)	14.125 aA	13.804 aA	13.804 aA	8.912 a	891 b	563 b

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, e maiúscula, na linha não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5%. Dados foram transformados para log X.

A sobrevivência das células nas sementes tratadas por inoculação sem peletização evidenciou um declínio populacional aos três dias de armazenamento e mortalidade total após sete dias (Quadro 7). Entretanto, nas sementes peletizadas, a população inicial da estirpe T154 foi mantida até os 14 dias e, no tratamento inoculado com a mistura das duas estirpes, essa população foi mantida até os 7 dias. Após 30 dias de armazenamento, ainda foi possível detectar população de rizóbio ($5,6 \times 10^2$ bactérias por semente). Nas sementes peletizadas, os rizóbios são protegidos contra a dessecação, o que favorece sua sobrevivência (Salema et al., 1982; Hoben et al., 1991).

CONCLUSÕES

1. As estirpes SEMIA 222, SEMIA 235, T107 e T154 apresentaram eficiência similar na fixação de N_2 , quando testadas em plantas de trevo vermelho (*Trifolium pratense*), var. Quiñequeli, porém a estirpe SEMIA 222 foi a mais competitiva por sítios de nodulação.

2. As estirpes SEMIA 222, T154 e T107 apresentaram maior taxa de crescimento do que a estirpe SEMIA 235, em meio de cultura contendo manitol mais sacarose.

3. As estirpes SEMIA 222 e T154 apresentaram sobrevivência similar em turfa esterilizada e armazenada a 4°C.

4. A estirpe T154 apresentou maior habilidade na colonização da turfa do que a estirpe SEMIA 222, quando inoculada em mistura.

5. A sobrevivência das estirpes SEMIA 222 e T154 foi similar nas sementes inoculadas, tanto sem quanto com peletização.

6. Com base nos parâmetros observados, as estirpes SEMIA 222 e T154 apresentaram características mais indicadas para serem recomendadas para a produção de inoculantes para trevo vermelho.

AGRADECIMENTO

Agradecemos ao Dr. Cayo García-Blásquez que, gentilmente, proporcionou a turfa para este trabalho.

LITERATURA CITADA

- ANDRADE, D.S. Seleção de estirpes nativas de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii para *Trifolium riograndense* Bur Kart. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1986. 93p. (Tese de Mestrado)
- BARBO, C.U.S. Eficiência simbiótica de cultivares de feijão. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1985. 136p. (Tese de Mestrado)
- BROCKWELL, J.; DIATTOFF, A.; ROUGHLEY, R.A. & DATE, R.A. Selection of rhizobia for inoculants. In: VINCENT, J.M., ed. Nitrogen fixation in legumes. Sidney, Academy Press, 1982. p.173-191.
- BROSE, E. Seleção de rhizobio para trevo branco em solo ácido. Pesq. Agropec. Bras., 29:281-285, 1994.

- FREIRE, J.R.J. Fixação do nitrogênio pela simbiose rizóbio leguminosas. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. & NEVES, M.C., eds. *Microbiologia do solo*. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.121-136.
- FRANKENBERG, C.L.C.; FREIRE, J.R.J. & THOMAS, R.W.S.P. Growth and competition between two strains of *Bradyrhizobium japonicum* in broth and in a peat-based inoculant: dinitrogen fixation efficiency and competition for nodulation sites. *R. Microbiol.*, 26:2211-218, 1995.
- GARCÍA-BLÁSQUEZ, C. Adição de montmorilonita e Polivinilpirrolidona em substrato turfoso para produção de inoculantes para leguminosas. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1993. 159p. (Tese de Doutorado)
- GONZALEZ, T.G. Efeito do uso de inóculos múltiplos de *Rhizobium phaseoli* sobre a fixação de nitrogênio em *Phaseolus vulgaris* L. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1984. 82p. (Tese de Mestrado)
- HOBEN, H.J.; HAUNG, N.N.; SOMASEGARAN, P.J. & KANG, U.V. Oils adhesives for seed inoculation and their influence on the survival of *Rhizobium* spp. and *Bradyrhizobium* spp. on inoculated seeds. *World J. Microb. Biotech.*, 7:324-330, 1991.
- MENDES, N.; FREIRE, J.R.J.; PEREIRA, J.J.; PEDROSO, M.E. & GODINHO, I. Seleção e recomendações de estirpes de *Rhizobium*. In: REUNION LATINOAMERICANA SOBRE RHIZOBIUM, 7., Chaco, 1974. Resúmenes. Resistência, Argentina, 1974. p.232-237.
- NEIDHARDT, F.C.; INGRAKAM, J.L. & SCHAECHTER, M. *Physiology of the bacterial cell: a molecular approach*. Massachusetts, Sinauer Associates, 1990. 506p.
- SATO, M.L. Interações entre *Bradyrhizobium japonicum* e a população microbiana em inoculante à base de turfa. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1990. 149p. (Tese de Mestrado)
- SALEMA, M.P.; PARKER, C.A.; KIDBY, D.K. & CHATEL, D.L. Death of rhizobia on inoculated seed. *Soil Biol. Biochem.*, 14:13-14, 1982.
- SOMASEGARAN, P. & HOBEN, H.J. *Methods in legume - Rhizobium technology*. Hawaii, NifTAL, 1985. 367p.
- SYLVESTER-BRADLEY, R.; KIPE-NOLT, J. & HARRIS, D. *Simbiosis leguminosa-Rizobio: evaluación, selección y manejo*. Cali, CIAT-UNDP, 1987. 178p.
- THOMPSON, J.A. Production and quality control of legume inoculants. In: BERGERSEN, F., ed. *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*. New York, J.Wiley, 1980. p.480-535.
- THOMPSON, J.A. Selection of *Rhizobium* strains. In: BECK, D.P. & MATERON, L.A., eds. *Nitrogen fixation in legumes in mediterranean agriculture*. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1988. p.207-224.