

Boletim Técnico

18

Pesquisa e Desenvolvimento

2026
ISSN 2674-8177

Júlio Kuhn da Trindade
Raquel Paz da Silva
Ludmila Fiorenzano Baethgen
Letícia Schonhofen Longoni
Fernanda de Oliveira de Andrade Bertolo
Marcos Caraffa
Tânia Maria Bayer da Silva
Anelise Beneduzi



**Avaliação preliminar do desempenho simbiótico
de estirpes de rizóbios em trevo-persa sob
condições controladas**



**GOVERNO DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
SECRETARIA DA AGRICULTURA, PECUÁRIA,
PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL E IRRIGAÇÃO
DEPARTAMENTO DE DIAGNÓSTICO E PESQUISA
AGROPECUÁRIA**

**BOLETIM TÉCNICO:
pesquisa e desenvolvimento**

**AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO DESEMPENHO
SIMBIÓTICO DE ESTIRPES DE RIZÓBIOS EM TREVO-
PERSA SOB CONDIÇÕES CONTROLADAS**

Júlio Kuhn da Trindade

Raquel Paz da Silva

Ludmila Fiorenzano Baethgen

Letícia Schonhofen Longoni

Fernanda de Oliveira de Andrade Bertolo

Marcos Caraffa

Tânia Maria Bayer da Silva

Anelise Beneduzi

Porto Alegre, RS

2026

Governador do Estado do Rio Grande do Sul: Eduardo Figueiredo Cavalheiro Leite.

Secretário da Agricultura, Pecuária, Produção Sustentável e Irrigação: Márcio Madalena.

Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária

Rua Gonçalves Dias, 570 – Bairro Menino Deus

Porto Alegre | RS – CEP: 90130-060

Telefone: (51) 3288.8000

<https://www.agricultura.rs.gov.br/ddpa>

Diretor: Caio Fábio Stoffel Efrom.

Comissão Editorial:

Loana Silveira Cardoso; Lia Rosane Rodrigues; Bruno Brito Lisboa; Larissa Bueno Ambrosini; Raquel Paz da Silva; Flávio Nunes.

Arte: Rodrigo Nolte Martins

Catálogo e normalização: Flávio Nunes

A945 Avaliação preliminar do desempenho simbiótico de estirpes de rizóbios em trevo-persa sob condições controladas / Júlio Kuhn da Trindade ... [et al.] – Porto Alegre : SEAPI/DDPA, 2026.

35 p. : il. – (Boletim técnico : pesquisa e desenvolvimento, 2674-8177 ; n. 18)

Continuação de: Boletim Fepagro, 1995-2016.

1. Fixação biológica de nitrogênio. 2. *Rhizobium leguminosarum*. 3. *Trifolium resupinatum*. 4. Inoculante. 5. Leguminosa forrageira. I. Trindade, Júlio Kuhn da. II. Série.

CDU 579.64

REFERÊNCIA

TRINDADE, Júlio Kuhn *et al.* **Avaliação preliminar do desempenho simbiótico de estirpes de rizóbios em trevo-persa sob condições controladas.** Porto Alegre: SEAPI/DDPA, 2026. 35 p. (Boletim técnico: pesquisa e desenvolvimento, 18).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 MATERIAL E MÉTODOS	12
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
3.1 Nodulação e viabilidade dos nódulos	21
3.2 Crescimento inicial da parte aérea e do sistema radicular	24
3.3 Acúmulo de biomassa seca	26
3.4 Teor de nitrogênio no tecido vegetal.....	28
3.5 Síntese integrada do desempenho das estirpes de rizóbios inoculantes	31
4 CONCLUSÕES.....	32
REFERÊNCIAS	33

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Vista geral das unidades experimentais uma semana após a semeadura do trevo-persa, em vasos convencionais e de Leonard, mantidos em casa de vegetação. 13
- Figura 2.** Plantas de trevo-persa aos 46 dias após a semeadura, no momento da coleta para avaliação do sistema radicular e da nodulação, em vasos convencionais e de Leonard. 16
- Figura 3.** Preparação das amostras de trevo-persa para avaliação da nodulação após lavagem do sistema radicular (A) e detalhe de nódulos observados em microscópio estereoscópico (B; C). 17
- Figura 4.** Plantas de trevo-persa após separação e preparo para mensuração do comprimento da parte aérea e das raízes. 18
- Figura 5.** Trevo-persa em estágio de florescimento (A), processo de destilação (B) e titulação das amostras para determinação do teor de nitrogênio nos tecidos vegetais (C). 19
- Figura 6.** Nódulo de trevo-persa com coloração interna rosada após corte transversal (A) e conjunto de nódulos viáveis (B), indicando presença de leghemoglobina e atividade de fixação biológica de nitrogênio. 24

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Número médio de nódulos por planta de trevo-persa submetida a diferentes condições de inoculação e de suprimento de nitrogênio, em vasos convencionais e de Leonard. 22
- Tabela 2.** Comprimento médio da parte aérea e da raiz de plantas de trevo-persa submetidas a diferentes condições de inoculação e de suprimento de nitrogênio, em vasos convencionais e de Leonard. 25
- Tabela 3.** Massa seca da parte aérea (MSPA), das raízes (MSR) e total (MST) de plantas de trevo-persa submetidas a diferentes condições de inoculação e de suprimento de nitrogênio, em vasos convencionais e de Leonard.....27
- Tabela 4.** Teor de nitrogênio em material vegetal comparável de plantas de trevo-persa submetidas a suprimento mineral de N ou à inoculação com diferentes materiais inoculantes, em vasos convencionais e de Leonard. 30

BOLETIM TÉCNICO: pesquisa e desenvolvimento

Avaliação preliminar do desempenho simbiótico de estirpes de rizóbios em trevo-persa sob condições controladas

Júlio Kuhn da Trindade¹, Raquel Paz da Silva², Ludmila
Fiorenzano Baethgen³, Letícia Schonhofen Longoni⁴,
Fernanda de Oliveira de Andrade Bertolo⁵, Marcos Caraffa⁶,
Tânia Maria Bayer da Silva⁷, Anelise Beneduzi⁸

¹ Pesquisador Agropecuário, Eng.º Agrônomo, Dr. em Zootecnia – Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária (DDPA) – SEAPI, julio-trindade@agricultura.rs.gov.br

² Pesquisadora Agropecuária, Eng.ª Agrônoma, Dra. em Fruticultura – Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária (DDPA) – SEAPI, raquel-paz@agricultura.rs.gov.br

³ Analista em políticas públicas e gestão governamental, Bióloga, Dra. em Bioquímica – Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária (DDPA) – SEAPI ludmila-baethgen@agricultura.rs.gov.br

⁴ Técnica em Laboratório, Bióloga, Me. em Biologia Animal – Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária (DDPA) – SEAPI leticia-longoni@agricultura.rs.gov.br

⁵ Técnica em Laboratório, Bióloga, Dra. em Fitotecnia – Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária (DDPA) – SEAPI fernanda-bertolo@agricultura.rs.gov.br

⁶ Professor Titular, Eng.º Agrônomo, Me. em Engenharia de Produção – Sociedade Educacional Três de Maio – SETREM caraffa@setrem.com.br

⁷ Professora, Eng. Agrônoma, Dra. em Fitossanidade - Instituto Federal Farroupilha - Campus Júlio de Castilhos tania.bayer.agro@gmail.com

⁸ Pesquisadora Agropecuária, Bióloga, Dra. em Genética e Biologia Molecular – Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária (DDPA) – SEAPI, anelise-silveira@agricultura.rs.gov.br

RESUMO

O trevo-persa (*Trifolium resupinatum* L.) é uma leguminosa hiberna com potencial de uso em sistemas de produção em terras baixas, especialmente pela adaptação a solos mal drenados e pela possibilidade de contribuir para o aporte biológico de nitrogênio (N). Este Boletim Técnico apresenta resultados preliminares da avaliação do desempenho simbiótico de estirpes de rizóbios em trevo-persa, em condições controladas de casa de vegetação. O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2×5 , com dois tipos de vaso, cinco condições experimentais e quatro repetições. Foram avaliados o controle absoluto, o controle com suprimento de N mineral e as estirpes de rizóbios inoculantes SEMIA 258, SEMIA 223 e SEMIA 222 + SEMIA 2082. As variáveis analisadas incluíram a nodulação, a viabilidade dos nódulos, o crescimento inicial, o acúmulo de biomassa seca e o teor de N no tecido vegetal. Os três tratamentos com os inoculantes induziram nodulação viável em plantas de trevo-persa, evidenciada pela formação de nódulos com coloração interna rosada. Entre os materiais avaliados, a SEMIA 223 apresentou o melhor desempenho, combinando os maiores valores médios de crescimento da parte aérea, de biomassa seca e de teor de N no material vegetal comparável. A combinação SEMIA 222 + SEMIA 2082 apresentou a maior estabilidade relativa de nodulação em vasos convencionais e em vasos de Leonard. Os resultados indicam o potencial das estirpes avaliadas para continuidade em etapas posteriores de validação, com maior controle experimental e avaliação em condições de solo.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio. *Rhizobium leguminosarum*. *Trifolium resupinatum*. Inoculante. Leguminosa Forrageira. Terras baixas.

Preliminary evaluation of the symbiotic performance of rhizobial strains in Persian clover under controlled conditions

ABSTRACT

Persian clover (*Trifolium resupinatum* L.) is a cool-season legume with potential use in lowland production systems, particularly for its adaptation to poorly drained soils and its capacity to contribute to biological nitrogen (N) input. This Technical Bulletin presents preliminary results from the evaluation of the symbiotic performance of rhizobial strains in Persian clover under controlled greenhouse conditions. The trial used a completely randomized design with a 2×5 factorial arrangement: two pot types and five experimental conditions, with four replications. The absolute control, the control with mineral N supply, and the rhizobial inoculant materials SEMIA 258, SEMIA 223, and SEMIA 222 + SEMIA 2082 were evaluated. The variables analyzed included nodulation, nodule viability, initial growth, dry biomass accumulation, and N concentration in plant tissue. The three inoculant materials induced viable nodulation in Persian clover plants, as evidenced by nodules with pink internal coloration. Among the evaluated materials, SEMIA 223 showed the most consistent integrated performance, combining the highest mean values for shoot growth, dry biomass, and N concentration in comparable plant material. The combination SEMIA 222 + SEMIA 2082 showed greater relative stability of nodulation in conventional pots and Leonard jars. The results indicate the potential of the evaluated materials to proceed to subsequent validation stages, with greater experimental control and evaluation under soil conditions.

Keywords: Biological nitrogen fixation. *Rhizobium leguminosarum*. *Trifolium resupinatum*. Inoculant. Forage legume. Lowlands.

1 INTRODUÇÃO

O arroz irrigado constitui um dos sistemas agrícolas mais relevantes das terras baixas do sul do Brasil, com especial importância econômica e territorial no Rio Grande do Sul (Rio Grande do Sul, 2025). Nas últimas décadas, os avanços em genética, manejo da irrigação, controle de plantas daninhas, fertilidade do solo e mecanização permitiram ganhos expressivos na produtividade de grãos. Entretanto, a intensificação do sistema também ampliou a dependência de insumos externos, especialmente de fertilizantes nitrogenados, e manteve como desafio a diversificação das áreas durante o período de outono-inverno, quando parte expressiva das lavouras permanece em pousio ou com baixa cobertura vegetal (Sousa *et al.*, 2021; Weinert *et al.*, 2023).

A inclusão de plantas de cobertura e forrageiras hibernais em terras baixas tem sido apontada como estratégia para aumentar a ciclagem de nutrientes, proteger o solo, favorecer a atividade biológica e reduzir a dependência de fertilizantes minerais em culturas subsequentes. Entre essas espécies, o trevo-persa (*Trifolium resupinatum* L.) destaca-se por sua adaptação a solos hidromórficos, tolerância a ambientes com drenagem imperfeita, produção de biomassa e potencial de uso como forrageira, planta de cobertura e espécie de duplo propósito em sistemas associados ao arroz irrigado (Costa *et al.*, 2005; Sganzerla *et al.*, 2015; Weinert *et al.*, 2023).

Estudos conduzidos em terras baixas indicam que o trevo-persa pode produzir quantidades expressivas de matéria seca e de cobertura vegetal, além de apresentar ressemeadura natural associada à produção de sementes duras, característica relevante para sua persistência em

sistemas de produção de inverno. Costa *et al.* (2005) relataram produção média anual de matéria seca de forragem de aproximadamente 4,2 t ha⁻¹ em solo hidromórfico, evidenciando sua adaptação a áreas típicas de arroz irrigado. Em sistemas de sucessão de arroz, Weinert *et al.* (2023) observaram que o cultivo de trevo-persa na entressafra aumentou a disponibilidade de nitrogênio (N) mineral e microbiano no solo, reduziu a dose ótima de N para o arroz e incrementou a produtividade de grãos em relação ao pousio.

A principal contribuição funcional das leguminosas em sistemas agrícolas decorre da fixação biológica de nitrogênio (FBN), processo mediado pela associação simbiótica entre plantas hospedeiras e bactérias fixadoras de nitrogênio, especialmente rizóbios. Nos trevos, essa associação ocorre predominantemente com bactérias do grupo *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, capazes de induzir a formação de nódulos nas raízes e de converter o N atmosférico em formas assimiláveis pelas plantas. A eficiência dessa simbiose, contudo, depende da compatibilidade entre a estirpe bacteriana e a planta hospedeira, da viabilidade do inoculante, das condições ambientais e da competição com populações microbianas presentes no solo (Santos, 2022; Sarmiento *et al.*, 2024).

Embora o trevo-persa apresente potencial agrônômico para uso em terras baixas, ainda há necessidade de ampliar o conhecimento sobre a eficiência de estirpes de rizóbios associadas à espécie. Além da lacuna experimental, há também uma lacuna normativa. A Instrução Normativa SDA nº 13/2011 estabelece as relações de micro-organismos autorizados e recomendados para a produção de inoculantes no Brasil e inclui espécies de *Trifolium*, como trevo-vermelho,

trevo-branco, trevo-subterrâneo e trevo-vesiculososo, mas não contempla o trevo-persa (*Trifolium resupinatum* L.) entre as culturas com recomendação específica para inoculação (Brasil, 2011). Essa ausência reforça a necessidade de estudos voltados à avaliação de estirpes capazes de nodular e de promover o crescimento nessa espécie, como etapa preliminar para a eventual validação agrônômica e o desenvolvimento de recomendações técnicas.

Trabalhos recentes têm demonstrado que diferentes estirpes podem apresentar respostas contrastantes quanto à nodulação, à eficiência simbiótica e à promoção do crescimento em espécies do gênero *Trifolium*. Em trevo-persa, Treichel, Huasasquiche e Sá (2021) destacaram a importância da seleção e da caracterização de rizóbios nativos eficientes na FBN, enquanto Santos (2022) observou diferenças entre estirpes quanto à eficiência simbiótica em plantas de trevo-persa. Esses resultados reforçam que a formação de nódulos, embora necessária, não é suficiente para caracterizar plenamente a eficiência de uma estirpe, sendo necessária a avaliação conjunta da nodulação, do crescimento vegetal, do acúmulo de biomassa e do teor de N.

A Coleção SEMIA de Rizóbios, mantida pelo Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária (DDPA), constitui uma base estratégica para esse tipo de avaliação. A coleção reúne estirpes de rizóbios de interesse agrícola e é reconhecida como referência nacional em rizóbios e como banco oficial de germoplasma para a produção de inoculantes comerciais no Brasil (Beneduzi *et al.*, 2018). Além disso, o catálogo da coleção registra estirpes de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* associadas a *T. resupinatum*, reforçando a importância de estudos de triagem e de avaliação de materiais com potencial simbiótico para trevo-

persa. Dessa forma, a avaliação de estirpes de rizóbios em trevo-persa pode contribuir para o avanço de estratégias de manejo baseadas na FBN e para o desenvolvimento de inoculantes específicos ou mais adequados às condições de cultivo da espécie.

Diante desse contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar, em condições controladas de casa de vegetação, o desempenho simbiótico preliminar de plantas de trevo-persa inoculadas com diferentes estirpes de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (SEMIA 258, SEMIA 223, SEMIA 222 e SEMIA 2082), considerando nodulação, crescimento inicial, acúmulo de biomassa seca e teor de N no tecido vegetal, visando à identificação preliminar de materiais com potencial para continuidade em etapas posteriores de validação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi conduzido em casa de vegetação da Sociedade Educacional Três de Maio (SETREM), no município de Três de Maio/RS, utilizando sementes de trevo-persa (*Trifolium resupinatum*) cultivar Lightning. A semeadura foi realizada em 14/05/2024, em vasos convencionais com capacidade de 3,0 L e em vasos de Leonard, ambos preenchidos com areia lavada e esterilizada (Figura 1).



Figura 1. Vista geral das unidades experimentais uma semana após a semeadura do trevo-persa, em vasos convencionais e de Leonard, mantidos em casa de vegetação.

Fonte: Marcos Caraffa – SETREM.

A utilização dos dois tipos de vasos teve como objetivo avaliar o desempenho simbiótico preliminar das estirpes inoculantes sob condições distintas de controle do ambiente radicular e de fornecimento da solução nutritiva. Os vasos de Leonard permitiram maior controle da nutrição mineral, com fornecimento da solução por capilaridade, condição usual em ensaios de eficiência simbiótica. Os vasos convencionais permitiram avaliar a nodulação e o crescimento inicial das plantas em uma condição de cultivo mais próxima da prática rotineira em casa de vegetação.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2×5 , com quatro repetições. Os fatores avaliados foram o tipo de vaso (vasos convencionais de 3,0 L e vasos de Leonard) e a condição

experimental de inoculação e/ou de suprimento de nitrogênio (N). As condições experimentais foram: sem inoculação, sem solução nutritiva e sem aplicação de N mineral (SI–SN), que correspondeu ao controle absoluto; sem inoculação e com aplicação de N mineral (SI–CN); inoculação da estirpe SEMIA 258 (S258); inoculação da estirpe SEMIA 223 (S223); e inoculação conjunta das estirpes SEMIA 222 + SEMIA 2082 (S222+2082). Dessa forma, foram avaliadas dez combinações de tratamentos, sendo cada vaso considerado uma unidade experimental, totalizando 40 unidades experimentais. Durante a condução do ensaio, os vasos foram reposicionados semanalmente na casa de vegetação, com o objetivo de reduzir possíveis efeitos de posição e minimizar a influência de gradientes ambientais não controlados.

Foram semeadas, inicialmente, 30 sementes de trevo-persa por vaso. A emergência foi avaliada aos 8 dias após a semeadura e, posteriormente, realizaram-se raleios aos 10, 17 e 24 dias após a semeadura. Os raleios foram necessários devido à variação observada no número de plântulas emergidas entre os tratamentos, atribuída à dificuldade operacional no manuseio e na padronização da quantidade de sementes de trevo-persa, muito pequenas e recobertas com inoculante em suporte turfoso nas condições experimentais de inoculação. Portanto, essa variação inicial no estande de plantas por vaso foi corrigida pelos raleios sucessivos, culminando na padronização do estande experimental em 10 plantas por vaso.

A solução nutritiva (MgSO_4 147,9 g L^{-1} , K_2HPO_4 208,8 g L^{-1} , KH_2PO_4 90,0 g L^{-1} , KCl 89,4 g L^{-1} , CaSO_4 12,37 g L^{-1} , CuSO_4 0,157 g L^{-1} , ZnSO_4 0,440 g L^{-1} , H_3BO_3 2,860 g L^{-1} e $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 0,020 g L^{-1} , FeSO_4 1,0 g + $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 1,0 g em

200 mL) foi aplicada semanalmente, na quantidade de 52 mL por vaso, exceto nas condições SI-SN (controle absoluto). Nas condições de suprimento mineral de N (SI-CN), aplicaram-se 10 mL de solução nitrogenada por vaso, também semanalmente. Nas condições experimentais de inoculação, aplicou-se a solução nutritiva sem adição de N mineral. Nos vasos de Leonard, a solução nutritiva foi mantida no reservatório inferior e reposta semanalmente, permitindo o suprimento por capilaridade. Na condição experimental SI-CN conduzida em vasos de Leonard, a solução nitrogenada foi aplicada pela parte superior dos vasos.

Na semeadura, os vasos foram irrigados até a capacidade de campo. Durante a condução do ensaio, as irrigações foram realizadas de forma intermitente, conforme a demanda das plantas e as condições ambientais no interior da casa de vegetação, buscando-se manter um padrão semelhante de fornecimento de água entre os vasos.

Aos 46 dias após a semeadura, quatro plantas de cada vaso foram retiradas aleatoriamente para avaliação do sistema radicular, da nodulação e do crescimento inicial (Figura 2). As raízes das plantas retiradas foram colocadas submersas em baldes de água por 10 a 15 minutos, facilitando a separação dos grãos de areia das raízes sem danificá-las. Na sequência, as raízes foram lavadas cuidadosamente para eliminar toda e qualquer sujidade, utilizando uma peneira para reduzir as perdas de nódulos.



Figura 2. Plantas de trevo-persa aos 46 dias após a semeadura, no momento da coleta para avaliação do sistema radicular e da nodulação, em vasos convencionais e de Leonard.

Fonte: Marcos Caraffa – SETREM.

Após o processo de lavagem, as plantas foram acondicionadas em béqueres com água destilada (Figura 3A) e avaliadas em laboratório com auxílio de um microscópio estereoscópico. Foi contado o número de nódulos por planta e realizada a verificação visual da viabilidade deles, mediante corte transversal, com análise da coloração rosácea (Figuras 3B e 3C), indicativa de leghemoglobina e de atividade de fixação biológica de nitrogênio.



Figura 3. Preparação das amostras de trevo-persa para avaliação da nodulação após lavagem do sistema radicular (A) e detalhe de nódulos observados em microscópio estereoscópico (B; C).

Fonte: Marcos Caraffa – SETREM.

Após a análise de todos os nódulos por planta, as quatro plantas por vaso foram mensuradas com régua quanto ao comprimento da parte aérea e das raízes (Figura 4). Na sequência, separaram-se a parte aérea e as raízes das plantas de cada vaso; então, o material vegetal foi colocado para secagem em estufa a 50 °C por pelo menos 72 horas, para a determinação da massa seca da parte aérea (MSPA) e da massa seca das raízes (MSR). A massa seca total (MST) foi calculada pela soma das duas frações de biomassa seca das quatro plantas coletadas de cada vaso.



Figura 4. Plantas de trevo-persa após separação e preparo para mensuração do comprimento da parte aérea e das raízes.

Fonte: Marcos Caraffa – SETREM.

As seis plantas remanescentes em cada vaso foram mantidas até o estágio de florescimento para avaliação do teor de nitrogênio no tecido vegetal (Figura 5). A coleta foi realizada em 27/09/2024, 136 dias após a semeadura. Nas unidades experimentais em que houve florescimento, foram coletadas folhas do terço médio das plantas. Nas unidades em que não houve florescimento, procedeu-se à coleta da planta inteira. O material vegetal foi acondicionado em sacos de papel, seco em estufa e submetido à determinação de N total pelo método de digestão semi-micro de Kjeldahl, com destilação a vapor e titulação, conforme B. Alves, Baêta e J. Alves (1999), com adaptações laboratoriais.



Figura 5. Trevo-persa em estágio de florescimento (A), processo de destilação (B) e titulação das amostras para determinação do teor de nitrogênio nos tecidos vegetais (C).

Fonte: Marcos Caraffa – SETREM.

Para fins de análise estatística, as variáveis obtidas a partir das quatro plantas retiradas de cada vaso foram tratadas como subamostras, utilizando-se os valores médios ou totais por vaso, conforme a natureza da variável. As variáveis contínuas relacionadas ao crescimento inicial e à biomassa seca, incluindo comprimento da parte aérea, comprimento das raízes, MSPA, MSR e MST, foram analisadas por meio de modelos lineares, considerando os efeitos fixos do tipo de vaso, da condição experimental e de sua interação. A significância dos efeitos foi avaliada por meio de análise de variância, adotando-se nível de significância de 5%. Quando necessário, foram avaliados os pressupostos dos modelos por meio da inspeção dos resíduos, do teste de Shapiro-Wilk para a normalidade e do teste de Levene para a homogeneidade das variâncias. Transformações logarítmicas foram utilizadas apenas como análise de sensibilidade,

quando aplicável, para avaliar a robustez dos padrões observados.

O número de nódulos foi analisado separadamente das variáveis contínuas, por se tratar de uma variável de contagem. Para essa variável, utilizou-se um modelo linear generalizado com distribuição quasi-Poisson e função de ligação logarítmica, devido à sobredispersão observada. O número de plantas avaliadas por vaso foi considerado no modelo, de modo a expressar a resposta em nódulos por planta. Além da análise geral, foi realizada uma análise restrita aos tratamentos inoculados, com o objetivo de comparar o desempenho nodulador dos materiais inoculantes, sem a influência dos controles sem nodulação. A viabilidade dos nódulos foi avaliada de forma descritiva, com base na coloração interna observada após corte transversal.

O teor de N no tecido vegetal foi tratado como variável complementar, devido à diferença no tipo de material coletado entre as unidades experimentais. Nos vasos em que houve florescimento, foram coletadas folhas do terço médio das plantas; nos vasos sem florescimento, foi coletada a planta inteira. Por esse motivo, não foi realizada análise fatorial completa 2×5 para essa variável. A análise inferencial do teor de N foi restrita às amostras de material vegetal comparável, excluindo-se as amostras de planta inteira, e considerou a condição sem inoculação com suprimento mineral de N (SI-CN) e as condições inoculadas. Os resultados foram interpretados em conjunto com a nodulação, o crescimento inicial e o acúmulo de biomassa seca, sem recorrer isoladamente ao teor de N como critério de eficiência simbiótica.

Todas as análises foram realizadas no ambiente R, versão 4.3.3 (R Core Team, 2024). Os resultados foram

apresentados como média $\pm$ desvio padrão, quando pertinente, e as diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$. Em razão do caráter preliminar do estudo e das limitações associadas ao protocolo experimental, a interpretação priorizou os padrões biológicos consistentes entre as variáveis, evitando-se inferências baseadas exclusivamente em comparações pontuais entre médias.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Nodulação e viabilidade dos nódulos

A inoculação das estirpes de rizóbios promoveu nodulação em plantas de trevo-persa, e a resposta foi dependente do tipo de vaso utilizado. A análise indicou efeitos significativos do tipo de vaso ($p < 0,001$), da condição experimental ($p < 0,001$) e da interação entre esses fatores ($p = 0,0014$) sobre o número de nódulos, demonstrando que o desempenho nodulador das estirpes inoculantes variou conforme as condições experimentais testadas.

Nos vasos convencionais, os tratamentos S258, S223 e S222+2082 apresentaram médias de 31,8, 29,6 e 24,6 nódulos por planta, respectivamente. Nos vasos de Leonard, os valores foram menores para S258 e S223, com média 53% inferior à do inoculante S222+2082, que apresentou média de 22,6 nódulos por planta (Tabela 1).

Tabela 1. Número médio de nódulos por planta de trevo-persa submetida a diferentes condições de inoculação e de suprimento de nitrogênio, em vasos convencionais e de Leonard.

Tipo de Vaso	Condição experimental	Nódulos (nº planta⁻¹)
Convencional	SI-SN	0,0 ± 0,0
	SI-CN	0,0 ± 0,0
	S258	31,8 ± 7,6
	S223	29,6 ± 15,5
	S222+2082	24,6 ± 12,1
Leonard	SI-SN	4,8 ± 2,1
	SI-CN	0,0 ± 0,0
	S258	9,4 ± 6,3
	S223	11,8 ± 7,9
	S222+2082	22,6 ± 7,9

Nota: valores apresentados como média ± desvio padrão, com quatro repetições por combinação de tratamento. SI-SN = sem inoculação, sem solução nutritiva e sem aplicação de N mineral; SI-CN = sem inoculação e com aplicação de N mineral; S258 = SEMIA 258; S223 = SEMIA 223; S222+2082 = combinação SEMIA 222 + SEMIA 2082. A análise foi realizada por meio de um modelo quasi-Poisson, devido à sobredispersão observada no número de nódulos.

Os controles sem inoculação e com N mineral não apresentaram nodulação, tanto em vasos convencionais quanto em vasos de Leonard. A exceção foi o controle sem inoculação e sem aplicação de N em vasos de Leonard, que apresentou nodulação residual média de 4,8 nódulos por planta, com registro de nódulos positivos e negativos. Esse resultado deve ser interpretado com cautela, pois pode estar associado à presença residual de rizóbios ou à contaminação operacional durante a condução do ensaio.

Quando considerados apenas os tratamentos inoculados, não houve diferença significativa entre os

materiais inoculantes ($p = 0,802$), mas houve efeito do tipo de vaso ($p = 0,003$), com maior nodulação média nos vasos convencionais em comparação aos vasos de Leonard (28,7 vs. 14,6 nódulos por planta). A interação entre o tipo de vaso e o material inoculante não foi significativa ao nível de 5% ($p = 0,079$).

Descritivamente, o S222+2082 apresentou valores médios mais próximos entre os vasos convencionais e os vasos Leonard, enquanto o S258 e o S223 apresentaram médias maiores nos vasos convencionais. Esse padrão deve ser interpretado com cautela, pois a interação entre o tipo de vaso e o material inoculante não foi significativa na análise restrita aos tratamentos inoculados.

A viabilidade dos nódulos foi avaliada visualmente, por meio de corte transversal e da observação da coloração interna (Figura 6). Os nódulos formados nos tratamentos inoculados apresentaram coloração rosada e homogênea, indicando a presença de leghemoglobina e de atividade de fixação biológica de nitrogênio. Assim, os resultados indicam que as estirpes inoculantes avaliadas induziram nodulação funcional em plantas de trevo-persa sob as condições controladas do protocolo experimental.

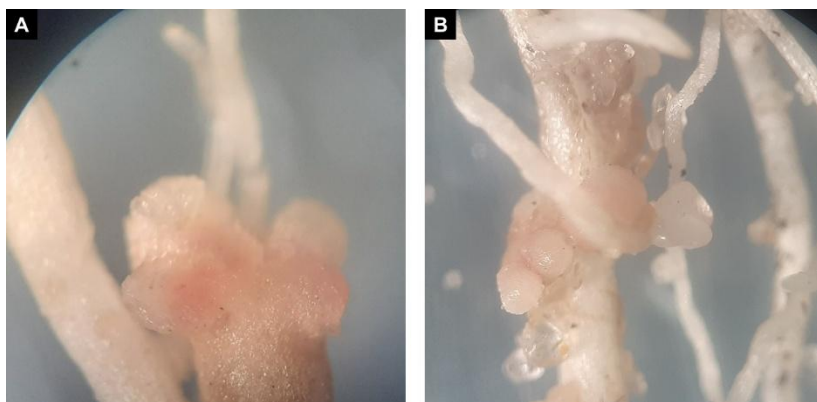


Figura 6. Nódulo de trevo-persa com coloração interna rosada após corte transversal (A) e conjunto de nódulos viáveis (B), indicando presença de leghemoglobina e atividade de fixação biológica de nitrogênio.

Fonte: Marcos Caraffa – SETREM.

3.2 Crescimento inicial da parte aérea e do sistema radicular

O crescimento inicial das plantas de trevo-persa foi influenciado pelas condições de inoculação e de suprimento de N, com resposta mais evidente no comprimento da parte aérea do que no comprimento radicular. Quanto ao comprimento da parte aérea, observou-se interação significativa entre o tipo de vaso e a condição experimental ($p < 0,001$), indicando que a resposta das plantas aos tratamentos variou conforme o tipo de vaso utilizado.

O maior crescimento da parte aérea foi observado na condição sem inoculação e com aplicação de N mineral (SI-CN), especialmente nos vasos de Leonard, nos quais as plantas atingiram uma média de 20,8 cm. Nos vasos

convencionais, o mesmo tratamento apresentou uma média de 13,1 cm. Entre os tratamentos inoculados, S223 apresentou os maiores valores médios de comprimento da parte aérea, tanto em vasos convencionais (12,2 cm) quanto em vasos de Leonard (11,9 cm), seguida por S222+2082 e S258 (Tabela 2).

Tabela 2. Comprimento médio da parte aérea e da raiz de plantas de trevo-persa submetidas a diferentes condições de inoculação e de suprimento de nitrogênio, em vasos convencionais e de Leonard.

Tipo de vaso	Condição experimental	Parte aérea (cm)	Raiz (cm)
Convencional	SI-SN	5,4 ± 0,8	7,2 ± 0,7
	SI-CN	13,1 ± 1,13	9,1 ± 1,9
	S258	9,6 ± 0,9	8,6 ± 0,6
	S223	12,2 ± 0,7	9,8 ± 1,1
	S222+2082	10,4 ± 0,40	8,6 ± 0,5
Leonard	SI-SN	5,7 ± 0,7	8,8 ± 1,1
	SI-CN	20,8 ± 1,2	9,6 ± 1,5
	S258	7,4 ± 2,1	7,2 ± 0,8
	S223	11,9 ± 1,7	9,6 ± 0,9
	S222+2082	9,1 ± 1,56	8,2 ± 1,2

Nota: valores apresentados como média ± desvio padrão com quatro repetições por combinação de tratamento. SI-SN = sem inoculação, sem solução nutritiva e sem aplicação de N mineral; SI-CN = sem inoculação e com aplicação de N mineral; S258 = SEMIA 258; S223 = SEMIA 223; S222+2082 = combinação SEMIA 222 + SEMIA 2082.

O comprimento radicular apresentou menor amplitude de resposta entre os tratamentos. Para essa variável, houve efeito significativo da condição experimental ($p = 0,007$), sem efeito significativo do tipo de vaso ($p = 0,943$) e sem interação

significativa entre o tipo de vaso e a condição experimental ($p = 0,115$). De modo geral, os maiores valores médios de comprimento de raiz foram observados em S223 e no tratamento SI–CN, enquanto os menores ocorreram em SI–SN, nos vasos convencionais, e em S258, nos vasos de Leonard.

Esses resultados indicam que os materiais inoculados apresentaram maior crescimento inicial do trevo-persa em relação ao controle absoluto SI–SN, especialmente na parte aérea. Contudo, essa comparação deve ser interpretada considerando que o controle SI–SN não recebeu inoculação, solução nutritiva nem N mineral. O crescimento máximo foi observado no tratamento com suprimento mineral de N, como se esperava devido à elevada disponibilidade imediata desse nutriente. Assim, os efeitos sobre o crescimento devem ser interpretados em conjunto com os resultados de nodulação, biomassa e teor de N na planta, e não isoladamente como critério de eficiência simbiótica e de FBN.

3.3 Acúmulo de biomassa seca

O acúmulo de biomassa seca das plantas de trevo-persa foi influenciado pelas condições de inoculação e de suprimento de N. Na MSPA, observou-se interação significativa entre o tipo de vaso e a condição experimental ($p < 0,001$). Para a MSR, observaram-se efeitos significativos do tipo de vaso ($p = 0,006$) e da condição experimental ($p < 0,001$), sem interação significativa entre esses fatores. Para a MST, também houve interação significativa entre o tipo de vaso e a condição experimental ($p < 0,001$).

O maior acúmulo de biomassa seca ocorreu no tratamento sem inoculação e com aplicação de N mineral (SI–CN), especialmente nos vasos de Leonard, nos quais foram observadas médias de 1245 mg de MSPA, 238 mg de MSR e 1482 mg de MST por quatro plantas. Nos vasos convencionais, o mesmo tratamento apresentou 398 mg de MSPA, 412 mg de MSR e 810 mg de MST (Tabela 3). Esse resultado era esperado em função da disponibilidade imediata de N mineral, sobretudo no ensaio conduzido com substrato inerte.

Tabela 3. Massa seca da parte aérea (MSPA), das raízes (MSR) e total (MST) de plantas de trevo-persa submetidas a diferentes condições de inoculação e de suprimento de nitrogênio, em vasos convencionais e de Leonard.

Tipo de vaso	Condição experimental	MSPA (mg)	MSR (mg)	MST (mg)
Convencional	SI–SN	42 ± 5	45 ± 6	88 ± 11
	SI–CN	398 ± 46	412 ± 111	810 ± 79
	S258	118 ± 14	72 ± 10	190 ± 15
	S223	200 ± 22	130 ± 29	330 ± 42
	S222+2082	135 ± 18	82 ± 14	218 ± 23
Leonard	SI–SN	40 ± 9	20 ± 4	60 ± 12
	SI–CN	1245 ± 132	238 ± 33	1482 ± 162
	S258	65 ± 10	25 ± 6	90 ± 16
	S223	188 ± 33	58 ± 11	245 ± 43
	S222+2082	112 ± 23	40 ± 4	152 ± 27

Nota: valores médios expressos como média ± erro padrão, em mg por quatro plantas, correspondentes à unidade experimental avaliada. SI–SN = sem inoculação, sem solução nutritiva e sem aplicação de N mineral; SI–CN = sem inoculação e com aplicação de N mineral; S258 = SEMIA 258; S223 = SEMIA 223; S222+2082 = combinação SEMIA 222 + SEMIA 2082.

Entre os materiais inoculantes, S223 apresentou o maior acúmulo médio de MSPA, MSR e MST em ambos os tipos de vaso. Nos vasos convencionais, S223 apresentou

200 mg de MSPA, 130 mg de MSR e 330 mg de MST. Nos vasos de Leonard, os valores correspondentes foram 188 mg de MSPA, 58 mg de MSR e 245 mg de MST.

Os materiais S258 e S222+2082 apresentaram valores intermediários de biomassa seca. Em vasos convencionais, S222+2082 apresentou MST de 218 mg, enquanto S258 apresentou MST de 190 mg. Em vasos de Leonard, S222+2082 apresentou 152 mg de MST, enquanto S258 apresentou 90 mg. Assim, embora todos os materiais inoculantes tenham induzido nodulação viável, o acúmulo de biomassa seca foi mais consistente em S223.

Analisados em conjunto, os resultados indicam que o suprimento mineral de N promoveu maior acúmulo de biomassa seca, enquanto que entre os materiais inoculantes, S223 apresentou o melhor desempenho vegetativo inicial. Esse padrão reforça que a avaliação das estirpes de rizóbios inoculantes deve considerar simultaneamente a nodulação, a FBN, o crescimento inicial, a biomassa seca e o teor de N no tecido vegetal.

3.4 Teor de nitrogênio no tecido vegetal

O teor de N no tecido vegetal foi interpretado como uma variável complementar, pois o material coletado para essa análise não foi uniforme entre as unidades experimentais. Nos tratamentos em que houve florescimento, foram coletadas folhas do terço médio das plantas, enquanto nos tratamentos sem florescimento, foi coletada a planta inteira. Dessa forma, a análise fatorial completa 2×5 para essa variável não foi mantida. A análise inferencial foi restrita às amostras de material vegetal comparáveis, considerando o

tratamento com N mineral e os tratamentos inoculados com as estirpes de rizóbios.

Nessa análise complementar, o teor de N foi influenciado pelo tipo de vaso ($p < 0,001$) e pela condição experimental ($p = 0,034$), sem interação significativa entre esses fatores ao nível de 5% de probabilidade ($p = 0,099$). Esse resultado indica que as diferenças entre as condições experimentais seguiram um padrão semelhante nos dois tipos de vaso, embora as plantas cultivadas em vasos convencionais tenham apresentado, em média, teores de N maiores do que as cultivadas em vasos de Leonard.

Na condição sem inoculação e com aplicação de N mineral (SI–CN), os teores médios de N foram de 4,17% nos vasos convencionais e de 3,38% nos vasos de Leonard (Tabela 4). Entre os tratamentos inoculados, S223 apresentou os maiores teores médios de N, com 4,75% nos vasos convencionais e 3,85% nos vasos de Leonard. O material S258 também apresentou valor elevado nos vasos convencionais, com média de 4,44%, enquanto S222+2082 apresentou teores médios de 3,74% e 3,78% nos vasos convencionais e de Leonard, respectivamente.

Tabela 4. Teor de nitrogênio em material vegetal comparável de plantas de trevo-persa submetidas a suprimento mineral de N ou à inoculação com diferentes materiais inoculantes, em vasos convencionais e de Leonard.

Tipo de vaso	Condição experimental	n	Teor N (%)
Convencional	SI–CN	4	4,17 ± 0,37
	S258	4	4,44 ± 0,48
	S223	4	4,75 ± 0,31
	S222+2082	4	3,74 ± 0,44
Leonard	SI–CN	4	3,38 ± 0,22
	S258	3	3,63 ± 0,15
	S223	4	3,85 ± 0,07
	S222+2082	4	3,78 ± 0,69

Nota: valores apresentados como média ± desvio padrão. SI–CN = sem inoculação e com aplicação de N mineral; S258 = SEMIA 258; S223 = SEMIA 223; S222+2082 = combinação SEMIA 222 + SEMIA 2082. Foram consideradas apenas amostras de material vegetal comparável; amostras de planta inteira não foram incluídas nesta tabela.

Em termos gerais, os tratamentos inoculados apresentaram teores de N próximos ou superiores aos observados no tratamento com suprimento mineral de N, especialmente nos vasos convencionais. Esse resultado é compatível com a contribuição dos materiais inoculantes avaliados para o estado nutricional nitrogenado das plantas. Entretanto, em razão das diferenças no material vegetal coletado e do caráter complementar dessa análise, o teor de N não deve ser interpretado isoladamente como critério de eficiência simbiótica, mas sim em conjunto com os resultados de nodulação, crescimento inicial e acúmulo de biomassa seca.

3.5 Síntese integrada do desempenho das estirpes de rizóbios inoculantes

A interpretação conjunta dos resultados indica que o desempenho dos materiais inoculantes avaliados não deve ser definido apenas pelo número de nódulos formados, mas também pela associação entre nodulação viável, FBN, crescimento inicial, acúmulo de biomassa e teor de N no tecido vegetal. Essa abordagem é especialmente importante em ensaios preliminares de eficiência simbiótica, nos quais a formação de nódulos representa condição necessária, mas não suficiente, para caracterizar melhor desempenho agrônomo do material inoculante.

Nesse sentido, o material S223 apresentou o padrão mais consistente entre os tratamentos inoculados, com os maiores valores médios de comprimento da parte aérea, massa seca da parte aérea, massa seca das raízes e teor de N no tecido vegetal. Esse comportamento sugere maior coerência entre a nodulação, o crescimento inicial e o estado nutricional nitrogenado das plantas, sobretudo quando comparado aos demais materiais inoculantes.

O material S222+2082, por sua vez, apresentou resposta nodular relevante, especialmente nos vasos de Leonard, nos quais manteve o número médio de nódulos mais próximo ao observado em vasos convencionais. Esse padrão sugere maior estabilidade relativa da nodulação entre os dois tipos de vaso, embora essa resposta não tenha se traduzido, na mesma magnitude, em maior crescimento ou acúmulo de biomassa. Já o material S258 apresentou elevada nodulação e teor de N nos vasos convencionais, mas menor desempenho relativo nos vasos de Leonard.

De modo geral, os resultados indicam que as estirpes de rizóbios utilizadas como inoculantes induziram nodulação viável em trevo-persa sob condições controladas. Entretanto, a resposta integrada das plantas foi distinta entre os materiais avaliados, reforçando a necessidade de etapas adicionais de validação, com maior controle experimental e posterior avaliação em condições de solo, antes de qualquer recomendação agronômica para uso em inoculantes comerciais ou em programas de manejo da fixação biológica de nitrogênio na espécie.

4 CONCLUSÕES

As estirpes de rizóbios avaliadas induziram nodulação viável em plantas de trevo-persa sob condições controladas, evidenciada pela formação de nódulos com coloração interna rosada.

A estirpe SEMIA 223 apresentou o desempenho simbiótico preliminar mais consistente entre os tratamentos inoculados, combinando maiores valores médios de crescimento da parte aérea, acúmulo de biomassa seca e teor de nitrogênio no tecido vegetal.

A combinação SEMIA 222 + SEMIA 2082 apresentou maior estabilidade de nodulação em vasos convencionais e em vasos de Leonard.

Os resultados obtidos indicam o potencial das estirpes avaliadas para continuidade de estudos de validação em condições de solo e em experimentos com maior controle experimental.

REFERÊNCIAS

ALVES, B. J. R.; BAÊTA, A. M.; ALVES, J. V. **Protocolo da Embrapa Agrobiologia para análise de nitrogênio em adubos orgânicos, solo e tecidos**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1999. 17 p. (Documentos, 100).

BENEDUZI, A.; GAZOLLA, C. V.; CASTILHO, C. L.; VARGAS, L. K. **Catálogo da Coleção SEMIA de rizóbios**. Porto Alegre: SEAPI-DDPA, 2018. v. 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa nº 13, de 24 de março de 2011. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, ano 148, n. 58, p. 3-7, 25 mar. 2011.

COSTA, N. L. da; REIS, J. C. L.; RODRIGUES, R. C.; COELHO, Rogério Waltrick. **Trevo-persa**: uma forrageira de duplo propósito. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2005. 3 p. (Comunicado técnico, 116).

R CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2024.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria da Agricultura, Pecuária, Produção Sustentável e Irrigação. **Radiografia da agropecuária gaúcha 2025**. [Porto Alegre]: Departamento de Governança dos Sistemas Produtivos, 2025. 43 p.

SANTOS, B. T. dos. **Rizóbios nativos eficientes na fixação simbiótica de nitrogênio em trevo persa (*Trifolium resupinatum* L.) e na promoção de crescimento de gramíneas forrageiras**. 2022. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2022.

SARMIENTO, L. H.; da SILVA, F. B.; TREICHEL, B.; BENEDUZI, Anelise; SÁ, E. L. S. de. Selection of multi-purpose native rhizobia from a new red clover cultivar developed in Brazil. **Rhizosphere**, Amsterdam, v. 29, 100847, 2024. DOI: 10.1016/j.rhisph.2023.100847.

SGANZERLA, D. C.; BILHARVA, M. G.; PRIEBE, C.; JIMÈNEZ, R. M.; FIGAS, M. F.; LEMOS, G. S.; FERREIRA, O. G. L.; MONKS, P. L. Características produtivas da consorciação de trevo-persa e azevém submetidos a pastejo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 67, n. 1, p. 173-180, 2015. DOI: 10.1590/1678-6669.

SOUSA, R. O. de; CARLOS, F. S.; da SILVA, L. S.; SCIVITTARO, W. B.; RIBEIRO, P. L.; de LIMA, C. L. R. No-tillage for flooded rice in Brazilian subtropical paddy fields: history, challenges, advances and perspectives. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 45, e0210102, 2021. DOI: 10.36783/18069657rbcs20210102.

TREICHEL, B.; HUASASQUICHE, L.; de SÁ, E. L. S. Seleção e caracterização de rizóbios nativos eficientes na fixação simbiótica de nitrogênio em trevo persa (*Trifolium resupinatum* L.) e na promoção de crescimento de gramíneas forrageiras. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA APLICADA, 13., 2021, Porto Alegre. **Anais [...]**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2021. ref. AG018.

WEINERT, C.; SOUSA, R. O.; BORTOWSKI, E. M.; CAMPELO, M. L.; PACHECO, D. S.; SANTOS, L. V.; DEUNER, S.; VALENTE, G. B.; MATOS, A. B.; VARGAS, V. L.; MARTINS, A. P.; CAMARGO, F. A. O.; CARLOS, F. S. Legume winter cover crop (Persian clover) reduces nitrogen requirement and increases grain yield in specialized irrigated

hybrid rice system. **European Journal of Agronomy**,
Amsterdam, v. 142, 126645, 2023. DOI:
10.1016/j.eja.2022.126645.



GOVERNO DO ESTADO
RIO GRANDE DO SUL
SECRETARIA DA AGRICULTURA, PECUÁRIA,
PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL E IRRIGAÇÃO

Secretaria de Agricultura, Pecuária, Produção Sustentável e Irrigação
Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária

Avenida Getúlio Vargas, 1384 - Menino Deus
CEP 90150-004 - Porto Alegre - RS
Fone: (51) 3288-8000

www.agricultura.rs.gov.br/ddpa