

IMPLANTAÇÃO DE ESTIRPES *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* BV. *TRIFOLII* EM SOLOS "PROBLEMA"

Alho, L.M.C.V.*
Maximino, C.F.*
Marques, J.F.**
Carvalho, M.J.G.P.R.*

RESUMO

Utilizando duas estirpes seleccionadas em condições de laboratório, uma para alta eficácia e grande gama de hospedeiros e outra para tolerância à acidez e toxicidade do alumínio, marcadas com resistência a antibióticos, estudou-se o comportamento de inoculantes em solos litólicos não húmicos de granitos (Pg) da Herdade Experimental da Mitra (U.E.), verificando-se melhor implantação da estirpe tolerante a condições adversas.

Estudou-se também a distribuição da população de *Rh. leg. bv. trifolii* ao longo do perfil de solo mais directamente envolvido nas operações de mobilização do solo para a cultura de trigo, constatando-se que a lavoura inverte a tendência dessa distribuição e que conduz a valores mais reduzidos na população dos 5cm mais superficiais.

ABSTRACT

Using two strains of *Rh. leg. bv. trifolii* selected in laboratory for large host spectrum and effectiveness in Nitrogen fixation (Strain A) and for tolerance to acidity and aluminium toxicity (Strain B), both marked with antibiotic resistance, we studied the behaviour of inoculants in a Pg soil (classified according to Carvalho, 1965, as Solo Litólico não Húmico de Granitos) at Mitra's Experimental Farm-Univ. of

* Universidade de Évora

** Estação Agronómica Nacional

Évora. The strain tolerant to adverse conditions Showed a better competition and persistence in this soil whatever the host used.

The distribution of the rhizobial population along the first 20cm of the soil profile was analysed. Tillage with the plow induces an inversion of the population distribution, resulting in a decrease in the top 5 centimeters. This may contribute to the reduction in dry matter production of legumes after cereal crop when plow is used in soil tillage for the cereal.

INTRODUÇÃO

Rhizobium leguminosarum bv. *trifolii* é uma espécie muito frequente na generalidade dos nossos solos, onde pode atingir populações apreciáveis capazes de nodular com uma larga gama de trevos, apresentando, no entanto, uma grande variabilidade na eficácia fixadora de azoto (Ferreira e Marques, 1986; Ferreira e Castro, 1989).

Da variabilidade encontrada na eficácia simbiótica das estirpes nativas surge, a prática corrente da inoculação dos trevos comerciais, utilizados na implantação de pastagens, usando-se para isso estirpes seleccionadas, que garantam elevados níveis de fixação de azoto. Os critérios fundamentais para a selecção de estirpes incluem para além da elevada eficácia fixadora de azoto com uma larga gama de hospedeiros, a capacidade competitiva e a colonização e persistência das estirpes no solo mesmo na ausência de hospedeiro (Brockwell e outros, 1982a).

O comportamento de um inóculo é afectado pelos factores ambientais (Brockwell e outros 1982a), sendo a competitividade e persistência das estirpes inoculantes determinada não apenas pelos hospedeiros (Roughley e outros 1976; Brockwell e outros, 1977) mas também por características de solo, nomeadamente pH (Dughri e Bottomley, 1984; Thornton, 1984). Concentrações elevadas de alumínio e manganês afectam a sobrevivência de *Rhizobium* (Keyser e Munns, 1979) podendo assim condicionar a sua capacidade de colonizar solos que manifestem o efeito da toxicidade destes elementos. Grandes populações nativas podem também constituir um obstáculo à implantação de inoculantes (McLoughlin e outros, 1984).

Nos sistemas de produção de pastagem em rotação com cereais e autoregeneração da pastagem, importa utilizar estirpes que para além de se estabelecerem no solo e competirem com as nativas na formação de nódulos, nele se mantenham agrícolas inerentes à sua cultura, particularmente as mobilizações do solo e a aplicação de herbicidas.

Neste estudo analisamos o efeito da mobilização do solo na estabelecimento e evolução de duas estirpes inoculantes de *Rh. leguminosarum* bv. *trifolii* de origem e características diferentes. Avaliamos a sua competitividade e persistência num solo litólico não húmico de granitos (Pg) de baixo pH, onde se têm detectado problemas de toxicidade de manganês (Carvalho, 1987), possuidor de elevadas populações de *Rh. leguminosarum* bv. *trifolii* e onde após a implantação de pastagem à base de trevo subterrâneo se procedeu a um ensaio de produção de trigo em diferentes níveis de mobilização do solo e aplicação de herbicidas. O efeito dos tratamentos com herbicida será objecto de estudo separado.

MATERIAL E MÉTODOS

1 Plantas

Quatro cultivares de trevo subterrâneo (Nungarin, Geraldton, Daliak e Woogenellup) foram introduzidas com uma elevada densidade de sementeira de 200Kg/ha. numa pastagem com 11 anos, por forma a incrementar a produção de leguminosas, segundo o protocolo apresentado por Carvalho e outros (1990).

2. Solo

O ensaio foi instalado na Herdade Experimental da Mitra – Évora, num solo litólico não húmico de granitos (Pg) com pH 4,5 em KCL e 2,6% de matéria orgânica. Em trabalhos anteriores foi detectada toxicidade de manganês na cultura do trigo (Carvalho, 1987).

3 Inóculo

Utilizaram-se duas estirpes de *Rh. leguminosarum* bv. *trifolii* pertencentes à colocação do Departamento de Microbiologia da Estação Agrónómica Nacional. Identificadas na colecção como Ts 282 e Ts 248-5, foram seleccionadas, respectivamente, para alta eficácia e largo espectro de hospedeiros (EFN 123Ts-2a, Ferreira, 1986) e para a tolerância à acidez e alumínio (Leitão, 19986). Estas estirpes apresentam diferentes tolerâncias aos efeitos da acidez (pH 4,5) e toxicidade do Al^{+++} , quando se fazem variar aqueles factores nos meios de cultura (Leitão, 1986). A partir destas duas estirpes foram isolados mutantes espontâneos resistentes a antibióticos utilizando o protocolo descrito por (Bromfield, 1977). Dos mutantes isolados escolheram-se para ensaios de campo um de cada uma das estirpes em estudo (Quadro 1), apresentando um nível de resistência superior a 250 ppm de Espectinomicina (Ts 282 - Estirpe A) e Estreptomomicina (Ts 248-5 - Estirpe B), característica esta que permite a sua identificação a partir de isolamento de nódulos (Obatan, 1971). Da análise dos caracteres culturais, simbióticos, antigéticos e de competitividade, verificou-se não haver diferenças detectáveis entre os mutantes escolhidos para os ensaios de campo e as respectivas estirpes originais, podendo assim ser utilizadas como indicadoras do comportamento no solo das estirpes em estudo (Bushby, 1982).

Após crescimento em Meio de Manitol Levedura (ML) durante 4 dias a 28°C em agitação, 50 ml da cultura de cada uma das estirpes (A e B) foi utilizada para inocular sacos de turfa esterilizada, seguindo-se um período de 10 dias para incubação a 25°C. Constituíram-se 2 lotes de mistura de trevos que foram inoculados cada um com uma estirpe (A ou B) utilizando o processo de perolização descrito por Ferreira (1986).

QUADRO 1 – Algumas características das estirpes utilizadas no ensaio.

Inoc.	Local, isolamento e solo	Toler. à acidez e toxi. do A1	Nº viáveis por semente	Resistência antibiótico
A	Vila Viçosa Luvissolo Vcc+Arc	Sensível	$1,7 \times 10^3$ \pm $3,1 \times 10^2$	Espectinomicina 250 ppm
B	Cova da Beira Derivado de gneisses pH 4,3	Tolerante pH 4,5 50 uM A1+++	$1,3 \times 10^3$ \pm $4,7 \times 10^2$	Estreptomicina 250 ppm

4 Contagens

Viáveis nas sementes (ufc)

Utilizou-se uma contagem de viáveis para avaliar o número de unidades formadoras de colónias (ufc) de *Rh. leguminosarum* bv. *trifolii* de cada uma das estirpes em ensaio. Duas amostras de 5 sementes cada foram recolhidas ao acaso de cada um dos lotes de semente perolizada e colocadas em tubos de ensaio aos quais se juntaram 2 ml de água destilada estéril e cinco pérolas de vidro esterilizadas, deixando embeber durante 15 minutos. Os tubos foram seguidamente vigorosamente agitados durante 2 minutos, findo os quais se procedeu a 3 diluições decimais e partir da suspensão inicial. De cada uma das diluições retiraram-se 0,2 ml em triplicado para inocular placas de petri às quais se adicionou maio de Agar Manitol Levedura (AML) suplemento com ciclohexamida, vermelho do congo (Vincent, 1970) e o antibiótico apropriado na concentração de 250 ppm segundo p inóculo de cada um dos lotes de semente. O nº de unidades formadoras de colónias assim determinado em cada lote de semente é apresentado no Quadro 1.

Viáveis no solo (ufn)

O número de unidades formadoras de nódulos (ufn) indicadora do nível populacional de *Rh. leguminosarum* bv. *trifolii* no solo, foi determinado pela técnica da infecção de plantas para determinação do número mais provável (NMP), utilizando-se uma modificação da técnica apresentada por Brockwell (1982c) que utiliza frascos de areia como suporte do crescimento de trevo (Leitão, 1986). O hospedeiro utilizado para a determinação das unidades formadoras de nódulos foi o *Trifolium subterraneum* cv. Nungarin.

As amostras de solo foram recolhidas com sonda de meia cana, separando-se no momento da recolha as secções do perfil correspondentes aos níveis de profundidade analisados (0-5 cm; 5-10 cm e 10-20 cm). Uma vez no laboratório foram guardadas no frigorífico até à realização das contagens.

5 Identificação das estirpes introduzidas

A identificação das estirpes introduzidas no ensaio foi realizada sobre isolamentos de nódulos quer de plantas recolhidas no campo, quer de plantas utilizadas nos diferentes níveis de diluição para a determinação das ufn.

As plantas recolhidas no campo e uma vez no laboratório, foram identificadas, formando-se grupos segundo as cultivares utilizadas na instalação da pastagem, depois de destacada a parte radicular, esta foi vigorosamente lavada em água corrente e rapidamente congeladas a -18°C até futura utilização. Após descongelamento as raízes foram desinfectadas com álcool e água oxigenada segundo Vincent (1970).

Os nódulos na raiz de cada planta foram comentados e seguidamente picados com alfinete estéril para inocular as placas de petri com meio AML suplementado com os antibióticos em uso (Espectinomicina para despistar a presença da estirpe A no nódulo e Estreptomomicina para a estirpe B). A ausência de crescimento nos meios suplementados com o antibiótico foi tomada como indicadora da presença de uma estirpe nativa no respectivo nódulo enquanto que o crescimento em meio com antibiótico foi considerado como indicador da presença das estirpes introduzidas, A ou B conforme o meio com antibiótico que apresentasse o crescimento. Este procedimento foi também utilizado para a identificação das estirpes responsáveis pela formação de nódulos nas plantas utilizadas na determinação das ufn a partir de amostras de solo para avaliação da persistência das estirpes introduzidas.

6 Delineamento Experimental

O estabelecimento da pastagem bem como o delineamento seguido para o estudo do efeito dos níveis de mobilização no restabelecimento da pastagem encontram-se descritos em Carvalho e outros (1990), e aplicam-se ao estudo que incidiu sobre a evolução das populações de rizóbio introduzidas.

Para análise de resultados e no que respeita à avaliação da competitividade das estirpes introduzidas utilizou-se a análise da variância de factor simples. Quanto aos níveis populacionais de *Rh. leguminosarum* bv. *trifolii*, optou-se pelo uso do método não-paramétrico de Kruskal-Wallis tanto de factor simples como multifactorial, dado o desconhecimento da natureza da distribuição destas populações, sempre sujeitas a fenómenos de agregação destas populações, sempre sujeitas a fenómenos de agregação e dispersão que conduzem a valores elevados da variância. Para a comparação de séries emparelhadas referentes aos efeitos do nível de mobilização na população dos 5 cm superficiais, utilizou-se o teste de Mann-Whitney.

Parâmetros determinados

Competitividade

A ocupação de nódulos nas plantas recolhidas no campo foi o critério utilizado para avaliação da competitividade das estirpes introduzidas. A recolha de plantas no campo decorreu de Março a Abril de 1988, com um intervalo de cerca de 3 semanas entre cada repetição. De cada subtalhão inoculado com uma estirpe A ou B

cortaram-se secções de linha de sementeira com aproximadamente 20 cm de comprimento e 10 cm de largura e profundidade, de forma a retirar raízes tão intactas quanto possível. No laboratório retiraram-se plantas inteiras de cada uma das secções trazidas do campo e identificaram-se as 4 cultivares utilizadas. Após a identificação, 5 raízes por repetição de cada cultivar e de cada modalidade de inoculação (correspondentes aos subtalhões em que se utilizou semente de trevo inoculado com a estirpe A ou B) foram utilizadas para contagem de nódulos e identificação dos acupantes através da resistência aos antibióticos, tendo-se utilizado todos os nódulos de cada planta.

Avaliação dos níveis populacionais (ufn) no solo.

A determinação dos níveis populacionais no solo foi realizada antes da sementeira dos trevos inoculados (ANO I), um ano após (ANO IIa) e após a mobilização para a cultura do trigo (ANO IIb).

ANO I – Por casualização recolheram-se 3 amostras de solo dos 5 cm superficiais com as quais se formou uma amostra compósita para cada um dos talhões principais (Mobilização). Uma 4ª amostra de solo foi recolhida em cada um dos talhões de ensaio, com as quais se formou uma amostra compósita para cada repetição e para cada nível de profundidade. A primeira serviu para a comparação do efeito da mobilização de solo na zona de desenvolvimento radicular importante para a nodulação, no ano seguinte e a segunda permitiu a avaliação da distribuição da população ao longo do perfil de solo mais directamente envolvida nas operações de mobilização (0-5, 5-10 e 10-20 cm).

ANO IIa – Antes da destruição da pastagem para a cultura de trigo foram recolhidas amostras casualizadas em todos os talhões de ensaio com as quais se formou uma amostra compósita para cada repetição, cada modalidade de inóculo (A e B) e para cada nível de profundidade.

ANO IIb – Após a destruição da pastagem para a cultura de trigo recolheram-se amostras compósitas em cada talhão principal (Mobilização), cada modalidade de inoculação e cada nível de profundidade.

Persistência

A persistência das estirpes introduzidas foi avaliada pela recolha de nódulos nas plantas utilizadas para as contagens dos níveis populacionais referentes às amostras de solo recolhidas no ANO IIa, em que a proporção de plantas que albergam nódulos ocupados pela(s) estirpe(s) foi utilizada como indicador da persistência.

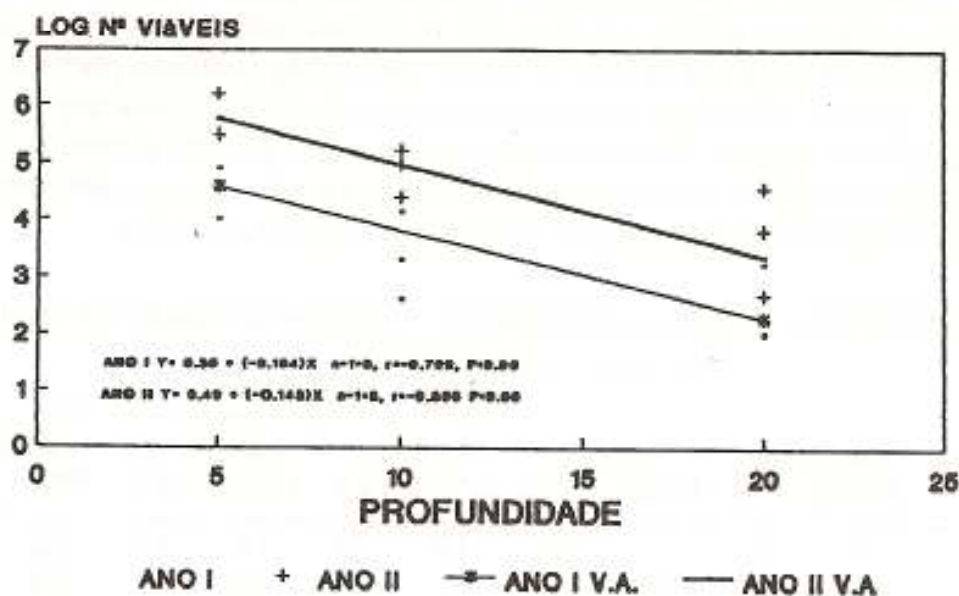
Como seria de prever as populações nativas de *Rh. leguminosarum* bv. *trifolii* atingem valores apreciáveis particularmente na camada superficial (0-5 cm), como se pode verificar no Quadro 2 e Figura 1. A população da camada mais superficial difere significativamente ($P < 0,05$) da do nível mais profundo (10-20 cm). Populações desta dimensão, particularmente nas camadas mais superficiais, criam uma barreira ao estabelecimento de estirpes inoculantes o que conduz à necessidade da introdução de estirpes altamente competitivas e/ou aplicadas em elevados números como refere McLoughlin e outros (1984).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

QUADRO 2 – População de *Rh. Leg. bv. trifolii* em 3 Níveis de Profundidade no Ano da Instalação da Pastagem (ANO I) e no Ano Seguinte (ANO IIa).

ANO I			ANO IIa		
0-5	5-10	10-20	0-5	5-10	10-20
5,6 x 10 ⁵	1,4 x 10 ⁴	1,7 x 10 ³	1,6 x 10 ⁶	9,6 x 10 ⁴	3,7 x 10 ⁴
1,0 x 10 ⁴	4,0 x 10 ²	1,0 x 10 ²	1,6 x 10 ⁶	1,7 x 10 ⁵	6,7 x 10 ³
8,1 x 10 ⁴	2,0 x 10 ³	1,1 x 10 ²	3,1 x 10 ⁵	2,5 x 10 ⁴	4,9 x 10 ²
H[3,3,3] = 5,68		0,02 < P < 0,05	ANO - H = 3,28 0,05 < P < 0,1 PROF - H = 9,98 0,005 < P < 0,01 ANO x PROF H = 0,14 n.s.		

FIGURA 1 – Distribuição da População de Rizóbios ao Longo do Perfil de Solo Analisado e sua Evolução entre ANO I e ANO IIa



O número de bactérias viáveis de cada um dos inóculos transportado em cada semente (Quadro 1) não é de forma alguma elevado, pelo que deixava em aberto a expressão da capacidade competitiva das estirpes utilizadas, tanto mais que esse número pode ser considerado equivalente para as duas estirpes. O Quadro 3 mostra bem a diferença de capacidade competitiva das estirpes utilizadas, sendo a estirpe B significativamente mais competitiva do que a estirpe A, independentemente do hospedeiro de onde foram recolhidos os nódulos. Podemos verificar também que o número de nódulos formados em cada uma das cultivares é independente da proporção em que os inóculos estão presentes e evidencia a capacidade de nodulação das

estirpes nativas. É de salientar que não foram detectados nódulos contendo bactérias resistentes aos dois antibióticos usados no estudo efectuado com as amostras anteriores à implantação do ensaio (Maximino, C.F., resultados não publicados).

QUADRO 3 – Número Médio de Nódulos Recolhidos em cada Cultivar e Percentagem de Nódulos Ocupados por cada uma das Estirpes.

	Woogenellup		Nungarin		Geraldton		Daliak		Média	
	NºNod.	% R	NºNod.	% R	NºNod.	% R	NºNod.	% R	NºNod.	% R
A	45	3	32	1	32	6	35	3	36	3
B	35	39	36	45	29	34	32	30	33	37
Inoc. A	%R		Cultivares – F[3,54] = 2,08				n.s.			
	NºNod.		Cultivares – F[3,54] = 1,65				n.s.			
Inoc. B	%R		Cultivares – F[3,50] = 0,76				n.s.			
	NºNod		Cultivares – F[3,55] = 0,39				n.s.			
Entre Inoc.	Média		Cultivares – F[1,110] = 99,43				P<0,001			

Atendendo às características evidenciadas pelas estirpes em ensaio, verificamos não haver grande surpresa nestes resultados dado que a estirpe B tem uma maior tolerância quer aos efeitos da acidez quer ao de concentrações tóxicas de alumínio (Leitão, 1986) que poderão também conferir tolerância aos efeitos da toxicidade do manganês. Por outro lado e como refere Castillo (1989) as estirpes isoladas de solos ácidos possuem maior resitência à acidez pelo que será de esperar maior facilidade na sua implantação, em solos com esta característica.

QUADRO 4 – Número de Nódulos e Proporção de Nódulos Ocupados pela Estirpe B em cada Repetição

REP	Woogenellup		Nungarin		Geraldton		Daliak		Média		
	NºNod.	% R	NºNod.	% R	NºNod.	% R	NºNod.	% R	NºNod.	% R	
I	26	28	8	58	17	38	19	44	18	41	
II	38	28	53	48	21	30	30	14	36	30	
III	41	61	42	31	48	34	50	-	46	42	
Méd.	35	39	36	45	29	34	33	30	33	37	
Nº Nod		– Repetições para Média das Cultivares – F[2,56] = 12,34				P≤0,001					
		– Cultivares para Média das Repetições – F[3,55] = 0,39				n.s.					
% R		– Repetições para Média das Cultivares – F[2,51] = 1,27				n.s.					
		– Cultivares para Média das Repetições – F[3,50] = 0,76				n.s.					

Verificamos também, que a implantação da estirpe B no 1º ano de ensaio se pode considerar satisfatória, dado que a proporção com que foi recolhida é independente do número de nódulos formados (Quadro 4). De facto constatamos que o Nº de nódulos formados cresceu de uma forma significativa ($P \leq 0,001$) de repetição

em repetição e que estas correspondem a diferentes épocas de recolha, diferindo de cerca de 3 semanas, sem que haja alteração significativa na proporção de nódulos ocupados pela estirpe B.

A evolução da população de *Rh. leg. bv. trifolii* no perfil de solo estudado está representada na Figura 1 e Quadro 2. Consta-se que a sementeira de trevo inoculado fez aumentar ($0,05 < P < 0,1$) a população de rizóbios de um ano para o outro, independentemente dos níveis de profundidade, entre os quais se continuam a verificar diferenças altamente significativas ($0,005 < p < 0,01$). Este incremento deverá ser o resultado do estímulo provocado pelo aumento da proporção de trevos na pastagem e não devido à inoculação, dadas as grandes populações existentes mesmo antes da sementeira do trevo.

QUADRO 5 – Número e Proporção de Trevos Nungarin Nodulados pelas Estirpes Introduzidas no ANO I e Recolhidas nas Amostras Referentes a ANO IIa

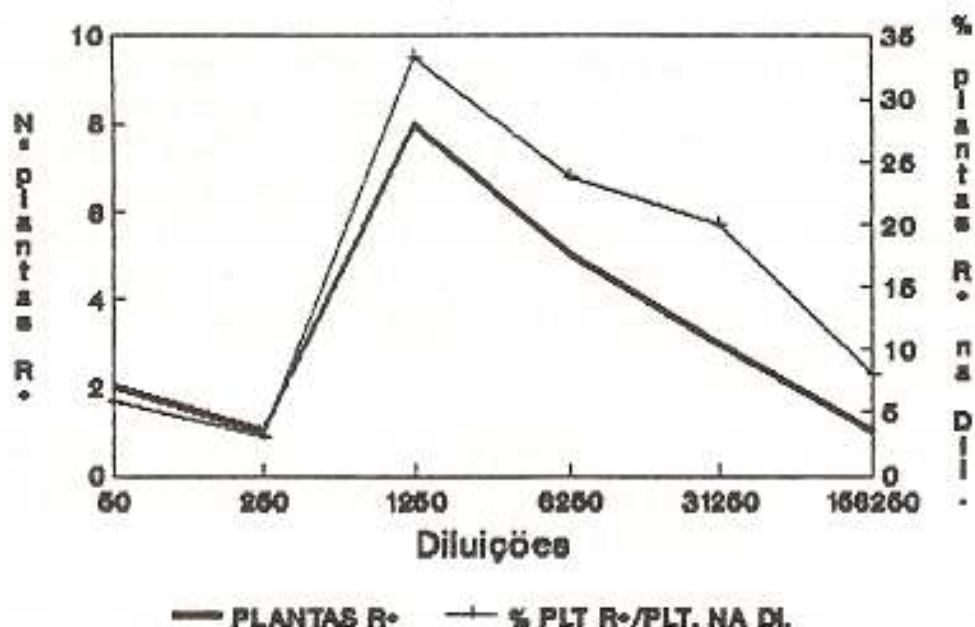
Talhões Inoc.c/	Prof. (cm)	NºPlantas Nodulações	NºPlt.c/Nod		%A	%B
			A	B		
A	0-5	64	0	5	0	7,8
	5-10	40	0	2	0	5,0
	10-20	20	2	1	10	5,0
B	0-5	70	0	13	0	18,6
	5-10	41	0	7	0	17,0
	10-20	27	0	0	0	0

A persistência das estirpes introduzidas foi avaliada através da sua presença nos nódulos formados em plantas de trevo Nungarin utilizadas nas contagens feitas para a determinação dos NMP por grama de solo, efectuadas sobre as amostras referentes ao ANO IIa. Como se pode verificar no Quadro Nº 5, a estirpe B aparece mesmo em amostras de solo recolhidas nos talhões que receberam trevos inoculados com a estirpe A, tendo esta estirpe apenas nodulado duas plantas. Consta-se também que é nas amostras recolhidas nos primeiros 10 cm de solo que se encontram plantas com nódulos formados pela estirpe B. A proporção não se pode considerar elevada (18,6% nos 0-5 cm e 17% nos 5-10 cm) mas não parece dever ser comparada à que se detecta no solo, devido haver interferência dos níveis de diluição usados, uma vez que a proporção de nódulos ocupados varia com o nível de diluição (Figura 2).

Com base nestes resultados poderemos afirmar que a estirpe B se estabeleceu bem no local de ensaios, e para além de apresentar melhor capacidade competitiva do que a estirpe A, possui também uma maior capacidade de persistir no solo.

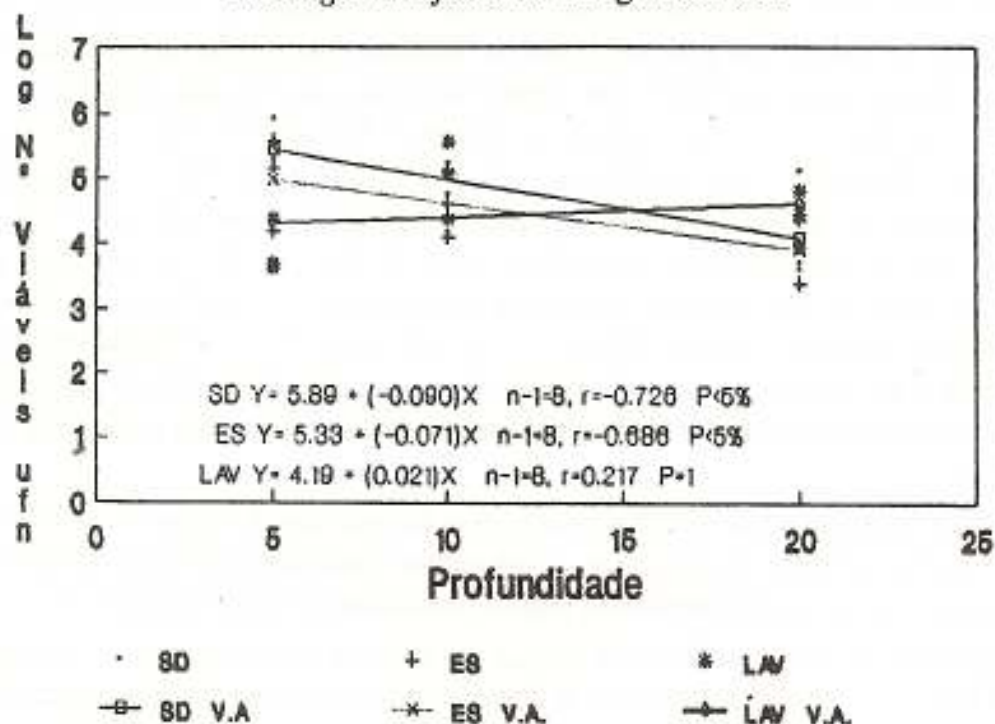
O efeito do sistema de mobilização do solo na da população de rizóbiana do solo foi analisado comparando a sua distribuição ao longo do perfil de solo estudado, com base em amostras compósitas recolhidas para cada talhão de mobilização.

FIGURA 2 – Efeito das Diluições no N^o e Proporção de Plantas Noduladas pela Estirpe B.



Os resultados obtidos parecem indicar uma forte interação entre o sistema de mobilização de solo e a localização da população ao longo do perfil de solo independentemente do inóculo utilizado (Quadro 6). de facto e como seria de esperar a Lavoura inverte a tendência da distribuição da população ao longo do perfil, parecendo conduzir a uma ligeira diminuição global da população (Figura 3).

FIGURA 3 – Efeito do Sistema de Mobilização de Solo na Distribuição de *Rh. leg. bv. trifolii* ao Longo do Perfil



QUADRO 6 – Efeito do Sistema de Mobilização na Distribuição de *Rh. leg* *bv. trifolii* no Perfil de Solo

INOC. A									INOC. B								
0-5			5-10			10-20			0-5			5-10			10-20		
SD	ES	LAV	SD	ES	LAV	SD	ES	LAV	SD	ES	LAV	SD	ES	LAV	SD	ES	LAV
7,1	3,5	8,1	8,2	8,2	2,0	6,0	3,8	6,0	1,0	4,1	2,0	4,1	2,0	2,7	3,5	1,4	7,1
x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
10 ⁵	10 ⁵	10 ³	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁵	10 ³	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁴
2,7	1,1	4,0	6,0	2,2	1,1	1,1	2,2	3,8	5,6	2,2	5,7	4,0	7,1	4,9	1,6	3,8	2,2
x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ⁴	10 ³	10 ⁴	10 ⁴	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁵	10 ³	10 ³	10 ⁴	10 ⁴	10 ³	10 ⁴	10 ⁴
2,7	6,0	4,9	7,1	2,0	5,4	1,4	5,7	1,1	1,4	3,5	1,1	4,9	8,2	2,5	2,0	1,1	7,1
x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
10 ⁵	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ³	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁵	10 ³	10 ³	10 ⁴
(A) Inoc.	H = 0,763		n.s.														
(B) Prof.	H = 7,388		0,01 < P < 0,025														
(A) x (B)	H = 0,30		n.s.														
(C) Mob.	H = 3,499		0,1 < P < 0,25														
(A) x (C)	H = 1,128		n.s.														
(B) x (C)	H = 13,210		0,01 < P < 0,025														
(A) x (B) x (C)	H = 1,970		n.s.														

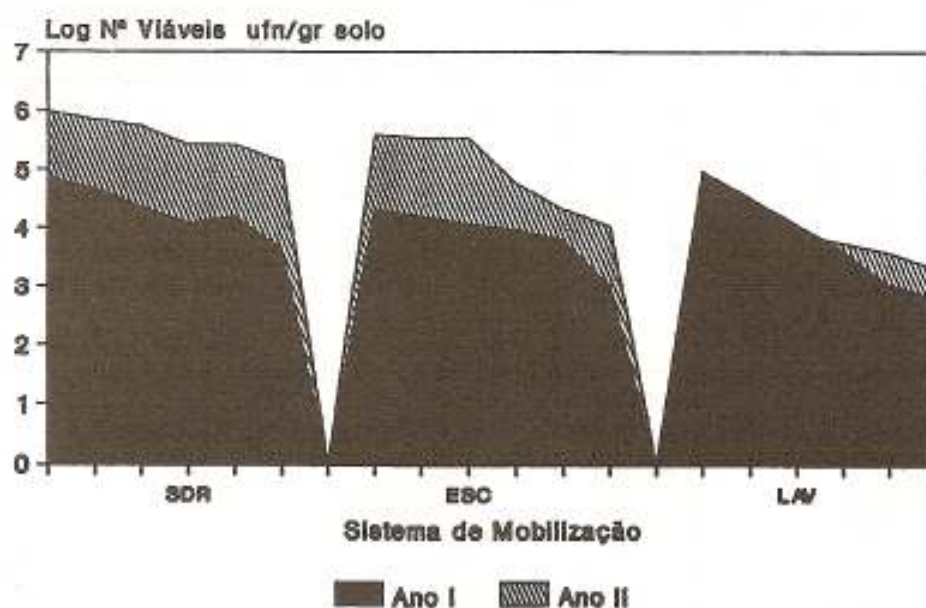
QUADRO 7 – População nos 5 cm Superficiais nos Locais Correspondentes aos Diferentes Níveis de Mobilização no ANO I e ANO IIb.

ANO I			ANO IIb		
SDR	ESC	LAV	SDR	ESC	LAV
5,8 x 10 ⁴	2,1 x 10 ⁴	9,7 x 10 ⁴	7,1 x 10 ⁵	3,5 x 10 ⁵	8,1 x 10 ³
7,0 x 10 ⁴	9,8 x 10 ³	3,5 x 10 ⁴	2,7 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁴	4,0 x 10 ³
1,6 x 10 ⁴	1,6 x 10 ⁴	1,2 x 10 ⁴	2,7 x 10 ⁵	6,0 x 10 ⁴	4,9 x 10 ⁴
2,3 x 10 ⁴	6,5 x 10 ³	6,5 x 10 ²	1,0 x 10 ⁶	4,1 x 10 ⁵	2,0 x 10 ³
1,2 x 10 ⁴	1,1 x 10 ³	1,1 x 10 ³	5,6 x 10 ⁵	2,2 x 10 ⁴	5,7 x 10 ³
4,5 x 10 ³	1,2 x 10 ⁴	4,3 x 10 ³	1,4 x 10 ⁵	3,5 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁴
ANO	H = 5,63	0,01 < P < 0,025	SDR	U[6,6] = 36	P < 0,05
MOB.	H = 10,44	0,005 < P < 0,01	ESC	U[6,6] = 33	P < 0,05
INTERACÇÃO	H = 4,19	0,1 < P < 0,25	LAV	U[6,6] = 18	n.s.

A análise dos resultados restringida aos 5 cm superficiais (Quadro 7) confirma o aumento da população do ANO I para o ANO IIb (0,01 < P < 0,025). O sistema de mobilização tem uma influência altamente significativa (0,005 < P < 0,01) na população deste nível superficial no qual as populações não diferem significativamente (U[6,6] 018) nos talhões com Lavoura quando comparados com as populações do ANO I. O incremento da população nos 5 cm superficiais pode ser

constante na Figura 4 onde se verifica a tendência para o não incremento da população no ANO IIb Lavoura.

FIGURA 4 – Efeitos do Nivel de Mobilização do Solo na População de Rizóbio dos 5 cm Superficiais



CONCLUSÕES

Os resultados obtidos referentes à proporção de nódulos ocupados pelas estirpes introduzidas, permitem concluir que a estirpe B é bastante mais competitiva e persistente do que a estirpe A, quando introduzida num solo que apresenta como factores limitantes o pH e toxicidade do manganês. A interferência das cultivares de trevo subterrâneo na proporção de nódulos formados por uma estirpe inoculante em solos com populações nativas (Roughley e outros, 1976; Brockwell e outros, 1977) não foi aqui detectada. A proporção de nódulos ocupados pela estirpe mais competitiva (entre 28 e 61%), parece razoável, em face do pequeno número de rizóbio inoculante veículado com a semente e das elevadas populações nativas encontradas no local de ensaio (entre $1,0 \times 10^4$ e $5,6 \times 10^5$ nos 5 cm superficiais do solo) adaptadas às condições adversas prevalecentes. Verifica-se ainda que a estirpe B, está presente em todas as plantas recolhidas nos talhões que receberam trevo inoculado com esta estirpe.

Quanto à distribuição da população de rizóbios no perfil de solo analisado, torna-se evidente a redução com a profundidade, sendo os 5 cm superficiais os que apresentam populações mais elevadas. A lavoura efectuada para a cultura do trigo inverte esta tendência, trazendo para a superfície as camadas mais profundas, com redução da população nos 5 cm superficiais. Faltou neste estudo a avaliação de efectividade simbiótica das estirpes nativas em função da sua localização ao longo do perfil, mas a redução dos níveis populacionais nos 5 cm superficiais poderá explicar em parte a redução da produção de matéria seca dos trevos (e leguminosas em geral)

que crescem após a cultura de cereal nos talhões mobilizados com lavoura (Carvalho e outros, 1987).

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Sra. Gertrudes Mariano pelo seu empenho e fastidioso trabalho de tipificação de nódulos.

O presente estudo foi possível graças ao projecto "Factores de Produtividade em Montado: Biologia e Mobilização do Solo", financiado pela JNICT, com o nº 87.134 daquela Instituição.

BIBLIOGRAFIA

- BROCKWELL, J.; SCHWINGHAMER, E. A.; GAULT, R. R. – *Ecological Studies of Root-Nodule Bacteria Introduced Into Field Environments – V.A Critical Examination of Stability of Antigenic and Streptomycin-Resistance for Identification of Strains of Rhizobium trifolii*. Soil Biol. & Biochem., Vol. 9, 1977, p. 19-24.
- BROCKWELL, J. ^a; DIATLOFF, A.; ROUGHLEY, R. J.; DATE, R. A. – *Selection of Rhizobia for Inoculants. in "Nitrogen Fixation in Legumes"*, Sydney, Acad. Press Aust., 1982, p. 173-191.
- BROCKWELL, J. ^b; GAULT, R.R.; ROBERTS, M. J. – *Effects of Environmental Variables on the Competition Between Inoculum Strains and Naturalized Populations of Rhizobium trifolii for Nodulation of Trifolium subterraneum L. and on Rhizobia Persistence in the Soil*. Aust. J. Agric. Research, Vol. 33, 1982, p. 802-815.
- BROCKWELL, J. ^c – *Plant Infection Counts of Rhizobia in Soils. in "Nitrogen Fixation in Legumes"*. Sydney, Acad. Press Aust., 1982, p. 41-58.
- BROMFIELD, E. D. P. – *The Use of Immunofluorescence and other Diagnostic Marker Techniques in Ecological Studies with Rhizobium trifolii*. PhD Thesis, University of Wales, Aberystwyth, 1977.
- BUSHBY, H. V. A. – *Direct Quantitative Recovery of Rhizobium from Soil and Rhizosphere, in "Nitrogen Fixation in Legumes"*. Sydney, Acad. Press Aust., 1982, p. 59-65.
- CARDOSO, C. – *Os Solos de Portugal, Sua Classificação, Caracterização e Génese. I – A Sul do Rio Tejo*. Lisboa, 1965.
- CARVALHO, M. J. G. P. R. – *Factores Limitantes e Técnicas Culturais da Produção de Trigo no Alentejo*. Tese de Doutoramento, Universidade de Évora, Évora, 1987.
- CARVALHO, M. J. G. P. R.; ALHO, L. M. C. V.; MARQUES, J. F. – *Efeito das Antecedentes Culturais no Restabelecimento Natural de uma Pastagem de Trevo Subterrâneo*, 1990. Em publicação.

- CARVALHO, M. J. G. P. R. e outros – *Efeito do Sistema de Mobilização e Nível de Herbicidas na Produção de Trigo e no Restabelecimento da Pastagem após o Cereal num Solo Pardo-Mediterrâneo de Granitos (Pmg). II – Restabelecimento da Pastagem*, Revista da Sociedade Portuguesa de Pastagens e Forragens, nº 8, 1988.
- CASTILLO, C. B. – *Tolerancia a Acidez en Rhizobium trifolii*. Comunicação Apresentada X Reunião de Primavera da S.P.P.F., Elvas, 1989.
- DUGHRI, M. H.; BOTTOMLEY, P.J. – *Soil Acidity and the Composition of an Indigenous Population of Rhizobium trifolii in Nodules of Different Cultivares of Trifolium subterraneum*. Soil Biol. & Biochem., Vol. 16, 1984, p. 405-411.
- FERREIRA, E. M. – *Inoculantes para Leguminosas - Isolamento, Caracterização, Estudo Ecológico e Selecção de Estirpes de Rhizobium trifolii de Solos Portugueses*. INIA, Estação Florestal Nacional, Lisboa, 1986.
- FERREIRA, E. M. – *Produção e Aplicação de Inoculantes para Leguminosas - Alguns Aspectos Práticos*. 1º Encontro sobre Montados de Sobro E Azinho, Évora, 1986, p. 309-315.
- FERREIRA, E. M.; MARQUES, J. F. – *Eficácia das Simbioese com Rhizobium trifolii. Competição entre Estirpes e Significado das Métodos de Avaliação*. Pastagens e Forragens - Revista da S.P.P.F., Elvas. nº 7, 1986, p. 57-66.
- FERREIRA, E. M.; CASTRO, I. V. – *Eficácia de Estirpes de Rhizobium trifolii. Isoladas de Trevos Indigenas Colhidos em Diferentes Solos Portugueses*. Comunicação Apresentada à X Reunião de Primavera da S.P.P.F., Elvas, 1989.
- KEYSER, H.H.; MUNNS, D.N. – *Effects of Calcium, Manganese and aluminium on Growth of Rhizobia in Acid Media*. Soil Sc. Amer. J., Vol. 43, 1979, p. 500-503.
- LEITÃO, T. – *Estudo de Populações Nativas de Rhizobium trifolii e seu Comportamento em Condições Adversas de pH e Alumínio*. Tese de Licenciatura, Universidade Clássica de Lisboa, Faculdade de Ciências, 1986.
- MCCLOUGHLIN, T. J.; BORDELEAU, L. M.; DUNICAN, L. K. – *Competition Studies with Rhizobium trifolii in a Field Experiment*. J. of Applied Bacteriology, Vol. 56, 1984, p. 131-135.
- OBATON, M. M. – *Utilisation de Mutants Spontanées résistents aux Antibiotiques pour l'étude Écologique des Rhizobium*. Comptes R. Acad. Sc. Paris, Seerie D, Vol. 272, 1971, p. 2630-2633.
- ROUGHLEY, R. J.; BLOWES, W. M.; HERRIDGE, D. F. – *Nodulation of Trifolium subterraneum by Introduced Rhizobia in Competition with Naturalised Strains*. Soil Biol. & Biochem., Vol. 8, 1976, p. 403-407.
- THORNTON, F. C. – *Saprophytic of Acid Tolerant Strains of Rhizobium trifolii in Acid Soil*. Plant and Soil, Vol. 80, 1984 p. 337-344.
- VINCENT, J. M. – *A Manual for the Pratical Study of Root-Nodule Bacteria*. I.B.P. Handbook nº 15, Oxford Blackwell Sc. Pub., 1970.

WACEK, T. J.; BRILL, W. J. – *Simple, Rapid Assay for Screening Nitrogen-Fixing*, Vol. 16. 1976, p. 519-523.