

**EFICÁCIA DAS SIMBIOSES COM *RHIZOBIUM TRIFOLII*.
COMPETIÇÃO ENTRE ESTIRPES
E SIGNIFICADOS DOS MÉTODOS DE AVALIAÇÃO ***

Eugénio Mendes Ferreira
Estação Florestal Nacional
Tapada das Necessidades
1300 LISBOA

José Figueiredo Marques
Estação Agronómica Nacional
Quinta do Marquês
2780 OEIRAS

RESUMO

Foi estudado o comportamento simbiótico de quatro estirpes de *Rhizobium trifolii*, quando inoculadas em diferentes plantas de trevo, crescidas em condições laboratoriais, comparando-se três processos de avaliação da eficácia: peso seco, área foliar e actividade nitrogenásica.

O comportamento das estirpes ensaiadas foi geralmente influenciado pela planta hospedeiro, verificando-se uma nítida diferenciação entre os resultados obtidos com trevos subterrâneos e os obtidos com os restantes trevos.

A actividade da nitrogenase dentro de certas limitações e na primeira fase do crescimento parece ser o método mais adequado para a determinação da eficácia.

* Conferência apresentada na VI Reunião de Primavera da SPPF. Vila Real, Maio 1986.

ABSTRACT

The symbiotic behaviour of four *Rhizobium trifolii* strains with different species and cultivars of clover was evaluated under controlled conditions and effectiveness evaluations based on dry matter, leaf area and nitrogenase activity were compared.

Nitrogenase activity in the early stage of growth seems an acceptable method for effectiveness evaluation giving results identical with the methods in a shorter delay.

Strain behaviour showed a marked influence of the host plant species and cultivars, with a clustering in two groups: sub-clovers all the other species assayed.

1 — INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

A eficácia e a competição das estirpes de *Rhizobium* são dos aspectos mais importantes no estudo da ecologia desta bactéria e na consequente previsão do comportamento de inoculantes introduzidos em sistemas de produção de pastagens.

A nodulação das leguminosas nem sempre se exerce no sentido de favorecer as estirpes mais eficazes, havendo casos em que estirpes menos eficazes dificultam a formação de nódulos pelas estirpes mais eficazes (5), podendo acontecer que uma estirpe incapaz de formar nódulos iniba a formação de nódulos por outra eficaz (3).

A capacidade de formar nódulos e a eficácia não estão necessariamente ligadas, podendo a planta hospedeiro modificar a competitividade relativa e a eficácia das estirpes (2, 8, 10), o que tem implicações práticas decisivas na selecção de estirpes destinadas à produção de inoculantes.

A avaliação da eficácia em laboratório está sempre sujeita a limitações devido às condições ambientais dificilmente reproduzirem as condições naturais, o que, associado às limitações inerentes aos métodos usados, exige prudência na interpretação dos resultados obtidos.

No presente estudo pretende-se avaliar o comportamento de algumas estirpes seleccionadas localmente, em simbiose com algumas das cultivares de trevo disponíveis no mercado, analisando-se o significado dos resultados obtidos por diferentes métodos de avaliação de eficácia (piso seco, actividade nitrogenásica e área foliar).

2 — MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizaram-se 4 estirpes de *R. trifolii* designadas por: A — 51Tch1, B — 123Ts2a e C — 147Ts3, seleccionadas no Laboratório de Microbiologia da EFN, sendo a estirpe B já utilizada na produção de inoculantes, e D — Tfr1, seleccionada no Departamento de Microbiologia da EAN, ineficaz e bastante competitiva com o trevo subterrâneo. As estirpes foram isoladas respectivamente de: *Trifolium cherleri*, *Trifolium subterraneum*, *Trifolium subterraneum* e *Trifolium fragiferum*, sendo os inóculos mistos constituídos por estirpes em quantidades iguais.

Utilizaram-se sementes de trevo disponíveis no mercado* das seguintes espécies e cultivares:

- Trifolium subterraneum* cv. Clare
- Trifolium subterraneum* cv. Mount Barker
- Trifolium subterraneum* cv. Seaton Park
- Trifolium subterraneum* cv. Trikkala
- Trifolium subterraneum* cv. Woogenellup
- Trifolium subterraneum* cv. Geraldton
- Trifolium subterraneum* cv. Daliak
- Trifolium fragiferum* cv. Palestine
- Trifolium resupinatum* (trevo da Pérsia)
- Trifolium pratense* (trevo violeta)
- Trifolium repens* cv. Branco Ladino

As plantas cresceram em ambiente controlado dentro de tubos de ensaio com substracto de areia durante 6 ou 8 semanas. Cada tubo foi inoculado com 0,5 ml de suspensão contendo 3×10^7 bact./ml. Nas testemunhas com azoto adicionou-se KNO_3 três dias após a inoculação (4).

O peso seco médio das plantas foi determinado por pesagem da parte aérea, sendo os resultados analisados estatisticamente no Centro de Cálculo da EFN, através de uma análise de variância — ANVOR (1) e a separação das médias, baseadas em números de observações diferentes (entre 5 e 9 plantas), feita por aplicação do teste t ao nível de 5 % (7).

As áreas foliares foram determinadas apenas para a cv. Clare, por medição fotométrica para o conjunto de folhas das plantas com o mesmo

* Gonçalves & Fonseca

inóculo, e a actividade nitrogenásica foi determinada por cromatografia gasosa utilizando sistemas radiculares imediatamente após corte da parte aérea.

A comparação dos métodos de avaliação foi efectuada recorrendo ao coeficiente de concordância de Kendall (9) aplicado ao ordenamento de pares simbióticos para plantas com 6 semanas.

3 — RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes à eficácia e competição baseados na análise dos pesos secos (mg) encontram-se no quadro 1, apresentando a figura 1 a representação gráfica do fenómeno.

Verificaram-se duas situações distintas consoante se tratava do grupo dos trevos subterrâneos, que teve um comportamento relativamente homogéneo, ou do grupo dos restantes trevos, constituído por diferentes espécies, bastante mais heterogéneo, como de resto seria de esperar. Por comodidade estes grupos serão analisados separadamente.

No trevo subterrâneo as estirpes A, B e C proporcionaram com qualquer deles uma simbiose mais eficaz que a estirpe B, a qual se mostrou sempre ineficaz (quadro 1). A estirpe B proporcionou de um modo geral o melhor crescimento, seguindo-se as estirpes C e A, com comportamentos semelhantes, sendo no entanto C superior a A.

Quando em mistura com a estirpe D, a estirpe A diferenciou-se perfeitamente do grupo das outras (B e C), decrescendo a sua eficácia (peso seco) de forma significativa, o que indica a sua fraca competitividade ou, pelo menos, a fraca expressão da sua capacidade simbiótica na presença de outra estirpe.

Nos restantes trevos, e quanto à eficácia das estirpes A, B e C, passou-se o inverso do que aconteceu com os trevos subterrâneos, sendo em média a estirpe A a melhor, seguindo-se-lhe C e B. A estirpe D teve um comportamento variável consoante a espécie.

Quando em mistura com a estirpe D, as estirpes A, B e C tiveram comportamentos diferentes, consoante o hospedeiro, sendo a estirpe A aquela em que a mistura deu origem a maior diversidade.

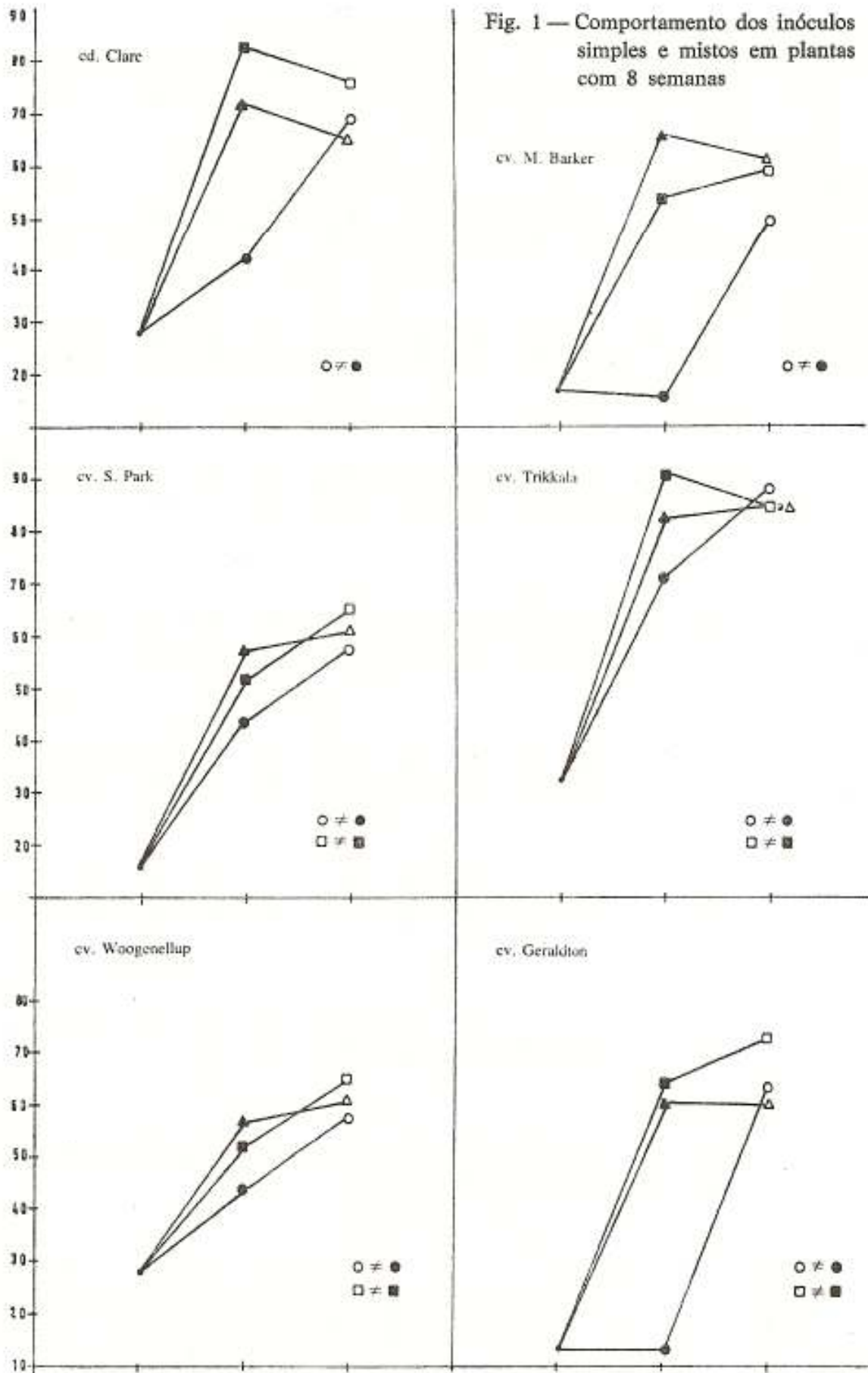
Os valores encontrados indicam que para os trevos subterrâneos a estirpe B é mais eficaz, sendo a estirpe D ineficaz, mais competitiva que a A e menos competitiva que a B ou a C.

QUADRO 1 — Peso seco médio (mg) das plantas às 8 semanas com os diferentes inóculos e sua diferenciação significativa

Cultivar/ espécie	A	B	C	D	A + D	B + D	C + D	TO	TN
Clare	67,56 bc	76,33 ab	64,75 c	27,60 e	42,33 d	82,50 a	71,86 abc	27,63 e	79,25 a
Mount Barker	49,89 d	58,67 bc	61,25 ab	17,44 e	15,56 e	54,22 cd	65,56 a	17,00 c	62,29 ab
Seaton Park	60,44 ab	65,11 a	61,11 ab	16,22 e	44,25 d	51,89 c	57,00 bc	16,11 e	54,78 bc
Trikkala	87,56 ab	84,63 b	84,67 ab	31,86 d	70,63 c	90,89 a	81,89 b	26,56 d	91,67 a
Woogenellup	62,88 c	75,00 b	79,78 ab	28,49 e	41,13 d	84,11 a	83,13 ab	25,22 e	59,89 c
Geraldton	64,89 b	73,67 a	61,33 b	14,25 c	14,11 c	65,44 b	61,22 b	13,89 c	60,75 b
Daliak	48,11 a	51,56 ab	48,00 ab	10,29 d	16,22 d	51,89 a	39,11 c	8,44 d	40,56 bc
Palestine	34,25 b	20,56 c	27,13 c	24,44 c	23,13 c	24,56 c	23,33 c	4,55 d	47,00 a
Persia	42,50 b	42,00 b	42,25 b	5,17 c	41,88 b	54,22 a	53,00 a	4,56 c	57,14 a
Violeta	36,67 b	8,00 c	32,50 b	4,25 c	6,25 c	4,50 c	5,50 c	4,25 c	60,50 a
B. Ladino	21,63 de	9,67 fg	26,57 cd	33,25 bc	36,88 ab	16,50 ef	29,25 bcd	2,22 g	44,83 a

Nota: Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente (nível de 5 %). As comparações são válidas para cada cultivar.

Fig. 1 — Comportamento dos inóculos simples e mistos em plantas com 8 semanas



(continua)

(Continuação)

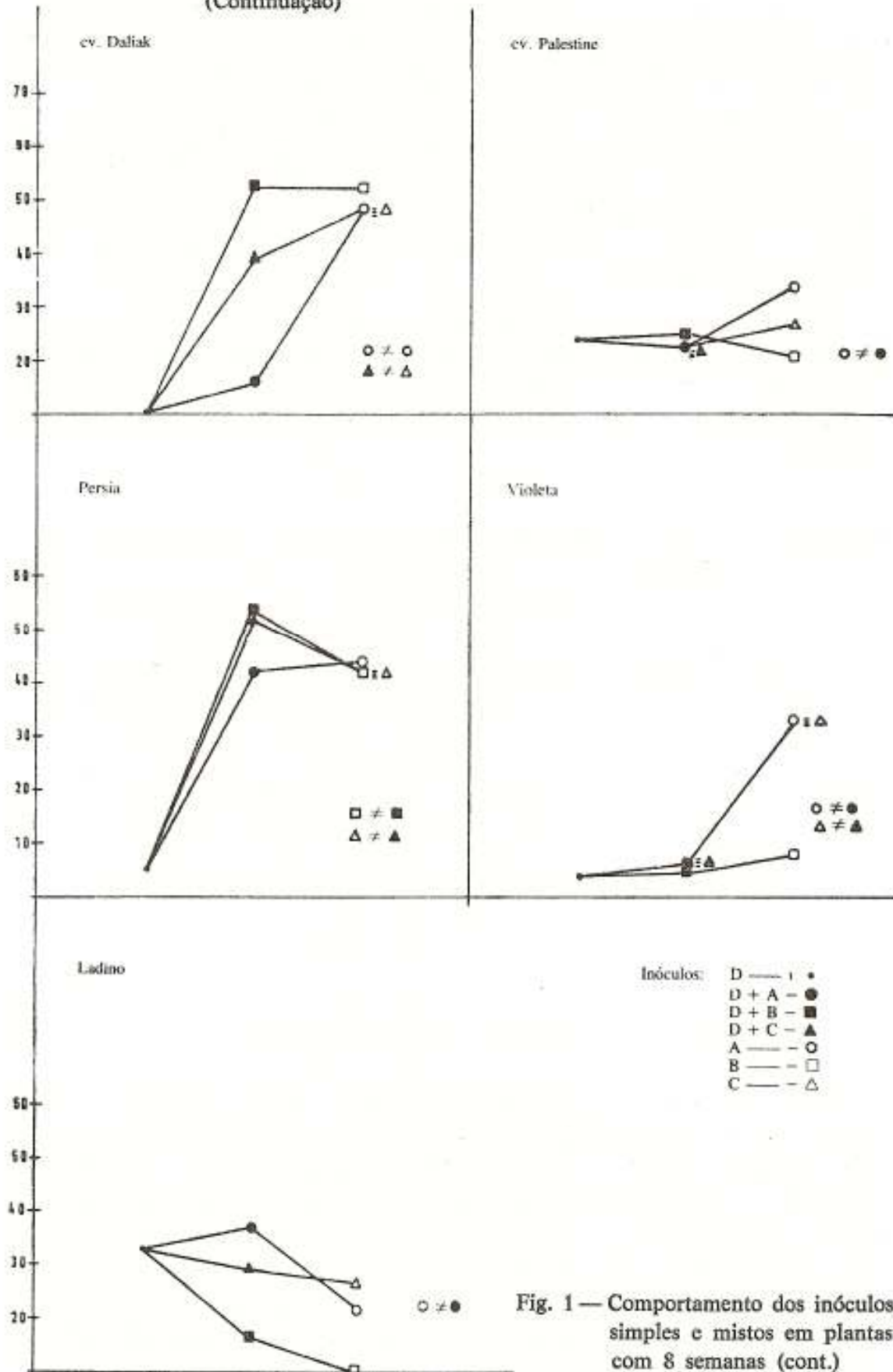


Fig. 1 — Comportamento dos inóculos simples e mistos em plantas com 8 semanas (cont.)

No caso dos trevos não subterrâneos a eficácia dependeu do hospedeiro, sugerindo ainda os resultados que a estirpe D é a mais competitiva, pois em três casos o valor da eficácia da mistura tende a aproximar-se do seu.

Os resultados obtidos têm especial importância prática no campo da produção dos inoculantes para trevos, mostrando a diversidade do comportamento das espécies e o perigo da utilização de inóculos múltiplos de grande espectro sem um estudo prévio. Para este conjunto limitado de pares simbióticos parece haver alguma influência do hospedeiro originário de que as estirpes foram isoladas.

Para a avaliação da eficácia de pares simbióticos, além do peso seco usaram-se ainda os valores relativos à área foliar e à actividade da nitrogenase. O ordenamento dos pares simbióticos obtidos por aplicação de cada um dos critérios referidos (quadro 2) foi utilizado para determinar a respectiva concordância.

QUADRO 2 — Comparação dos métodos de avaliação de eficácia (plantas com 6 semanas)

Pares simbióticos cv. Clare + estirpes	Métodos de avaliação (ordens)		
	Peso seco	Área foliar	Nitrogenase
B	1	1	2
D	4	5	5,5
D + C	2	2	1
D + B	3	3	3
D + A	5	4	4
TO	6	6	5,5

Dado o nível de concordância observado, os métodos poderão usar-se de acordo com as vantagens pontuais de utilização que apresentem. No entanto deve ter-se em atenção o efeito do desenvolvimento da planta traduzido em área foliar no funcionamento dos nódulos, dependente dos produtos da fotossíntese, estando também por sua vez a expansão das folhas dependente da disponibilidade de azoto e conseqüentemente do funcionamento dos nódulos. Assim e para plantas de trevo cv. Clare com 6 semanas, verificam-se correlações mais elevadas entre área foliar-nitrogenase e área foliar-peso seco do que entre peso seco-nitrogenase.

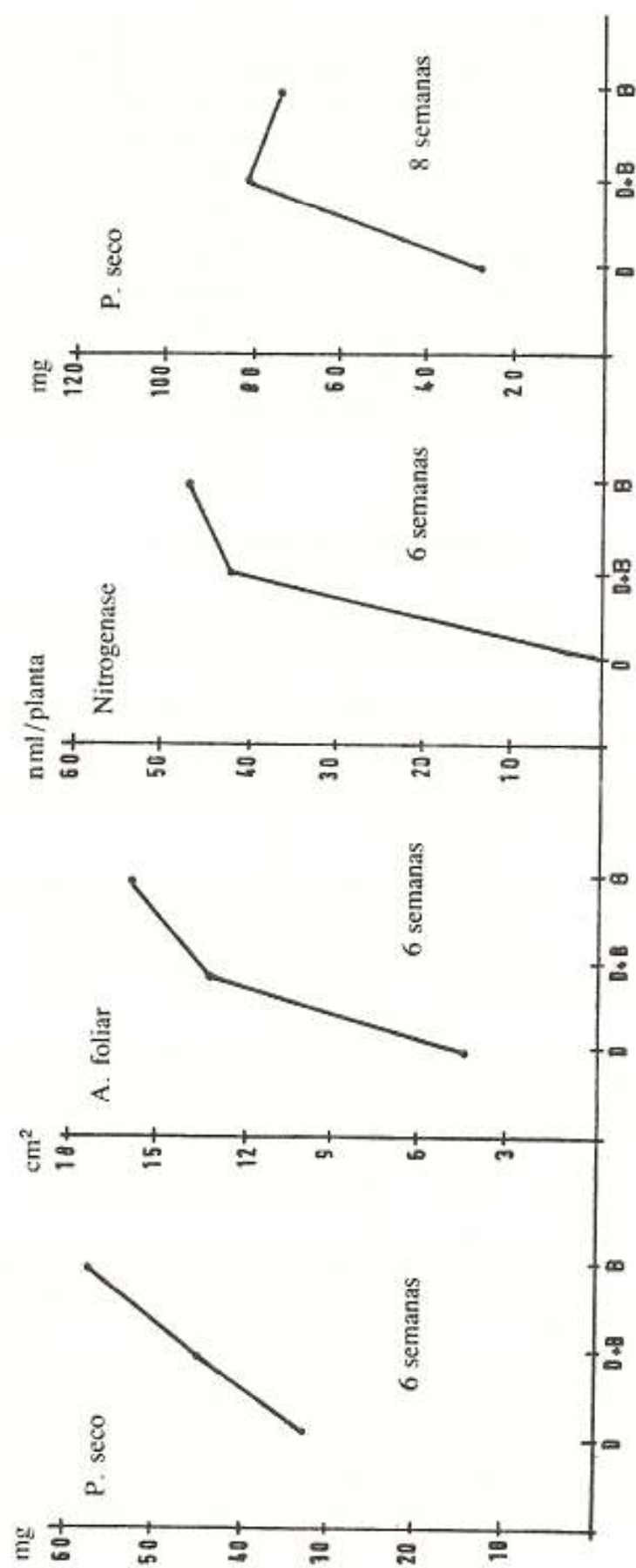


Fig. 2 — Peso seco — 6 e 8 semanas, área foliar — 6 semanas e nitrogenase — 6 semanas em plantas de trevo subterrâneo cv. Clare

Do ponto de vista do valor preditivo do desenvolvimento e apesar das limitações inerentes ao método (6), a actividade da nitrogenase parece revelar-se superior aos restantes métodos, sobretudo havendo resultados concordes com os obtidos para a área foliar, parecendo ser mais sensível nas primeiras semanas, verificando-se que às 6 semanas são antecipados os resultados obtidos por análise dos pesos secos às 8 semanas, de forma mais perfeita do que usando a área foliar ou o peso seco (figura 2).

Estes resultados devem no entanto ser considerados como indicativos, pois baseiam-se apenas no uso de uma cultivar (*T. subterraneum* cv. Clare) em simbiose com duas estirpes, num intervalo de tempo limitado (6-8 semanas), crescendo em ambiente controlado bem específico (Laboratório de Microbiologia da EFN).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — ALMEIDA, V. C. — *Modelos de Variância Octogonal. Modelos de Regressão Linear*. Lisboa, INIA, 1983. (Notas Técnico-Científicas, EFN-05).
- 2 — BUSHBY, H. V. A. — *Ecology*. In: BROUGHTON, W. J. (ed.) — «Nitrogen fixation. Vol. 2 — *Rhizobium*». Oxford, Clarendon Press, 1976.
- 3 — DIATLOFF, A.; BROCKWELL, J. — «Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.», vol. 16, 1976, p. 514-521. (Cif. Bushby, 1982).
- 4 — FERREIRA, E. M. — *Estudo da Eficácia de Estirpes de Rhizobium em Ambiente Controlado*. Lisboa, INIA, 1983. (Notas Técnico-Científicas, EFN-01).
- 5 — IRELAND, J. A.; VINCENT, J. M. — «Trans. 9 th Int. Cong. Soil Sci.», vol. 2, 1968, p. 85-93. (Cf. Bushby, 1982).
- 6 — KRISTINA, L. — *Effect of various Rhizobium trifolii strains on nitrogenase (C_2H_2) activity profiles of red clover *Trifolium pratense* cv. Venla*. «Plant and Soil», vol. 80, 1984, p. 79-89.
- 7 — LITTLE, T. M.; HILLS, F. J. — *Agricultural experimentation*. New York, John Wiley and Sons, 1978, p. 61-76.
- 8 — MYTTON, L. R.; DE FELICE, J. — *The effect of mixture of Rhizobium strains in the dry matter production of white clover grown in agar*. «Ann. Appl. Biol.», vol. 87, 1977, p. 83-93.
- 9 — REIS, C. S. — *Curso de Bioestática — Testes não Paramétricos em Biologia*. Luanda, Instituto Nacional de Saúde Pública de Angola, 1974.
- 10 — TRINICK, M. J. — *Competition between rhizobial strains for nodulation*. In: VINCENT, M. J. (ed.) — «Nitrogen fixation in legumes». Sydney, Academic Press, 1982.