

EFICÁCIA DE ESTIRPES DE *RHIZOBIUM* ISOLADAS DE TREVOS INDÍGENAS COLHIDOS EM DIFERENTES SOLOS PORTUGUESES .

EUGÉNIO MENDES FERREIRA

ISABEL VIDEIRA CASTRO

Estação Florestal Nacional

Tapada das Necessidades , 1300- Lisboa

RESUMO: Isolamentos de estirpes de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* obtidos de trevos indígenas, foram avaliados em trevo subterrâneo cv. Clare e trevo fragífero cv. Pales_tine sob condições controladas de luz e temperatura .

Duma forma geral as estirpes apresentaram uma eficácia elevada independentemente da planta e do solo de origem .

PALAVRAS CHAVE: Trevos indígenas , estirpes de *Rhizobium*, eficácia , inoculantes .

1-INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

A inoculação das leguminosas com as bactérias *Rhizobium* é um dos poucos casos bem sucedidos da aplicação da microbiologia na agricultura, exigindo porém que se utilizem estirpes seleccionadas que proporcionem uma alta taxa de fixação de azoto .

Havendo em Portugal grande diversidade de espécies de trevos indígenas ou naturalizados, a variação de estirpes de *Rhizobium* será grande, acompanhando a evolução dos ecótipos nativos na sua grande diversidade. As bactérias isoladas de plantas espontâneas possuem de modo análogo às plantas hospedeiras maior variabilidade genética que as originárias de plantas cultivadas, sendo mais compensadora a selecção naquele grupo (LIE, 1981 ; LIE *et al.* 1987) .

Segundo BERGERSEN *et al.* (1971), a população nativa de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* em cada local abrange uma grande escala de eficácia, não sendo

estas estirpes sempre eficazes com as plantas cultivadas (LOWE & HOLDING, 1970), verificando-se que algumas estirpes de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* indígenas eram muito mais eficazes com os trevos indígenas que com as linhas comerciais da mesma espécie.

FERREIRA & MARQUES (1986), verificaram o diferente comportamento de estirpes de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* consoante o hospedeiro, havendo estirpes altamente eficazes com trevos subterrâneos e ineficazes com trevo branco e vice-versa .

Com o objectivo de obter inoculantes destinados a instalação de pastagens em regime agro-silvo-pastoril pela D.G.F. (ex-Fundo de Fomento Florestal), fez-se a colheita de plantas de trevo nas zonas onde a sua acção incide com maior acuidade (Alentejo, Ribatejo e Algarve) de modo a obterem-se estirpes já adaptadas aos condicionalismos locais . As colheitas, abrangendo uma grande diversidade de solos, incidiram especialmente no trevo subterrâneo devido a esta planta constituir a base da maioria das pastagens instaladas.

2-MATERIAL E MÉTODOS

As estirpes de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* foram isoladas de nódulos frescos das seguintes espécies :

Trifolium angustifolium L.
Trifolium campestre Schreb.
Trifolium cherleri L.
Trifolium pratense L.
Trifolium repens L.
Trifolium subterraneum L.
Trifolium tomentosum L.
Trifolium sp.

De cada local de colheita retiraram-se de uma das melhores plantas três nódulos da parte superior da raiz , fazendo-se os isolamentos conforme descrito por VINCENT (1970) e BROCKWELL (1980) com ligeiras alterações adequadas às nossas condições de trabalho .

Os isolamentos após caracterização foram testados quanto à sua eficácia utilizando-se como hospedeiros o trevo subterrâneo cv. Clare e o trevo fragífero cv. Palestine (plantas que dominam nas misturas usadas pela D.G.F.), os quais cresceram encerrados em tubos com substracto de areia adicionada de

solução de Jensen , conservados à temperatura de 15-18°C correspondendo ao período escuro e período de luz alternados com a duração de 12 horas, iluminados lateralmente com tubos fluorescentes PHILIPS TL 40W/54, fornecendo uma radiação fotossintética activa de 300 microeinstein $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, medida no exterior dos tubos .

Os isolamentos foram avaliados pelo seu índice de eficácia (E) , determinado usando a média do peso de 5 plantas ($\bar{X}$) de cada cultivar (i) por estirpe (j) , em função das testemunhas não inoculadas adicionadas de azoto (TN) e das testemunhas não inoculadas e não adicionadas de azoto (TO) , de acordo com a fórmula adaptada por MARQUES-PINTO, (inf. pessoal) .

$$E_{ij} = \frac{\bar{X}_{ij} - \bar{X}_{iTO}}{\bar{X}_{iT_N} - \bar{X}_{iTO}} \times 100$$

adoptando-se apenas duas classes de estirpes:

A- Estirpes ineficazes ou pouco eficazes , $E \leq 50\%$

B- Estirpes medianamente eficazes ou altamente eficazes, $E > 50\%$

Os ensaios decorreram ao longo de um grande espaço de tempo com uma duração média de 8 semanas .

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes aos índices de eficácia dos diferentes isolamentos distribuidos pelas classes A e B , consoante a sua origem (planta e solo), são os constantes dos quadros 1 e 2 .

Decorrendo os ensaios ao longo de um grande espaço de tempo e com duração diferente , as condições não foram perfeitamente homogéneas . Adoptamos apenas duas classes de eficácia (A e B) .

A análise da nodulação e índices de eficácia obtidos (FERREIRA,1986), mostraram que todos os isolamentos deram origem a formação de nódulos em qualquer dos hospedeiros , variando alguns entre o parasitismo e a alta eficácia, consoante o hospedeiro. Verificou-se uma grande variabilidade no comportamento dos isolamentos com determinado hospedeiro, à semelhança do verificado em Espanha por ECHEVARRIETA *et al.* (1985) para o caso das luzernas . Este aspecto é importante quando se tem em vista a produção de inoculantes.

QUADRO 1. Número de isolamentos por classe de eficácia com os trevos "Clare" e "Palestine", consoante a plan^a de origem.

ORIGEM	CLASSE DE EFICÁCIA				
	CLARE PALESTINE	A A	A B	B A	B B
<i>T. subterraneum</i> (110 isolamentos)		12	24	8	66
<i>T. angustifolium</i> (15 isolamentos)		-	2	-	13
<i>T. pratense</i> (15 isolamentos)		9	3	1	2
<i>T. sp.</i> (14 isolamentos)		-	4	-	10
<i>T. campestre</i> (4 isolamentos)		-	-	3	1
<i>T. tomentosum</i> (3 isolamentos)		1	-	-	2
<i>T. cherleri</i> (1 isolamento)		-	-	-	1
<i>T. repens</i> (1 isolamento)		-	-	-	1

QUADRO 2. Número de isolamentos por classe de eficácia com os trevos "Clare" e "Palestine", consoante o solo de origem (*).

ORIGEM	CLASSE DE EFICÁCIA				
	CLARE PALESTINE	A A	A B	B A	B B
Litossolo (71 isolamentos)		8	15	4	44
Luvissolo (50 isolamentos)		3	9	3	35
Podzol (16 isolamentos)		1	3	5	7
Cambissolo (11 isolamentos)		5	1	0	5
Regossolo + Podzol (9 isolamentos)		2	4	0	3
Ranker (6 isolamentos)		3	1	1	1

* Carta de Solos, SROA, 1:10⁶ (1971).

Os resultados (quadros 1 e 2) sugerem que a eficácia dos isolamentos é independente da planta e do solo de origem, estando de acordo com a hipótese levantada por BROCKWELL & KATZNELSON (1976), de que o tipo de solo não influencia a eficácia geral das estirpes e que as plantas (espécies) que melhor respondem com determinadas estirpes não são aquelas donde foram feitos os isolamentos .

Os isolamentos pertencem na sua grande maioria à classe B (melhor) com exceção dos obtidos de *T. pratense*, colhidos na sua quase totalidade em solos Ranker e Cambissolos , que não serão aconselhados para colheita de estirpes destinadas aos hospedeiros em causa, podendo haver nestes solos trevos que são altamente específicos simbioticamente. Refere-se ainda que os resultados poderiam ser diferentes se os hospedeiros utilizados para determinação da eficácia fossem outros.

BIBLIOGRAFIA

- BERGERSEN, F.J.; BROCKWELL, J.; GIBSON, A.H. ; SCHWINGHAMER, E.A. (1971): Studies of natural populations and mutants of *Rhizobium* in the improvement of legume inoculants . *Plant and Soil* , Special volume, p.3-16 .
- BROCKWELL, J. (1980): Experiments with crop and pasture legumes- principles and practice, in F.J. Bergersen (ed.), *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*, John Wiley & Sons , Brisbane, Australia , p. 417-489.
- BROCKWELL, J. ; KATZNELSON, J. (1976): Symbiotic characteristics of *Rhizobium trifolii* from Israel in association with 10 species of *Trifolium*. *Aust. j. Agric. Res.*, 27 , p. 799-810 .
- BROCKWELL, J. ; DIATLOFF, A. ; ROUGHLEY, R. J. ; DATE, R. A. (1982): Selection of rhizobia for inoculants , in J.M. Vincent (ed.) , *Nitrogen Fixation in Legumes*, Academic Press , Sydney , p. 173-188.
- ECHEVARRIETA, R.O. ; NAVARRO, D.N.R. ; VERA, F.T. (1985): Selección en condiciones controladas de cepas de *Rhizobium meliloti* en varias especies de *Medicago* . II Reunion Nacional de Fijación de Nitrógeno, p. 106-107, Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno , Universidad de Granada .

FERREIRA, E.M. (1986): *Inoculantes para leguminosas*. Isolamento, caracterização, estudo ecológico e selecção de estirpes de *Rhizobium trifolii* de solos portugueses . Dissertação para acesso à categoria de Investigador Auxiliar, INIA , Lisboa .

FERREIRA, E. M. ; MARQUES, J.F.(1986): Eficácia das simbioses com *Rhizobium trifolii*. Competição entre estirpes e significado dos métodos de avaliação. *Reunião de Primavera da Sociedade Portuguesa de Pastagens e Forragens*, p. 57-66, SPPF, Elvas .

LIE, T. A. (1981): Environmental physiology of legume - *Rhizobium* symbiosis, in W.J. Broughton (ed.), *Nitrogen Fixation* .Volume I. Ecology, Clarendon Press, Oxford , p.104-134.

LIE, T. A. ; GÖKTAN, D. ; ENGIN, M. ; PIJNENBORG, J. ; ANLARSAL, E. (1987) : Co-evolution of the legume - *Rhizobium* association . *Plant and Soil* , 100 , p.171-181 .

LOWE, J. F. ; HOLDING, A. J. (1970) : In *White Clover Research* , Edinburgh Sch. Agric. Misc. Publ. 458 , p.79. (cf. BROCKWELL et al. , 1982) .

VINCENT, J. M. (1970) : *A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria* , IBP 15 , Blackwell Scientific Publications , Oxford e Edinburgh.

SYMBIOTIC EFFICIENCY OF RHIZOBIUM STRAINS COLLECTED FROM INDIGENOUS
TRIFOLIUM SPECIES GROWN ON DIFFERENT PORTUGUESE SOILS .

ABSTRACT: Rhizobial strains from native clovers growing on different soil types of southern of Portugal , were evaluated for symbiotic properties with *Trifolium subterraneum* cv. Clare and *Trifolium fragiferum* cv. Palestine under controled conditions. Strain effectiveness was generally high and not related with the original host or soil .