

**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**IMPLANTAÇÃO DE ESTIRPES DE RIZÓBIO EM SOLOS DO  
ALENTEJO**

**LUÍS MANUEL CARDOSO VIEIRA ALHO**

Dissertação apresentada à Universidade de Évora  
para a obtenção do Grau de Doutor em Biologia,  
especialidade de Microbiologia.

**Orientador: José Joaquim Figueiredo Marques**  
**Investigador Principal do Instituto Nacional de Investigação Agrária (INIA)**

Esta tese não inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri

**Évora**  
**2006**

47206  
P. G.  
2774

**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**IMPLANTAÇÃO DE ESTIRPES DE RIZÓBIO EM SOLOS DO  
ALENTEJO**

**LUÍS MANUEL CARDOSO VIEIRA ALHO**

Dissertação apresentada à Universidade de Évora  
para a obtenção do Grau de Doutor em Biologia,  
especialidade de Microbiologia.



**Orientador: José Joaquim Figueiredo Marques**  
**Investigador Principal do Instituto Nacional de Investigação Agrária (INIA)**

169256

Esta tese não inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri

**Évora**  
**2006**

Ao Luís, João e Catarina,  
Tudo...

## **Agradecimentos**

Ao meu Orientador, Investigador José Figueiredo Marques, pela orientação ensinamentos, total disponibilidade e, acima de tudo, pelo que não se pode agradecer, a grande amizade dispensada ao longo destes muitos anos.

Aos Professores Mário de Carvalho e Gotlieb Bash pelos ensinamentos, pela possibilidade que me deram de com eles participar nos projectos que permitiram o desenvolvimento não só desta tese como da criação desta área de trabalho na UE e, claro está, pela amizade criada.

Á minha colega de lides da Microbiologia do Solo, Isabel Brito, à qual por não haver aqui grande espaço, simplesmente por tudo agradeço.

Á nossa Técnica de Laboratório Gertrudes Mariano pela amizade, pela paciência que lhe permitiu “picar” milhares de nódulos e pela dedicação necessárias para que tudo funcione mesmo quando o planeamento ficava apenas pela minha cabeça.

Aos alunos estagiários, hoje Engenheiros, Maria Celeste Fernandes, José Gabriel Pereira, Rogério Junceira e João Pedro Milheiro pela colaboração prestada no desenvolvimento dos ensaios de campo e pelo impacto que tiveram no “crescer” do laboratório de Microbiologia do Solo

Ás colegas Isabel Solange e Marta Laranjo por tudo o que de novo trouxeram ao laboratório

Ao Investigador Tavares de Sousa da ENMP - Elvas pela cedência das novas variedades de grão-de-bico e pela possibilidade de com elas desenvolver o estudo das suas simbioses

Ao Investigador Eugénio Ferreira da EFN – Lisboa pela cedência das estirpes para grão-de-bico disponíveis à época em Portugal

Deixo o colega Professor Luís Dias para último pois quando por fim aqui apareceu teve a capacidade única de por ordem no “caos” em que os dados resultantes deste trabalho se tornaram

Agradeço também a todos os colegas do Departamento de Biologia pois sem um grupo nada se faz neste mundo de relações

A todos os que não nomeei as minhas desculpas mas nem sempre fazemos o que devemos, o que queremos nem o que gostávamos...

A todos muito obrigado

Évora, Julho de 2006

## Índice

	pg
<b>1. Introdução Geral e Objectivos.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. A relação rizóbio leguminosa .....</b>	<b>3</b>
1.1.1. Leguminosas e sua importância agrícola.....	3
1.1.2. Rizóbio.....	4
1.1.3. A simbiose rizóbio – leguminosa.....	4
1.1.3.1. Reconhecimento.....	6
1.1.3.2. Genes de nodulação de rizóbio.....	7
1.1.3.3. Especificidade.....	8
1.1.3.4. Infecção e desenvolvimento do nódulo.....	10
1.1.3.5. A fixação do azoto.....	12
1.1.3.6. Genes da planta envolvidos na formação e desenvolvimento de nódulos.....	12
<b>1.2. O rizóbio no solo.....</b>	<b>13</b>
1.2.1. Dinâmica das populações de rizóbio no solo.....	14
1.2.1.1. A dimensão das populações de rizóbio no solo.....	14
1.2.1.2. Presença do hospedeiro.....	15
1.2.1.3. Rizóbios não infectivos na população de solo.....	16
1.2.1.4. Relações entre rizóbios e a população microbiana do solo.....	16
1.2.2. Efeito de condições físicas do solo na população de rizóbio.....	17
1.2.2.1. Interações entre rizóbio e minerais de argila.....	18
1.2.2.2. Relação entre estrutura do solo e características morfo-fisiológicas de rizóbio.....	18
1.2.2.2.1. Dimensão da célula.....	18
1.2.2.2.2. Relações Hídricas.....	19
1.2.2.2.3. Mobilidade.....	20
1.2.2.3. Temperatura.....	21
1.2.3. Influência das propriedades químicas do solo no rizóbio.....	22
1.2.3.1. A acidez do solo.....	22
1.2.3.2. Influência da acidez no crescimento e sobrevivência.....	22
1.2.3.3. Influência da acidez na formação de nódulos.....	23
1.2.3.4. Influência da acidez no funcionamento do nódulo.....	24
1.2.3.5. Influência do fósforo.....	24
1.2.3.6. Influência do cálcio.....	25
<b>1.3. Competição pela ocupação de nódulos.....</b>	<b>26</b>
1.3.1. O problema da Competição.....	26
1.3.2. Factores que afectam a competição.....	27
1.3.2.1. Factores abióticos.....	27
1.3.2.2. Factores da Planta.....	28
1.3.2.3. Quimiotaxia e mobilidade.....	29
1.3.2.4. Actividade catalítica.....	29
1.3.2.5. Velocidade de nodulação.....	30
1.3.2.6. Efectividade simbiótica.....	30
1.3.2.7. Características da superfície da célula bacteriana.....	31
1.3.2.8. Plasmídeos de rizóbio e competição.....	32
1.3.2.9. Bacteriocinas e Rhizopinas.....	33
<b>1.4. Introdução de estirpes de rizóbio.....</b>	<b>34</b>
1.4.1. Avaliação da necessidade de inoculação.....	34
1.4.2. Características das estirpes inoculantes.....	35
1.4.3. O sucesso da inoculação de leguminosas.....	36

1.5.	<b>Objectivos</b> .....	38
2.	<b>Competição de estirpes <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> num solo de pastagem</b> .....	41
2.1.	<b>Introdução</b> .....	43
2.2.	<b>Material e Métodos</b> .....	46
2.2.1.	Plantas.....	46
2.2.2.	Solo.....	46
2.2.3.	Inóculos e instalação do ensaio.....	46
2.2.3.1.	Uso de mutantes espontâneos resistentes a antibióticos.....	46
2.2.3.2.	Inóculos usados.....	48
2.2.3.3.	Sementeira.....	49
2.2.4.	Estimativas populacionais.....	49
2.2.4.1.	Viáveis nas sementes (ufc).....	49
2.2.4.2.	População nativa de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> .....	50
2.2.4.2.1.	Colheita e processamento das amostras de solo.....	50
2.2.4.2.2.	Diluições de solo e inoculação de plântulas.....	50
2.2.4.2.3.	Crescimento e observação de raízes.....	51
2.2.5.	Colheita de trevo e identificação das estirpes inoculantes.....	52
2.2.6.	Identificação da estirpe inoculante.....	52
2.2.7.	Distribuição dos nódulos ao longo da raiz.....	52
2.3.	<b>Resultados</b> .....	54
2.3.1.	População nativa de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> .....	54
2.3.2.	Capacidade competitiva das estirpes introduzidas.....	55
2.3.3.	Avaliação da distribuição dos nódulos e da estirpe de competitiva ao longo da raiz.....	56
2.3.3.1.	A cultivar (independentemente de repetições e plantas) afecta o número de nódulos?.....	57
2.3.3.2.	A Cultivar (independentemente das repetições e plantas) afecta a presença da estirpe inoculante?.....	59
2.3.3.3.	A cultivar (independentemente das repetições e plantas) afecta do inóculo quando expressa em percentagem da nodulação?.....	61
2.3.3.4.	Análises Discriminantes.....	64
2.3.3.5.	Classificações automáticas.....	66
2.3.3.5.1.	Classificação automática com base nas variáveis nódulos.....	67
2.3.3.5.2.	Classificação automática com base nas variáveis nódulos ocupados pelo inóculo.....	68
2.3.3.5.3.	Classificação automática óptima com base nas variáveis nódulos ocupados pelo inóculo.....	69
2.3.3.6.	Distribuição de nódulos e resistentes pelas diferentes zonas da raiz.....	70
2.3.3.6.1.	Cultivar Woogenellup.....	72
2.3.3.6.2.	Cultivar Geraldton.....	74
2.3.3.6.3.	Cultivar Daliak.....	74
2.3.3.6.4.	Cultivar Nungarin.....	76
2.3.3.7.	Variabilidade Intra e Inter repetições.....	77
2.4.	<b>Discussão</b> .....	83
3.	<b>Competição de estirpes <i>Mesorhizobium ciceri</i> em variedades grão de bico de sementeira Outono/Inverno</b> .....	87
3.1.	<b>Introdução</b> .....	89
3.2.	<b>Material e métodos</b> .....	92
3.2.1.	Breve descrição dos locais de ensaio.....	92

3.2.2.	Quantificação das populações nativas de <i>M. ciceri</i> .....	93
3.2.2.1.	Colheita das amostras de solo.....	93
3.2.2.2.	Diluições de solo e inoculação de plântulas.....	93
3.2.2.3.	Condições de Crescimento.....	94
3.2.2.4.	Estimativa populacional.....	95
3.2.3.	Obtenção e caracterização de mutantes espontâneos resistentes a antibióticos..	95
3.2.3.1	Seleção de mutantes espontâneas a antibióticos.....	95
3.2.3.2.	Avaliação comparativa da capacidade simbiótica .....	97
3.2.3.3.	Avaliação comparativa da capacidade competitiva .....	98
3.2.4.	Avaliação da capacidade competitiva em condições de campo .....	99
<b>3.3.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>105</b>
3.3.1.	Populações nativas de <i>Mesorhizobium ciceri</i> .....	105
3.3.2.	Seleção de mutantes espontâneos a antibióticos.....	107
3.3.3.	Avaliação comparativa da capacidade simbiótica.....	109
3.3.4.	Avaliação comparativa da capacidade competitiva.....	110
3.3.5	Avaliação da capacidade competitiva em condições de campo (Competição – Intensidade).....	115
3.3.5.1.	Análises não paramétricas.....	118
3.3.5.1.1.	A origem das estirpes (independentemente dos destinos, repetições e plantas) afecta a competição?.....	118
3.3.5.1.2.	O destino das estirpes (independentemente da origem, repetições e plantas) afecta a competição?.....	119
3.3.5.1.3.	Combinação origem / destino (independentemente das repetições e plantas) afecta a competição? .....	120
3.3.5.1.4.	Estirpes (independentemente da origem, destino, repetições e plantas) afectam a intensidade da competição?.....	121
3.3.5.2.	Análises discriminantes.....	124
3.3.5.3.	Análise das correspondências.....	130
3.3.5.4.	Classificações automáticas.....	124
3.3.5.4.1.	Partição em quatro classes (Origem das estirpes).....	135
3.3.5.4.2.	Partição em duas classes de origem idêntica segundo 3.3.5.1.1.....	136
3.3.5.4.3.	Partição em duas classes (Origem e destino igual ou diferente).....	136
3.3.5.4.4.	Partição em dez classes (Estirpes).....	137
3.3.5.4.5.	Melhor partição possível.....	136
3.3.5.5.	Validação das classificações.....	140
3.3.5.6.	Resumo final das análises realizadas.....	142
3.3.6.	Variabilidade da Competição .....	143
3.3.6.1.	A origem das estirpes (independentemente dos destinos, repetições e plantas) afecta a variabilidade da competição?.....	146
3.3.6.2.	O destino das estirpes (independentemente da origem, repetições e plantas) afecta a variabilidade da competição?.....	147
3.3.6.3.	Combinação origem / destino (independentemente das repetições e plantas) afecta a variabilidade da competição?.....	147
3.3.6.4.	Estirpes (independentemente da origem, destino, repetições e plantas) afectam a variabilidade da competição?	148
3.3.6.5.	Melhor partição possível.....	149
<b>3.4.</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>152</b>
<b>4.</b>	<b>Persistência de estirpes <i>Mesorhizobium ciceri</i> em variedades de grão de bico de sementeira Outono/Inverno .....</b>	<b>157</b>
<b>4.1.</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>159</b>



<b>4.2.</b>	<b>Material e métodos.....</b>	<b>161</b>
4.2.1.	Instalação do ensaio de persistência.....	161
4.2.2.	Quantificação de populações nativas de <i>M. ciceri</i> .....	161
4.2.2.1.	Colheita de amostras de solo.....	161
4.2.2.2.	Diluições de solo e inoculação de plântulas, condições de crescimento e estimativa populacional.....	162
4.2.2.3.	Avaliação da persistência em condições de campo.....	162
<b>4.3.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>163</b>
4.3.1.	Populações nativas de <i>Mesorhizobium ciceri</i> .....	163
4.3.2.	Capacidade competitiva das estirpes introduzidas no ano anterior.....	164
4.3.3.	Análises não paramétricas.....	168
4.3.3.1.	A origem das estirpes (independentemente dos destinos, repetições e plantas) afecta a persistência?.....	168
4.3.3.2.	O destino das estirpes (independentemente da origem, repetições e plantas) afecta a intensidade da persistência?.....	169
4.3.3.3.	Combinação origem / destino (independentemente das repetições e plantas) afecta a persistência?.....	171
4.3.3.4.	Inóculos (independentemente da origem, destino, repetições e plantas) afectam a persistência?.....	172
4.3.4.	Análises discriminantes.....	174
4.3.5.	Análise das correspondências.....	178
4.3.6.	Classificações automáticas.....	182
4.3.6.1.	Partição em quatro classes.....	182
4.3.6.2.	Partição em duas classes (origem idêntica).....	183
4.3.6.3.	Partição em três classes (destinos idênticos).....	184
4.3.6.4.	Partição em duas classes (destinos idênticos).....	185
4.3.6.5.	Partição em duas classes (origem e destino igual ou diferente).....	186
4.3.6.6.	Partição em onze classes (inóculos).....	187
4.3.6.7.	Melhor partição possível.....	188
4.3.7.	Variabilidade da Persistência.....	191
4.3.7.1.	A origem das estirpes (independentemente dos destinos, repetições e plantas) afecta a variabilidade da persistência?.....	194
4.3.7.2.	O destino das estirpes (independentemente da origem, repetições e plantas) afecta a variabilidade da persistência?.....	195
4.3.7.3.	Combinação origem / destino (independentemente das repetições e plantas) afecta a variabilidade da persistência?.....	196
4.3.7.4.	Estirpes (independentemente da origem, destino, repetições e plantas) afectam a variabilidade da persistência?.....	196
4.3.7.5.	Melhor partição possível.....	197
<b>4.4.</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>199</b>
<b>5.</b>	<b>Considerações finais.....</b>	<b>205</b>
<b>6.</b>	<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>209</b>
<b>7.</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>233</b>

## Resumo

A competição e persistência são aspectos muito importantes na selecção de estirpes de rizóbio usadas como inoculantes para leguminosas, com o objectivo de uma racional utilização agronómica da fixação biológica de azoto.

Usando quatro cultivares de trevo subterrâneo, avaliou-se a capacidade competitiva de duas estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, introduzidas num solo de pH ácido, com evidência de toxicidade por manganês e elevadas populações nativas. A estirpe isolada de um solo ácido com toxicidade de alumínio, revelou-se como a mais competitiva, mostrando a importância da origem das estirpes na capacidade competitiva, principalmente quando aplicados em solos com limitações à implantação inóculos. Estudou-se a distribuição dos nódulos e recuperação do inóculo usando técnicas estatísticas baseadas na análise discriminante, análise das correspondências e classificações automáticas, verificando-se que, apesar de não haver diferenças significativas entre cultivares, quer na formação de nódulos quer na recuperação do inóculo, verificaram-se diferenças na recuperação do inóculo em três zonas distintas da raiz, revelando que a distribuição do inóculo não é uniforme, dependendo de variações ambientais e de características do hospedeiro.

No estudo realizado usando onze estirpes de *Mesorhizobium ciceri* com diferentes locais de origem, inoculadas em grão de bico de sementeira Outono/Inverno, e introduzidas em três solos de características diferentes, albergando populações nativas muito de diferente magnitude, verificou-se que, quer a capacidade competitiva dos inóculos, quer a sua persistência no solo, foi influenciada pela origem das estirpes e pelas características dos locais de ensaio. A dimensão da população nativa presente foi determinante na implantação das estirpes nos solos estudados. A avaliação da capacidade competitiva e da persistência, aliada à variabilidade local na expressão destas características dos pares estirpe/local de ensaio e através da análise possibilitada pelas classificações automáticas, permitiu estabelecer um critério de ordenação com o objectivo de uma escolha criteriosa de inóculos em função das características do solo onde se pretenda cultivar grão de bico inoculado. Os resultados mostram que em solos com baixas populações nativas, as estirpes inoculantes implantam-se, podendo comprometer futuras respostas à inoculação com estirpes de maior eficácia fixadora de azoto.

## Abstract

Rhizobia strain competition and persistence are important aspects in the selection of inoculant strains for a rational agronomic use of biological nitrogen fixation.

Using four subclover cultivars, the competitive ability of two strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, introduced into an acid soil with evidences of manganese toxicity and high numbers of native rhizobia, were evaluated. The inoculant strain originated from a soil with low pH and aluminium toxicity, was the most recovered one, showing its competitive capacity and the importance of strain origin on competition for nodule occupation, specially when to be used as inoculum in soils showing limiting factors for strain establishment. No differences were detected between cultivars in nodule formation or inoculant recover. However, differences between cultivars were detected in nodule occupancy by the competitive strain in three of the root zones, indicating that inoculant distribution is not uniform along the root system and is influenciaded by environmental conditions and host characteristics at the time of nodule initiation.

In the study of the competitive and persistence ability of eleven *Mesorhizobium ciceri* strains, with different origins, inoculated on a Winter sown chickpea variety, in three different soils, the strains showed differences in the percentage of inoculant recovery, depending on their origin and on the soils characteristics of the experimental site. The size of native population present in these soils seems to be the most important factor determining strain establishment. The evaluation of competition and persistence of the strains, together with the estimated local variability, analysed by the automatic classification method, permitted a rank organization of the pairs strain/experimental field in order to set a criteria to choose the best strain according to local conditions. Results showed that in the soil with low numbers of native population, almost all the tested strains were established and this can compromise future responses to field inoculations with superior strains in symbiotic nitrogen fixation efficiency with winter sown chickpea.

## Índice de Figuras

	pg
<b>Figura 1.1.</b> Diagrama representativo das interacções moleculares conducentes à formação de nódulos em leguminosas.....	11
<b>Figura 2.1.</b> Zonagem da raiz de trevo subterrâneo para colheita de nódulos e caracterização da sua distribuição.....	53
<b>Figura 2.2.</b> Distribuição observada e esperada das cultivares (Woogenellup, Geraldton, Daliak e Nungarin) com base em nódulos.....	68
<b>Figura 2.3.</b> Distribuição observada e esperada das cultivares (Woogenellup, Geraldton, Daliak e Nungarin) com base nas variáveis nódulos ocupados pelo inóculo.....	69
<b>Figura 2.4.</b> Classificação óptima das cultivares (Woogenellup, Geraldton, Daliak e Nungarin) com base nódulos ocupados pelo inóculo.....	70
<b>Figura 2.5.</b> Distribuição da nodulação e presença da estirpe inoculante (resistentes) nas diferentes zonas da raiz resultante da melhor partição possível na análise das correspondências. <b>Variedade Woogenellup</b> .....	73
<b>Figura 2.6.</b> Distribuição da nodulação e presença da estirpe inoculante (resistentes) nas diferentes zonas da raiz resultante da melhor partição possível na análise das correspondências. <b>Variedade Geraldton</b> .....	75
<b>Figura 2.7.</b> Distribuição da nodulação e presença da estirpe inoculante (resistentes) nas diferentes zonas da raiz resultante da melhor partição possível na análise das correspondências. <b>Variedade Daliak</b> .....	76
<b>Figura 2.8.</b> Distribuição da nodulação e presença da estirpe inoculante (resistentes) nas diferentes zonas da raiz resultante da melhor partição possível na análise das correspondências. <b>Variedade Nungarin</b> .....	77
<b>Figura 2.9.</b> Variabilidade Intra/Inter Repetições nos diferentes locais de nodulação da raiz na cultivar <b>Woogenellup</b> .....	79
<b>Figura 2.10.</b> Variabilidade Intra/Inter Repetições nos diferentes locais de nodulação da raiz na cultivar <b>Geraldton</b> . .....	80
<b>Figura 2.11.</b> Variabilidade Intra/Inter Repetições nos diferentes locais de nodulação da raiz na cultivar <b>Daliak</b> . .....	81
<b>Figura 2.12.</b> Variabilidade Intra/Inter Repetições nos diferentes locais de nodulação da raiz na cultivar <b>Nungarin</b> . .....	82
<b>Figura 3.1.</b> Organização dos ensaio de competição de estirpes em grão de bico. Herdade do Almocreva. Beja.....	101
<b>Figura 3.2.</b> Organização do ensaio de competição de estirpes em grão de bico. Herdade das Casas Velhas. Elvas.....	102
<b>Figura 3.3.</b> Organização dos ensaio de competição de estirpes em grão de bico. Herdade Fundação Eugénio de Almeida. Évora.....	103

<b>Figura 3.4.</b> Relação entre % mutantes no inóculo e nódulos ocupados pelo mutante no nível intermédio de representação.....	<b>112</b>
<b>Figura 3.5.</b> Relação entre proporção de mutante no inóculo e proporção de nódulos formados pelos mutantes em todos os pares original : mutante .....	<b>113</b>
<b>Figura 3.6.</b> Representação gráfica da proporção de inóculo recuperado em cada um dos locais de ensaio. ....	<b>117</b>
<b>Figura 3.7.</b> Desvios-padrão centrados total e intra-repetições em função do desvio padrão centrado inter-repetições. ....	<b>126</b>
<b>Figura 3.8.</b> Valores próprios em função dos eixos factoriais. ....	<b>131</b>
<b>Figura 3.9.</b> Distância de $\chi^2$ dos indivíduos em função do seu peso relativo.....	<b>131</b>
<b>Figura 3.10.</b> Distância de $\chi^2$ das variáveis em função do seu peso relativo.....	<b>132</b>
<b>Figura 3.11.</b> Representação dos indivíduos e variáveis nos dois primeiros eixos factoriais. ....	<b>134</b>
<b>Figura 3.12.</b> Distribuição esperada e observada da origem das estirpes (Beja, Elvas, Évora e ICARDA).....	<b>135</b>
<b>Figura 3.13.</b> Distribuição esperada e observada da origem das estirpes (Beja e ICARDA, Elvas e Évora), considerando as classes resultado dos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.....	<b>136</b>
<b>Figura 3.14.</b> Distribuição esperada e observada da origem e destino das estirpes ser igual ou diferente.....	<b>137</b>
<b>Figura 3.15.</b> Distribuição esperada e observada para as estirpes.....	<b>138</b>
<b>Figura 3.16.</b> Resultado da melhor classificação possível.....	<b>139</b>
<b>Figura 3.17.</b> Validação das classificações automáticas. Efeito nas melhores classificações ao retirar uma das repetições.....	<b>141</b>
<b>Figura 3.18.</b> Organização geral da análise e métodos estatísticos usados no ensaio de competição em condições de campo.....	<b>142</b>
<b>Figura 3.19.</b> Representação gráfica da média dos desvios padrão, representando a variabilidade da competição dos diferentes inóculos em cada um dos locais de ensaio.....	<b>145</b>
<b>Figura 3.20.</b> Resultado da melhor classificação possível.....	<b>150</b>
<b>Figura 3.21.</b> Resultado da junção das duas classes de menor variabilidade da competição obtidas da melhor classificação possível.....	<b>151</b>
<b>Figura 4.1.</b> Representação gráfica da proporção média de inóculo recuperado em cada um dos locais de ensaio, 18 meses após inoculação das sementes. ....	<b>166</b>
<b>Figura 4.2</b> Representação gráfica da proporção média de inóculo em cada um dos locais de ensaio representando os valores de competição e persistência.....	<b>167</b>

<b>Figura 4.3.</b> Desvios-padrão total e intra-repetições em função do desvio-padrão inter-repetições. ....	<b>175</b>
<b>Figura 4.4.</b> Valores próprios em função dos eixos factoriais.....	<b>179</b>
<b>Figura 4.5.</b> Distância de $\chi^2$ dos indivíduos em função do seu peso relativo. ....	<b>180</b>
<b>Figura 4.6.</b> Distância de $\chi^2$ das variáveis em função do seu peso relativo.....	<b>180</b>
<b>Figura 4.7.</b> Representação dos indivíduos e variáveis nos dois primeiros eixos factoriais, com indicação dos indivíduos e variáveis que caracterizam os dois eixos .....	<b>181</b>
<b>Figura 4.8.</b> Partição em 4 classes. Distribuição esperada e observada da origem das estirpes (Beja, Elvas, Évora e ICARDA) .....	<b>183</b>
<b>Figura 4.9.</b> Partição em duas classes. Distribuição esperada e observada da origem das estirpes (Beja+Évora, Elvas+ICARDA).....	<b>184</b>
<b>Figura 4.10.</b> Partição em 3 classes. Distribuição esperada e observada do destino das estirpes (Beja, Elvas e Évora).....	<b>185</b>
<b>Figura 4.11.</b> Partição em duas classes. Distribuição esperada e observada do destino das estirpes (Beja+Elvas, Évora).....	<b>185</b>
<b>Figura 4.12.</b> Partição em 2 classes. Distribuição esperada e observada da origem e destino das estirpes ser igual ou diferente.....	<b>186</b>
<b>Figura 4.13.</b> Partição em 11 classes. Distribuição esperada e observada das estirpes.....	<b>187</b>
<b>Figura 4.14.</b> Resultado da melhor classificação possível.....	<b>188</b>
<b>Figura 4.15.</b> Resultado da junção das duas classes de menor intensidade de persistência obtidas da melhor classificação possível.....	<b>190</b>
<b>Figura 4.16.</b> Representação gráfica da média dos desvios padrão, representando a variabilidade da persistência dos diferentes inóculos em cada um dos locais de ensaio.....	<b>193</b>
<b>Figura 4.17</b> Resultado da melhor classificação possível.....	<b>198</b>
<b>Figura 4.18.</b> Junção das classificações automáticas para a competição, variabilidade de competição, persistência e variabilidade de persistência, com ordenação decrescente das classes de competição. ...	<b>207</b>

## Índice de Quadros

	pg
<b>Quadro 1.1.</b> Famílias e géneros presentemente referenciados para as bactérias conhecidas como rizóbio, adaptado de Sawada <i>et al.</i> (2003).....	5
<b>Quadro 2.1.</b> Estratégias de amostragens de nódulos para a caracterização dos ocupantes em estudos de competição de estirpes seguidas por vários autores.....	45
<b>Quadro 2.2.</b> Algumas características das estirpes <i>R. leguminosarum</i> <i>bv.</i> <i>trifolii</i> usadas no ensaio.....	49
<b>Quadro 2.3.</b> População de <i>R. leguminosarum</i> <i>bv.</i> <i>trifolii</i> no local de ensaio segundo repetições e profundidade (ufn g <sup>-1</sup> de solo).....	54
<b>Quadro 2.4.</b> População de inóculo por semente (ufc/semente).....	55
<b>Quadro 2.5.</b> Número de nódulos recolhidos em cada cultivar (Nº Nod) e percentagem de nódulos ocupados (%R) por cada uma das estirpes A e B. ....	55
<b>Quadro 2.6.</b> Número de nódulos e proporção de nódulos ocupados pela estirpe B (%R) em cada repetição.....	57
<b>Quadro 2.7.</b> Parâmetros estatísticos das variáveis em que não se detectaram diferenças significativas no nº de nódulos entre as cultivares, independentemente das repetições e plantas.....	58
<b>Quadro 2.8.</b> Parâmetros estatísticos para o nº de nódulos na zona PA. Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente.....	59
<b>Quadro 2.9.</b> Parâmetros estatísticos das variáveis em que não se detectaram diferenças significativas na presença da estirpe inoculante entre as cultivares, independentemente das repetições e plantas.....	60
<b>Quadro 2.10.</b> Parâmetros estatísticos para o nº resistentes nas zonas RLAA, RPC, RLCA e R - Somatório das recuperações de inóculo absolutas.....	61
<b>Quadro 2.11.</b> Parâmetros estatísticos das variáveis em que não se detectaram diferenças significativas na percentagem de resistentes entre as cultivares, independentemente das repetições e plantas.....	63
<b>Quadro 2.12.</b> Parâmetros estatísticos para a percentagem de resistentes nas zonas RNLAA, RNPC e RN - Somatório da percentagem de resistentes absolutos.....	64
<b>Quadro 2.13.</b> Análise discriminante para as variáveis nódulos e presença da estirpe inoculante. Quatro classes (Woogenellup, Geraldton, Daliak e Nungarin).....	65
<b>Quadro 3.1.</b> Eficiência simbiótica (%) de estirpes <i>M. ciceri</i> testadas em variedades regionais e em variedades melhoradas para sementeira antecipada. ....	91
<b>Quadro 3.2</b> – Características químicas dos solos nos locais de ensaio.....	92
<b>Quadro 3.3.</b> Identificação de estirpes usadas nos ensaios, sua origem e actividade nitrogenásica medida pela técnica da redução do acetileno .....	96

<b>Quadro 3.4.</b> Estimativas populacionais de <i>M. ciceri</i> nos solos e repetições dos locais de ensaio, avaliadas pela técnica de infecção de plantas para determinação do Número Mais Provável (MPN).....	<b>106</b>
<b>Quadro 3.5.</b> Colónias obtidas inoculando 0.1 ml de uma suspensão inicial de 10 <sup>9</sup> células por ml. Valores assinalados representam a placa de onde se partiu para o passo seguinte na selecção para 2 <sup>a</sup> marcação ou uso do de mutante com resistência única.....	<b>108</b>
<b>Quadro 3.6.</b> Eficiência Simbiótica de mutantes resistentes a antibióticos comparados com as suas estirpes originais. ....	<b>109</b>
<b>Quadro 3.7.</b> Competição de mutantes versos estirpes originais em diferentes proporções no inóculo.....	<b>111</b>
<b>Quadro 3.8.</b> Proporção média e erro padrão da média para os nódulos ocupados pelos inóculos nos locais de ensaio de Beja, Elvas e Évora.....	<b>116</b>
<b>Quadro 3.9.</b> Proporção média da recuperação de inóculos de diferente origem independentemente de locais de ensaio (destinos), repetições e plantas.....	<b>118</b>
<b>Quadro 3.10.</b> Proporção média da recuperação de inóculos de diferente origem independentemente de locais de ensaio (destinos) repetições e plantas não considerando as variáveis E2B, E2E, E2V e V1E. ....	<b>119</b>
<b>Quadro 3.11.</b> Proporção média da recuperação de inóculos nos diferentes destinos independentemente da origem, repetições e plantas.....	<b>119</b>
<b>Quadro 3.12.</b> Proporção média da recuperação de inóculos nos diferentes destinos independentemente da origem, repetições e plantas, retirando da análise as variáveis E2B, E2E, E2V e V1E. ....	<b>120</b>
<b>Quadro 3.13.</b> Proporção média da recuperação de nódulos para a combinação origem / destino iguais ou diferentes. ....	<b>121</b>
<b>Quadro 3.14.</b> Proporção média da recuperação de nódulos para a combinação origem / destino iguais ou diferentes retirando da análise as variáveis E2B, E2E, E2V e V1E. ....	<b>121</b>
<b>Quadro 3.15.</b> Proporção média da recuperação de inóculos (independentemente da origem, destino, repetições e plantas). As letras resultam do teste de U de Mann-Whitney.....	<b>122</b>
<b>Quadro 3.16.</b> Proporção média da recuperação de inóculos (independentemente da origem, destino, repetições e plantas, retirando da análise as variáveis E2B, E2E, E2V e V1E. ....	<b>123</b>
<b>Quadro 3.17.</b> Análise discriminante para a competição considerando as classes de origem, destino e estirpes, bem como as definidas nas análises não paramétricas.....	<b>129</b>
<b>Quadro 3.18.</b> Média dos desvios padrão e erro padrão da média como medida da variabilidade da competição nos diferentes locais de ensaio, Beja, Elvas e Évora.....	<b>144</b>
<b>Quadro 3.19.</b> Variabilidade na recuperação de inóculos de diferente origem independentemente de locais de ensaio (destinos) repetições e plantas não considerando as variáveis E2B, E2E, E2V, B4V e V1E.....	<b>146</b>



<b>Quadro 3.20.</b> Variabilidade na recuperação de inóculos de diferentes destinos, independentemente da origem, repetições e plantas não considerando as variáveis E2B, E2E, E2V, B4V e V1E. ....	<b>147</b>
<b>Quadro 3.21.</b> Variabilidade na recuperação de inóculo para a combinação origem / destino igual ou diferente, não considerando as variáveis E2B, E2E, E2V, B4V e V1E. ....	<b>148</b>
<b>Quadro 3.22.</b> Variabilidade na recuperação de inóculo para as estirpes (independentemente da origem, destino, repetições e plantas, retirando da análise as variáveis E2B, E2E, E2V e V1E. ....	<b>149</b>
<b>Quadro 4.1.</b> Estimativas populacionais de <i>M. ciceri</i> nos solos e repetições dos locais de ensaio, avaliadas pela técnica de infecção de plantas para determinação do Número Mais Provável (MPN), no segundo ano de ensaio (ensaio de persistência).....	<b>163</b>
<b>Quadro 4.2.</b> Proporção média e erro padrão da média para os nódulos ocupados pelos inóculos nos locais de ensaio de Beja, Elvas e Évora no ano seguinte à sua introdução.....	<b>165</b>
<b>Quadro 4.3.</b> Proporção média da recuperação de inóculos de diferente origem independentemente de locais de ensaio, repetições e plantas. ....	<b>168</b>
<b>Quadro 4.4.</b> Proporção média da recuperação de inóculos de diferente origem independentemente de locais de ensaio, repetições e plantas não considerando as variáveis V2B, B3E, E1E, E3E, V1E.....	<b>169</b>
<b>Quadro 4.5.</b> Proporção média da recuperação de inóculos nos diferentes destinos independentemente da origem, repetições e plantas. ....	<b>170</b>
<b>Quadro 4.6.</b> Proporção média da recuperação de inóculos nos diferentes destinos independentemente de locais de ensaio, repetições e plantas não, considerando as variáveis V2B, B3E, E1E, E3E, V1E, I2E. ....	<b>170</b>
<b>Quadro 4.7.</b> Proporção média de recuperação de inóculo para a combinação origem / destino iguais ou diferentes.....	<b>171</b>
<b>Quadro 4.8.</b> Proporção média da recuperação de inóculo para a combinação origem / destino iguais ou diferentes retirando da análise as variáveis V2B, B3E, E1E, E3E e V1E. ....	<b>171</b>
<b>Quadro 4.9.</b> Proporção média da recuperação de inóculo independentemente da origem, destino, repetições e plantas. ....	<b>172</b>
<b>Quadro 4.10.</b> Proporção média da recuperação de nódulos ocupados por inóculos independentemente da origem, destino, repetições e plantas, retirando da análise as variáveis V2B, B3E, E1E, E3E e V1E. ....	<b>173</b>
<b>Quadro 4.11.</b> Análise discriminante para a persistência considerando as classes de origem, destino e estirpes, bem como as definidas pelas análises não paramétricas. ....	<b>177</b>
<b>Quadro 4.12.</b> Média dos desvios padrão e erro padrão da média como medida da variabilidade da persistência nos diferentes locais de ensaio, Beja, Elvas e Évora.....	<b>192</b>
<b>Quadro 4.13.</b> Variabilidade na recuperação de inóculos de diferente origem independentemente de locais de ensaio (destinos) repetições e plantas não considerando as variáveis V1B, V2B,B3E,E1E e V1E. ....	<b>194</b>

<b>Quadro 4.14.</b> Variabilidade na recuperação de inóculos de diferentes destinos, independentemente da origem, repetições e plantas não considerando as variáveis V1B, V2B,B3E,E1E e V1E. ....	<b>195</b>
<b>Quadro 4.15.</b> Variabilidade na recuperação de inóculo para a combinação origem / destino igual ou diferente, não considerando as variáveis V1B, V2B,B3E,E1E e V1E.....	<b>196</b>
<b>Quadro 4.16.</b> Variabilidade na recuperação de inóculo para as estirpes (independentemente da origem, destino, repetições e plantas, retirando da análise as variáveis V1B, V2B, B3E, E1E e V1E. ....	<b>197</b>

## **1. Introdução Geral e Objectivos**



## **1. Introdução Geral e Objectivos**

### **1.1. A relação rizóbio leguminosa**

#### **1.1.1. Leguminosas e sua importância agrícola**

As plantas normalmente conhecidas como leguminosas pertencem à família *Leguminosae* que compreende cerca de 12000 espécies distribuídas por 3 subfamílias, *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae* e *Pappilionoideae* (Postgate, 1982). As leguminosas têm uma distribuição global sendo há muito usadas pelo homem como fonte de alimentos (Hadri *et al*, 1998; Howieson *et al.*, 2000b). Muitas leguminosas têm a capacidade de fixar o azoto atmosférico (N<sub>2</sub>) em estruturas nodulares que formam nas suas raízes resultado, da simbiose que estabelecem com bactérias do solo normalmente designadas por rizóbios (Sprent, 2001). A associação simbiótica entre leguminosas e rizóbio tem um papel importante na produtividade agrícola mundial, convertendo cerca de 120 milhões de toneladas de azoto atmosférico em formas assimiláveis pelas plantas (Freiberg *et al*, 1997).

A importância da fixação biológica de azoto para a produção alimentar mundial é inquestionável. As leguminosas usadas desde os primórdios da agricultura nos mais variados sistemas, incluem espécies de proteaginosas, oleaginosas e forrageiras, importantes na alimentação humana e animal (Howieson, 1999; Francis, 1999), na melhoria de características da estrutura do solo tais como porosidade, estabilidade de agregados e retenção de água (Greenland, 1971) e no incremento da fertilidade do solo (Brockwell e Bottomley, 1995; van Kessel e Hartley, 2000).

Os cerca de 6 biliões de seres humanos que actualmente povoam o planeta consomem uma média de 11g de N nos alimentos por dia, ou seja, cerca de 24 milhões de toneladas por ano (Fink *et al*, 1999). A produção mundial de leguminosas garante cerca de 33% das necessidades da humanidade em N, no entanto, este valor pode-se elevar a cerca de 80% das necessidades, nas regiões tropicais e subtropicais. As leguminosas ocupam aproximadamente 275 milhões de hectares ou seja, perto de 11% das terras aráveis (Hartley, 2000; Kinzigt, Socolow, 1994).

### 1.1.2 Rizóbio

As bactérias do solo que formam simbioses fixadoras de azoto, normalmente designadas por rizóbios, são microsimbiontes facultativos que podem infectar raízes de muitas espécies de leguminosas (mas não de todas) formando nódulos passíveis de realizar a fixação simbiótica de azoto atmosférico, transformando-o em formas assimiláveis pelas plantas (Herridge *et al.*, 2001; Sessitsch *et al.*, 2002). Os rizóbios são bactérias Gram negativas, móveis, com morfologias variáveis (pleomorficas) sendo a mais frequente a de pequenos bastonetes (Jordan, 1984). É frequente apresentarem a formação de grânulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato como substância de reserva quando em crescimento em meios ricos em carbono, sendo bactérias aeróbias usam oxigénio como aceitador final de electrões (Jordan, 1984).

Presentemente são reconhecidas 44 espécies de rizóbio distribuídas por 12 géneros englobados principalmente na classe  $\alpha$ -*Proteobacteria* (Sawada *et al.*, 2003), tendo sido também referidos casos de nodulação de leguminosas por membros da classe  $\beta$ -*Proteobacteria* (Vandamme *et al.*, 2002), o que revela uma origem polifiletica das bactérias rizóbio (Young, 1996). No Quadro nº 1 apresentam-se as famílias e géneros propostos por Sawada *et al.* (2003), para a classificação de rizóbios bem como exemplos de espécies de bactérias e hospedeiros com os quais têm sido referenciadas relações simbióticas efectivas.

### 1.1.3. A simbiose rizóbio – leguminosa

O estabelecimento de qualquer interacção simbiótica necessita de um elevado nível de compatibilidade entre os simbiontes e no caso da simbiose entre rizóbio e leguminosas esta compatibilidade deverá ocorrer desde os primeiros estádios da relação até à diferenciação do nódulo ( Long e Ehrhardt, 1989). A fixação de  $N_2$  atmosférico é o culminar de um longo processo de diálogo químico entre a bactéria e o seu hospedeiro, que resultará no desenvolvimento de um novo “organito” no interior da célula hospedeira conhecido como simbiossoma, sede dos processos bioquímicos que conduzem à fixação de  $N_2$  pela bactéria e utilização pelo hospedeiro dos compostos azotados resultantes (Hadri *et al.*, 1998).

**Quadro 1.1.** Famílias e gêneros presentemente referenciados para as bactérias conhecidas como rizóbio, adaptado de Sawada *et al.* (2003).

Classe	Família	Gênero	Algumas espécies	Exemplo de hospedeiro	
<i>α-Proteobacteria</i>	<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Rhizobium</i>	<i>Erti</i> bv. <i>phaseoli</i> <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Trifolium spp</i> <i>M. sativa</i> ; <i>Acacia senegal</i>	
		<i>Allorhizobium</i>	<i>A. undicola</i>		
		<i>Sinorhizobium</i>	<i>S. fredii</i> <i>S. meliloti</i> <i>S. terengae</i> bv. <i>sesbaniae</i> bv. <i>acaciae</i> <i>E. adhaerens</i>	<i>Cajanus cajan</i> , <i>Glycine soja</i> , <i>Vigna unguiculata</i> <i>Melilotus spp.</i> , <i>Medicago spp.</i> , <i>Trigonella spp.</i> <i>Sesbania grandiflora</i> , <i>S. pubescens</i> <i>Acacia senegal</i> , <i>Leucaena leucocephala</i> <i>Sesbania grandiflora</i> , <i>Leucaena leucocephala</i>	
	<i>Phyllobacteriaceae</i>	<i>Ensifer</i>			
		<i>Mesorhizobium</i>	<i>M. ciceri</i> <i>M. loti</i> <i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i> <i>Lotus corniculatus</i> , <i>L. japonicum</i> , <i>Lupinus spp.</i> <i>Cicer arietinum</i>	
		<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. elkani</i> <i>B. japonicum</i>	<i>Glycine spp.</i> , <i>Vigna spp.</i> <i>Glycine spp.</i> , <i>Macroptilium atropurpureum</i>	
		<i>Blastobacter</i>	<i>B. denitrificans</i>	<i>Aeschynomene indica</i>	
		<i>Photrhizobium*</i>	<i>P. thompsonianum</i>	<i>Aeschynomene indica</i>	
		<i>Methylobacterium</i>	<i>M. nodulans</i>	<i>Crotalaria podocarpa</i> , <i>C. perrottetii</i>	
		<i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Azorhizobium</i>	<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
			<i>Devosia</i>	<i>D. neptunea</i>	<i>Neptunia natans</i>
			<i>Burkholderia</i>	<i>B. tuberum</i>	<i>Aspalathus carnosa</i>
		<i>β-Proteobacteria</i>	<i>Ralstonia</i>	<i>R. taiwanensis</i>	<i>Mimosa pudica</i> , <i>M. diplotrichia</i>

\* - Este gênero por possuir capacidade quer para fixar azoto quer para realizar fotossíntese poderá ser considerado como independente.

### 1.1.3.1. Reconhecimento

Em condições naturais um primeiro evento no estabelecimento da relação está relacionado com o número de bactérias necessário ao início da relação. Todas as plantas produzem no seu desenvolvimento radical exsudados que constituem um estímulo à actividade microbiana no solo, particularmente na rizosfera. Este estímulo, conhecido como efeito rizosférico, é particularmente evidente nas bactérias rizóbio perante exsudados de leguminosas (Parker, 1977), mas também evidente para muitos outros organismos da rizosfera (Perret *et al.*, 2000). Apenas alguns organismos poderão realizar o passo decisivo para o estabelecimento da simbiose através da penetração na raiz do hospedeiro, pelo que um elaborado mecanismo de reconhecimento terá de existir. A comunicação e reconhecimento molecular entre macro e microsimbionte é realizada por troca de sinais químicos entre ambos. Os mediadores químicos envolvidos neste diálogo molecular incluem flavonoídes, factores Nod, polissacarídeos de superfície e proteínas extracelulares (Broughton *et al.*, 2000; Perret *et al.*, 2000; Rélic *et al.*, 1994).

As lectinas são proteínas da planta com capacidade de se ligarem especificamente a receptores de superfície de bactérias e têm um papel na adsorção à raiz e à especificidade no desenvolvimento de nódulos (Long e Ehrhardt, 1989). Diaz *et al* (1989) ao introduzir genes para a síntese de lectina de *P. sativum* em *Trifolium repens* demonstrou que as raízes de *T. repens* transgénico nodularam com êxito, quando inoculadas com *R. leguminosarum* bv. *viciae*, bactéria específica de *P. sativum* incapaz de nodular *T. repens* em condições normais.

Em várias estirpes de vários géneros de rizóbio tem sido detectada presença de um sistema de secreção tipo III (TTSS) usado para o envio de “mensagens” químicas a células eucariotas com as quais interactivam quer em relações simbióticas mutualistas quer parasíticas (Marie *et al*, 2003; Saad *et al*, 2005). O equipamento TTSS é normalmente composto por cerca de 20 proteínas que formam um complexo na membrana bacteriana através do qual transitam proteínas intactas drenadas para o ambiente exterior. Estas proteínas têm como principais funções subverter o metabolismo do hospedeiro (Cornelis e Van Gijsegem, 2000), permitir o trânsito de sinais químicos através da membrana plasmática da célula eucariota (Büttner e Bonas, 2002) e mediar a indução de genes no hospedeiro (Hueck, 1998). As proteínas de rizóbio segregadas por esta via têm um papel na nodulação sendo designadas por proteínas exteriores de nodulação, *nops* (Marie *et al*, 2003). Tem sido referenciado que as *nops* influenciam a nodulação, o número de nódulos na planta hospedeira assim como a efectividade dos nódulos formados (Viprey *et al*, 1998; Krishnen, 2002; Ausmees, 2004).



Exopolissacarídeos (EPS), produzidos por rizóbio também influenciam o desenvolvimento de nódulos e estabelecimento da simbiose (Becker e Pühler, 1998).

Compostos flavonoídes e derivados de 2-fenil-1,4-benzopirona segregados pelas plantas constituem o principal sinal indutor de resposta por parte do rizóbio (Perret *et al.*, 2000). A resposta do rizóbio a estes estímulos é constituída por sinais morfológicos globalmente referenciados como “factores Nod”.

Os factores Nod são lipo-chito-oligosacarídeos com uma estrutura base de N-acetilglucoseamina que pode ser ligeiramente modificada por vários radicais químicos (Downie, 1998). O tipo de factor Nod produzido tem um papel significativo na especificidade e gama de hospedeiros uma vez que induzem a planta a reconhecer certos rizóbios e assim facilitar a sua penetração na raiz (Broughton *et al.*, 2000, Parnisk e Downie, 2003).

Os receptores nas leguminosas para os factores Nod produzidos por rizóbio são constituídos por um conjunto de cinases receptoras (Limpens *et al.*, 2003; Madsen *et al.*, 2003). As cinases são controladores de vias enzimáticas ou de sinalização que actuam pela adição de grupos fosfato a proteínas (Parniske e Downie, 2003). Os genes NFR1, NFR2 (em *Lotus japonicus*) e LYK (em *Pisum sativum*) codificam cinases com sequencias de ácidos aminados LysMet extracelulares (Madsen *et al.*, 2003, Limpens, *et al.*, 2003), que provavelmente reconhecem factores Nod ligado-se a polímeros contendo N-acetilglucoseamina (Amon *et al.*, 1998; Bateman e Bycroft, 2000), indicando que estas cinases terão um papel importante no reconhecimento.

### 1.1.3.2. Genes de nodulação de rizóbio

Os genes de rizóbio envolvidos na nodulação e sua regulação são normalmente designados como genes *nod*. Estes genes necessários para a nodulação podem estar localizados em plasmídeos (Hynes e MacGregor, 1990; Barnett *et al.*, 2001; Finan *et al.*, 2001), no cromossoma bacteriano (Kaneko *et al.*, 2000) ou em “ilhas” simbióticas móveis integradas no cromossoma (Sullivan *et al.*, 2002). Cerca de cinquenta genes envolvidos na nodulação têm sido identificados, pelo que são divididos, com base nas suas funções em cinco diferentes categorias; (a) genes de regulação, (b) genes envolvidos na biossíntese e modificação de factores Nod, (c) genes envolvidos na secreção de factores Nod (d) genes envolvidos na secreção de proteínas e (e) genes sem função ainda definida (Downie, 1998).

Os genes *nodA*, *nodB*, *nodC*, *nodD*, *nodI* e *nodJ* são muito comuns e presentes em todos os rizóbios estudados. Outros genes *nod* estão apenas presentes em certos grupos, espécies ou mesmo estirpes. Por exemplo, *nodX* apenas está presente em *R. leguminosarum* bv. *viciae* estirpe TOM (Firmin *et al.*, 1993). Alguns dos genes de nodulação como *nodA*, *nodB* e *nodC* estão presentes em cópias únicas enquanto sequências paralogas se encontram noutros locais do genoma para *nodD*, *nodP*, *nodQ* e *nodT* (Surin e Downie, 1988; Baev *et al.*, 1991; Rivilla e Downie, 1994). Os genes de nodulação encontram-se frequentemente agregados numa pequena região do genoma, estando organizados em operões conservados presentes nalgumas espécies de rizóbio (Downie, 1998). A organização física dos genes de nodulação, isto é, a sua sequência, é muito variável entre géneros e espécies. Por exemplo, em *R. leguminosarum* e em *S. meliloti*, os genes *nodA*, *nodB*, *nodC* estão localizados num operão por esta ordem (Downie, 1998), enquanto em *M. loti*, *nodA* e *nodC* estão juntos no operão e *nodB* está separado e localizado a jusante do operão (Sullivan, *et al.*, 2002), e em rizóbios que nodulam *Astragalus sinicus* os genes *nodB* e *nodC* estão separados de *nodA* (Zhang *et al.*, 2000).

### 1.1.3.3. Especificidade

A nodulação de leguminosas resulta de uma intensa troca de sinais químicos entre os simbiontes pelo que a especificidade da interacção simbiótica é controlada em muitos níveis. O tipo de flavonóides produzido pela célula hospedeira, os genes de nodulação presentes no rizóbio e o(s) tipo(s) de factores Nod produzidos são alguns dos factores que determinam a especificidade da relação simbiótica, bem como a gama de hospedeiros noduláveis por uma estirpe de rizóbio.

A sequência de DNA do gene *nodD* difere consideravelmente nas diferentes espécies de rizóbio (Downie, 1994), pelo que poderemos considerar que diferentes espécies produzem diferentes proteínas NodD em resposta a diferentes tipos de flavonóides da planta. Em *Rhizobium* sp. estirpe NGR234, rizóbio de largo espectro de hospedeiros, a proteína NodD1 reconhece uma larga gama de flavonóides, e a transferência do gene *nodD1* da estirpe NGR234 para estirpes de gama de hospedeiros restrita, mostrou um aumento do espectro de hospedeiros das estirpes de rizóbio transformadas, pelo que um nível inicial da especificidade estará controlado pelo gene *nodD* de rizóbio (Bender *et al.*, 1988).

Na presença de indutores flavonóides as proteínas NodD ou SyrM regulam a fase inicial da nodulação pela activação da transcrição de outros genes *nod* (Roche *et al.*, 1996; Dowie, 1998). SyrM, identificado em *S. meliloti*, é bastante semelhante às proteínas NodD, e ambos os tipos de proteínas actuam como sensores de sinais da planta e activadoras transcripcionais (Barnett e Long, 1990; Schlaman *et al.*, 1992; Schell, 1993). As proteínas NodD e SyrM induzem a transcrição do operão *nodABC* em rizóbio, pela ligação à “Nod-box” na região promotora deste operão. A estirpe de largo espectro de hospedeiros, NGR234 de *Rhizobium* sp., contem 19 diferentes sequências homólogas para a “Nod-box” criando assim as condições para um ajustamento muito fino para a expressão dos genes *nod*, em função das características dos indutores do hospedeiro, determinando a importância de “Nod-box” no controlo da especificidade simbiótica (Perret *et al.*, 2000).

Um outro nível para a determinação da especificidade de hospedeiro envolve o tipo de factores Nod produzido por rizóbio. Os genes *nod* comuns, *nodA*, *nodB* e *nodC*, são responsáveis pela síntese do núcleo central do factor Nod. Apesar destes genes serem comuns a todos os rizóbios, as suas sequências podem ser variáveis entre espécies de rizóbios e isto tem sido apontado como importante para a especificidade (Roche *et al.*, 1996).

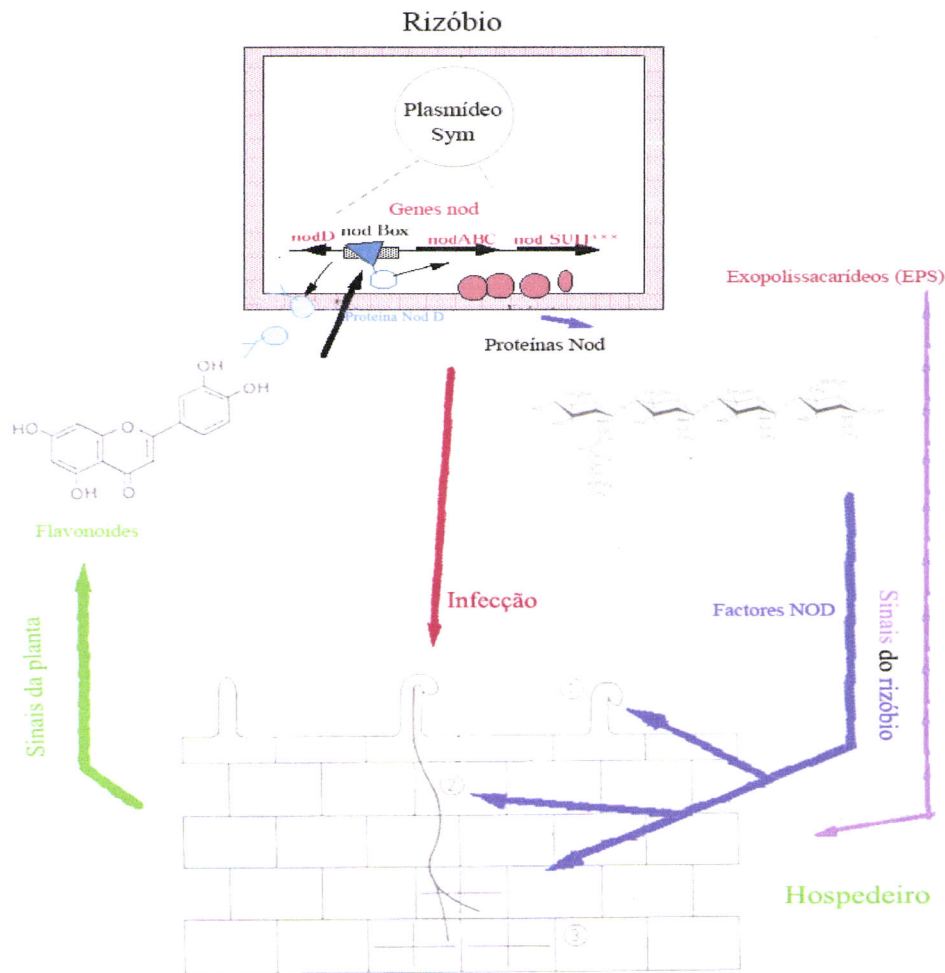
Uma outra via que conduz à especificidade de nodulação e gama de hospedeiros resulta do tipo de substituições realizadas na estrutura base do oligossacarídeo que constitui os factores Nod. Os genes que codificam estes diferentes tipos de substituições químicas são específicos das diferentes espécies de rizóbio e por isso responsáveis, em parte, pela determinação da especificidade (genes *hsn*). Debelle *et al.* (1988) transformaram *R. leguminosarum* bv. *trifolii* tornando-o capaz de nodular *Medicago sativa* e perdendo a capacidade de nodular o seu hospedeiro natural, através da transferência de genes *nodEFGHPQ*, responsáveis por diferentes tipos de substituições na estrutura base do factor Nod (Perret *et al.*, 2000).

Apesar da importância que parece existir do papel do gene *nodD* e proteínas NodD, proteínas SyrM, diferenças nas sequências dos genes *nodA*, *nodB*, *nodC*, e substituições químicas na estrutura base dos factores Nod, estes por si só, não conseguem determinar por completo a especificidade simbiótica (Perret *et al.*, 2000). *R. etli* e *M. loti* produzem factores Nod muito idênticos apesar destas duas espécies possuírem gamas de hospedeiros diferentes (Cardenas *et al.*, 1995). Por outro lado, *R. tropici* e *R. etli* nodulam eficazmente *Phaseolus vulgaris*, apesar de produzirem factores Nod de tipo diferente (Poupot *et al.*, 1993; 1995).

#### 1.1.3.4. Infecção e desenvolvimento do nódulo

Até agora temos nos referido a alguns dos processos do reconhecimento e da especificidade, fundamentais para o estabelecimento da simbiose entre rizóbio e leguminosa. Após esta fase, digamos preliminar, e se hospedeiro e bactéria responderam de forma positiva aos mútuos estímulos químicos, desenvolver-se-á um processo de infecção da raiz e organogênese do nódulo, que segundo Hadri *et al.* (1998) são processos simultâneos o que mostra a importância do abordado até aqui.

A via mais comum de infecção da raiz de leguminosas é realizada através dos pêlos radiculares. A infecção é iniciada pela adesão de bactérias rizóbio ao pêlo radicular seguida de uma deformação deste, conduzindo a um encaracolamento que permite o aprisionamento das bactérias adsorvidas (Kijne *et al.*, 1992). A degradação da parede celular do pêlo radicular e a multiplicação das células de rizóbios dão origem à formação do chamado “cordão de invasão” que se desenvolve no sentido das células corticais da raiz (Turgeon e Bauer, 1985; Kijne, 1992). Ao mesmo tempo que se desenvolve a infecção do pêlo radicular e formação do cordão de invasão, células do cortex da raiz voltam a ter actividade meristemática, diferenciando-se em primórdio nodular (Hadri *et al.*, 1998), cuja distribuição na raiz parece seguir um padrão correspondente a variações do pH intracelular (Oliveira e Marques, 1992). O cordão de invasão contendo os rizóbios em crescimento desenvolve-se no sentido do primórdio nodular no córtex da raiz, apresentando ramificações que atingem várias células (Bakhuizen, 1988). O cordão de invasão acaba por libertar células de rizóbio no citoplasma de algumas células de pró-meristemas, com a produção de membrana envolvendo cada uma delas (membrana peribacteróide). As bactérias rizóbio diferenciam-se agora na sua forma endosimbiótica, tomando o nome de bacteróides (Newcomb, 1981; Kijne, 1992). Os bacteróides envolvidos pela membrana peribacteróide constituem o designado “simbiossoma” local da fixação de N<sub>2</sub> (Roth e Stacey, 1989).

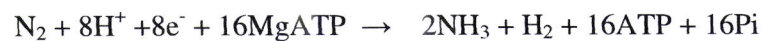


**Figura 1.1.** Diagrama representativo das interações moleculares conducentes à formação de nódulos em leguminosas. A produção de compostos flavonóides pela planta induz a activação de genes *nodD* em rizóbio, conduzindo a activação de outros genes *nod* para a síntese de diferentes factores Nod que em conjunto com exopolissacarídeos produzidos pela bactéria desencadeiam os passos iniciais do processo de infecção específica; (1) deformação do pêlo radicular, (2) formação do cordão de invasão, (3) divisão de células do córtex da raiz a serem infectadas por rizóbio (Adaptado de Haukka, 1997).

### 1.1.3.5. A fixação do azoto

A fixação de azoto atmosférico pela simbiose rizóbio – leguminosa é realizada nos nódulos formados e nestes, pelos bacteróides nos simbiossomas, sendo a enzima nitrogenase o catalizador da reacção de fixação. Este complexo enzimático é constituído por duas metaloproteínas, designadas por molibdenoferroproteína (MoFe, ou componente I) e ferroproteína (N<sub>2</sub> redutase ou componente II) cujo funcionamento é essencial à fixação de N<sub>2</sub> (Howard e Rees, 1996).

As condições essenciais à fixação de azoto pela nitrogenase são a disponibilidade de energia (MgATP) e ambiente de baixa disponibilidade de oxigénio. Estes dois requerimentos essenciais resultam das próprias características da nitrogenase e da reacção que este complexo enzimático desencadeia ( Postgate, 1982):



A síntese de leghemoglobina parece ser um contributo decisivo para o funcionamento da simbiose e fixação de azoto, uma vez que garante (dadas as suas características de transportador de O<sub>2</sub>) uma baixa pressão de difusão de O<sub>2</sub>, ao mesmo tempo que garante o O<sub>2</sub> necessário à produção de energia necessária à fixação de azoto (Appleby, 1984). A efectividade dos nódulos para a fixação de N<sub>2</sub>, está directamente correlacionada com a presença de leghemoglobina (Verma et al., 1992). Alguns estudos parecem sugerir que, pelo menos em alguns pares simbióticos, a leghemoglobina é o resultado da simbiose dado que a globina é codificada pela planta hospedeira enquanto que os grupos heme são inicialmente produzidos pela bactéria e transportados para o citoplasma do hospedeiro (Lee *et al.*, 1983). O desenvolvimento estrutural da nitrogenase e sua regulação são codificados por produtos de genes *nif* e genes *fix* de rizóbio (Rubio e Ludden, 2002).

### 1.1.3.6. Genes da planta envolvidos na formação e desenvolvimento de nódulos

Como vimos, a formação de nódulos pode ser dividida em três etapas distintas: i) a etapa pré infecciosa, ii) infecção e organogénese do nódulo e iii) funcionamento e manutenção do nódulo. Durante a primeira fase o rizóbio interacciona com o pêlo radicular induzindo o seu encaracolamento formando-se uma “bolsa” com bactérias aprisionadas. Durante a segunda fase as bactérias rizóbio penetram a parede celular, dissolvendo-a parcialmente invadindo a célula, formando-se o cordão de invasão. Entretanto, durante do

processo de infecção algumas células do córtex da raiz diferenciam-se, multiplicam-se e dão origem ao primórdio do nódulo. O cordão de invasão cresce no sentido desses primórdios e os rizóbios são drenados no citoplasma da célula cortical diferenciada, por um processo tipicamente endocitótico, ficando a bactéria rodeada por uma membrana peribacteróide. Na célula cortical, bactéria e membrana peribacteróide dividem-se de forma coordenada, preenchendo o citoplasma da célula infectada no córtex do hospedeiro. Durante a terceira fase as bactérias diferenciam-se em formas pleomórficas (bacteróides) e fixam  $N_2$ .

A formação de nódulos é acompanhada pela expressão de genes das plantas hospedeiras, conhecidos como genes das nodulinas. Os genes das nodulinas são expressos exclusivamente durante o desenvolvimento da simbiose, pelo que, conseqüentemente não são expressos em raízes não infectadas ou em outras partes da planta. A expressão destes genes é realizada diferencialmente durante todo o processo de desenvolvimento do nódulo. A maioria das nodulinas é expressa no início do processo de fixação de azoto sendo designadas por “late nodulins” (NOD). As nodulinas expressas nas fases iniciais do desenvolvimento do nódulo, como resposta a factores Nod de rizóbio (Fisher e Long, 1992), são designadas por “early nodulins” (ENOD). Estes genes são expressos quando a planta já está infectada e a estrutura do nódulo já se começou a formar. Os genes da planta especificamente expressos na fase de pré-infecção não são designados por nodulinas pois não são expressos no nódulo (Franssen et al., 1993).

As ENOD intervêm nas fases iniciais do processo de infecção e organogênese do nódulo. As NOD estão envolvidas no funcionamento e manutenção do nódulo. O desencadear da expressão de genes NOD, coincide com o início da fixação de  $N_2$ . Conseqüentemente os genes NOD terão funções relacionadas com o processo de fixação de azoto tais como assimilação e transporte de metabolitos através da membrana peribacteróide, e/ou criação de condições fisiológicas necessárias à fixação de  $N_2$  nos bacteróides, com especial destaque para a síntese de leghemoglobina (Franssen et al., 1992).

## 1.2. O rizóbio no solo

Os rizóbios são simbioses facultativos proliferando no solo como componentes normais da população microbiana do solo, sendo frequente a sua presença em solos agrícolas quer como populações nativas quer como populações naturalizadas (Parker *et al.*, 1977; Wang *et al.*, 1999; Ballard e Charman, 2000). Parker *et al.* (1977) considera rizóbios nativos os

característicos de uma flora de leguminosas típica e espontânea de uma determinada região ou local, considerando naturalizados os introduzidos em determinada região ou solo, com ou sem cultura de leguminosa a acompanhá-los, e que adquiriram a capacidade de sobrevivência nas condições do local onde foram introduzidos.

Para que uma determinada estirpe de rizóbio nodule com êxito uma leguminosa compatível, terá de sobreviver e proliferar no solo em condições por vezes adversas. Assim, o aproveitamento das leguminosas depende em muito das características apresentadas pelas estirpes capazes de viver no solo em condições saprofitas.

O estudo do comportamento do rizóbio no solo engloba aspectos que assentam essencialmente em três características das estirpes; competitividade, persistência e competência saprofítica. Diz-se que uma estirpe é competitiva (Brockwell e Gibson, 1968), quando capaz de nodular com sucesso, em presença de outra ou outras estirpes concorrentes. Persistente, quando introduzida em novo "habitat", é capaz de nele se manter em números adequados à nodulação dos hospedeiros (Brockwell, 1968). A competência saprofítica é uma característica da estirpe persistente em solo não rizosférico, que é capaz de colonizar, e sobreviver em condições adversas (Chatel *et al.*, 1968).

A sobrevivência do rizóbio no solo, está na dependência de diversos factores, entre os quais se realça a presença de rizosferas favoráveis, incluindo a do seu hospedeiro específico, pH, temperatura, humidade, tipo e abundância de matéria orgânica, toxicidades, antagonismos, parasitismo e acção de bacteriófagos.

### **1.2.1. Dinâmica das populações de rizóbio no solo**

#### **1.2.1.1. A dimensão das populações de rizóbio no solo**

A utilização da técnica de infecção de plantas axénicas com diluições de solo, em combinação com a determinação estatística dos números mais prováveis (NMP), (Brockwell, 1963) tem permitido estimativas da densidade das populações de rizóbio no solo que podem variar desde a sua não detecção a valores da ordem de  $10^7$  ufn (unidades formadoras de nódulos) por grama (Bushby, 1982; Vincent, 1974). Apesar da densidade populacional ter sido positivamente correlacionada com muitos factores, incluindo matéria orgânica, teor de argilas, presença de leguminosas, ou vigor no crescimento de leguminosas (Woomer *et al.*, 1988; Lawson *et al.*, 1987) outros estudos não mostraram qualquer relação simples entre



densidades populacionais e parâmetros ambientais específicos (Gibson *et al.*, 1975; Hiltbold e *tal.*, 1985; Wood *et al.*, 1985). Provavelmente, tais discrepâncias estão relacionadas com a técnica de contagem normalmente utilizada, que impõe restrições ao número de amostras de solo que podem ser analisadas e o período de tempo ao longo do qual as amostras são tomadas. Nalguns estudos, grandes flutuações na densidade populacional têm sido detectadas num mesmo local quando as amostras de solo foram tomadas a intervalos de tempo regulares por períodos de um ou dois anos (Dudeja e Khurana, 1989).

Distribuições não uniformes de rizóbios no solo podem confundir interpretações da influência de parâmetros ambientais na densidade populacional. Wollum e Cassel (1984) observaram que a densidade populacional de *B. japonicum* variava entre  $10^2$  e  $10^7$  ufn por grama de solo ao longo de pequenas distancias no campo (30 cm). Estudos em *R. leguminosarum* bv. *trifolii* revelaram que 90% ou mais da população total estava localizada nos 2 primeiros cm do perfil de solo (Richardson e Simpson, 1988) ou associada ao tecido nodular desidratado de plantas mortas (Chatel e Greenwood, 1973).

#### 1.2.1.2. Presença do hospedeiro

Diferentes populações de rizóbio podem coexistir num mesmo solo em baixas densidades durante muitos anos na ausência da leguminosa hospedeira (Kucey e Hynes, 1989; Nutman e Ross, 1970). No entanto, outros estudos mostraram o impacto que a presença de um hospedeiro específico pode ter na perturbação do equilíbrio das densidades populacionais entre biovariedades estreitamente relacionadas dentro da mesma espécie de *Rhizobium*. Em campos de ervilhas (*Pisum sativum* L.) as populações de *R. leguminosarum* bv. *viciae* eram 1000 vezes maiores do que as da biovariedade *phaseoli*. Em campos vizinhos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) as densidades populacionais relativas das duas biovariedades estavam invertidas (Kucey e Hynes, 1989). Estudos realizados por Bottomley (1991) confirmam estas observações com populações de *R. leguminosarum* bvs. *trifolii* e *viciae*. Em pastagens de trevo subterrâneo onde espécies de ervilhaca (*Vicia* spp.) estavam ausentes, *R. leguminosarum* bvs. *viciae* e *trifolii* coexistiam em populações de  $<10^2/g$  e  $>10^6/g$  respectivamente. Em campos adjacentes não utilizados onde as ervilhacas eram a leguminosa dominante e onde as espécies de trevo (*Trifolium*) estavam ausentes, as densidades populacionais das duas biovariedades estavam invertidas. Mais investigação é necessária para esclarecer se o impacto da presença do hospedeiro é devido a um efeito rizosférico selectivo ou devido à libertação de

células por parte de nódulos senescentes. No caso de *Bradyrhizobium*, apesar de *B. japonicum* persistir no solo durante muitos anos na ausência de soja (Weaver *et al.*, 1972; Brunel *et al.*, 1988) não são conhecidos dados sobre a dinâmica das populações de solo de *B. japonicum* relativamente a outras populações de *Bradyrhizobium* de hospedeiros alternativos.

### 1.2.1.3. Rizóbios não infectivos na população de solo.

Apesar da técnica de imunofluorescência permitir aos pesquisadores a determinação das densidades de rizóbio no solo, sem o recurso à técnica da infecção de plantas para determinação do NMP, têm sido expressas preocupações acerca da proporção de células viáveis e competentes para a nodulação de entre a população observada por imunofluorescência (Kennedy e Wollum, 1988; Postma *et al.*, 1988).

Bactérias sem a capacidade de formar nódulos têm sido isoladas, sendo antigenicamente relacionadas, ou mostrando homologia parcial de DNA, com biovariedades simbioticamente competentes de *R. leguminosarum* (Jarvis *et al.*, 1989; Soberon-Chavez e Najera, 1989). As contagens por imunofluorescência de populações nativas de *Bradyrhizobium* sp. (Lochner *et al.*, 1989) e de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Bottomley e Dughri, 1989) têm tido resultados significativamente superiores a contagens realizadas pelo procedimento para a determinação do NMP. Apesar disso, existem evidências de que rizóbios não competentes não poderão persistir no solo por longos períodos de tempo (Bohlool e Schmidt, 1973).

### 1.2.1.4. Relações entre rizóbios e a população microbiana do solo

A informação sobre as relações entre rizóbios e a população microbiana do solo é bastante escassa. A proporção de rizóbios na população microbiana total do solo é difícil de determinar e os valores descritos na literatura apresentam grandes variações. Contagens de bactérias totais feitas por epifluorescência, comparadas com contagens de rizóbio por imunofluorescência mostram que *B. japonicum* (Moawad e tal., 1984) e *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Bottomley e Dughri, 1989; Bottomley e Maggard, 1990) representam entre 0,1% e 1,0% do total de bactérias do solo e da rizosfera. Em estudos onde os valores de NMP de rizóbio foram comparados com contagens em placa das bactérias totais do solo (considerando totais apenas as bactérias cultiváveis em placa, excluindo por isso muitas outras bactérias), os

primeiros contribuem com aproximadamente 8% das bactérias totais do solo contadas em pastagens de trevo e campos de soja (Mahler e McDole, 1987) e cerca de 25% das bactérias totais na rizosfera de trevos (Rovira, 1961). Enquanto que a técnica de contagem em placa é sabido que subestima a magnitude das populações de viáveis do solo (Bottomley e Maggard, 1990), a quantificação por microscopia de fluorescência sofre de dificuldades na determinação de qual a proporção de bactérias *nativas* que pode ser recolhida da matriz do solo (Crozat e Cleyet-Marel, 1984; Postma e tal., 1988; Kim e tal., 1985). A evolução da permanência da biomassa microbiana no solo varia em diferentes solos (Van Veen e tal., 1987) e a taxa de declínio até ao equilíbrio de populações introduzidas pode ter uma descrição cinética cujas taxas de variação são variáveis entre solo (Crozat e tal., 1982; Corman e tal., 1987).

Estudos laboratoriais levados a cabo com rizóbios, mutantes resistentes a antibióticos e fungicidas, introduzidos no solo mostraram que protozoários e outros predadores microbianos podem causar um declínio na densidade populacional de rizóbios introduzidos no solo (Hapte e Alexander, 1977; Heynen *et al.*, 1988; Lennox e Alexander, 1981; Ramirez e Alexander, 1980). Vale a pena referir, no entanto, que as densidades populacionais de rizóbio nas quais os predadores se tornam inefectivos são similares aos valores tipicamente encontrados em solo não estéril. Mais ainda, uma vez que os rizóbios introduzidos são distribuídos diferencialmente no solo em relação aos rizóbios nativos (Ozawa e Yamaguchi, 1986), a acessibilidade tanto dos *nativos* como dos rizóbios introduzidos aos predadores necessita de ser comparada tanto no solo como na rizosfera.

### **1.2.2. Efeito de condições físicas do solo na população de rizóbio**

Solos de textura grosseira, susceptíveis de deficiência hídrica, acidificação e deficiências nutritivas são obstáculos ao estabelecimento de leguminosas e à sua produtividade. Solos de textura fina, muito meteorizados e ácidos podem também ser problemáticos se contiverem excessos de elementos tóxicos tais como alumínio e manganês, fracções minerais que possuem alta capacidade e afinidade para a absorção de fosfato, e se forem propensos a variações estruturais durante os ciclos de humedecimento e secagem. Solos mal drenados de grande saturação em bases não têm recebido grande atenção, apesar das dificuldades usualmente encontradas na cultura de leguminosas nestas condições.

### 1.2.2.1. Interações entre rizóbio e minerais de argila

Apesar das cargas eléctricas características de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* serem diferentes, e poderem variar entre estirpes de rizóbio (Marshall, 1969), evidências de que a carga superficial característica dos minerais de argila influencia o comportamento de rizóbio no solo é meramente circunstancial. Uma solução de extracção contendo gelatina parcialmente hidrolisada e fosfato de amónio (pH 8,2) era essencial para a recolha de rizóbios introduzidos em solos das ordens Oxisol, Vertisol e Andisol (Kinsley e Bohlool, 1981). Apesar de os autores sugerirem que o rizóbio era difícil de recolher dada a forte associação electrostática com a fracção mineral, uma explicação alternativa pode ser a de que o rizóbio era dispersado com sucesso da estrutura do solo mas subsequentemente aprisionado pelos colóides do solo como resultado de um comportamento floculante anómalo (Demezas e Bottomley, 1986).

Evidências circunstanciais sobre o papel dos minerais de argila no sucesso da nodulação por rizóbio, vêm de experiências de nodulação competitiva entre misturas de *R. leguminosarum* bv. *viciae* em lentilhas (*Lens esculenta*), (May e Bohlool, 1983) *Rhizobium* sp. em leucaena (Moawad e Bohlool, 1984) (*Leucaena leucocephala*), e *Rhizobium* sp. (Cicer) em grão-de-bico (Somesegaran, 1989). Diferenças de competição foram observadas em experiências conduzidas tanto num Oxisol dominado por minerais amorfos de cargas variáveis como em solos menos meteorizados contendo predominantemente minerais cristalinos de carga constante. Em contraste, não houve influência do tipo de solo na nodulação competitiva entre 3 estirpes de *B. japonicum* quando foram inoculadas em soja crescida em 3 solos diferentes (George *et al.*, 1987).

### 1.2.2.2. Relação entre estrutura do solo e características morfo-fisiológicas de rizóbio

#### 1.2.2.2.1. Dimensão da célula

Ozawa e Yamaguchi (1986) relataram que apesar de 90% dos rizóbios nativos estarem fortemente associados às partículas do solo, um grande período de incubação é necessário até que a maioria dos rizóbios introduzidos penetre nos poros dos agregados de solo. Num estudo

recente, uma maior percentagem de rizóbios introduzidos fica associada às partículas de solo com diâmetros  $\geq 50 \mu\text{m}$  à medida que o teor de humidade do solo se reduzia (Postma *et al.*, 1989). Estes autores lançaram a hipótese de que o movimento do rizóbio para os agregados do solo seria retardado até que os poros de diâmetro semelhante ao de um rizóbio crescido em laboratório ( $\leq 3,0 \mu\text{m}$ ) estivessem livres de água. Em relação à dimensão do rizóbio indígena, tem sido demonstrado que tanto *B. japonicum* como *R. leguminosarum* bv. *trifolii* decrescem de tamanho após incubação prolongada no solo (Postma *et al.*, 1988; Crozat *et al.*, 1982). Células morfológicamente atípicas têm sido observadas em populações *nativas* de *B. japonicum* (Bohlool e Schmidt, 1970) e *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Bottomley e Dughri, 1989). Provavelmente uma célula pequena confere uma vantagem ecológica ao rizóbio permitindo a ocupação de poros pequenos e evitar de baixo potencial mátrico do solo e predação. Por outro lado, a ocupação de poros pequenos pode ser desvantajosa, dado que o acesso a nutrientes pode ser limitado, e o acesso à raiz de uma leguminosa restringido.

#### 1.2.2.2. Relações Hídricas

Tem sido demonstrado que as populações de *Bradyrhizobium* spp. (de crescimento lento) são mais persistentes que as populações de *Rhizobium* spp. (de crescimento rápido) em solos que sofram deficiências hídricas sazonais (Chatel e Parker, 1973). Tem sido sugerido que *Bradyrhizobium* entra em dormência mais rapidamente do que *Rhizobium* dado que os primeiros mantêm um teor em água interno mais baixo que os últimos, em baixos potenciais hídricos (Bushby e Marshall, 1977). Esta hipótese não tem sido suportada por outros estudos (Hartel e Alexander, 1986; Mahaler e Wollum, 1981; Singleton *et al.*, 1982; Woormer e Bohlool, 1989).

As bactérias do solo podem ser influenciadas por um grande número de factores incluindo o teor de humidade do solo (England *et al.*, 1993). Gray e Williams (1971) referem que a maioria dos microrganismos não cresce em solos com valores de pF superiores a 4,2, isto é, potenciais mátricos inferiores a  $-1,5\text{MPa}$ . A razão para esta limitação ao crescimento prende-se com o facto dos microrganismos não exercerem uma pressão de sucção suficiente para água presente nos poros de diâmetro inferior a  $0,2 \mu\text{m}$  (diâmetro máximo dos poros com água num potencial mátrico de  $-1,5\text{MPa}$  e dimensão mínima conhecida para *Rhizobium* e *Agrobacter* em condições muito adversas no solo). Amara e Miller (1986) verificaram que o número de *Rhizobium phaseoli* decresce em potenciais mátricos inferiores a  $-1,5\text{MPa}$ , o

mesmo acontecendo a *B. japonicum* onde o declínio populacional varia de uma a três ordens de grandeza em potenciais de -1,5Mpa, quando comparado com potenciais próximos da capacidade de campo (Mahler e Wollum, 1980). Apesar disso, Postma *et al.* (1989) verificaram que *R. trifolii* sobreviveu muito melhor em solos com um teor de água inicial mais baixo quando comparado com solos em que esse teor inicial era superior, o que pode estar relacionado com a predação por protozoários (apenas presentes em poros de diâmetro superior a 10 µm).

A capacidade de rizóbio sobreviver em solos com condições limitantes de disponibilidade hídrica é variável entre espécies (Bushby e Marshall, 1977; Mahler e Wollum, 1981) e entre estirpes dentro de espécies (Amara e Miller, 1986). Issa e Wood (1995) verificaram que em rizóbio para grão-de-bico o efeito, sobre o crescimento e sobrevivência, do tipo de solo e das estirpes usadas nos ensaios, foi muito maior do que o efeito do potencial mátrico mesmo quando este variou entre -0,03 e -5 MPa.

O tipo de solo influencia bastante o crescimento e sobrevivência em condições de stress hídrico. Os rizóbios sobrevivem melhor em solos de textura fina do que em solos grosseiros (Danzo e Alexander, 1974; Postma *et al.*, 1990), existindo evidências de que os minerais de argila oferecem protecção às células contra fenómenos de dessecação (Bushby e Marshal, 1977).

Não deixa de ser interessante que apesar da infecção de pêlos radiculares de trevo subterrâneo ( com diâmetros geralmente superiores a 10 µm) não ocorrer a potenciais mátricos inferiores a -0,3 Mpa ( Worrall e Rougley, 1976), as sementes de trevo subterrâneo podem germinar no solo com potenciais hídricos tão baixos como -1,2 Mpa (McWilliam, *et al.*, 1969), pelo que pode haver germinação e desenvolvimento radicular sem que haja imediata nodulação, apesar de poder haver população de rizóbio para o poder fazer, .

#### **1.2.2.2.3. Mobilidade**

Dada a capacidade do rizóbio produzir flagelos, vários relatórios sugerem que a mobilidade pode ser vantajosa para o rizóbio colonizar raízes de leguminosas e iniciar a formação de simbioses (Ames e Bergman, 1981; Caetano-Anolles *et al.*, 1988; Mellor *et al.*, 1987; Thornton e Davey, 1983). No entanto, apenas um daqueles estudos de nodulação foi levado a cabo em solo, e esse solo seria um solo de textura muito ligeira (Thornton e Davey, 1983). A estrutura de macro poros predominante nesse tipo de solo e o teor de humidade

elevado mantido para o crescimento das plantas, representam uma combinação de factores do solo que facilitariam o movimento de bactérias para a superfície da raiz. Os resultados de outros estudos em solo levantam dúvidas sobre a importância da mobilidade na facilitação do acesso à superfície da raiz em condições de solo não saturado. Em solos de diferentes texturas, o movimento de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* cessou quando os poros cheios de água se tornaram descontínuos (-0,005 a - 0,026 Mpa) apesar dos poros ocupados por água serem ainda bastante grandes ( $\leq 6,8 \mu\text{m}$ ) relativamente ao tamanho da célula rizobiana (Hambdi, 1971). Liu *et al.* (1989) mostrou não haver diferenças entre um mutante não móvel e a sua respectiva estirpe-mãe de *B. japonicum*, ao colonizarem igualmente as rizosferas de soja num solo "silt loam" (usualmente caracterizado por fraca estrutura e domínio dos poros pequenos). Para evitar compactações desnecessárias do solo, a maior parte das leguminosas é semeada no campo após o solo ter secado o suficiente para permitir o tráfego de máquinas. Nestas circunstâncias de solo não saturado, parece razoável especular que a mobilidade não confere qualquer vantagem e que apenas os rizóbios localizados na periferia dos agregados entrarão em contacto com a radícula emergente e com os sítios primários de nodulação.

### 1.2.2.3. Temperatura

A temperatura do solo é um factor determinante para a capacidade de rizóbio para competir e persistir no solo e rizosfera. As estirpes diferem entre si na sua capacidade em crescer e sobreviver numa gama de temperaturas (Hartel e Alexander, 1984; Boonkerd e Weaver, 1982). A incapacidade de inoculantes para *R. leguminosarum* bv. *trifolii* em persistir por mais do que uma época de crescimento em solos do Oeste Australiano tem sido atribuída à prevalência de altas temperaturas estivais (Chatel e Parker, 1973).

A temperatura pode alterar as relações competitivas entre estirpes. Weber e Miller (1972) plantaram soja em vasos contendo solo com largas populações de rizóbios nativos. Diferentes serogrupos predominaram nos nódulos das plantas incubadas a diferentes temperaturas. Duas estirpes de *R. trifolii* foram inoculadas em trevos onde se detectou que a maioria dos nódulos a 12°C era formada por uma das estirpes, invertendo-se a situação quando a temperatura de incubação foi de 25°C (Hardson e Jones, 1979). Por outro lado, Brockwell *et al.* (1982), em ensaios de campo, ao correlacionarem o efeito entre pares de locais de diferentes temperaturas, verificaram não haver uma influência global da temperatura tanto na competição como na persistência das estirpes inoculantes em ensaio.

### **1.2.3. Influência das propriedades químicas do solo no rizóbio**

#### **1.2.3.1. A acidez do solo**

As leguminosas são exigentes quanto às reservas minerais do solo. Muitos solos que podem beneficiar do crescimento de leguminosas e fixação de azoto associada, são frequentemente deficientes nos minerais essenciais para o crescimento das leguminosas. Estes solos são frequentemente ácidos ( $\text{pH} \leq 5,5$ ), ou de poder tampão muito fraco sendo sujeitos a acidificação tanto como resultado do crescimento de leguminosas como da aplicação de fertilizantes amoniacais a não leguminosas usadas na rotação (Mahler e McDole, 1987; Rasmussen e Rohde, 1989). Apesar da aplicação de calcário poder rectificar o problema, a sua disponibilidade, custo e a sua aplicação pode constituir uma séria limitação à sua utilização. Por outro lado, em solos de baixa capacidade de troca catiónica a sobre dosagem das correcções pode ocorrer levando a graves desordens físicas e químicas (Robson, 1989). Apesar do factor comum a todos os solos ácidos ser o seu baixo pH, é importante considerar que grandes variações na sua textura, estrutura, mineralogia, teor de matéria orgânica, actividade de espécies iónicas monoméricas ou poliméricas de alumínio e disponibilidade de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , Mo, e P, tornam muito difícil a comparação de resultados de estudos desenvolvidos em diferentes solos. Os resultados apresentados por Coventry *et al.* (1987) exemplificam este problema fornecendo exemplos das diferentes limitações ao crescimento de leguminosas que foram encontradas em solos ácidos no Sudoeste da Austrália.

#### **1.2.3.2. Influencia da acidez no crescimento e sobrevivência**

Os problemas no estabelecimento de leguminosas em solos ácidos têm sido frequentemente atribuídos à sensibilidade variável do rizóbio à acidez. A identificação de estirpes de *Bradyrhizobium* capazes de crescer a baixo pH na presença de alumínio solúvel (Date e Halliday, 1979; Keyser e Munns, 1979) estimulou numerosas pesquisas nas colecções de outras espécies de rizóbio para a detecção de estirpes tolerantes à acidez e à toxicidade por alumínio (Cooper, 1982; Graham *et al.*, 1982; Hartel *et al.*, 1983; Vargas e Graham, 1988; Wood e Cooper, 1988; Howieson *et al.*, 1988). A extensão lógica destes esforços foi a de



questionar se os rizóbios nativos em solos ácidos seriam colonizadores de sucesso dada a sua superior tolerância à acidez.

Estudos de populações *nativas* de rizóbio em solos ácidos não produziram resultados que suportem esta possibilidade. Woomer *et al.* (1988) num levantamento realizado em solos do Havai com valores de pH entre 4,9 e 7,9, verificaram que as maiores densidades populacionais de *Bradyrhizobium* spp. foram detectadas em solo de pH inferior a 5,0. A maior precipitação média anual recebida pelo solo mais ácido teve uma influência positiva na densidade populacional que suplantou o impacto negativo, se este existiu, do baixo pH do solo. Não foram detectadas diferenças na tolerância à acidez de isolamentos de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Wood e Shepherd, 1987) e *Rhizobium meliloti* (Howieson *et al.*, 1988) e colhidas em solos de pH variável. A maioria da população de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* recolhida de um solo extremamente ácido não era mais tolerante à acidez do que as estirpes do laboratório, e a maioria da população “evitava” o baixo pH colonizando os 2 cm superficiais menos ácidos do perfil solo (Richardson e Simpson, 1988). Apesar da calagem de um solo ácido alterar a ocupação de nódulos por quatro serotipos nativos de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* em trevo subterrâneo (Dughri e Bottomley, 1984), a densidade populacional dos 4 serotipos não foi alterada pela calagem, independentemente da influência do calcário nas capacidades de nodulação (Almendras e Bottomley, 1987).

### 1.2.3.3. Influência da acidez na formação de nódulos

Tanto na formação como na actividade de várias simbioses rizóbio-leguminosa, tem sido demonstrada a sensibilidade à acidez do solo. Na verdade, a importância do pH no processo de infecção foi reconhecido há muitos anos quando pequenas quantidades de calcário adicionado a sementes de trevo se mostraram benéficas para a nodulação de leguminosas semeadas em solos ácidos (Loneragan *et al.*, 1955). No processo de infecção de certas leguminosas de regiões temperadas (*Trifolium*, *Pisum* e *Medicago*) foi detectado ser mais sensível à acidez do que o próprio crescimento da planta (Lie, 1969; Munns, 1968). Para além disso, a formação do nódulo (Bushby, 1981; Munns *et al.*, 1979) e a expressão dos genes *nod* pelo rizóbio (Richardson *et al.*, 1988) pode ser mais sensível à acidez ou ao alumínio do que o crescimento ou sobrevivência do rizóbio *per se*. Apesar de tanto estirpes de *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) Al-sensíveis como estirpes Al-tolerantes sobreviverem bem em solo ácido rico em alumínio (Soby e Bergman, 1983), as estirpes Al-sensíveis nodulam com

menor eficácia em solo ácido do que o fazem as estirpes Al-tolerantes (Hartel *et al.*, 1983). Em contraste, Graham *et al.* (1982) detectaram que uma estirpe ácido-tolerante de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* não só sobrevivia melhor do que a estirpe ácido-sensível em solo ácido como dava origem a melhor nodulação e produção de feijão.

#### 1.2.3.4. Influência da acidez no funcionamento do nódulo

Apesar do crescimento de muitas leguminosas em condições de fixação de azoto ser mais sensível à acidez e ao alumínio do que plantas a crescer com base em azoto mineral, (Andrew, 1976; Doerge *et al.*, 1985; Munns *et al.*, 1979) existem exceções onde não têm sido detectadas diferenças entre crescimento dependente da simbiose e azoto mineral (Lindstrom *et al.*, 1985; Munns *et al.*, 1981). Têm também sido documentadas diferenças de tolerância à acidez entre géneros de leguminosas (Munns *et al.*, 1977), entre espécies do mesmo género (Carvalho *et al.*, 1981), e entre cultivares da mesma espécie (Kim *et al.*, 1985; Vargas e Graham, 1988 e 1989). A capacidade de adaptação de espécies de leguminosas a solos ácidos de baixa fertilidade é frequentemente revelada pela sua indiferença à fertilização mineral (Henzell, 1988).

#### 1.2.3.5. Influência do fosfato

É bem conhecida a característica de muitas leguminosas serem inferiores a outras espécies vegetais na captação de fosfato do solo (Caradus, 1980). Como consequência, muitos solos requerem quantidades apreciáveis de fertilizantes fosfatados para que a cultura de leguminosas possa ser economicamente viável (Ozanne e Biddiscombe, 1969). Uma vez que algumas leguminosas têm maiores necessidades em fósforo para o crescimento usando azoto resultante da fixação simbiótica do que para o crescimento quando usam azoto mineral (Cassman *et al.*, 1981; Israel, 1987; Singleton *et al.*, 1985), surge a questão de saber se estas diferenças se devem a diferentes capacidades de armazenagem do P por parte da célula de rizóbio. Soja inoculada com a estirpe USDA 110, crescida em condições de escassez de P deu origem a menor actividade nitrogenásica e menor teor de azoto na parte aérea, do que quando inoculada com bactérias crescidas em condições de abundância de P (Mullen *et al.*, 1988). Estirpes de *B. japonicum*, (Cassman *et al.*, 1981)<sup>64</sup> *R. meliloti*, (Beck e Munns, 1984 e 1985) e

*R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Leung e Bottomley, 1987) mostraram diferenças na sua capacidade de captar baixas concentrações de P inorgânico. No caso de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, estirpes que mostram superior capacidade de armazenar P, eram membros do serotipo indígena dominante nos nódulos de trevo subterrâneo em solos ácidos deficientes em P (Almendras e Bottomley, 1987).

### 1.2.3.6. Influência do cálcio

Apesar das pequenas necessidades em cálcio para o crescimento de rizóbio em condições de laboratório, várias evidências sugerem um papel crítico do cálcio no crescimento e sobrevivência de rizóbio no solo em condições de baixo pH. A velocidade de crescimento de *S. meliloti* aumenta com o incremento da concentração de Ca de 200 para 2000  $\mu\text{M}$  em baixo pH (5,7) o que não ocorre a pH mais elevado (7,5), pelo que as necessidades em cálcio, em condições, ácidas para o crescimento de *S. meliloti* são maiores do que o inicialmente previsto (Howieson *et al.*, 1992). O declínio populacional a pH 4 é também reduzido com o aumento das concentrações de cálcio no meio (Dilworth *et al.*, 1999). Beck e Munns (1984 e 1985) referem por outro lado que cálcio suplementar é necessário para o crescimento de *S. meliloti* em baixas concentrações de fosfatos inorgânicos e de escassez de água. Também as estirpes de *S. meliloti* isoladas de solos ácidos e com comportamento ácido-tolerante, requerem níveis de cálcio mais elevados para o crescimento, quando comparadas com estirpes ácido-sensíveis (O'Hara *et al.*, 1989).

O cálcio tem um papel importante no processo de formação dos nódulos, participando na síntese de proteínas importantes na adesão de *R. leguminosarum* bv. *viciae* a pêlos radiculares de ervilha (Smit *et al.*, 1989). Em condições acídicas o aumento da concentração de cálcio amplifica a indução de genes *nod* de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* por 7,4'-dihidroxi-flavona (Richardson *et al.*, 1988).



### 1.3. Competição pela ocupação de nódulos

#### 1.3.1. O problema da Competição

A presença de populações de rizóbio nativas ou naturalizadas é muito frequente na generalidade dos solos agrícolas sendo comum a nodulação de leguminosas cultivadas sem inoculação prévia (Thies *et al.*, 1991; Sessitsch *et al.*, 2002). Esta distribuição generalizada pode ser devida à disseminação global de muitas leguminosas cultivadas bem como aos rizóbios usados na sua inoculação (Brockwell e Bottomley, 1995; Ballard e Charman, 2000). Apesar de nodularem com grande frequência, a eficiência na fixação de azoto é muito variável e, frequentemente, muito baixa em relação às necessidades da planta cultivada (Keyser e Li, 1992; Ballard e Charman, 2000; Denton *et al.*, 2002). A soja (*Glycine max*) originária e domesticada na China nodula eficazmente sem inoculação naquela zona do globo (Keyser e Li, 1992), já quando cultivada sem inoculação na América do Norte a nodulação e fixação de azoto pelas estirpes nativas é normalmente pobre (Zdor e Pueppke, 1998). Como consequência, a inoculação de leguminosas como prática agronómica usando estirpes de rizóbio de superior qualidade para a nodulação e fixação de azoto tem sido usada de forma a aumentar a produtividade da cultura de leguminosas (Brockwell *et al.*, 1982; Thies *et al.*, 1991; Howieson e Ballard, 2004). A inoculação de leguminosas é especialmente indicada e praticada quando se introduz uma nova espécie de leguminosa numa nova região ou num local em que não há tradição na sua cultura (Brockwell e Bottomley, 1995).

Respostas positivas à inoculação quer na produtividade da cultura quer na ocupação de nódulos pela(s) estirpe(s) de rizóbio inoculante têm sido referenciadas em locais onde a cultura é realizada pela primeira vez e onde os solos não possuem rizóbios nativos compatíveis (Bell e Nutman, 1971; Brockwell *et al.*, 1987; Somesegaran *et al.*, 1988). No entanto, em muitos solos com populações nativas de rizóbio bem estabelecidas estas criam obstáculos à nodulação, criando uma pressão competitiva que impede a formação de nódulos por parte da estirpe inoculante (Jonson *et al.*, 1965; Bromfield *et al.*, 1986; Bohlool *et al.*, 1992; Brockwell e Bottomley, 1995). Em alguns casos a estirpe inoculante domina a ocupação de nódulos no ano da implantação (estirpes competitivas) mas vão perdendo representatividade nos nódulos formados nos anos subsequentes, evidenciando problemas de persistência (Parker *et al.*, 1977; Brockwell *et al.*, 1982; Dowling e Broughton, 1986; Hebb *et al.*, 1998). A ocupação de nódulos por estirpes nativas excluindo as estirpes inoculantes, ocorre mesmo nas raras situações (Brockwell e Bottomley, 1995) em que a população

inoculante em muito ultrapassa em número a população nativa presente (Weaver e Frederick, 1974), tendo sido referidos casos em que a resposta à inoculação não ocorre na presença de apenas 50 ufn por grama de solo de rizóbios nativos (Thies *et al.*, 1991).

As populações nativas de rizóbio estão bem adaptadas ao seu “habitat” mas apresentam com frequência uma baixa capacidade fixadora de azoto, especialmente quando se procede à cultura de leguminosas seleccionadas (Triplett e Sadowsky, 1992; Denton *et al.*, 2002).

Por estes motivos, as populações nativas ou naturalizadas de rizóbios constituem uma barreira competitiva importante ao sucesso da implantação de estirpes inoculantes para leguminosas., sendo referido por Triplett e Sadowsky (1992) como “o problema da competição em rizóbio”.

### **1.3.2. Factores que afectam a competição**

A competição aqui referida diz respeito à competição entre estirpes de *Rhizobium* geneticamente relacionadas para a nodulação de uma dada planta hospedeira. (Sadowsky e Graham, 1998). Pode ser assumido que mutações que afectam a maior parte dos genes necessários ao crescimento e sobrevivência no solo também resultarão num fenótipo menos competitivo, pelo que tais genes não são verdadeiros loccus de competição (Sadowsky e Graham, 1998). Tal como referido por Streeter (1994) estudos dos assim chamados determinantes genéticos para a competição têm muitas limitações, uma vez que no ambiente onde se encontram, a grande diversidade genética dos rizóbios permitirá a capacidade para a ocupação de uma variedade de nichos, e a adaptação para a sobrevivência em alguns destes nichos poderá não ser relevante na competição para a nodulação. Apesar disso, têm sido identificados certos factores aos quais têm sido atribuídas funções específicas na competição (Sadowsky e Graham, 1998; Triplett e Sadowsky, 1992).

#### **1.3.2.1. Factores abióticos**

Os factores abióticos que afectam a competição para a nodulação incluem a limitação de nutrientes para plantas e bactérias, a humidade do solo e o seu teor em matéria orgânica, o tipo de solo, o pH, a temperatura e a textura (Sadowsky e Graham, 1998). Respostas variáveis

de diferentes isolamentos de rizóbio a condições de extrema alcalinidade, incrementos de temperatura e de concentração de sais têm sido referidas (Lie, 1984; Surange *et al.*, 1997). Em ensaios de campo realizados no Brasil, a fertilização e correção do solo com P, K, S, micronutrientes e calagem, a nodulação por estirpes inoculantes marcadas foi fortemente incrementada (Oliveira *et al.*, 1998). Estirpes de trevo subterrâneo também têm mostrado diferenças na capacidade de resistir à dessecação (Fuhrmann, 1986). Está postulado que uma baixa actividade da água pode alterar o tipo e quantidade de exsudados de raiz libertados, assim como o crescimento da planta, e assim indirectamente afectar a capacidade de certas estirpes competirem na formação do nódulo (Sadowsky e Graham, 1998). O efeito do teor de humidade e do pH irão variar na dependência da temperatura, e valores extremos de temperatura serão prejudiciais para a nodulação (Sadowsky e Graham, 1998). Estirpes com tolerâncias acrescidas a estas diferentes condições são de esperar serem mais competitivas do que estirpes mais sensíveis.

#### 1.3.2.2. Factores da Planta

Uma das técnicas sugeridas para ultrapassar o problema da competição é a utilização de germoplasmas de plantas que excluam a nodulação por estirpes de rizóbio indesejáveis (Triplett e Sadowsky, 1992). Estirpes altamente eficientes na fixação de azoto podem competir melhor na formação de nódulos quando o genótipo da planta restringe a nodulação por outras estirpes (Cregan e Keyser, 1986). No caso da ervilha cultivar Afghanistan, a resistência à nodulação pela maioria das estirpes Europeias é determinada por um gene recessivo da planta hospedeira (Lie, 1984). O gene *nodX* da estirpe TOM permite a esta ultrapassar a resistência da planta à nodulação (Davis *et al.*, 1988). A transferência do gene *nodX* para estirpes que normalmente não nodulam a variedade Afghanistan de ervilha, conferem-lhes a capacidade de nodular esta variedade (Fobert *et al.*, 1991).

O tipo de leguminosa cultivada pode também influenciar a competição por nodulação preferencial por certas estirpes. Num ensaio de campo com ervilha e fava verificou-se preferência por certas estirpes de rizóbio. Um grupo de estirpes, identificado por perfis de plasmídeos específicos, formou cerca de metade dos nódulos nas plantas de ervilha, enquanto que nas plantas de fava aquele grupo nunca foi encontrado. Inversamente, um grupo diferente de estirpes que formou a maioria dos nódulos em fava mas nenhum em ervilha (Hynes e O'Connell, 1990). Situação idêntica foi verificada num outro estudo realizado no Egipto em

que uma estirpe inoculante para lentilhas não mostrava capacidade competitiva em relação às nativas, mas que quando inoculada em trevo bersim mostrou-se altamente competitiva, apesar de não haver diferenças na produção em relação aos trevos não inoculados (Moawad *et al.*, 1998).

#### 1.3.2.3. Quimiotaxia e mobilidade

Em mutantes de rizóbio sem mobilidade mas com capacidade de nodulação e não afectados na velocidade de crescimento, tem sido verificado um comportamento menos competitivo na formação de nódulos quando comparados com as estirpes-mãe (Ames e Bergman, 1981; Mellor *et al.*, 1987), provavelmente devido a uma menor capacidade de adsorção aos pelos radiculares (Caetano-Anollés *et al.*, 1988). Por outro lado, a obtenção de mutantes hipermóveis, teve como resultado o incremento da capacidade competitiva em relação à estirpe-mãe (Bauer e Caetano-Anollés, 1990; Wei e Bauer, 1999). Insucessos na capacidade competitiva têm também sido detectados em estirpes com mutações para a quimiotaxia quando comparadas com as estirpes-mãe, sendo que a quimiotaxia para compostos específicos importantes para a nodulação pode ser importante para um fenótipo competitivo para a nodulação (Yost *et al.*, 1998).

#### 1.3.2.4. Actividade catalítica

A capacidade para metabolizar certos compostos pode dar a certas estirpes uma vantagem competitiva para a formação dos nódulos. Num estudo de Oresnik *et al.* (1998) a mutação e clonagem de genes plasmídicos para o catabolismo de rhamnose, sorbitol e adonitol, foi verificado que apenas os mutantes para a rhamnose eram menos competitivos do que a estirpe-mãe, uma vez que os genes para a utilização deste composto são indutíveis por extratos da raiz de trevo, o que sugere algum papel destes genes nas etapas iniciais da formação dos nódulos. Noutros trabalhos, a competição para a nodulação foi correlacionada com a capacidade de utilização de homoserina, um composto abundante nos exsudados da raiz de ervilha (Hynnes e O'Connell, 1990). A toxina "mimosina" produzida pela leguminosa arbórea *Leucaena*, também parece interferir com a competição, uma vez que as estirpes capazes de a degradar ganham uma vantagem competitiva (Soedarjo e Borthakur, 1998).

### 1.3.2.5. Velocidade de nodulação

Quando as raízes ficam infectadas e noduladas por rizóbio, desenvolve-se uma resposta autoregulatória por parte da planta hospedeira que previne infecções por inoculações subsequentes (Sargent *et al.*, 1987). Esta resposta é demonstrada por ensaios com raízes separadas (*Split-root assay*), nos quais raízes de plantas jovens são espacialmente separadas. Se uma das secções de raízes for inoculada e a outra secção for inoculada com um atraso de mais de 24 horas, a nodulação prossegue normalmente na primeira secção enquanto que na segunda a nodulação é fortemente retardada. Estes resultados permitem inferir que estirpes que nodulem rapidamente poderão ter uma vantagem competitiva. Vários estudos mostram que uma capacidade de nodulação mais rápida conduz a uma competição aumentada. Uma estirpe de *Rhizobium huakuii* capaz de nodular alfavaca (*Astragalus* spp.) mais rapidamente do que *Rhizobium* sp. ACMP18 era mais competitiva do que esta última mesmo quando o inoculo de ACMP18 era 9 vezes mais abundante (Maleck *et al.*, 1998; Stephens e Cooper, 1988). Há no entanto, estudos contraditórios que indicam que uma estirpe capaz de formar infecções mais rápidas do que o seu competidor era, em última análise menos competitiva (Zdor e Pueppke, 1988). Tais estudos apresentam como principal dificuldade de interpretação, o facto de a velocidade de nodulação não ser um conceito bem definido, e a velocidade à qual decorre a iniciação do processo de infecção pode não estar relacionada com a velocidade de formação dos nódulos.

### 1.3.2.6. Efectividade simbiótica

Microsimbiontes efectivos devem ser capazes de formar nódulos nos seus hospedeiros e fixar azoto. Uma região de DNA em *S. Meliloti* foi identificada e designada por *nfe* para a eficiência na formação de nódulos; mutações em *nfe* retardam a formação de nódulos e reduzem a competitividade da estirpe (Sanjuan e Olivares, 1989). O gene *nfeC* de *B. japonicum* também foi evidenciado como afectando a competição (Chun e Stacey, 1994). Mutações no gene *nolJ* na estirpe USDA 201 de *Rhizobium fredii* provocam atrasos na nodulação, diminuição da eficiência de fixação de azoto e redução na competitividade da estirpe (Boundy-Mills *et al.*, 1994). Usando ensaios de raiz separada (*Split-root assay*), Sargent e colaboradores (1987), mostraram que a pré-exposição das raízes a uma estirpe mutante  $\text{Fix}^+$  mas incapaz de nodular, não inibia nodulações posteriores pela estirpe



selvagem. A inoculação simultânea de uma secção da raiz com o mutante e a outra secção com a estirpe selvagem resulta num bloqueio da nodulação pelo mutante e a co-inoculação de um ensaio de raiz simples resultava em vantagem competitiva pela estirpe selvagem. Alguma investigação indica que as plantas seleccionam como simbioses estirpes efectivas na fixação de azoto para a formação dos seus nódulos (George e Robert, 1991). No entanto, Hahn e Studer (1986), detectaram um mutante de *B. japonicum* Fix<sup>-</sup> induzido por Tn5 que competia muito bem com a estirpe parental isogénica. Curiosamente, mais de 60% dos nódulos apresentavam co-infecção, em contraste com os 2-4% frequentemente encontrados (Hynes, 1990). Aqueles autores chamam a atenção para a possibilidade de avaliar co-infecções em estudos de competição.

#### 1.3.2.7. Características da superfície da célula bacteriana

As características da superfície celular que são determinantes do hospedeiro ou que sejam importantes para a nodulação serão importantes para a competitividade. A contribuição de outras características da superfície celular para um fenótipo competitivo já não é tão clara. Em algumas espécies EPS não são determinantes para uma nodulação efectiva. Num estudo onde foram obtidos mutantes de *B. japonicum* induzidos por Tn5, com produção de EPS polisacarídicos de mais baixo peso molecular em relação aos da estirpe parental, verificou-se que os mutantes eram mais competitivos do que a estirpe parental na nodulação de soja (Ozawa *et al.*, 1992). Por outro lado, outra estirpe de *B. japonicum* foi mais competitiva do que a estirpe parental após mutação induzida por Tn5, manifestando deficiência nos seus EPS (Bhagwat *et al.*, 1999). Um mutante de *S. meliloti* deficiente em LPS mostrou competitividade alterada na nodulação de luzerna onde se revelou mais lento na formação de nódulos, menor número de nódulos e de uma maneira geral menos competitiva do que a estirpe parental (Lagares *et al.*, 1992). Este estudo mostra a dificuldade em separar e influência dos factores necessários para uma efectiva nodulação dos factores que contribuem para a competição entre estirpes.

### 1.3.2.8. Plasmídeos de rizóbio e competição

As bactérias da família das *Rhizobiaceae* são caracterizadas por conterem plasmídeos de grande dimensão. Estirpes de *R. leguminosarum* possuem um cromossoma com 3200 kb e quatro ou mais plasmídeos com dimensões superiores a 300 kb (Hynes e Finan, 1998). Apesar de alguns destes plasmídeos serem necessários para a simbiose, nenhum parece ser essencial para a sobrevivência, pelo que não poderão ser considerados como “mini cromossomas” (Hynes e Finan, 1998). Para além disso, estes elementos genéticos comportam-se da mesma forma que plasmídeos mais pequenos ao poderem ser transferidos para outros géneros bacterianos mantendo a capacidade de se replicarem e, aparentemente, sem produzirem danos à bactéria receptora, sendo também possível a cura destes grandes plasmídeos ou a deleção de grandes porções deles (Hynes e McGregor, 1990; Oresnik *et al.*, 2000). As funções determinadas por plasmídeos incluem funções simbióticas, produção de bacteriocinas, actividade catalítica e produção de melanina (Hynes *et al.*, 1988; Hynes e Finan, 1998).

Alguns plasmídeos têm sido relacionados com um fenótipo competitivo ou não competitivo. Plasmídeos auto-transmissíveis detectados em estirpes *R. leguminosarum* bv. *viciae* têm mostrado capacidade de transferir a produção de bacteriocinas para estirpes incapazes de o fazer, em frequências relativamente altas de  $10^{-1}$  a  $10^{-2}$  (Hirsch, 1978; Hirsch, 1979). O plasmídeo Sym auto-transmissível pRL1J1 confere a capacidade de nodular ervilhas bem como outras funções simbióticas (Brewin *et al.*, 1980; Johnston *et al.*, 1978). Esta transferência de plasmídeos é verificada em géis de agarose pelo aparecimento de plasmídeos extra ou maiores (reorganizados) nas células receptoras, correspondendo a plasmídeos do mesmo tamanho nas células dadoras (Hirsch *et al.*, 1980).

Alguns plasmídeos não simbióticos têm sido ligados a um comportamento competitivo (Brewin *et al.*, 1983; Bromfield *et al.*, 1985; Martinez-Romero e Rosenblueth, 1990). Em alguns casos a cura de plasmídeos em estirpes de *Rhizobium loti* reduz a competitividade em relação à estirpe parental (Brom *et al.*, 1992). Por outro lado, estirpes de *Rhizobium loti* curadas mostram competitividade e eficiência fixadora de azoto incrementados em relação à estirpe parental (Pankhurst *et al.*, 1986). Estes resultados mostram a dificuldade em estabelecer o papel dos plasmídeos no desenvolvimento de um fenótipo competitivo.

### 1.3.2.9. Bacteriocinas e Rhizopinas

As bacteriocinas são compostos proteicos de origem microbiana com actividade antibiótica contra estirpes filogeneticamente próximas com o organismo produtor (Barefoot *et al.*, 1994). As rizobiocinas referem-se a bacteriocinas produzidas por rizóbio (Roslycky, 1967). As colicinas de *E. coli* e outras *Enterobacteriaceae* são provavelmente as melhor caracterizadas de todas as bacteriocinas, sendo conhecido que a produção de bacteriocinas ocorre em todo o espectro de eubacterias e Archea (Konisky, 1982; Sahl e Bierbaum, 1998; Jack *et al.*, 1995; Cheung *et al.*, 1997). A capacidade de produzir bacteriocinas pode constituir uma vantagem competitiva na natureza, tal como acontece com a capacidade de *Streptococcus mutans* em colonizar a cavidade bucal de humanos (Hillman *et al.*, 1987) ou com a capacidade de *Leuconostoc plantarum* em competir na fermentação de azeitonas verdes (Riley, 1998).

Os trabalhos desenvolvidos por Triplett e colaboradores têm-se focalizado na aplicação prática de uma rizobiotoxina no problema da competição de estirpes na ocupação de nódulos (Triplett e Barta, 1987; Triplett, 1988; Triplett e Sodowsky, 1992; Scupham *et al.*, 1996; Robleto *et al.*, 1997; Robleto *et al.*, 1999). A estirpe T24 de *Rhizobium trifolii* é conhecida pela capacidade de induzir a formação de nódulos ineficazes e de inibir ou prevenir a formação de nódulos por outras estirpes (Schwinghamer e Belkengren, 1968). A capacidade da estirpe T24 em competir com sucesso com outras estirpes é devida à produção de trifolitoxina (TFX) que possui um carácter inibidor e antibiótico contra rizóbios (Triplett e Barta, 1987). A TFX, de produção constitutiva, tem um relativo largo espectro de actuação (Robleto *et al.*, 1999; Triplett e Barta, 1987). Triplett e Barta (1987) evidenciaram que a TFX aumenta a capacidade competitiva para a nodulação da estirpe T24.

Têm sido obtidos rizóbios recombinantes para a produção de bacteriocinas, especialmente TFX, com evidentes vantagens do ponto de vista competitivo quer em solo estéril quer não estéril (Robleto *et al.*, 1997). Apesar disso, a obtenção de estirpes recombinantes com estas características a utilizar na agricultura, envolve riscos dado existirem evidências de que a produção de TFX poderá ter um efeito negativo na biodiversidade microbiana da rizosfera (Robleto *et al.*, 1999).

Outro factor que pode contribuir para a capacidade competitiva de algumas estirpes é a produção de “rhizopinas”. Estes compostos derivados de myo-inositol constituem um substrato preferencial para as estirpes capazes de os metabolizar e, assim, ao terem um substrato exclusivo, podem exprimir uma vantagem competitiva. Estirpes de *R.*

*leguminosarum* bv. *viciae* e *S. meliloti* produzem e metabolizam a rhizopina L-3-O-methylscyllo-inosamine. Os bacteroides destas estirpes sintetizam estes compostos, exclusivamente usados pelas células da mesma estirpe presentes nos cordões de invasão (Murphy *et al.*, 1995; Wexler *et al.*, 1995). Heinrich *et al.* (1999) referem que uma estirpe de *S. meliloti*, manteve um comportamento competitivo superior ao longo de quatro anos de presença no solo. O catabolismo das rhizopinas parece dependente de uma via metabólica específica, tendo sido recentemente evidenciado que a capacidade de certas estirpes em degradar *myo*-inositol é essencial para uma nodulação eficiente (Fry *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2001).

#### **1.4. Introdução de estirpes de rizóbio**

##### **1.4.1. Avaliação da necessidade de inoculação**

O termo “inoculação de leguminosas” é normalmente usado para descrever a aplicação de rizóbio a sementes ou ao meio usado para o crescimento de plantas leguminosas. Salfeld terá realizado, por volta de 1880, a primeira descrição do acompanhamento da resposta de leguminosas a inoculações por transferência de solo, ao que se seguiram tentativas para a produção de inóculos na década seguinte ao isolamento da bactéria dos nódulos por Beijerinck em 1888. Nobbe e Hiltner requereram, em 1895, patentes na Inglaterra e Estados Unidos para a produção de inoculantes para leguminosas tendo mais tarde sido comercializados com a marca Nitragin (Fred *et al.*, 1932; Eaglesham, 1989).

Segundo Giller e Wilson (1991), para o estabelecimento de nodulações e fixação de N<sub>2</sub> efectivas, a inoculação de leguminosas é normalmente necessária nas seguintes situações:

- 1) Quando rizóbios compatíveis estão ausentes no solo
- 2) Quando a população compatível no solo é muito baixa para dar origem a uma rápida nodulação
- 3) Quando a população indígena é inefectiva ou menos efectiva na fixação de N<sub>2</sub> do que estirpes seleccionadas para a leguminosa em cultura.
- 4) Quando uma leguminosa segue culturas de não leguminosas na rotação
- 5) Na recuperação de solos sujeitos a fortes perturbações físicas ou químicas.

Para além destes critérios, outro tipo de ênfase quanto à necessidade de inoculação, principalmente em leguminosas de produção de grão, pode ser considerado, tal como proposto por Roughley e Brokwell (1987):

- 1) Promiscuidade do hospedeiro em relação às estirpes com que nodula
- 2) Efectividade simbiótica de estirpes nativas associadas a leguminosas indígenas aparentadas com a cultura
- 3) Historial da cultura no local, em especial o intervalo em que a cultura não foi feita
- 4) Condições do solo com influencia na persistência e capacidade saprofitica.

Para a determinação de benefícios resultantes da inoculação de leguminosas, ensaios simples de resposta à inoculação têm sido considerados como um pré requisito essencial para a introdução de leguminosas em novas áreas e para a selecção de estirpes de rizóbio (Vincent, 1970; Nutman, 1976; Date, 1977; Sylvester-Bradley, 1984). Estes ensaios comparam plantas testemunha não inoculadas, plantas inoculadas com estirpes seleccionadas e plantas não inoculadas fertilizadas com azoto mineral. As plantas do tratamento testemunha não inoculado indicam a presença ou ausência de estirpes indígenas e, se presentes, dão-nos indicações sobre a sua efectividade simbiótica. Os tratamentos inoculados indicam-nos a capacidade das estirpes usadas em colonizar o ambiente radicular da planta hospedeira (rizosfera) e de competirem pela ocupação de nódulos com estirpes indígenas eventualmente presentes. O tratamento com utilização de fertilização azotada permite garantir que a leguminosa desenvolve o seu potencial de crescimento, permitindo a detecção de outros factores limitantes.

A possibilidade de resposta à inoculação pode também ser estabelecida pela contagem da população de rizóbio no solo usando uma planta armadilha apropriada (Thompson e Vincent, 1967). Se a população de rizóbios indígenas efectivos no solo for pequena (menor que 20-50 células/g solo) é provável que uma resposta produtiva à inoculação seja detectada (Singleton e Tavares, 1986; Thies *et al.*, 1991). No entanto, apesar deste método nos poder dizer onde será provável encontrar respostas à inoculação, a presença de populações indígenas numerosas não afasta a hipótese de se detectarem respostas à inoculação se forem usados inóculos de alta qualidade, muito competitivos e de elevada efectividade. Se rizóbios compatíveis estiverem ausentes, o incremento na nodulação e fixação de N<sub>2</sub> da cultura poderá ser proporcional à dimensão da população de rizóbio aplicada no inoculo (Brockwell *et al.*, 1985;1989).

#### 1.4.2. Características das estirpes inoculantes

Segundo Brockwell *et al.* (1982) a necessidade de rizóbios inoculantes para leguminosas será crescente, dado que, por um lado, novas variedades de leguminosas de superiores performances agronômicas e produtivas vão sendo introduzidas nos sistemas culturais e, por outro, solos com limitações de fertilidade e pluviosidade serão reclamados para a cultura de leguminosas. Assim, a selecção de estirpes inoculantes deverá ter em conta, para além de elevada eficácia fixadora de azoto atmosférico com hospedeiros compatíveis, várias outras características assim sumarizadas por Freire e Scholles (1996):

- Características agronômicas
  - . Capacidade competitiva para a formação de nódulos na presença de estirpes concorrentes
  - . Sobrevivência na semente e resistência à dessecação
  - . Persistência e sobrevivência no solo. Tolerância a elevadas temperaturas, deficit hídrico, acidez de solo e perturbações químicas associadas
  - . Capacidade para migrar a partir do local de inoculação
  - . Tolerância a agro-químicos e antibióticos
- Características culturais e industriais
  - . Estabilidade genética
  - . Crescimento rápido e pequena produção de gomas extracelulares
  - . Sobrevivência no veículo de transporte de inoculo.

#### 1.4.3. O sucesso da inoculação de leguminosas

A presença e dimensão de populações nativas de rizóbio são o factor determinante do sucesso do estabelecimento de inoculantes em condições de campo (Brockwell e Bottomley, 1995). As bactérias rizóbio estão disseminadas pela generalidade dos solos agrícolas acompanhando a distribuição da presença de leguminosas quer introduzidas quer como componentes da flora espontânea de um dado local. No entanto, alguns solos permanecem sem populações de rizóbio significativas para algumas das leguminosas mais cultivadas, como é o caso da soja na Austrália (Diatloff e Brockwell, 1976) e da luzerna no Cerrado Brasileiro (Xavier *et al.*, 2005). O êxito no estabelecimento de inoculantes nestas condições é frequente. Se as condições edáficas forem apropriadas para o vigoroso crescimento da leguminosa

hospedeira e a quantidade de rizóbios veiculadas na inoculação for suficiente, é então de esperar uma colonização de raiz, rizosfera e solo durante a estação de crescimento da cultura. Após o primeiro ano de cultura e quando ocorrer a senescência dos nódulos, numerosas células viáveis serão libertadas para o solo constituindo uma fonte de inoculo para as culturas subsequentes, tornando-se um componente persistente da micropopulação do solo (Kuykendal *et al.*, 1982).

Em solos com populações nativas, a dimensão destas é muito variável em termos numéricos para uma determinada leguminosa, sendo normalmente tanto maiores quanto melhores condições de crescimento da leguminosa hospedeira. Para Rupela *et al.* (1987) o principal factor que determina a magnitude das populações de rizóbio para grão de bico é a presença (contínua ou a periodicidade com que ocorre) do hospedeiro apropriado. Como já anteriormente referido, outros factores como acidez de solo, textura e distúrbios químicos afectam a dimensão das populações de rizóbio no solo, apesar de ser considerado que os factores ambientais não têm uma influência regular na população de rizóbio desde que não afectem a ocorrência de leguminosas na vegetação (Brockwell e Bottomley, 1995). Para estes mesmos autores, quando no solo existem grandes populações de rizóbio (superiores a  $10^4$  ufn  $gr^{-1}$  de solo) a inoculação de leguminosas é invariavelmente fútil, sendo considerado que, na presença de populações nativas entre 10 e 1000 por grama de solo, a introdução de rizóbios através de inoculantes para leguminosas poderá ter importância prática e mesmo assim na condição de que a população nativa residente, ou uma boa proporção dela, seja pouco eficaz na fixação de azoto.

Nestas circunstancias assume particular importância não só a quantidade de rizóbio veiculado pelo inoculo como também a forma como este é veiculado. Vários autores mostraram que respostas na ocupação de nódulos por estirpes inoculantes em condições de competição com estirpes nativas estão na dependência directa da quantidade de inoculo (Roughley *et al.*, 1993; Somasegaran *et al.*, 1988; Date, 2000), e para que ocorra uma ocupação de pelo menos 50% dos nódulos é necessária uma dose de inoculo 1000 vezes superior ao número estimado de rizóbios nativos presentes no solo (Bohloul e Schmidt, 1973; Weaver e Frederick, 1974). A localização estratégica do inoculo no solo junto aos locais da raiz que primeiramente aceitam infecções pode também constituir uma vantagem na ocupação de nódulos por estirpes inoculantes, sendo a base para a prática corrente da perolização de sementes (Ferreira, 1983).

O sucesso da implantação de estirpes inoculantes para leguminosas está também relacionado com a origem das estirpes usadas e sua relação com condições de solo. O caso da

acidez do solo e suas limitações na nodulação e competição de estirpes tem sido objecto de muitos estudos sobre as vantagens da utilização de inoculantes oriundos de solos ácidos para a inoculação de leguminosas a introduzir neste tipo de solos (Dughri e Bottomley, 1984; Howieson *et al.*, 1988; Richardson e Simpson, 1989; Howieson e Ewing, 1986; Vargas e Graham, 1988).

Na selecção de estirpes apropriadas para serem usadas como inoculantes Brockwell *et al.* (1982) referem que a abordagem pragmática é a de que a estirpe que melhor responder em ensaios de campo será a desejável para uso na prática da inoculação de sementes na cultura de leguminosas, dando assim ênfase à importância da avaliação de estirpes em situações de campo.

### 1.5. Objectivos

O trabalho agora apresentado pretende ser um contributo para um melhor conhecimento sobre a forma como estirpes de rizóbio se implantam em solos de diferentes situações ecológicas do Alentejo, tirando partido de ensaios de campo desenvolvidos para outros fins para além dos aqui abordados.

É conhecido que devido a séculos de co-evolução os solos portugueses são colonizados por populações nativas de rizóbio para trevos, apresentando variações quer na dimensão das populações quer na sua efectividade simbiótica (Ferreira e Marques, 1992; Ferreira e Castro, 1990). Já em relação às populações de rizóbio para grão de bico o conhecimento é bastante incipiente apesar de ser uma cultura com alguma importância num passado recente. Em relação a este hospedeiro, a introdução de novas variedades de sementeira antecipada (Outono/Inverno), impõe um conhecimento sobre as populações nativas em diferentes solos e o comportamento de estirpes introduzidas.

Assim os objectivos propostos são:

- 1) Estimar a dimensão das populações nativas de rizóbio para trevo subterrâneo e para grão de bico.
- 2) Avaliar a capacidade competitiva de inoculantes de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* usando duas estirpes de diferente capacidade de tolerância a condições adversas
- 3) Estudar o padrão de nodulação e recuperação de inoculantes em diferentes variedades de trevo subterrâneo



- 4) Avaliar o comportamento competitivo e de persistência no solo de estirpes de *M. ciceri* de origens diferentes e em solos de diferentes.

A presente dissertação engloba quatro capítulos. Para além da presente introdução, o segundo capítulo refere-se ao estudo da implantação de estirpes de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* em solo que apresenta limitações de pH e toxicidade de manganês, no terceiro e quarto capítulos apresenta-se o estudo sobre a competição e persistência de *M. ciceri* em três locais do Alentejo, procurando relacionar o comportamento de estirpes com as condições de meio e sua variação.



**2. Competição de estirpes *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* num  
solo de pastagem**



## 2. Competição de estirpes *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* num solo de pastagem

### 2.1. Introdução

*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* é uma espécie de rizóbio muito frequente nos solos de Portugal devido à abundância de espécies indígenas de trevos o que permitiu uma co-evolução entre os dois organismos que poderá ter resultado na grande diversidade genética detectada nas populações de rizóbio nativo (Ferreira e Marques, 1992). Tal variabilidade genética nestas populações nativas terá expressão na variabilidade da capacidade de fixação de azoto encontrada entre rizóbios para trevo (Ferreira e Marques, 1986; Ferreira e Castro, 1989). Por este motivo é prática corrente a inoculação de sementes de trevos na implantação de pastagens, especialmente das baseadas em trevo subterrâneo, tendo-se usado numa primeira fase inóculos oriundos de isolamentos exóticos, principalmente importados da Austrália (Ferreira e Castro, 1989), tendo-se verificado em trabalhos de selecção de estirpes nativas a superioridade de alguns dos isolamentos nacionais passíveis de serem usados como inoculantes para trevo (Ferreira, 1983, 1986; Ferreira e Marques 1992). Para além destes trabalhos, foram realizadas pesquisas para o isolamento e selecção de estirpes com capacidade de tolerância a condições adversas de solo nomeadamente, de baixo pH e evidências de toxicidade de alumínio, tendo sido isoladas várias estirpes prometedoras quer na capacidade de fixar azoto quer na tolerância a estas condições de solo prejudiciais à nodulação, competição com estirpes nativas e fixação de azoto (Leitão, 1986).

Os critérios fundamentais para a selecção de estirpes usadas como inoculantes incluem, para além de elevada capacidade de fixação de azoto com uma gama alargada quanto possível de hospedeiros, capacidade competitiva com estirpes nativas, colonização da rizosfera e persistência no solo mesmo na ausência de hospedeiro, principalmente quando usadas em solos com populações nativas de apreciável dimensão (Brockwell *et al.*, 1982; Thies *et al.*, 1991; Brockwell e Bottomley, 1995).

O comportamento de inóculos na competição com estirpes nativas é afectado pelo hospedeiro (Rougley *et al.*, 1976; Brockwell *et al.*, 1977), pelas características do solo, nomeadamente pH e desequilíbrios químicos (Dughri e Bottomley, 1894). Concentrações elevadas de alumínio e manganês afectam a sobrevivência de rizóbio

(Keyser e Munns, 1979), podendo assim condicionar a sua capacidade de colonizar solos e rizosfera onde o efeito destas toxicidades se faça sentir.

Um aspecto pouco abordado na literatura diz respeito à forma como são distribuídos os nódulos ao longo do sistema radicular e, na situação de perolização de sementes, é importante conhecer as implicações que a aplicação do inóculo em local privilegiado para a nodulação pela estirpe inoculante, tem na capacidade de recuperação de estirpes em estudos de competição. Também o aspecto relacionado com o número de plantas a recolher para a avaliação da ocupação de nódulos bem como o número de nódulos a recolher em cada planta é objecto de grande discrepância na literatura. No Quadro 2.1. podemos verificar que em diferentes estudos de competição de estirpes, dois critérios parecem ser os mais relevantes. A escolha de um único nódulo proeminente, isto é, bem desenvolvido, de cor avermelhada e localizado junto ao colo da raiz parece ser um critério de eleição dos autores que consideram que, por um lado, nódulos localizados nas primeiras zonas de desenvolvimento da raiz tiveram um papel relevante no crescimento da radícula e, por outro lado, nódulos proeminentes na região do colo da raiz não diferem significativamente dos nódulos localizados noutras zonas do sistema radicular (Gibson et al., 1976; Diatloff e Brockwell, 1976). Outros autores privilegiam a recolha aleatória ao longo da raiz e outros ainda não fazem qualquer referência à forma como foram eleitos os nódulos objecto de tipagem para identificação dos seus ocupantes.

A análise do Quadro 2.1. permite-nos também observar que quer o número de nódulos recolhidos por planta quer o número de plantas por tratamento objecto de avaliação da ocupação de nódulos, também revela falta de critério uniforme, com consequência na grande variação do total de nódulos avaliados por tratamento podendo variar entre 4 e 200. Também o método de identificação dos ocupantes de nódulos e o tipo de ensaio, seja no campo ou no laboratório, parece não influenciar o método e o tipo de amostragem nos autores apresentados.

No presente estudo, avaliamos o comportamento competitivo de duas estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* inoculadas em quatro cultivares de trevo subterrâneo semeadas num solo usado como pastagem ao longo de 11 anos. Face aos resultados obtidos por vários autores que indicam variações na susceptibilidade à nodulação em diferentes zonas da raiz (Bhuvanewari *et al.*, 1981; Oliveira, 1989), foi realizada uma zonagem do sistema radicular de forma a identificar zonas preferenciais de nodulação e de recuperação da estirpe que se revelou como mais competitiva, dado

que as zonas radiculares susceptíveis de nodular vão estando sujeitas a condições diversas ao longo do tempo, e vão ocupando posições diversas no perfil de solo, pelo que, dada a possibilidade de colonização diversificada, dependente da diversidade de rizóbio compatíveis presentes (Harrison *et al.*, 1989), uma amostragem dirigida apenas ao colo ou uma amostragem aleatória são inadequadas, não permitindo detectar o efeito de condicionantes da nodulação.

**Quadro 2.1.** Estratégias de amostragens de nódulos para a caracterização dos ocupantes em estudos de competição de estirpes seguidas por vários autores. <sup>a</sup> - Amostragem dirigida a nódulos proeminentes baseados no tamanho, cor e posição; <sup>b</sup> - Amostragem aleatória; <sup>c</sup> - Sem indicação do tipo de amostragem. Métodos de identificação: ID-Imunodifusão; AF-Anticorpos Fluorescentes; ELISA-Enzime Linked Imunosorbent Assay; RA-Resistência a Antibiótico; PCR-Polimerase Chain Reaction; PP-Perfil de Plasmídeos; IAR- Resistência Intrínseca a antibióticos; AG-Imunoaglutinação.

Hospedeiro	Tipo de Ensaio	Nódulos por Planta	Nº de Repetições	Nº de Plantas	Nódulos por Tratamento	Método de detecção	Autor
Trevo	Campo	1 <sup>a</sup>	4	4	16	ID	Brockwell <i>et al.</i> , 1982
Grão de bico	Lab/vermiculite	7 - 12 <sup>b</sup>	4	2	56 - 96	AF	Somasegaran <i>et al.</i> , 1988
	Vasos/Solo	7 - 12 <sup>b</sup>	3	2	42 - 72	AF	
Trevo	Campo	15 <sup>a</sup>	4	Não refere	60	ELISA	Slattery e Coventry, 1999
Trevo	Campo	Não refere	Não refere	40	200	ELISA/RA	Renwick e Jones, 1985
Trevo	Campo	10 <sup>b</sup>	4	4	160	AF	Ames-Gottfred e Christie, 1989
Luzerna	Campo	1 <sup>a</sup>	6	Não refere	101	PCR/ID	Hebb <i>et al.</i> , 1998
Ervilha	Campo	5 <sup>b</sup>	Sem Repts	6	30	RA	Amarger, 1981
Ervilha	Lab/Agar	20 <sup>c</sup>	-	10	200	PP/RA	Brevin <i>et al.</i> , 1983
Trevo	Lab/Agar	6 <sup>b</sup>	-	12	72	RA	McLoughlin <i>et al.</i> , 1985
	Lab/solo	8 <sup>b</sup>	-	5	40		
Lentilha	Lab/Vermiculite	50% >20 <sup>b</sup>	3	2	-	AF	May e Bohlool, 1983
Ervilha	Lab/Agar	2 <sup>c</sup>	2	1	4	IAR	Josey <i>et al.</i> , 1979
Feijão	Campo	Não refere	4	4	21	IAR/AG	Beynon e Josey, 1980
Feijão	Lab./Areia	5 <sup>c</sup>	4	1	20	AF/PP	Pepper <i>et al.</i> , 1989
Luzerna	Lab./Areia	10 <sup>c</sup>	5	2	100	RA	Lewis <i>et al.</i> , 1987

## **2.2. Material e Métodos**

### **2.2.1. Plantas**

Quatro cultivares de trevo subterrâneo (Nungarin, Geraldton, Daliak e Woogenellup) foram introduzidas por sementeira directa com uma elevada densidade de sementeira de 200 kg/ha em proporções equitativas de cada uma das cultivares, numa pastagem permanente com 11 anos. O objectivo desta elevada densidade de sementeira consistia em proporcionar um forte aumento da presença de leguminosas com vista à avaliação dos efeitos da mobilização de solo e antecedentes culturais no restabelecimento de pastagens, segundo o protocolo apresentado por Carvalho *et al.*, 1990).

### **2.2.2. Solo**

O ensaio foi instalado no Centro de Estudos e Experimentação da Mitra (C.E.E.M.) pertencente à Universidade de Évora, num solo Litólico não Húmico de Granitos (Pg) com pH de 4,5 em KCl e 2,6% de matéria orgânica. Em trabalhos anteriores, foi detectada toxicidade por manganês na cultura de trigo (Carvalho, 1987).

### **2.2.3. Inóculos e Instalação do ensaio**

#### **2.2.3.1. Uso de mutantes espontâneos resistentes a antibióticos**

Os estudos de ecologia de rizóbio dependem de metodologias capazes de fazer a identificação de estirpes utilizadas em ensaios de campo, particularmente em locais onde as populações nativas exercem pressão competitiva na ocupação de nódulos. Tais metodologias deverão ser razoavelmente específicas, reprodutíveis, simples, rápidas e capazes de serem aplicadas a várias estirpes. Os métodos de identificação normalmente usados em estudos de ecologia de rizóbio incluem morfologia colonial, métodos imunológicos (imunodifusão, anticorpos fluorescentes, ELISA), métodos moleculares (perfis de plasmídeos, PCR, RAPD) e resistência a antibióticos (Resistência intrínseca e mutantes resistentes a elevadas concentrações de antibiótico).



A resistência intrínseca a antibióticos consiste na determinação do padrão de resistência a uma dada gama de antibióticos exibido pela(s) estirpe(s) em estudo. Apesar de útil e muito usado, este método, para ser fiável na distinção entre diferentes estirpes, necessita da utilização de uma larga gama de antibióticos ( 12 a 15), para além de ser aconselhável em estudos de acompanhamento de inoculantes introduzidos no solo, um conhecimento prévio do padrão de resistência encontrado nas estirpes nativas presentes no local de ensaio (Beynon e Josey, 1980; Stein *et al.*, 1982; Sinclair e Eaglesham, 1984). Este método tem a grande vantagem de usar, em estudos de ecologia, estirpes não alteradas e de permitir a caracterização de populações nativas.

Uma segunda possibilidade para a identificação de estirpes com base na sua resistência a antibióticos, recorre à obtenção de mutantes resistentes a elevadas concentrações de antibiótico e sua utilização em ensaios de campo como forma de avaliar o comportamento de estirpes de rizóbio em diferentes situações ecológicas, metodologia inicialmente proposta por Obaton (1971). As estirpes marcadas com resistência a antibióticos podem ser fácil e definitivamente reconhecidas em culturas a partir de solo ou nódulos, quando crescem em meios de cultura onde a pressão selectiva das concentrações correctas do(s) antibiótico(s) apropriado(s) se faz sentir. Apesar da aparente simplicidade do método, a escolha do tipo de antibiótico a usar deve ser criteriosa dado que a aquisição de resistência pode interferir em várias características das estirpes, incluindo caracteres simbióticos, com destaque para a nodulação, efectividade na fixação de azoto e competição. Pankhurst (1977) divide uma larga gama de antibióticos em quatro grupos segundo os seus modos de acção e suas consequenciais ao nível dos caracteres simbióticos, tanto em estirpes de crescimento lento como em estirpes de crescimento rápido. O grupo dos aminoglicosidos, (Estreptomicina, Espectinomicina, Kanamicina, Neomicina, Gentamicina e outros) inibidores de síntese de proteínas nos ribossomas bacterianos, parecer ser aquele em que os seus mutantes resistentes menos interferência têm na efectividade simbiótica apesar de vários relatos em contrário (Hagedorn, 1979; Zelazna-Kowalska, 1971; Jones e Bromfield, 1978; Bromfield e Jones, 1979; Renwick e Jones, 1985). Também em relação é capacidade competitiva destes mutantes têm sido encontradas variações em relação às estirpes originais (Turco *et al.*, 1986; Jones e Bromfield, 1978; Amarger, 1981).

Segundo Bushby (1982) a selecção de mutantes para estudos de ecologia deve ter em conta o nível de resistência atingido, bem como, a estabilidade da mutação após várias gerações e passagem pelo hospedeiro. Os mutantes resistentes a antibiótico

devem manter a efectividade simbiótica e a capacidade competitiva patenteadas pela estirpe original.

### 2.2.3.2. Inóculos usados

Utilizaram-se duas estirpes de *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* pertencentes à colecção do Departamento de Microbiologia da Estação Agronómica Nacional. Identificadas na colecção como Ts282 e Ts248-5. A estirpe Ts282, identificada na colecção da Estação Florestal Nacional como 123Ts-2a, foi seleccionada pela sua elevada eficácia na fixação de azoto e pelo seu largo espectro de hospedeiros (Ferreira, 1986). A estirpe Ts248-5 foi seleccionada, para além da sua capacidade fixadora de azoto quando testada em trevo subterrâneo da cultivar Mount Barker, pela sua tolerância no crescimento e nodulação a baixo pH (4,5) e em meio com 100  $\mu\text{M}$   $\text{Al}^{+++}$  (Leitão, 1986). A partir destas duas estirpes foram isolados mutantes espontâneos resistentes a antibióticos usando o protocolo descrito por Bromfield (1977). Dos mutantes obtidos, escolheu-se para o ensaio de campo um de cada uma das estirpes em estudo (Quadro 2.2.), e que apresentavam um nível de resistência superior a 250  $\mu\text{g/ml}$  de Espectinomicina (Ts282 – Estirpe A) e Estrptomicina (Ts248-5 – Estirpe B) no meio de cultura (AML). O nível de resistência aos antibióticos atingido permite a sua identificação a partir de isolamento de nódulos recolhidos do solo (Obaton, 1971). Foi usada uma marcação simples (apenas resistência a um antibiótico) dado no local de ensaio não se terem detectado estirpes nativas com resistências a estes antibióticos (Maximino, 1992). Nos mutantes escolhidos não foi detectada alteração das suas características culturais e simbióticas quando comparadas com as estirpes originais, podendo assim ser usadas como indicadores do seu comportamento no solo (Bushby, 1982).

Para a preparação dos inóculos a usar no ensaio de campo, inoculou-se meio de Manitol Levedura (ML) seguindo-se incubação durante 72 horas a 28°C em agitação. Após o crescimento, 50 ml da cultura de cada uma das estirpes (A e B), foi utilizada para inocular sacos de 200 g de turfa esterilizada, ao que se seguiu um período de 10 dias para incubação a 25°C. Constituíram-se dois lotes de mistura de trevos, cada um deles inoculados com uma das estirpes (A ou B), utilizando o processo de perolização descrito por Ferreira (1986).

**Quadro 2.2.** Algumas características das estirpes *R. leguminosarum bv. trifolii* usadas no ensaio

Inóculo		Origem	Tolerância à acidez e toxicidade Al	Resistência a antibiótico
Ts282	A	Vila Viçosa Luvissole	Sensível	Espectinomicina 250 ppm
Ts248-5	B	Cova da Beira Derivado de gneisses pH 4,3	Tolerante pH 4,5 100 µM Al <sup>+++</sup>	Estreptomomicina 250 ppm

### 2.2.3.3. Sementeira

A sementeira dos trevos foi realizada por sementeira directa, em que cada passagem do semeador foi feita distribuindo semente inoculada com cada um dos inóculos A e B. Entre cada distribuição de semente inoculada foi feita uma desinfecção das tremonha de semente usando-se uma solução comercial de lixívia deixando um período de cerca de duas horas para secagem. O ensaio foi realizado em blocos casualizados com três repetições. Os talhões de ensaio tinham uma dimensão de 2,1 metros (largura do semeador) por 20 metros de comprimento.

### 2.2.4. Estimativas populacionais

#### 2.2.4.1. Viáveis nas sementes (ufc)

Utilizou-se uma contagem de viáveis em placa para avaliar o número de unidades formadoras de colónias (ufc) de cada uma das estirpes presentes nas sementes perolizadas. Duas amostras de 5 sementes de trevo foram recolhidas aleatoriamente de cada um dos lotes de semente perolizada e colocados em tubos de ensaio aos quais se juntaram 2 ml de água destilada estéril e cinco pérolas de vidro esterilizadas, ficando a embeber durante 15 minutos para dissolução do invólucro resultante da perolização, ao que se seguiu uma forte agitação em vortex durante 2 minutos. A partir da suspensão assim obtida realizaram-se 3 diluições decimais, plaqueando-se, em triplicado, 200 µl de

cada diluição. Sobre o inóculo em placa de Petri verteram-se 20 ml de meio de Agar de Manitol Levedura suplementado com Ciclohexamida, Vermelho do Congo (Vincent, 1970) e o antibiótico apropriado na concentração de 250 µg/ml, segundo o inóculo de cada um dos lotes de semente. Após 4 dias de incubação contaram-se o número de colônias típicas em cada uma das placas e estimou-se a densidade de inóculo em cada semente.

#### **2.2.4.2. População nativa de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii***

##### **2.2.4.2.1. Colheita e processamento das amostras de solo**

Para cada uma das três repetições do ensaio foram recolhidas amostras de solo usando uma sonda de meia cana, retirando-se três cilindros de solo até à profundidade de 20 cm em cada uma das repetições. Para um saco foram retirados segmentos cilíndricos de solo de modo a obter amostras correspondentes a três níveis de profundidade; 1-5 cm, 5-10 cm e 10-20 cm. Com as três amostras recolhidas por repetição constitui-se uma amostra compósita representativa de cada repetição de ensaio. Uma vez no laboratório, cada um dos sacos correspondentes aos três níveis de profundidade, foi homogeneizado e o solo crivado por crivo de 2mm, tendo-se colocado todas as amostras a 4°C até à realização das diluições de solo para estimativa da população nativa de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Para cada uma das amostras foi determinado o peso seco de solo a 105°C. A colheita das amostras de solo foi realizada em Novembro de 1987.

##### **2.2.4.2.2. Diluições de solo e inoculação de plântulas**

As amostras de solo retiradas do frio foram pesadas a um equivalente de 10 g de solo seco sendo seguidamente diluídas a 1:10 usando-se 90 ml de solução nutriente WB (Wacek e Brill, 1976) diluída a um quarto e sem adição de sacarose. A suspensão de solo obtida em balão Erlenmeyer 250 ml foram adicionadas pérolas de vidro tendo-se procedido à sua agitação em agitador orbital durante 10 minutos a 250 ciclos por minuto.

Sementes de trevo subterrâneo cultivar Nungarin foram exteriormente desinfectadas segundo o descrito por Vincent (1970), distribuídas em placas de Petri com Agar de água 0,8%, colocadas uma noite a 4°C e incubadas a 28°C para germinação. Quando as radículas atingiram aproximadamente 1 cm foram assépticamente transferidas para frascos serológicos de 25 ml cheios com areia quartzosa estéril e 4 ml de solução nutritiva WB.

A partir da diluição 1:10 inicialmente realizada, procedeu-se a uma nova diluição da suspensão de solo de modo a obter uma diluição inicial de 1:500, sendo esta a diluição inicial, realizando-se 6 diluições sequenciais de factor 1:5, usando-se 1 ml de cada diluição para inoculação de plântulas em quadruplicado para determinação do Número Mais Provável (MPN) de rizóbio por grama de solo, segundo o descrito por Brockwell (1963).

#### **2.2.4.2.3. Crescimento e observação de raízes**

Os frascos com as plântulas de trevo inoculadas com as diluições de solo foram colocados em câmara de crescimento de plantas com fotoperíodo de 16 horas e 8 horas de obscuridade. A temperatura diurna foi de 24°C e nocturna de 18°C. A radiação fotossinteticamente activa medida na câmara foi de  $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . O crescimento das plantas durou 3 semanas, tendo-se realizado semanalmente uma redistribuição dos frascos na câmara de modo a minimizar efeitos de variação térmicas e luminosas nos diferentes locais das prateleiras onde se localizaram os fracos suporte.

Após o crescimento, as plantas foram cuidadosamente removidas dos frascos, e o sistema radicular lavado em água corrente de modo a remover a areia. O sistema radicular foi cuidadosamente observado de modo a detectar a presença de nódulos. A presença de um único nódulo num sistema radicular foi considerado como um resultado positivo e a ausência de nódulos, um resultado negativo. A estimativa das densidades populacionais de *R. leguminosarum bv. trifolii* foi feita comparando os códigos de positivos e negativos obtidos com as tabelas apresentadas por Brockwell, 1963, 1982) e os resultados apresentados em unidades formadoras de nódulos (ufn) por grama de solo.

### **2.2.5. Colheita de trevo e identificação das estirpes inoculantes**

A colheita dos trevos realizada para a identificação das variedades de trevo e da detecção da presença de estirpes inoculantes nos seus nódulos foi realizada no início de Primavera de 1988. Nas linhas de sementeira, foram recolhidas secções de cerca de 20 cm de comprimento por 10 cm de largura e uma profundidade de cerca de 15 cm. Foram recolhidas de forma aleatória 3 secções por talhão de ensaio. No laboratório, em água corrente foi retirado o solo, separadas as plantas, identificadas as variedades de trevo, as raízes removidas e desinfectadas com lixívia comercial diluída a 10%. Colocadas em sacos de plástico foram congeladas a -18°C até futura utilização. Pelo menos cinco raízes por variedade de trevo, por repetição e por inóculo (A e B) foram recolhidas.

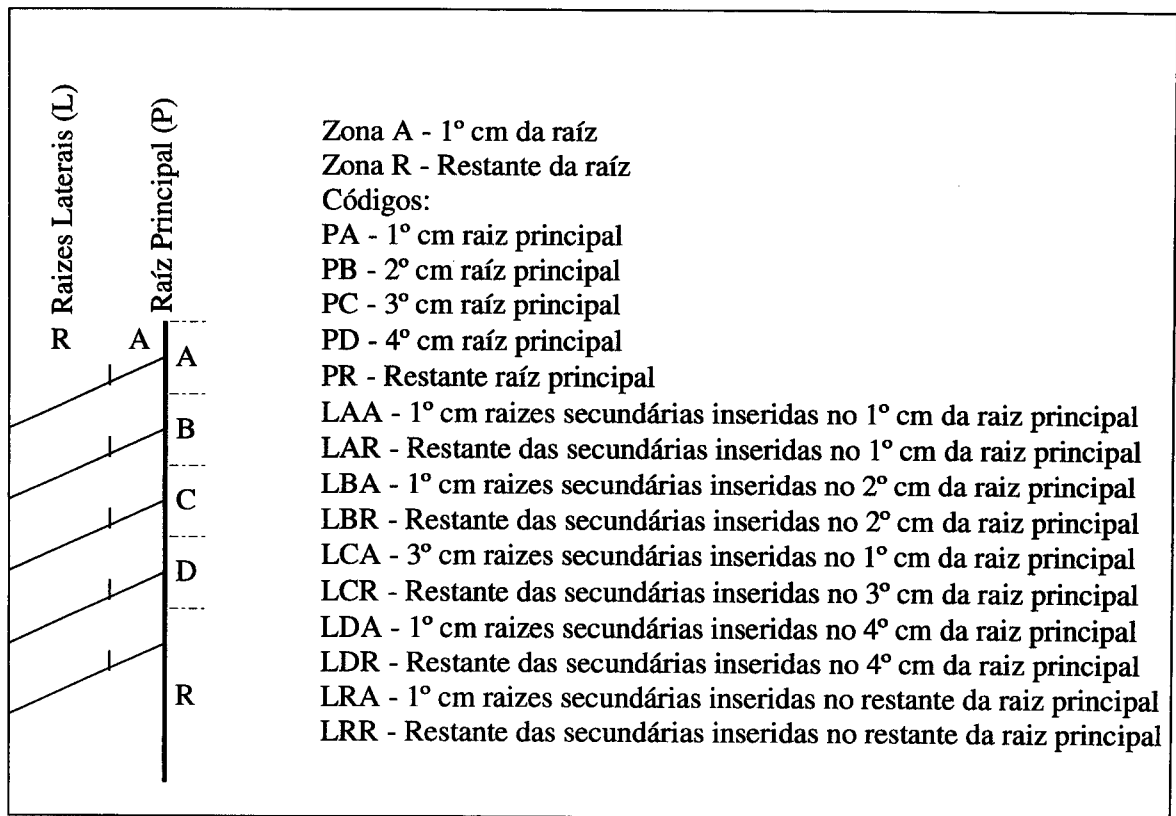
### **2.2.6. Identificação da estirpe inoculante**

Todos os nódulos de cada raiz foram contados e picados com agulha estéril segundo Winarno e Lie (1979). A picada resultante foi seguidamente transferida para meio de Agar Manitol Levedura (AML) e para meio AML suplementando com os antibióticos em uso (Espectinomicina para o despiste da estirpe A e Estreptomomicina para o despiste da estirpe B). A ausência de crescimento nos meios suplementados com antibiótico foi tomada como indicadora da presença de estirpes nativas no respectivo nódulo, enquanto que o crescimento típico de colónia de rizóbio foi tomado como indicador das estirpes introduzidas, A ou B conforme o antibiótico usado.

### **2.2.7. Distribuição dos nódulos ao longo da raiz**

A recuperação dos ocupantes de nódulos foi realizada registando a posição relativa dos nódulos na raiz. Com o auxílio de uma grelha (Figura nº 2), dividiu-se a raiz a raiz principal em segmentos de 1 cm desde o colo até aos 4 cm. A partir daí foi considerado o restante da raiz principal. Foram também consideradas as raízes secundárias inseridas nos diferentes segmentos da raiz principal, obtendo-se assim os códigos de localização apresentados na Figura 2.2.. Este sistema permitiu conhecer a

localização preferencial da localização dos nódulos bem como estabelecer a sua relação com a recuperação das estirpes inoculantes.



**Figura 2.1.** Zonagem da raiz de trevo subterrâneo para colheita de nódulos e caracterização da sua distribuição.

## 2.3. Resultados

### 2.3.1. População nativa de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*

Os resultados obtidos para a população nativa de rizóbio para trevo subterrâneo parecem denotar uma população elevada principalmente na camada mais superficial do solo, verificando-se, como seria de esperar, uma redução dos níveis populacionais com a profundidade das amostras recolhidas. No Quadro 2.3. podemos observar os resultados das contagens populacionais obtidas para cada uma das três repetições. De notar que a população na repetição 2 é inferior à da repetição 1 em mais do que uma ordem de logaritmo e que esta repetição 1 apresenta uma população sempre superior às outras repetições em todas as profundidade analisadas.

**Quadro 2.3.** População de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* no local de ensaio segundo repetições e profundidade (ufn g<sup>-1</sup> de solo).

	Profundidade (cm)		
	0 - 5	5 - 10	10 - 20
Rep I	5,6x10 <sup>5</sup>	1,4x 10 <sup>4</sup>	1,7x10 <sup>4</sup>
Rep II	1,0x10 <sup>4</sup>	4,0x10 <sup>2</sup>	1,0x10 <sup>3</sup>
Rep III	8,1x10 <sup>4</sup>	2,0x10 <sup>3</sup>	1,1x10 <sup>3</sup>

Segundo Brockwell e Bottomley (1995), populações destas dimensões constituem um obstáculo à implantação de estirpes inoculantes, tanto mais que o solo no local de ensaio evidencia um pH ácido com toxicidade provocada por manganês na cultura de trigo (Carvalho, 1987).

As populações introduzidas com as sementes inoculadas apesar de não poderem ser consideradas como elevadas, deixam no entanto a possibilidade de revelarem a sua capacidade competitiva perante população nativa (Quadro 2.4.).



**Quadro 2.4..** População de inóculo por semente (ufc/semente).

Inóculo	População
A	$1,7 \times 10^3 \pm 3,1 \times 10^2$
B	$1,3 \times 10^3 \pm 4,7 \times 10^2$

### 2.3.2. Capacidade competitiva das estirpes introduzidas

A capacidade competitiva das estirpes introduzidas revelada pela proporção dos nódulos ocupados por cada uma das estirpes utilizadas nas quatro variedades de trevo subterrâneo estudadas é apresentada no Quadro 2.5., sendo evidente a diferença registada entre a estirpe A e a estirpe B, independentemente do hospedeiro de onde os nódulos foram recolhidos. Podemos também verificar que o número de nódulos formados em cada uma das variedades de trevo subterrâneo é independente da proporção de inoculo recolhido, evidenciando a capacidade de nodulação das estirpes nativas.

**Quadro 2.5.** Número de nódulos recolhidos em cada cultivar (Nº Nod) e percentagem de nódulos ocupados (%R) por cada uma das estirpes A e B.

Var. Inoc.	Woogenellup		Geraldton		Daliak		Nungarin	
	Nº Nod.	%R	Nº Nod.	%R	Nº Nod.	%R	Nº Nod.	%R
A	45	3	32	6	35	3	32	1
B	35	39	29	34	32	30	36	45

Inoc. A	%R	Cultivares - F[3,54] = 2,08 n.s
	Nº Nod.	Cultivares - F[3,54] = 1,65 n.s
Inoc. B	%R	Cultivares - F[3,50] = 0,76 n.s
	Nº Nod.	Cultivares - F[3,55] = 0,39 n.s
Entre Inoc.	Média	Cultivares - F[1,110] = 99,43 P<0,001

Parece evidente que a estirpe B mostrou uma capacidade competitiva perante as estirpes nativas significativamente superior à verificada para a estirpe A. Dadas as

características evidenciadas pelas estirpes, tais resultados seriam de esperar pois a estirpe **B** possui maior tolerância quer ao efeitos da acidez de solo, quer à toxicidade ao alumínio, sendo originária de solo que apresentava tais características (Leitão, 1986), que lhe poderão ter conferido alguma capacidade em tolerar a toxicidade por manganês evidenciada neste solo. A estirpe **A**, derivada da estirpe 123Ts-2ª, anteriormente testada em solo vermelho de xisto (Vx), de pH 5, foi considerada muito competitiva em relação a outras estirpes testadas e às nativas (Ferreira, 1986). No entanto, o solo dos referidos ensaios apresentava uma população nativa de rizóbio para trevo de apenas 40 ufn g<sup>-1</sup> e realizou-se uma calagem do solo antes da realização desse ensaio, o que poderá ter tido influência nos bons resultados obtidos na recuperação desta estirpe naquelas condições.

### **2.3.3. Avaliação da distribuição dos nódulos e da estirpe de competitiva ao longo da raiz**

Com o objectivo de conhecer melhor as condições de competição de estirpes inoculantes, a forma como a nodulação se distribui ao longo da raiz e a variabilidade dos resultados obtidos poder ser devida a condições do solo e/ou das plantas, procedeu-se, aquando da recolha dos nódulos da raiz, a uma zonagem da raiz registando-se segundo, o esquema da Figura 2.1., os locais da raiz onde se encontravam os nódulos assim como daqueles que revelavam a presença da estirpe **B**, revelada pela sua resistência ao antibiótico usado como marcador (Estreptomina).

Nos resultados apresentados no Quadro 2.6., verifica-se uma variação significativa no número de nódulos formados nas três repetições usadas no delineamento, pelo que importava fazer uma abordagem mais fina de forma a verificar as razões de tal variação.

Optou-se por um tratamento dos dados recorrendo a métodos baseados na análise discriminante e análise das correspondências seguida de classificações automáticas de forma a classificar as zonas da raiz segundo a presença de nódulos e de resistentes (considerada a estirpe inoculante **B**) em todas as cultivares usadas e em todas as repetições. Tendo em conta a natureza binomial dos dados adoptaram-se métodos não paramétricos por serem apropriados quando os pressupostos distribucionais da análise de variância não são satisfeitos (nem aproximadamente), testando-se hipóteses nulas sobre a distribuição dos dados e não sobre parâmetros estatísticos específicos, como seja a média na análise de variância (Sokal & Rohlf 1995). Os testes de Kruskal-Wallis e os

testes bilaterais U de Mann-Whitney foram realizados usando o programa *Statgraphics* 4.2 (STSC, Inc., Rockville, MD, USA).

**Quadro 2.6.** Número de nódulos e proporção de nódulos ocupados pela estirpe B (%R) em cada repetição

Var. Rep.	Woogenellup		Geraldton		Daliak		Nungarin	
	Nº Nod.	%R	Nº Nod.	%R	Nº Nod.	%R	Nº Nod.	%R
I	26	28	17	38	19	44	8	58
II	38	28	21	30	30	14	53	48
III	41	61	48	34	50	-	42	31
Med	35	39	29	34	33	30	36	45

Nº Nod	Repetições para médias 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 médias das cultivares	F[3,51] = 1,27 n.s
	Cultivares para média das repetições	F[3,50] = 0,76 n.s

### 2.3.3.1. A cultivar (independentemente de repetições e plantas) afecta o número de nódulos?

Optou-se por testar a igualdade da nodulação entre as 4 cultivares separadamente para cada uma das 15 variáveis localização na raiz e para o total (somatório) de nodulações nas raízes.

Assim, para as 16 variáveis examinadas, só se detectaram diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis em NPA (P=0.015), em todas as restantes, as cultivares não diferiam significativamente quanto ao número de nódulos (P≥0.086).

Numa primeira abordagem, não parece haver diferenças significativas entre as cultivares no que diz respeito à nodulação independentemente das repetições e plantas.

No entanto, e tendo em conta que a hipótese científica está a ser avaliada por um total de 16 variáveis, decidiu-se recorrer a técnicas de meta-análise (Hedges e Olkin, 1985).

De acordo com essas técnicas e tendo em conta os níveis de significância

individuais dos 16 testes independentes de Kruskal-Wallis, a hipótese nula de não haver diferenças significativas entre a nodulação das 4 cultivares deverá ser aceite ( $P=0.317$ ), conforme o apresentado no Quadro 2.7..

**Quadro 2.7.** Parâmetros estatísticos das variáveis em que não se detectaram diferenças significativas no nº de nódulos entre as cultivares, independentemente das repetições e plantas (N – Somatório da nodulações absolutas).

	n	mediana	média (SE)
N	59	28	32.4 (2.5)
NLAA	59	6	6.3 (0.6)
NLAR	59	5	8.5 (1.3)
NPB	59	2	2.7 (0.3)
NLBA	59	1	1.7 (0.4)
NLBR	59	1	2.7 (0.7)
NPC	59	1	1.3 (0.2)
NLCA	59	0	0.6 (0.2)
NLCR	59	0	0.9 (0.3)
NPD	59	0	0.8 (0.2)
NLDA	59	0	0.3 (0.1)
NLDR	59	0	0.2 (0.1)
NPR	59	0	0.9 (0.2)
NLRA	59	0	0.2 (0.1)
NLRR	59	0	0.2 (0.1)

Adicionalmente, é de ainda de referir que na única variável em que se detectaram diferenças significativas entre as cultivares (NPA – Nódulos recolhidos no 1º segmento da raiz principal, Figura 2.1.) os testes de U de Mann -Whitney não foram conclusivos no que diz respeito a quais as cultivares que diferem de quais, já que se formaram grupos não mutuamente exclusivos (Quadro 2.8.) embora pareça relativamente claro que a nodulação na zona NPA de Daliak é superior à das restantes cultivares.

**Quadro 2.8.** Parâmetros estatísticos para o n° de nódulos na zona PA. Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente.

NPA	n	mediana	média (SE)	
Woogenellup	15	5	5.1 (0.6)	ab
Geraldton	15	3	3.7 (0.6)	b
Daliak	15	7	6.7 (0.7)	a
Nungarin	14	3.5	4.8 (1.4)	b

**2.3.3.2. A Cultivar (independentemente das repetições e plantas) afecta a presença da estirpe inoculante?**

Optou-se por testar a igualdade da estirpe inoculante (resistente ao antibiótico) entre as 4 cultivares separadamente para cada uma das 15 variáveis localização na raiz e para o total (somatório) da sua presença nas raízes (R). Assim, para as 16 variáveis examinadas, detectaram-se diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis em R ( $P=0.010$ ), RLAA ( $P=2.252 \times 10^{-3}$ ), RPC ( $P=0.037$ ) e RLCA ( $P=4.566 \times 10^{-3}$ ); em todas as restantes, as cultivares não diferiam significativamente quanto à presença da estirpe inoculante ( $P \geq 0.109$ ).

Numa primeira abordagem, não parece haver diferenças significativas entre as cultivares no que diz respeito à presença da estirpe **B**, independentemente das repetições e plantas. No entanto, e tendo em conta que a hipótese científica está a ser avaliada por um total de 16 variáveis, decidiu-se recorrer a técnicas de meta-análise (Hedges e Olkin, 1985). De acordo com essas técnicas e tendo em conta os níveis de significância individuais dos 16 testes independentes de Kruskal-Wallis, a hipótese nula de não haver diferenças significativas de recuperação de inóculo nas 4 cultivares não deverá ser aceite ( $P=7.601 \times 10^{-4}$ ), conforme o Quadro 2.9..

**Quadro 2.9.** Parâmetros estatísticos das variáveis em que não se detectaram diferenças significativas na presença da estirpe inoculante entre as cultivares, independentemente das repetições e plantas.

	n	mediana	média (SE)
RPA	59	1	2.0 (0.3)
RLAR	59	0	1.8 (0.5)
RPB	59	0	0.9 (0.2)
RLBA	59	0	0.3 (0.1)
RLBR	59	0	0.8 (0.2)
RLCR	59	0	0.2 (0.1)
RPD	59	0	0.3 (0.1)
RLDA	59	0	0.03 (0.03)
RLDR	59	0	0.1 (0.03)
RPR	59	0	0.3 (0.1)
RLRA	59	0	0.1 (0.04)
RLRR	59	0	0.1 (0.03)

Apesar de globalmente haver diferenças significativas entre as cultivares no que diz respeito à presença do inóculo, nas variáveis em que se detectaram diferenças significativas entre as cultivares (R, RLAA, RPC e RLCA) os testes de U de Mann-Whitney não foram geralmente conclusivos no que diz respeito a quais das cultivares diferem de quais, já que se formaram geralmente grupos não mutuamente exclusivos (Quadro 2.10), sendo a única exceção RLCA, em que Nungarin tem valores significativamente superiores aos das restantes 3 cultivares. Nas restantes variáveis a tendência parece ser de Woogenellup e Nungarin terem valores de recuperação de inóculo superiores e Daliak sempre inferiores.

**Quadro 2.10.** Parâmetros estatísticos para o nº resistentes nas zonas RLAA, RPC, RLCA e R - Somatório das recuperações de inóculo absolutas.

	n	mediana	média (SE)	
<b>R</b>				
Woogenellup	15	11	13.0 (2.5)	a
Geraldton	15	7	8.2 (1.9)	ab
Daliak	15	3	4.1 (1.2)	b
Nungarin	14	8	12.1 (3.4)	a
<b>RLAA</b>				
Woogenellup	15	4	3.7 (0.9)	a
Geraldton	15	2	1.5 (0.4)	b
Daliak	15	0	0.5 (0.3)	c
Nungarin	14	1	1.8 (0.5)	ab
<b>RPC</b>				
Woogenellup	15	0	0.5 (0.3)	ab
Geraldton	15	0	0.5 (0.3)	ab
Daliak	15	0	0.1 (0.1)	b
Nungarin	14	1	1.0 (0.4)	a
<b>RLCA</b>				
Woogenellup	15	0	0.1 (0.1)	b
Geraldton	15	0	0.2 (0.2)	b
Daliak	15	0	0 (0)	b
Nungarin	14	0	0.5 (0.2)	a

**2.3.3.3. A cultivar (independentemente das repetições e plantas) afecta do inóculo quando expressa em percentagem da nodulação?**

Optou-se por testar a igualdade das percentagens de resistência (RN) entre as 4 cultivares separadamente para cada uma das 15 variáveis localização na raiz e para o total (somatório) de resistentes e nódulos nas raízes. Assim, para as 16 variáveis examinadas, detectaram-se diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis em RN

( $P=0.047$ ), RNLAA ( $P=8.157 \times 10^{-3}$ ) e RNPC ( $P=0.018$ ); em todas as restantes, as cultivares não diferiam significativamente quanto à percentagem de resistentes ( $P \geq 0.053$ ).

Numa primeira abordagem, não parece haver diferenças significativas entre as cultivares no que diz respeito à percentagem de nódulos ocupados pelo inoculante independentemente das repetições e plantas. No entanto, e tendo em conta que a hipótese científica está a ser avaliada por um total de 16 variáveis, decidiu-se recorrer a técnicas de meta-análise (Hedges e Olkin, 1985).

De acordo com essas técnicas e tendo em conta os níveis de significância individuais dos 16 testes independentes de Kruskal-Wallis, a hipótese nula de não haver diferenças significativas entre a percentagem de resistentes das 4 cultivares não deverá ser aceite ( $P=4.488 \times 10^{-3}$ ), tal como apresentado no Quadro 2.11..

Apesar de haver globalmente diferenças significativas entre as cultivares no que diz respeito à percentagem de resistentes, nas variáveis em que se detectaram diferenças significativas entre as cultivares (RN, RNLAA e RNPC) os testes de U de Mann-Whitney não foram geralmente conclusivos no que diz respeito a quais das cultivares diferem de quais, já que se formaram geralmente grupos não mutuamente exclusivos (Quadro 2.12.), a única exceção sendo RNLAA em que Daliak tem valores de percentagem de resistentes significativamente inferiores aos das restantes 3 cultivares. Nas restantes duas variáveis a tendência parece ser a de Nungarin ter percentagens de resistentes superiores e Daliak inferiores.



**Quadro 2.11.** Parâmetros estatísticos das variáveis em que não se detectaram diferenças significativas na percentagem de resistentes entre as cultivares, independentemente das repetições e plantas.

	n	mediana	média (SE)
RNPA	56	33.3	44.8 (5.3)
RNLAR	52	0	18.9 (3.8)
RNPB	50	0	31.2 (5.5)
RNLBA	30	0	18.5 (6.6)
RNLBR	30	26.1	36.8 (7.2)
RNLCA	18	0	36.1 (10.6)
RNLCR	15	33.3	30.4 (7.6)
RNPD	23	0	34.1 (9.6)
RNLDA	7	0	9.5 (9.5)
RNLDR	7	0	32.1 (17.9)
RNPR	21	0	28.4 (8.0)
RNLRA	10	0	35.0 (15.0)
RNLRR	6	7.1	35.7 (20.5)

**Quadro 2.12.** Parâmetros estatísticos para a percentagem de resistentes nas zonas RNLAA, RNPC e RN - Somatório da percentagem de resistentes absolutos.

	n	mediana	média (SE)	
<b>RN</b>				
Woogenellup	15	33.3	38.8 (6.6)	ab
Geraldton	15	41.0	34.2 (5.5)	ab
Daliak	15	14.8	19.8 (6.7)	b
Nungarin	14	42.5	41.0 (6.7)	a
<b>RNLAA</b>				
Woogenellup	15	36.4	45.5 (7.9)	a
Geraldton	15	28.6	29.1 (6.7)	a
Daliak	13	0	10.7 (4.6)	b
Nungarin	11	33.3	43.8 (10.3)	a
<b>RNPC</b>				
Woogenellup	10	0	35.0 (15.0)	ab
Geraldton	8	25.0	43.8 (17.5)	a
Daliak	10	0	2.5 (2.5)	b
Nungarin	10	75.0	63.3 (13.3)	a

#### 2.3.3.4. Análises Discriminantes

Nas análises anteriores concluiu-se que não havia diferenças significativas entre as cultivares no que diz respeito ao número de nódulos, o contrário acontecendo com o número de nódulos ocupados pelo inóculo e, naturalmente, com a percentagem da sua recuperação. No entanto, nos dois últimos não só não se detectaram diferenças significativas entre as cultivares para a maior parte das variáveis como, nos casos em que se detectaram, não foi possível determinar de forma não ambígua, qual ou quais as cultivares que diferem de qual ou quais. Naturalmente que nessas análises se procuraram diferenças globais, independentes de variações internas de cada grupo considerado, pelo que a ambiguidade observada poderá ser devida a perfis diferenciados das plantas, podendo admitir-se que quer no caso em que não há diferenças entre as

cultivares quer nos dois casos em que globalmente há, as cultivares tenham características para o conjunto das plantas e repetições que permitam individualizá-las e separá-las (discriminá-las) umas das outras. Consequentemente, uma análise discriminante permitirá individualizar e separar grupos (cultivares).

Assim realizaram-se análises discriminantes para as várias hipóteses testadas probabilisticamente por métodos não paramétricos. Seguiu-se o método da árvore de decisão binária (Gueguen e Nakache 1988) usando os procedimentos DISAR e DISEL de SPAD-S (Gueguen et al. 1996), usando uma selecção aleatória de 66% dos indivíduos como grupo-base e os restantes como grupo-teste e avaliando a qualidade da discriminação pela proporção de bem classificados e pela de mal classificados quer do grupo-base quer do grupo-teste.

Consideraram-se assim 59 plantas classificadas em quatro classes consoante as cultivares e descritas pelas 16 variáveis, realizando-se separadamente uma análise discriminante para as variáveis nódulos e para as variáveis presença da estirpe inoculante. Tendo em conta que para as variáveis inóculo, em percentagem dos nódulos, o número de dados em falta representava quase metade (49.6%) da matriz de dados optou-se por não realizar uma análise discriminante com estas variáveis.

**Quadro 2.13.** Análise discriminante para as variáveis nódulos e presença da estirpe inoculante. Quatro classes (Woogenellup, Geraldton, Daliak e Nungarin).

Classificação	Grupo-base:	Grupo-teste:
<b>Nódulos</b>		
Bem classificados	41 %	30%
Mal classificados	59%	70%
Variedade melhor (máximo)	Woogenellup 100%	Woogenellup 100%
Variedade pior (mínimo)	Daliak e Nungarin 0%	Daliak e Nungarin 0%
<b>Inóculo</b>		
Bem classificados	51.3%	40%
Mal classificados	48.7%	60%
Variedade melhor (máximo)	Woogenellup 90%	Woogenellup e Daliak 60%
Variedade pior (mínimo)	Geraldton 0%	Geraldton 0%

Do Quadro 2.13 resulta que, apesar da descrição das plantas pelas variáveis presença do inóculo melhorar a capacidade de discriminação das plantas classificadas pelas cultivares quando comparada com a descrição pela distribuição dos nódulos, ainda

assim a capacidade de discriminação destas é relativamente baixa, sugerindo e de alguma forma confirmando as conclusões obtidas previamente dos testes não-paramétricos, que os perfis de nódulos e de resistentes não permitem diferenciar satisfatoriamente as cultivares. Isto é, ao tentar classificar ou caracterizar as variedades através da presença de nódulos nos diferentes locais ou zonas da raiz, verificamos que apenas a variedade Woogenellup assim pode ser caracterizada. Já a caracterização das variedades ou classes através da presença da estirpe inoculante, a discriminação das variedades embora melhor, continua muito baixa. A redução da qualidade da classificação da variedade Woogenellup verificada na distribuição dos nódulos ocupados pela estirpe inoculante na raiz, principalmente no grupo teste, pode indicar que localização de nódulos e recuperação de inoculo poderão não estar relacionados

#### 2.3.3.5. Classificações automáticas

Adicionalmente, e como forma independente de avaliação da hipótese de haver diferenças entre as cultivares, realizaram-se classificações automáticas em 4 classes e no número de classes óptimo pelo método hierárquico. As classificações automáticas foram feitas usando as coordenadas dos indivíduos nos factores retidos usando o método hierárquico que cria partições dos indivíduos agregando os mais próximos, resultando numa hierarquia de partições (dendograma) usando como critério de agregação a perda de inércia mínima, critério de Ward (Lebart et al., 1984, 2000). As classificações automáticas (criação e corte do dendograma) foram feitas usando os procedimentos RECIP e PARTI\_DECLA de SPAD-N (Lebart et al., 1996).

Assim, sem critérios de classificação pré-estabelecidos, e considerando à partida todos os indivíduos como tendo perfis de competição diferentes, procurou-se agrupar os indivíduos, tendo como pressuposto que, a haver diferenças entre as cultivares, estas se «arrumariam» pelas classes pondo em evidência as semelhanças e dissemelhanças entre os indivíduos.

A análise das correspondências foi feita usando o procedimento CORBI de SPAD-N (Lebart et al. 1996), a escolha do número de eixos factoriais a reter foi feita tendo em conta os valores-teste (Lebart *et al.* 2000) conjugado com o teste do «cascalho» (*scree test*, Johnson e Wichern, 1998) e com a comparação dos valores-próprios de cada eixo factorial com a média de todos os valores-próprios.

Todas as classificações foram feitas usando o procedimento RECIP de SPAD-N (Lebart et al. 1996). A partir do dendrograma obtido realizaram-se diversas partições de acordo com critérios descritos a seguir usando o procedimento PARTI-DECLA de SPAD-N (Lebart et al. 1996).

Tal como para as análises discriminantes, as classificações automáticas foram realizadas separadamente para as variáveis nódulos e recuperação do inóculo, não tendo sido feitas (dado o excessivo número de valores em falta) para as variáveis expressas em percentagem dos nódulos ocupados pela estirpe inoculante.

#### **2.3.3.5.1. Classificação automática com base nas variáveis nódulos.**

Partição em quatro classes para comparar a constituição esperada de cada classe se as plantas da mesma cultivar tiverem características comuns de número de nódulos nas várias zonas da raiz que permitem distingui-las umas das outras com a constituição observada das mesmas classes.

Classificação baseada nos primeiros 4 eixos factoriais obtidos da análise das correspondências (62.3% da inércia total).

Na Figura 2.2 apresenta-se o resultado desta classificação (que é simultaneamente a classificação óptima) representando com a mesma cor as células que deveriam pertencer à mesma classe e com números a classe a que de facto pertencem (a preto dados inexistentes).

Do exame do Figura 2.2 verifica-se que se formam essencialmente duas classes, a classe 1 constituída por 35 elementos e que inclui plantas das 4 cultivares (5 de Woogenellup, 10 de Geraldton, 12 de Daliak, 8 de Nungarin) e a classe 3 constituída por 21 elementos e que também inclui plantas das 4 cultivares (8 de Woogenellup, 5 de Geraldton, 3 de Daliak, 5 de Nungarin), com duas classes com um número residual de elementos, respectivamente 2 na classe 2 e 1 na classe 4. Ou seja, e tendo como base as variáveis nódulos, não há evidências, antes pelo contrário, de haver diferenças entre as cultivares.

		Planta 1	Planta 2	Planta 3	Planta 4	Planta 5
Woogenolup	Rep. 1	1	1	1	3	1
	Rep. 2	4	1	3	3	3
	Rep. 3	2	3	3	3	3
Geraldton	Rep. 1	1	1	1	1	1
	Rep. 2	1	1	3	1	3
	Rep. 3	1	1	3	3	3
Daliak	Rep. 1	1	1	1	1	1
	Rep. 2	1	1	3	1	3
	Rep. 3	1	1	1	1	3
Nungarin	Rep. 1	1	1	1	1	
	Rep. 2	3	1	3	2	1
	Rep. 3	3	1	3	3	1

**Figura 2. 2.** Distribuição observada e esperada das cultivares (Woogenellup, Geraldton, Daliak e Nungarin) com base em nódulos.

#### 2.3.3.5.2. Classificação automática com base nas variáveis nódulos ocupados pelo inóculo

Partição em quatro classes para comparar a constituição esperada de cada classe se as plantas da mesma cultivar tiverem características comuns de número de resistentes nas várias zonas da raiz que permitem distingui-las umas das outras com a constituição observada das mesmas classes.

Classificação baseada nos primeiros 6 eixos factoriais obtidos da análise das correspondências (74.0% da inércia total).

Na Figura 2.3. apresenta-se o resultado desta classificação representando com a mesma cor as células que deveriam pertencer à mesma classe e com números a classe a que de facto pertencem (a preto dados inexistentes, a cinzento classe com todos os elementos com resistentes iguais a zero). Do exame da Figura verifica-se que uma classe se destaca claramente, a classe 1 constituída por 32 elementos e que inclui plantas

das 4 cultivares (9 de Woogenellup, 10 de Geraldton, 7 de Daliak, 7 de Nungarin), com as classes 3 e 4 ambas com 9 elementos, a classe 3 sem qualquer planta da cultivar Daliak, a classe 4 incluindo as 4 cultivares. Adicionalmente, observa-se uma quase total incidência de plantas com zero nódulos ocupados pelo inóculo em Daliak, repetição 3.

		Planta 1	Planta 2	Planta 3	Planta 4	Planta 5
Woogenolup	Rep. 1	1	1	1	3	1
	Rep. 2	2	1	1	3	1
	Rep. 3	4	1	3	3	1
Geraldton	Rep. 1	1	1	4	1	1
	Rep. 2	1	1	1	3	1
	Rep. 3	4	4	1		1
Daliak	Rep. 1	1	1	1	4	1
	Rep. 2	1		1	4	1
	Rep. 3					
Nungarin	Rep. 1		1	1	1	
	Rep. 2	1	1	3	4	1
	Rep. 3	4	4	3	3	1

**Figura 2.3.** Distribuição observada e esperada das cultivares (Woogenellup, Geraldton, Daliak e Nungarin) com base nas variáveis nódulos ocupados pelo inóculo.

### 2.3.3.5.3. Classificação automática ótima com base nas variáveis nódulos ocupados pelo inóculo

Classificação baseada nos primeiros 6 eixos factoriais obtidos da análise das correspondências (74.0% da inércia total).

Na Figura 2.4. representa-se o resultado desta classificação (5 classes) representando com a mesma cor as células que pertencem à mesma classe (a preto dados inexistentes, a cinzento classe com todos os elementos com resistentes iguais a zero).

**Figura 2.4.** Classificação óptima das cultivares (Woogenellup, Geraldton, Daliak e Nungarin) com base nódulos ocupados pelo inóculo.

		Planta 1	Planta 2	Planta 3	Planta 4	Planta 5
Woogenolup	Rep. 1					
	Rep. 2					
	Rep. 3					
Geraldton	Rep. 1					
	Rep. 2					
	Rep. 3					
Daliak	Rep. 1					
	Rep. 2					
	Rep. 3					
Nungarin	Rep. 1					
	Rep. 2					
	Rep. 3					

Do exame da Figura 2.4 e da sua comparação com a Figura 2.3. verifica-se basicamente que a anterior classe 1 se dividiu, dando origem às classes representadas a azul e rosa na Figura 2.4. (ambas com elementos das 4 cultivares), mantendo-se as restantes praticamente inalteradas. Ou seja, e tal como na classificação baseada em nódulos, não há evidências, antes pelo contrário, de haver diferenças entre as cultivares.

### 2.3.3.6. Distribuição de nódulos e resistentes pelas diferentes zonas da raiz

Trata-se agora de analisar a distribuição de nódulos e resistentes pelas diferentes zonas da raiz, ou seja, de alguma forma transpor a abordagem anterior e passar a considerar as zonas como os indivíduos descritos pelas variáveis plantas das várias repetições das diferentes cultivares. Apesar de termos concluído não haver diferenças entre as cultivares no que diz respeito ao número de nódulos e no número de nódulos



ocupados pelo inóculo, esta nova abordagem irá ser realizada separadamente para cada cultivar.

Esta abordagem assente essencialmente em análises de correspondências e classificações automáticas. Naturalmente que a organização dos dados exige que cada variável (planta) tenha um significado comum para todos os indivíduos (zonas da raiz). As variáveis são, naturalmente e à partida, as 5 plantas de cada uma das 3 repetições. Tendo em conta o delineamento experimental todas as plantas da mesma repetição foram obtidas no mesmo local (qualquer que seja a cultivar) que se distingue, mais não seja aleatoriamente, das plantas de outra repetição.

A análise das correspondências foi feita usando o procedimento CORBI de SPAD-N (Lebart et al. 1996) A escolha do número de eixos factoriais a reter foi feita tendo em conta os valores-teste conjugado com o teste do «cascalho» e com a comparação dos valores-próprios de cada eixo factorial com a média de todos os valores-próprios (quando todos os valores da matriz de dados original tendem para ser todos iguais ou são totalmente aleatórios, não há uma estrutura diferenciada e todos os valores-próprios tendem para o mesmo valor, isto é, são todos iguais ou quase).

Tendo em conta que o objectivo destas análises era essencialmente determinar como é que os indivíduos («zonas») se agrupavam tendo em conta os seus perfis dados pela variáveis, apresentamos seguidamente o resultado da melhor partição possível no espaço reduzido resultante da análise das correspondências, bem como, para avaliar a estabilidade das classificações obtidas, as melhores partições possíveis (usando os mesmos procedimentos) retirando de cada vez os dados de uma das repetições.

A caracterização das classes foi feita recorrendo a técnicas simples, usadas em técnicas de controlo de qualidade (Montgomery 1991), determinando-se em primeiro lugar o intervalo de confiança de 95% para a média de todos os valores, comparando-se seguidamente a média dos indivíduos de cada classe com esse intervalo de confiança. Assim, se a média dos indivíduos de uma classe for superior ao limite superior do intervalo de confiança considera-se que os indivíduos dessa classe têm um «excesso» de nódulos (ou resistentes) relativamente ao que seria de esperar de uma distribuição equitativa de nódulos (ou resistentes) por todos os indivíduos e variáveis e portanto esses indivíduos representam zonas da raiz em que os nódulos (ou resistentes) ocorrem preferencialmente. Analogamente, quando a média dos indivíduos de uma classe for inferior ao limite inferior do intervalo de confiança considera-se que os

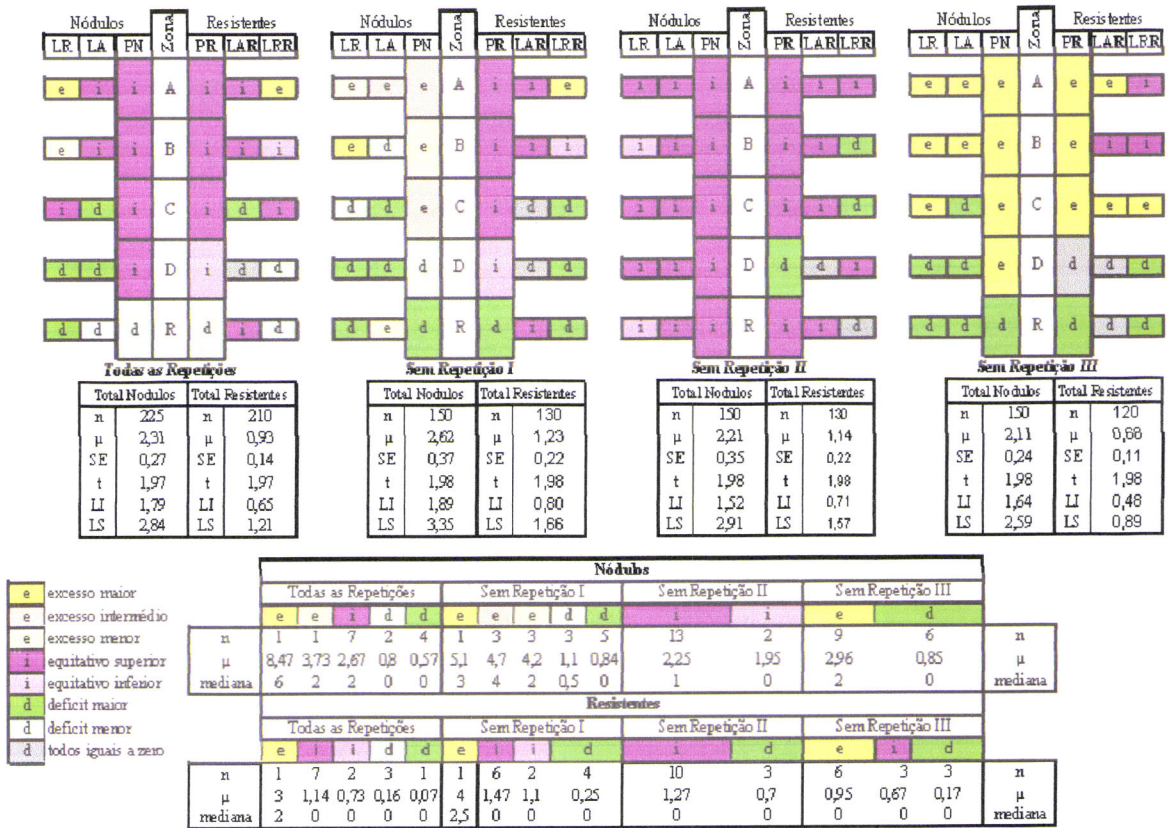
indivíduos dessa classe têm um «deficit» de nódulos (ou de nódulos ocupados pelo inóculo) relativamente ao que seria de esperar de uma distribuição equitativa de nódulos (ou inóculo) por todos os indivíduos e variáveis e portanto esses indivíduos representam zonas da raiz em que os nódulos (ou inóculo) não ocorrem preferencialmente. Finalmente, quando a média dos indivíduos de uma classe está dentro dos limites do intervalo de confiança considera-se que os indivíduos dessa classe são «equitativos» em nódulos (ou inóculo) e portanto esses indivíduos representam zonas da raiz de ocorrência indiferenciada de nódulos ou de nódulos ocupados pelo inóculo introduzido.

#### 2.3.3.6.1. Cultivar Woogenellup.

Na Figura 2.5. apresenta-se o resultado da melhor partição possível (5 classes) para os nódulos, baseada nos 4 primeiros eixos factoriais (83.5% da inércia total), intervalo de confiança entre 1.8 e 2.8 nódulos e, para os resistentes, (5 classes) baseada nos 5 primeiros eixos factoriais (84.0% da inércia total), intervalo de confiança entre 0.6 e 1.2 resistentes.

Nesta figura, como nas restantes, representam-se as zonas da raiz principal na coluna central, os nódulos inseridos nestas zonas na coluna da esquerda, e os nódulos ocupados pela estirpe inoculante (resistente) na coluna da direita. Daí emergem as raízes secundárias inseridas nas diferentes zonas da raiz principal em que para o lado esquerdo se apresenta a distribuição dos nódulos e para o lado direito a distribuição dos nódulos ocupados pelo inóculo (resistentes). Representa-se também por e todas as zonas em que há excesso (média maior que o limite superior do intervalo de confiança), i quando a média está dentro do intervalo de confiança, d todas as zonas em que há deficit (média menor que o limite inferior do intervalo de confiança).

Ao longo da raiz principal parece existir uma distribuição uniforme ao longo dos 4 primeiros cm havendo uma redução do nódulos nas zonas mais profundas de crescimento radicular. Já nas raízes secundárias denota-se uma concentração de nódulos nas zonas mais afastadas destas, principalmente nas inseridas nos 2 primeiros segmentos da raiz principal, denotando que nodulação ocorreu logo nos primeiros estádios do desenvolvimento da planta e nas zonas mais superficiais do solo. Com o objectivo de detectar algumas diferenças no padrão de nodulação devidas a efeitos do solo, foi retirada sucessivamente uma repetição da análise das classificações automática



**Figura 2.5.** - Distribuição da nodulação e presença da estirpe inoculante (resistentes) nas diferentes zonas da raiz resultante da melhor partição possível na análise das correspondências. **Cultivar Woogenellup.**

verificando-se que a nodulação se mantém preferencialmente nas zonas mais precoces do desenvolvimento da planta mas detectando-se variações que sugerem um efeito de condições de solo, especialmente visíveis quando se retira a Repetição 3 resultando num padrão de distribuição preferencialmente localizado nos primeiros segmentos da raiz principal e raízes secundárias aí inseridas.

Pela análise da Figura 2.5. verifica-se que o padrão da presença da estirpe inoculante ao longo do perfil da raiz segue muito de perto o da presença de nódulos, sugerindo que a estirpe **B** competiu com a população nativa na nodulação desta variedade sempre que existiram condições para a formação de nódulos nestas zonas da raiz. Quando retiramos da análise das melhores classificações a Repetição 3, mais esta tendência se acentua nomeadamente na raiz principal em que a uma predominância das nodulações corresponde também uma predominância da recuperação da estirpe inoculante, ou seja, parece existir alguma dependência para a nodulação da presença do inóculo nos locais correspondentes à Repetição 1 e 2.

### 2.3.3.6.2. Cultivar Geraldton

Na Figura 2.6. apresenta-se o resultado da melhor partição possível (2 classes) para os nódulos, baseada nos 4 primeiros eixos factoriais (77.3% da inércia total), intervalo de confiança entre 1.4 e 2.6 nódulos e, para os resistentes, (4 classes) baseada nos 5 primeiros eixos factoriais (85.9.% da inércia total), intervalo de confiança entre 0.4 e 0.8 resistentes.

A distribuição dos nódulos nesta variedade parece ser muito uniforme ao longo da raiz havendo apenas uma situação de deficit em LDA. Já em relação à distribuição do inóculo (resistentes) ao longo da raiz, existem situações de excesso em PA, LAA e LCR, LDR., o que pode indicar alguma dependência do inóculo para a formação dos nódulos, ou variações da distribuição da população nativa. Quando retiramos das análises a Repetição 1 verifica-se que a nodulação nas Repetições 2 e 3 depende da presença do inóculo principalmente em PA, ou seja, um deficit de nodulação nesta zona teve no entanto um excesso em relação ao esperado na recuperação do inoculo (resistente) o que pode estar relacionado com a localização privilegiada deste em relação à radícula emergente. Esta situação parece ser bem diferente da verificada com a variedade *Woogenellup*, em que se verifica esta situação, não quando se retira a Repetição 1 mas sim a Repetição 3, o que parece indicar que a formação dos nódulos e recuperação do inóculo está ligada a interações entre o hospedeiro e as condições ambientais em que se formam os nódulos.

### 2.3.3.6.3. Cultivar Daliak

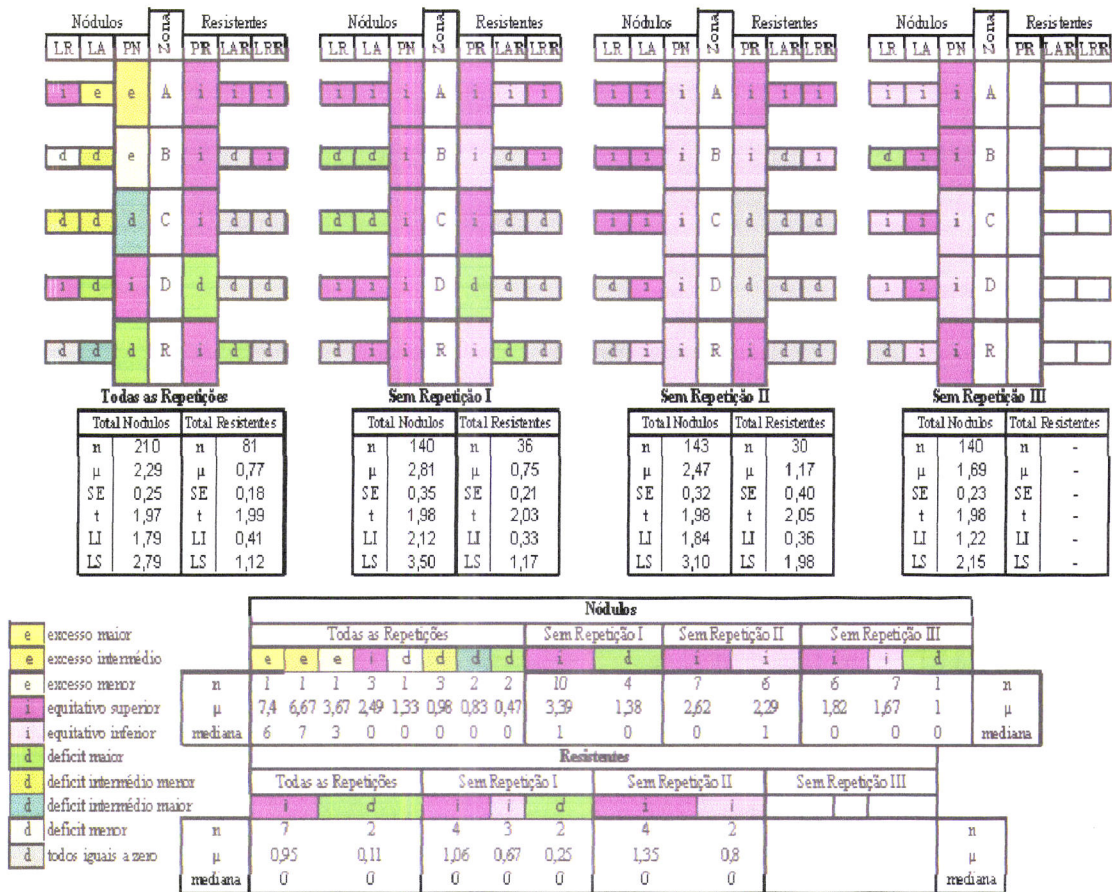
Na Figura 2.7. apresenta-se o resultado da melhor partição possível (8 classes) para os nódulos, baseada nos 5 primeiros eixos factoriais (79.9% da inércia total), intervalo de confiança entre 1.8 e 2.8 nódulos e, para os resistentes, (2 classes) baseada nos 4 primeiros eixos factoriais (93% da inércia total), intervalo de confiança entre 0.4 e 1.1 resistentes.

Para esta variedade verifica-se haver alguma uniformidade na distribuição dos nódulos e na recuperação do inóculo ao longo das diferentes zonas da raiz, apesar das recuperações de inóculo terem sido nulas na Repetição 3 desta variedade. Deve-se salientar que observando a Figura 2.7. os nódulos desta variedade se localizam

essencialmente nos dois primeiros segmentos da raiz principal e em LAA, com uma recuperação da estirpe inoculante equitativa em relação ao que seria de esperar. Por outro lado, a recuperação da estirpe inoculante, faz-se essencialmente na raiz principal e nas secundárias inseridas em PA, verificando-se um deficit de recuperação em todas as raízes secundárias á excepção da de localização já referidas, independentemente da Repetição que for retirada.



**Figura 2.6.** - Distribuição da nodulação e presença da estirpe inoculante (resistentes) nas diferentes zonas da raiz resultante da melhor partição possível na análise das correspondências. **Cultivar Geraldton.**



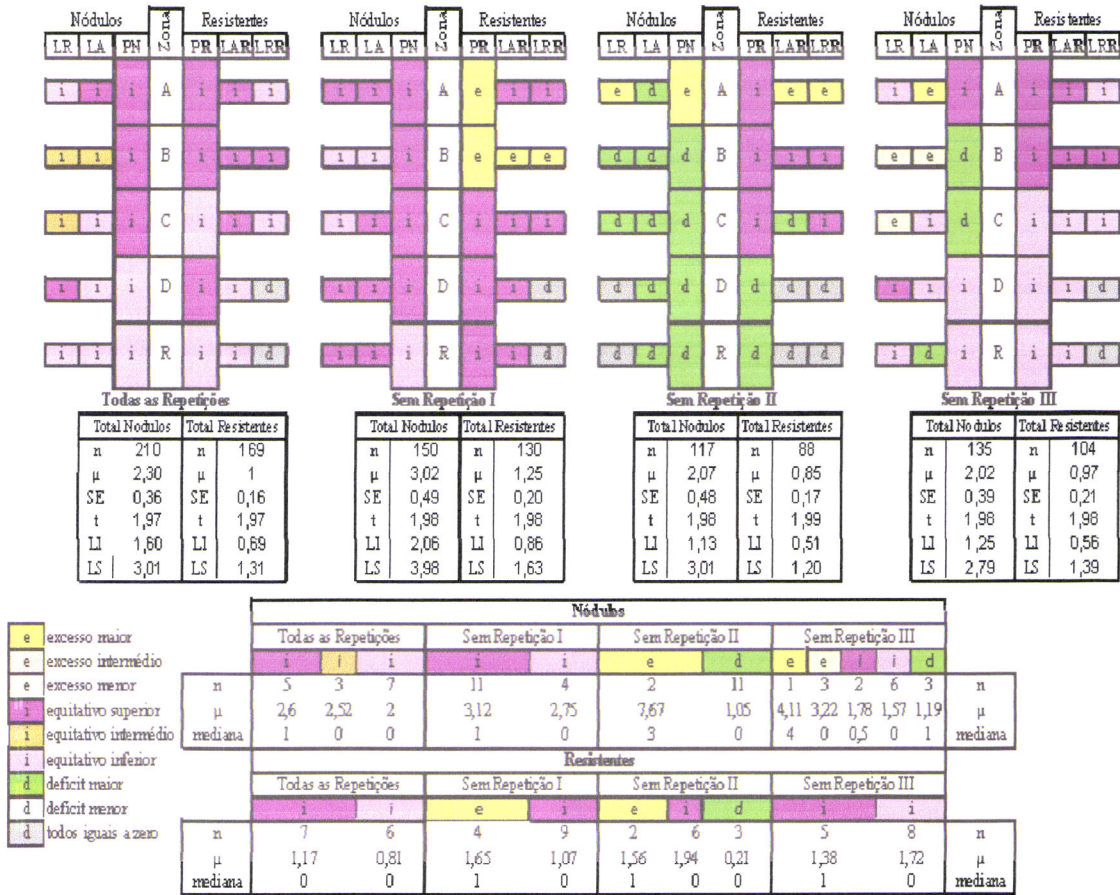
**Figura 2.7.** - Distribuição da nodulação e presença da estirpe inoculante (resistentes) nas diferentes zonas da raiz resultante da melhor partição possível na análise das correspondências. **Cultivar Daliak.**

### 2.3.3.6.4. Cultivar Nungarin

Na Figura 2.8. apresenta-se o resultado da melhor partição possível (3 classes) para os nódulos, baseada nos 4 primeiros eixos factoriais (80.1% da inércia total), intervalo de confiança entre 1.6 e 3.0 nódulos e, para os resistentes, (2 classes) baseada nos 4 primeiros eixos factoriais (82.5% da inércia total), intervalo de confiança entre 0.7 e 1.3 resistentes.

Observando a Figura 2.8. tendo em conta todas as Repetições constata-se uma certa homogeneidade quer na distribuição dos nódulos quer na recuperação da estirpe inoculante (resistentes). No entanto, quando se retira da análise a Repetição 1, tal como já tinha acontecido com a variedade Geraldton, encontramos um excesso de

recuperação de inóculo em relação ao esperado nos dois primeiros segmentos da raiz principal e em LAA e LAR, podendo indicar alguma sensibilidade desta variedade na nodulação em função das condições do meio e um claro efeito da camada superficial, na qual a estirpe inoculada parece ter vantagens competitivas.



**Figura 2.8.** - Distribuição da nodulação e presença da estirpe inoculante (resistentes) nas diferentes zonas da raiz resultante da melhor partição possível na análise das correspondências. **Cultivar Nungarin.**

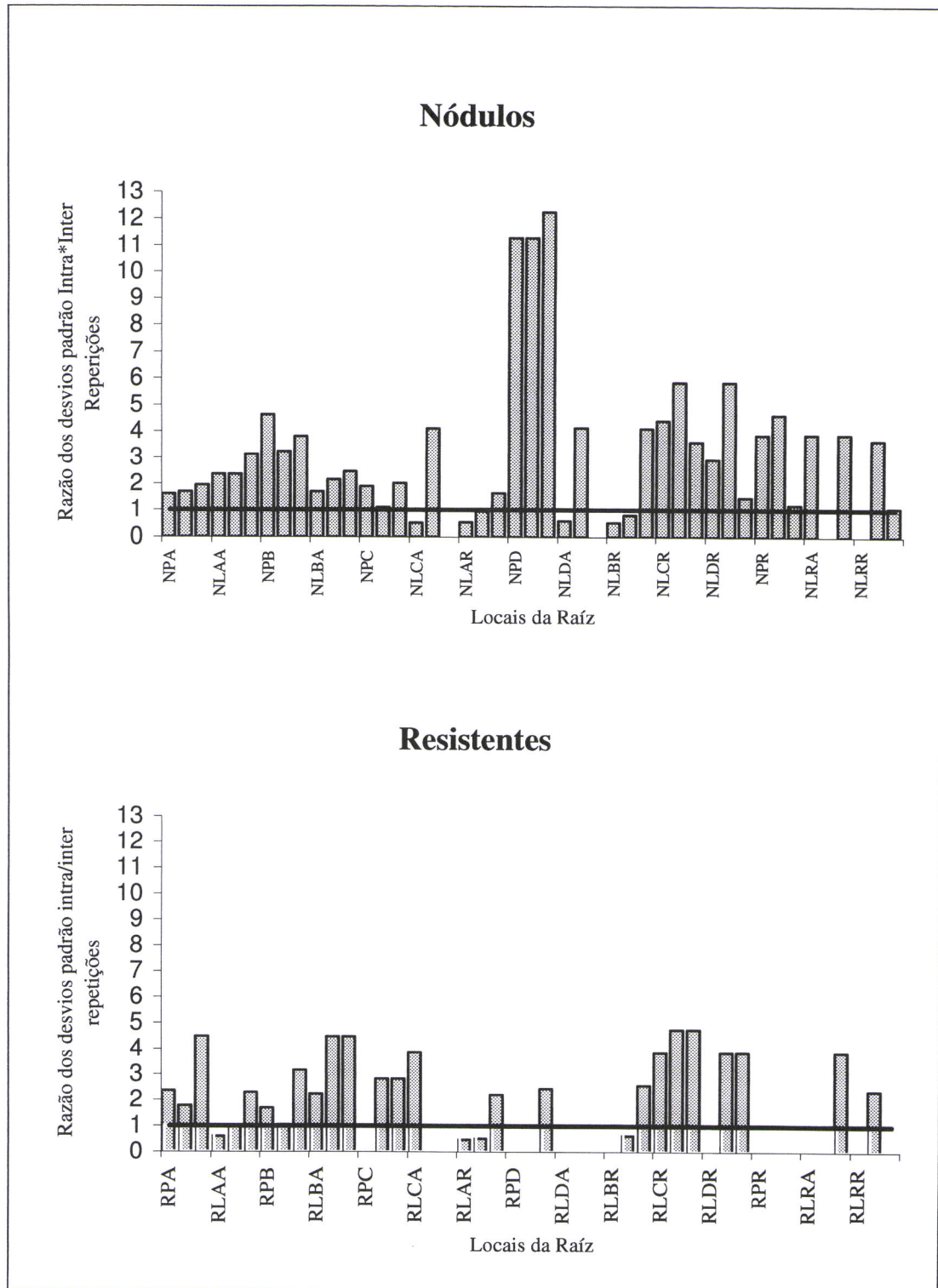
### 2.3.3.7. Variabilidade Intra e Inter repetições

Das análises anteriores parece evidente existir um marcado efeito das Repetições, isto é das condições do solo, quer na distribuição dos nódulos ao longo da raiz, quer na recuperação da estirpe inoculante (resistente), para além de um possível efeito das variedades que, como já anteriormente verificado, a existir não será determinante.

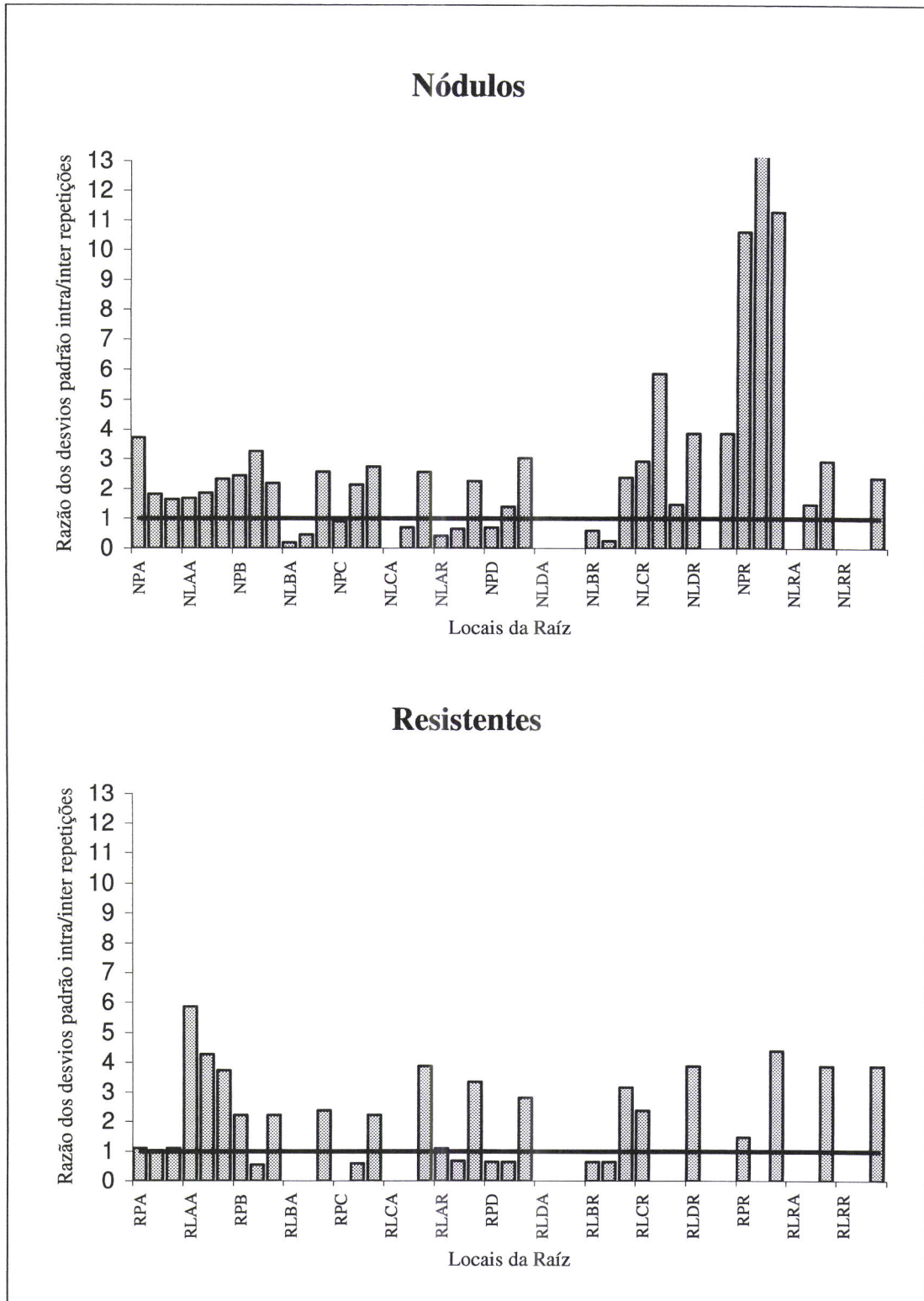
Importa por isso verificar agora, se tal efeito das condições de solo será essencialmente devido às Repetições ou se devido a variações elevadas dentro das próprias Repetições, isto é, avaliar se existem marcadas variações entre plantas dentro de cada Repetição. Uma das possibilidades para esta verificação pode resultar da obtenção de uma razão entre os desvios padrão das cinco plantas de cada Repetição (desvio padrão intra-repetições) relacionando-o com o desvio padrão das 3 Repetições (desvio padrão inter-repetições) para cada um dos locais da raiz e para cada uma das cultivares. Tal relação, quanto mais se afastar da unidade no sentido ascendente, maior a magnitude dos desvios padrão intra-repetições. Em sentido inverso, quanto menor o valor dessa razão maior a magnitude da variabilidade inter-repetições. Esta relação pode ser facilmente visualizada na forma gráfica para cada um dos locais da raiz.

Na Figura 2.9. e seguintes, podemos verificar o efeito da variabilidade Intra/Inter Repetições quer para a distribuição dos nódulos quer para a recuperação da estirpe inoculante nas variedades usadas no ensaio. Para a cultivar Woogenellup (Figura 2.6), a variabilidade Intra/Inter Repetições é superior a 1 na maior parte dos segmentos da raiz, o que pode indicar que cada zona de cada raiz tem características muito próprias, provavelmente determinadas por condições ambientais. Uma situação semelhante podemos observar para a variabilidade detectada na distribuição dos nódulos ocupados pela estirpe inoculante (resistente). Nas restantes cultivares (Figuras 2.10., 2.11. e 2.12.) a variabilidade medida pela razão dos desvios padrão Intra e Inter Repetições é bastante semelhante à verificada para a cultivar Woogenellup, embora na cultivar Geraldton exista uma tendência para uma redução da dimensão da variabilidade, principalmente na recuperação do inóculo (resistentes) com maior incidência em segmentos da raiz principal.

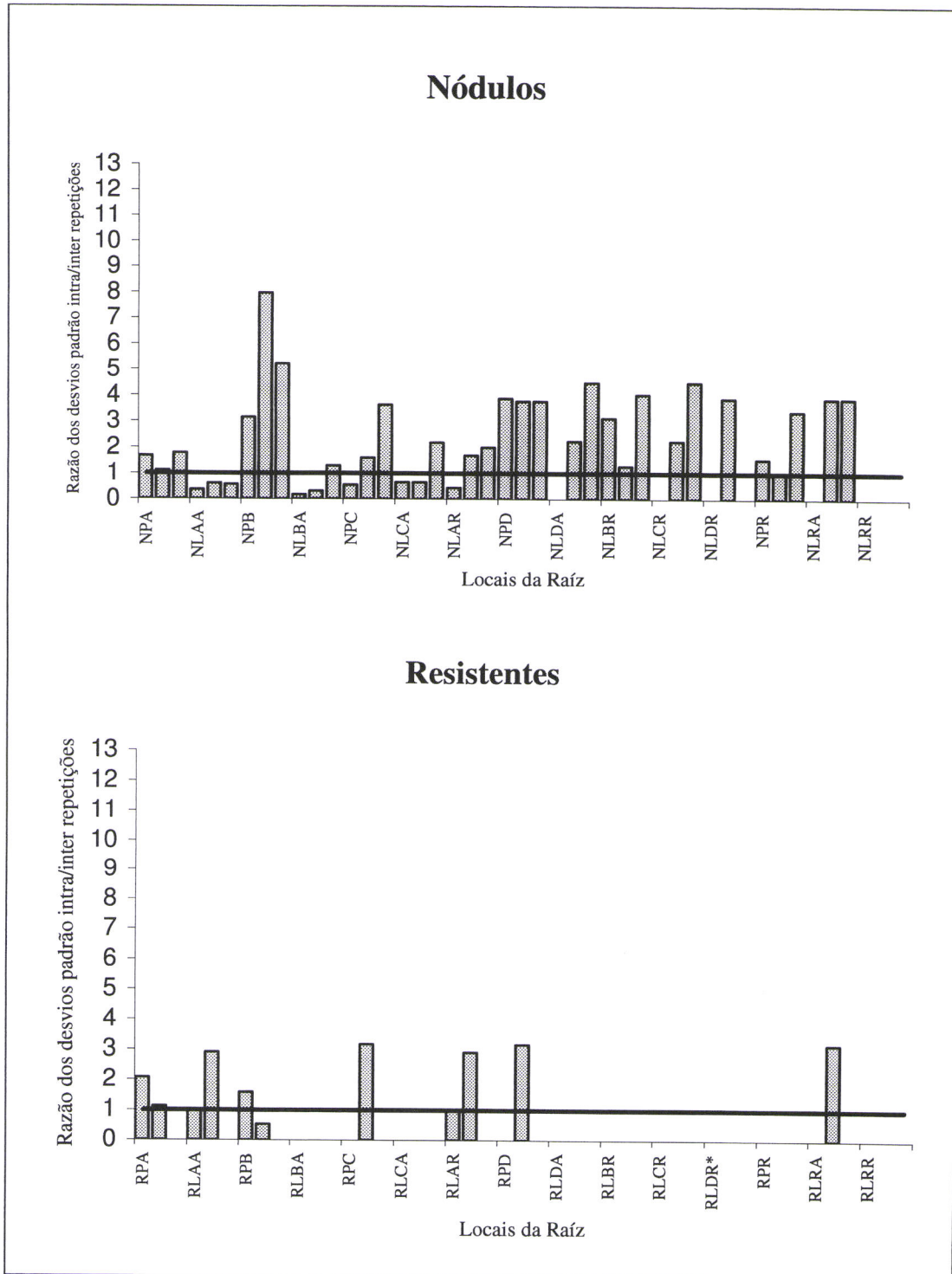




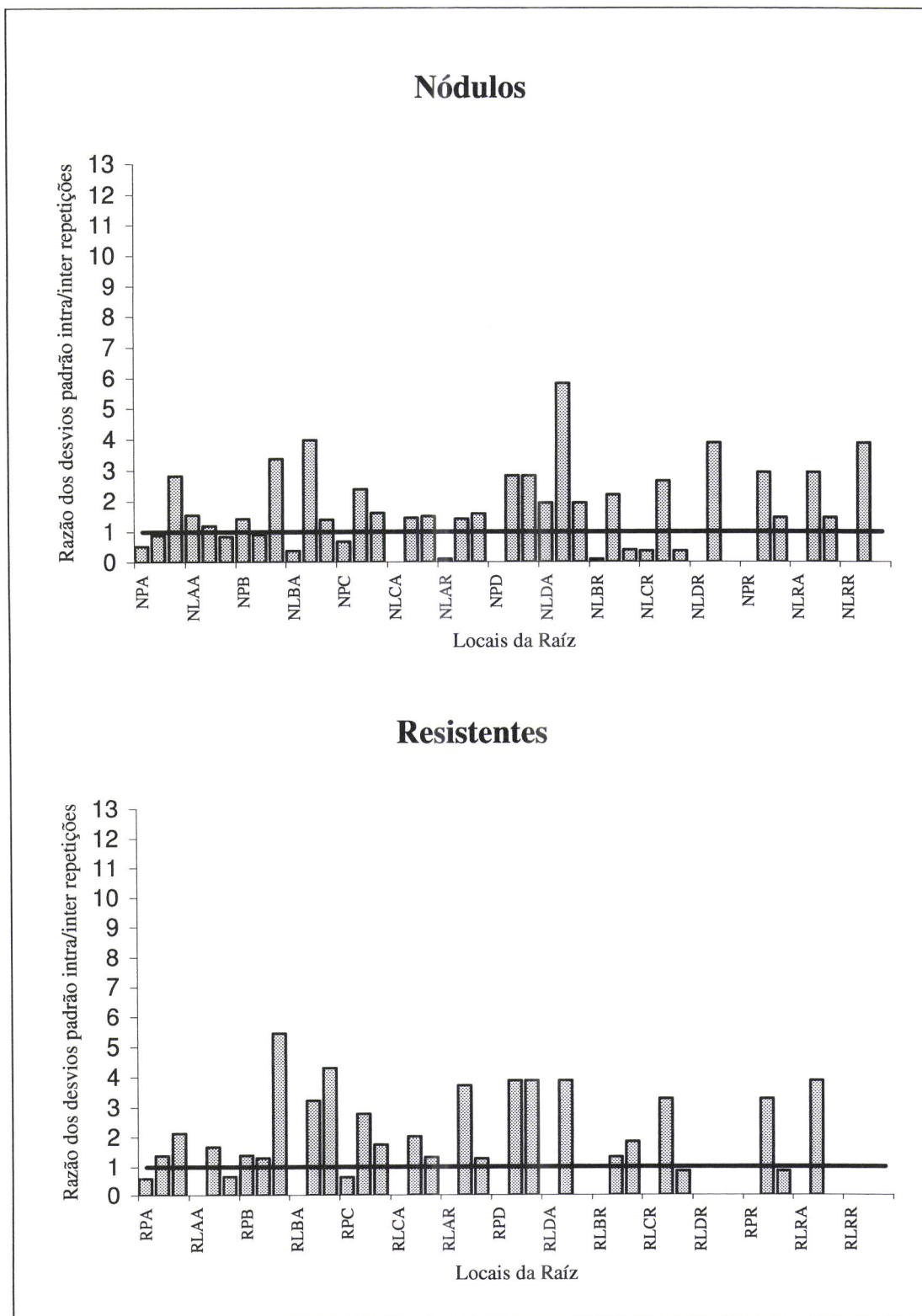
**Figura 2.9.** Variabilidade Intra/Inter Repetições nos diferentes locais de nodulação da raiz na cultivar **Woo genellup**. Traço negro contínuo indica razão dos desvios padrão Intra/Inter Repetições igual a 1.



**Figura 2.10.** Variabilidade Intra/Inter Repetições nos diferentes locais de nodulação da raiz na cultivar **Geraldton**. Traço negro contínuo indica razão dos desvios padrão Intra/Inter Repetições igual a 1.



**Figura 2.11.** Variabilidade Intra/Inter Repetições nos diferentes locais de nodulação da raiz na cultivar **Daliak**. Traço negro contínuo indica razão dos desvios padrão Intra/Inter Repetições igual a 1.



**Figura 2.12.** Variabilidade Intra/Inter Repetições nos diferentes locais de nodulação da raiz na cultivar **Nungarin**. Traço negro contínuo indica razão dos desvios padrão Intra/Inter Repetições igual a 1.

## 2.4. Discussão

As populações nativas de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* estimadas para o local de ensaio são bastante elevadas, apesar do solo apresentar condições consideradas limitantes de pH e toxicidade de manganês, o que parece estar de acordo com Woomer *et al.*, (1988), que consideram que a acidez pode não constituir uma limitação à presença de populações no solo de dimensão apreciável, sendo a presença do hospedeiro o factor mais importante na presença de rizóbio no solo (Bottomley, 1991).

Nos resultados obtidos também se verifica que a população vai diminuindo com a profundidade nos três níveis estudados, sendo os 5 cm mais superficiais os que albergam a maior quantidade de rizóbios por grama de solo, com cerca de 93 por cento da população dos 20 cm colhidos. Tão elevada proporção da população neste segmento inicial pode resultar de uma estratégia de sobrevivência devido à natural maior proporção de matéria orgânica que deverá ser aqui encontrada com vantagem na protecção contra a acidez do solo (Richardson e Simpsom, 1988). Populações nativas desta dimensão ( $\approx 10^5$ ) são limitativas á implantação de estirpes inoculantes, pelo que a detecção de nódulos ocupados por inoculantes nestas condições revelariam elevada capacidade competidoras por parte dessas estirpes (Brockwell e Bottomley, 1995).

A avaliação da competição estimada pela proporção de nódulos formados pelas estirpes inoculantes A e B, revelou esta última como a melhor competidora nestas condições de ensaio. Dado que esta estirpe é originária de um solo ácido com toxicidade por alumínio, o resultado obtido está de acordo com Castillo (1989), referindo este autor que estirpes isoladas em solos ácidos possuem maior resistência à acidez, sendo de esperar maior facilidade da sua implantação em solos com tal característica.

Não foram detectadas diferenças significativas quer no número de nódulos quer na proporção de nódulos ocupados pelos inóculos entre as cultivares (Quadro 2.4.). Verificou-se haver diferenças significativas no número de nódulos entre Repetições para a média das cultivares, sem que isso tenha tido qualquer influência na proporção da recuperação da estirpe B (Quadro 2.5.). Tal situação poderá dever-se a qualquer factor que interveio na nodulação das plantas na Repetição 1, dado que foi nesta Repetição que as nodulações foram menos abundantes.

A segmentação das raízes recolhidas para contagem de nódulos nas diferentes zonas (Figura 2.1) e recolha da estirpe B, permitiu avaliar zonas preferenciais de nodulação e de recuperação da estirpe inoculante. Verificou-se não haver diferenças

significativas entre as cultivares para a distribuição dos nódulos, excepto no primeiro segmento da raiz principal, **PA** (zona do colo). Neste segmento, a cultivar Daliak formou significativamente mais nódulos do que as cultivares Geraldton e Nungarin. Dado que a semente foi perolizada podemos pensar que esta cultivar exerceu alguma influencia na nodulação preferencial pelo inoculo nesta zona. Este resultado corresponde a condições menos favoráveis para a nodulação de todas as estirpes presentes pois a região **PA** de Daliak não foi significativamente beneficiada na nodulação pelo inóculo, nem em valor absoluto nem na proporção de nódulos ocupados pela estirpe **B** (Quadros 2.9 e 2.11).

Nos diferentes testes estatísticos realizados, os resultados mostraram que a nodulação e recuperação do inoculo não foi afectada pelas cultivares, no entanto, quando se avalia a recuperação da estirpe **B** nas diferentes zonas da raiz, verificamos que, apesar de não mutuamente exclusivas, há diferenças entre variedades na recuperação do inóculo nos locais **LAA**, **PC** e **LCA**. Quando esta avaliação é feita através da proporção dos nódulos ocupados pelo inoculo, novamente as zonas **LAA** e **PC** mostram diferenças significativas entre cultivares. Com base nestas observações podemos inferir que a representatividade das amostras de nódulos na raiz pode ser influenciada pelas cultivares e nestas, pela zona onde são recolhidos os nódulos. Os critérios baseados no tamanho, cor e posição dos nódulos (com preferência dos localizados no colo da raiz) seguidos por vários autores (Brockwell *et al.*, 1982; Slattery e Coventry, 1999; Hebb *et al.*, 1998) nas nossas condições de trabalho, podem conduzir a resultados que não representam a distribuição do inóculo na raiz e logo a proporção da sua recolha, pelo menos em algumas variedades de trevo subterrâneo. Por outro lado, não havendo diferenças na recuperação do inóculo entre cultivares no segmento **PA** e existindo diferenças entre cultivares no segmento **PC**, poderemos afirmar que as condições de nodulação nestas zonas foram diferentes nas presentes condições de ensaio e, logo, os ocupantes destes segmentos serão diferentes. Gibson *et al.*, (1976) e Diatloff e Brockwell (1976) referem não haver diferença significativa nos ocupantes de nódulos localizados no colo da raiz e os ocupantes de nódulos no restante do sistema radicular, enquanto Young *et al.* (1987) refere poderem existir diferentes tipos electroforéticos entre ocupantes de nódulos na raiz primária e raízes secundárias e que uma grande proporção da diversidade genética de uma população nativa é encontrada em plantas individuais. Os resultados agora obtidos parecem estar mais de acordo com esta última constatação

Não houve possibilidade de fazer o estudo emparelhado das séries temporais correspondentes à formação de nódulos e condições de meio verificadas à data em que o estágio fenológico das raízes permitia a nodulação nas diferentes zonas amostradas. Um estudo orientado nesse sentido poderia dar lugar a uma abordagem para reduzir a necessidade de avaliação através de séries prolongadas (5 a 6 anos) de ensaios de avaliação de implantação de estirpes em sementeiras de Outono em zonas de clima mediterrânico com grande variabilidade inter-anual. Este aspecto das avaliações cultivar/estirpe tem implicações em termos do risco empresarial envolvido relativamente à proporção de sucessos na implantação de pastagens, sobretudo em zonas de solos com condições limitantes.





**3. Competição de estirpes *Mesorhizobium ciceri* em variedades  
de grão de bico de sementeira Outono/Inverno**



### 3. Competição de estirpes *Mesorhizobium ciceri* em variedades grão de bico de sementeira Outono/Inverno

#### 3.1. Introdução

A cultura cerealífera em Portugal e de um modo geral em toda a Europa mediterrânica tem sofrido forte redução nos últimos anos, sendo de esperar num futuro próximo a continuação dessa tendência. De entre as culturas alternativas aos cereais, as leguminosas para grão constituem uma possível solução para a agricultura mediterrânica, uma vez que a Europa é altamente deficitária na produção de proteína vegetal (Duarte *et al.*, 1992). As leguminosas grão têm grande importância na alimentação humana e animal, sendo o grão de bico a segunda leguminosa grão em importância no mundo e a primeira na região mediterrânica (Maçãs, 1994).

Nas condições do sequeiro do Sul de Portugal, o grão de bico é tradicionalmente uma cultura de Primavera/Verão, usada no revestimento de alqueives e, como tal, caracterizada por pequenas produções unitárias devido essencialmente à reduzida disponibilidade de água no solo nos meses de maior crescimento. O desenvolvimento de variedades de grão de bico tolerantes a baixas temperaturas invernais e ao fungo fitopatogénico *Ascochyta rabiei*, tornou possível a antecipação da época de sementeira, permitindo que as fases vegetativas e reprodutivas da planta tenham normalmente lugar em condições de ausência de stress hídrico, permitindo melhor desenvolvimento vegetativo com consequências num acréscimo do potencial produtivo da cultura (Sousa e Duarte, 1990).

Ensaio realizados em diferentes locais de Portugal indicaram médias de produção de grão para as variedades de sementeira antecipada (Outono/Inverno) da ordem de 2500 kg ha<sup>-1</sup>, em contraste com produções médias de 700 kg ha<sup>-1</sup> para as variedades tradicionais de sementeira primaveril (Duarte, 1992). No entanto, este elevado potencial produtivo das variedades de Outono/Inverno mostrou-se muito dependente dos locais de ensaio (Pereira *et al.*, 1992).

Segundo Sousa (1989), as baixas produções de grão verificadas nas variedades de sementeira primaveril resultam, para além da fraca disponibilidade de água, de escassas nodulações, principalmente em Primaveras pouco húmidas (situação muito frequente no Sul de Portugal). A utilização de variedades de maior potencial produtivo pela sua sementeira antecipada, necessitará necessariamente de maiores disponibilidades de azoto,

principalmente derivado de fixação biológica, sendo estimadas extracções de azoto na cultura que variam entre 60 e 140 kg ha<sup>-1</sup> dependendo das condições de crescimento (Bellido e Garcia, 1986; Carranca *et al.*, 1999).

De entre as leguminosas grão usadas em rotação com cereais, o grão de bico é frequentemente considerado como hospedeiro inferior na sua capacidade de fixação de azoto (Papastylianoi, 1987; Smith *et al.*, 1987; Keatinge *et al.*, 1988), possivelmente devido, em parte, à ausência no solo de estirpes de rizóbio apropriadas. As estimativas para a capacidade fixadora de azoto pelo grão de bico, variam de 0 a 180 kg N ha<sup>-1</sup> ano, e o azoto extraído derivado de fixação biológica pode variar de 0 a 82% dependendo de vários factores (Keatinge *et al.*, 1988; Carranca *et al.*, 1999). Segundo Beck (1992) a cultura de variedades tolerantes ao frio e a *Ascochyta rabiei* em sementeiras de Outono/Inverno na região mediterrânica, tem evidenciado deficiências na nodulação principalmente em solos onde a cultura não tem ocorrido. Nestes locais, será certamente improvável a existência de populações de *M. ciceri* adequadas à nodulação, pelo que será de esperar incrementos na produção de grão se for realizada a inoculação de sementes com estirpes efectivas.

É conhecido o elevado grau de especificidade do grão de bico em relação ao seu microsimbionte (Gaur e Sen, 1979), podendo ser esta situação estendida a uma elevada especificidade na eficácia simbiótica ao nível da variedade/estirpe (Arsac e Cleyet-Marcel, 1986; Somasegaran *et al.*, 1988), sendo de esperar necessidades de inoculação onde forem cultivadas variedades objecto de melhoramento recente, quer em locais onde não existam populações nativas, quer em locais onde estas estejam presentes, dado que a co-evolução do rizóbio com variedades tradicionais, os poder tornar pouco efectivos na simbiose com as variedades melhoradas (Beck, 1992).

Em ensaios realizados na Universidade de Évora foi avaliada a eficiência simbiótica de quatro estirpes de rizóbio para grão de bico (3 isolamentos regionais e uma estirpe da colecção do ICARDA) inoculadas em variedades regionais e em variedades melhoradas para a sementeira de Outono/Inverno. No Quadro 3.1 podemos verificar a variedade “Elvar”, variedade do tipo “Kabuli” seleccionada para a sementeira antecipada, não encontra nas estirpes ensaiadas nenhuma com a qual a sua eficiência simbiótica relativa seja melhor que a generalidade dos outros pares simbióticos. Pelo contrário uma das variedades regionais (Reg 256) teve com os dois isolamentos regionais um comportamento simbiótico assinalável.

**Quadro 3.1.** Eficiência simbiótica (%) de estirpes *M. ciceri* testadas em variedades regionais e em variedades melhoradas para sementeira antecipada. Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente para  $P \leq 0,05$ . <sup>a</sup> – Estirpe ICARDA, <sup>b</sup> – Isolamentos regionais.

Variedade	Estirpes			
	CP36 <sup>a</sup>	98Ca <sup>b</sup>	61Ca <sup>b</sup>	85Ca <sup>b</sup>
Reg. 2517	43.9cd	40.3d	44.1cd	45.6cd
Reg. 2056	40.3d	45.3cd	40.2d	47.4bd
Reg. 256	46.3cd	47.8bd	59.2ab	61.8a
Reg. 2516	50.2ad	60.4bd	40.3d	51.7ad
“Elvar”	39.5d	42.7cd	41.8cd	46.5cd
“Elmo”	54.0ac	54.4ac	62.0s	59.5ab

Com base no exposto, torna-se evidente a necessidade de, por um lado seleccionar estirpes mais eficazes para estas variedades de sementeira antecipada e, por outro, proceder à inoculação de sementes na cultura de sementeira Outono/Inverno. As condições de competição com estirpes nativas deverão por isso ser consideradas, dado ser o grão de bico uma cultura tradicional em solos com capacidade de retenção para a água devido à sua época de sementeira (Primavera), sendo por isso importante conhecer a dimensão das populações nativas presentes.

O presente trabalho teve como objectivo estimar as populações nativas de *M. ciceri* em três locais de solos representativos da região alentejana e avaliar a capacidade competitiva de isolamentos de diferentes origens aplicados nos locais testados, usando como hospedeiro a variedade “Elvar” seleccionada para permitir a sua sementeira no Outono/Inverno.

## 3.2. Material e métodos

### 3.2.1. Breve descrição dos locais de ensaio

**Beja** – Solo Bvc – Barros castanhos-avermelhados calcários muito descarbonatados de dioritos ou gabros ou rochas cristalofílicas básicas – Herdade da Almocreva

**Évora** – Solo Pmg – Solos Mediterrâneos pardos de quartzodioritos – Herdade da Fundação Eugénio de Almeida

**Elvas** – Solo Vx - Solos Mediterrâneos vermelhos ou amarelos de xistos – Herdade das Casas Velhas

**Quadro 3.2** – Características químicas dos solos nos locais de ensaio

	K <sub>2</sub> O (ppm)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (ppm)	NO <sub>3</sub> (ppm)	pH (água)	M.O. (%)
Beja Solo Bvc	180.9	43.4	6.0	7.9	1.4
Elvas Solo Vx	275.5	25.0	25.5	5.8	1.7
Évora Solo Pmg	75.5	58.0	5.3	5.9	0.8

Em qualquer destes locais não é conhecida nos últimos vinte anos a cultura tradicional de grão de bico, sendo na altura a rotação de culturas a seguinte: Trigo-Aveia-Pousio-Girasol. No entanto, no solo do local Beja, por se tratar de um barro, é muito natural que em tempos aí se tenha realizado o alqueive revestido, no qual o grão de bico seria uma das culturas realizadas. Pelo contrário, no solo do local Évora, é altamente improvável que a cultura de grão de bico tenha aí alguma vez sido realizada. No solo do local Elvas, na Herdade das Casas Velhas, uma vez que a Estação Nacional de Melhoramento de Plantas aí realizou ensaios com leguminosas, o grão de bico fez parte desses ensaios, apesar de na folha de cultura onde se realizaram os presentes ensaios não é do nosso conhecimento qualquer uso do solo com grão de bico.

### 3.2.2. Quantificação das populações nativas de *M. ciceri*

#### 3.2.2.1. Colheita das amostras de solo

As amostras de solo dos locais de ensaio foram recolhidas no dia da sementeira dos ensaios de competição. Foi usada uma sonda de meia cana com a qual se retiraram 3 amostras aleatórias dos 20 cm superficiais em cada uma das três repetições. As amostras de solo foram colocadas num saco de plástico. Dado que os locais de ensaio escolhidas estavam sujeitos a rotações de cultura com mobilizações de solo, optou-se por usar amostras compósitas para cada uma das repetições dos três locais de ensaio. No laboratório as amostras de solo foram colocadas a 4°C até ao seu processamento para estimativa populacional, permanecendo nestas condições durante, no máximo, uma semana.

#### 3.2.2.2. Diluições de solo e inoculação de plântulas

Para a quantificação da população nativa *M. ciceri* presente nos solos em estudo foi usada a técnica da inoculação de plantas com diluições de solo, descrita por Brockwell (1982). Foram usadas diluições decimais até  $10^{-6}$  com inoculação de 4 plantas axénicas por diluição para a determinação do número mais provável por grama de solo.

O solo recolhido no campo foi homogeneizado e passado por crivo de malha com 2 mm. Pesaram-se amostras para determinação do peso seco a 70°C (peso constante), do solo de cada uma das repetições de cada local de ensaio.

De cada amostra compósita de cada uma das repetições de cada local de ensaio e após a determinação do teor de humidade do solo, colheram-se duas sub amostras de 10g (equivalente peso seco) para diluições decimais. Assim, procedeu-se a duas estimativas da população nativa por cada repetição. Em balões Erlenmeyer 250 ml com 90 ml de solução Harper e Gibson (1984), diluída 1:4, e pérolas de vidro a adição do equivalente a 10 g de solo seco permitiu obter a primeira diluição de solo ( $10^{-1}$ ). Os balões foram agitados a 250 ciclos por minuto durante um mínimo de 15 minutos, após o que se procedeu a 6 sucessivas diluições decimais.

As sementes de grão-de-bico (variedade “Elvar”) para a obtenção de plantas armadilha foram esterilizadas por imersão durante 5 minutos em solução a 5% de hipoclorito de

cálcio, ao que se seguiram 3 lavagens em água esterilizada. As sementes assim desinfetadas foram colocadas em caixas de Petri com agar de água a 0,75%, para germinação à temperatura de 25-30°C. Ao atingirem cerca de 2 cm de comprimento, as plântulas obtidas foram transferidas para os sacos de areia. No dia seguinte à transferência das radículas para o suporte de crescimento procedeu-se à sua inoculação em quadruplicado usando 1 ml por planta de cada diluição de solo.

O suporte para o crescimento das plantas foi areia lavada e crivada, contida em sacos de polipropileno esterilizados. A solução nutritiva usada foi a proposta por Harper e Gibson (1984).

### 3.2.2.3. Condições de Crescimento

Os sistemas para o crescimento de leguminosas em condições controladas apresentam grande variabilidade de soluções, determinadas por duas condições fundamentais; as características do crescimento da planta e o controlo de contaminações (Gibson 1987). Assim sendo, os sistemas fechados que garantem um muito bom controlo asséptico são difíceis de implementar quando se trabalha com proteaginosas que apresentam um grande volume quer de raízes quer de parte aérea após algumas semanas de crescimento. Por estes motivos optamos por adaptar um sistema aberto fácil de executar, de custos reduzidos e onde o controlo da assepsia é eficaz principalmente nas fases iniciais do crescimento da planta. O sistema usado foi de sacos de plástico autoclaváveis com cerca de 17 cm de altura por 7 cm de largura. Em cada saco foram colocados 200 ml de areia quartzosa e 25 ml de solução Harper e Gibson (1984), seguindo-se esterilização na autoclave a 121°C durante 30 minutos.

Após introdução das radículas e subsequente inoculação com diluições de solo, os sacos foram colocados em câmara de crescimento de plantas nas seguintes condições:

Fotoperíodo – 16 horas

Temperatura. Diurna - 24°C

Temperatura nocturna - 16°C

Radiação fotossinteticamente activa – 350  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Regas – 5 ml de solução de 2 em 2 dias a partir da segunda semana de crescimento

Período de crescimento – Quatro semanas



#### **3.2.2.4. Estimativa populacional**

A estimativa populacional foi feita pela observação do número de plantas noduladas permitindo a elaboração de códigos de positivos e negativos para a consulta de tabelas de Número Mais Provável. Foram usadas as tabelas propostas por Vincent (1970) e adaptadas por Somasegaran e Hoben (1994), para 6 diluições decimais com 4 repetições. Foi registado o somatório de todos os tubos positivos de cada ensaio ( $m$ ) e aplicada a seguinte expressão:  $X = (m \times d)/v$ , em que  $X$  é o Número Mais Provável por grama de solo,  $m$  o valor tabelado para o número de positivos,  $d$  o recíproco do factor de diluição inicial e  $v$  o volume de diluição usado para inocular plântulas. Os resultados encontram-se expressos em número de ufn (unidades formadoras de nódulos) por grama de solo seco a peso constante.

#### **3.2.3. Obtenção e caracterização de mutantes espontâneos resistentes a antibióticos**

O uso de mutantes espontâneos resistentes a antibióticos tem incidido fundamentalmente em *R. leguminosarum* bv trifolii, sendo bem conhecidas as possíveis alterações às características simbióticas e competitivas que tais mutantes possam apresentar em relação às estirpes originais (ver 2.2.3.1). No entanto, o uso desta técnica de marcação em rizóbios para grão de bico, não tem sido usada com frequência e as referencias a alterações apresentadas pelos mutantes em relação a caracteres simbióticos e competitivos, também são escassas.

O presente protocolo refere-se à metodologia seguida para a obtenção de resistentes a antibiótico, avaliação da efectividade simbiótica e capacidade competitiva em relação à estirpe original.

##### **3.2.3.1 Seleção de mutantes espontâneas a antibióticos**

Com o objectivo de obter informação sobre a competição e persistência de campo de estirpes promissoras para grão-de-bico, as estirpes listadas no Quadro 3.3. foram marcadas por resistência a antibióticos. A técnica de marcação usada foi a da resistência a elevadas concentrações de antibióticos, por selecção de mutantes espontâneos. Para a

obtenção de tais mutantes foi usada uma modificação da técnica descrita por Schwinghamer and Dudman (1973).

**Quadro 3.3.** Identificação de estirpes usadas nos ensaios, sua origem e actividade nitrogenásica medida pela técnica da redução do acetileno (média de 12 plantas).

Isolamentos	Inóculo	Origem/Tipo solo	Actividade Nitrogenásica ( $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4.\text{pl}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )
<b>53Ca</b>	<b>B1</b>	Beja/Bvc	3.730
<b>54Ca</b>	<b>B2</b>	Beja/Bvc	3.140
<b>61Ca</b>	<b>B3</b>	Beja/Bvc	3.671
<b>64bCa</b>	<b>B4</b>	Beja/Bvc	5.555
<b>83Ca</b>	<b>E1</b>	Elvas/Vx	3.210
<b>84aCa</b>	<b>E2</b>	Elvas/Vx	4.025
<b>85Ca</b>	<b>E3</b>	Elvas/Vx	3.900
<b>98Ca</b>	<b>V1</b>	Évora/Pmg	4.642
<b>102Ca</b>	<b>V2</b>	Évora/Pmg	2.850
<b>CP31</b>	<b>I1</b>	ICARDA	2.817
<b>CP36</b>	<b>I2</b>	ICARDA	2.338

Suspensões densas de aproximadamente  $10^9$  ufc  $\text{ml}^{-1}$ , foram inoculadas por espalhamento em placas de Petri com meio de cultura MLA suplementados com  $125 \mu\text{g ml}^{-1}$  de antibiótico, usando 0,1 ml de inóculo. Após incubação a  $28^\circ\text{C}$  durante 6 a 8 dias foi registado o número de colónias formado em cada placa e repicadas para placas com meio MLA sem antibiótico, 3 colónias bem desenvolvidas de cada estirpe e de cada antibiótico usado. Após crescimento em duas repicagens sucessivas de cada uma das colónias isoladas, repetiu-se o procedimento inicial, agora usando uma concentração de antibiótico de  $250 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Após incubação contou-se o número de colónias desenvolvidas e repicaram-se 3 colónias bem desenvolvidas para meio sem antibiótico, após o que se seguiu novo período de incubação e mais duas passagens sucessivas de cada colónia isolada para meio sem antibiótico. Terminadas estas passagens por meio sem antibiótico, procedeu-se à inoculação de cada um dos isolamentos por meio com antibiótico na

concentração de 250  $\mu\text{g ml}^{-1}$  para confirmação da estabilidade e nível da resistência ao antibiótico obtido.

Para as estirpes em que se usou dupla marcação, isto é, resistência a dois antibióticos, procedeu-se de forma idêntica à seguida para a obtenção da primeira resistência, agora partindo de um isolamento já com resistência a um antibiótico.

Os isolamentos obtidos foram guardados em microtubos com cunhas de Agar e colocados a 4°C até futura utilização.

### 3.2.3.2. Avaliação comparativa da capacidade simbiótica

A avaliação da capacidade simbiótica dos mutantes em comparação com as suas estirpes originais, foi realizada através da inoculação de plantas com as estirpes (Originais e Mutantes) e avaliação após 8 semanas de crescimento em condições controladas. A obtenção de plântulas de grão de bico, o substrato e suporte de crescimento, bem como as condições de crescimento foram idênticas ao exposto em 3.2.2.2. e 3.2.2.3.. A inoculação das plântulas foi realizada com 2 ml de uma suspensão diluída com cerca de  $10^8$  ufc  $\text{ml}^{-1}$  de cada um dos isolamentos em análise. O ensaio foi realizado em blocos casualizados com 12 plantas por tratamento. Uma vez por semana foi realizada uma re-casualização da distribuição das plantas na câmara de crescimento de modo a uniformizar todas as plantas em relação às condições no interior da câmara. Os parâmetros determinados no fim do ensaio foram a avaliação da actividade nitrogenásica pelo método da redução do acetileno, o peso seco de nódulos e o peso seco da parte aérea da planta.

No fim do período de crescimento das plantas, e imediatamente após a retirada das plantas da câmara de crescimento procedeu-se ao corte da parte aérea, lavagem das raízes para remoção da areia, colocando-as em frascos serológicos de 50 ml, rolhados, seguindo-se injeção de 2 ml de acetileno. Ao fim de uma hora de incubação a 28°C, recolheu-se 1 ml de amostra de gás de cada frasco e quantificou-se a produção de etileno usando cromatografia de fase gasosa, segundo a metodologia descrita por Upchurch (1987).

Após a determinação da actividade nitrogenásica procedeu-se à recolha de todos os nódulos em cada planta. Das plantas inoculadas com bactérias resistentes a antibiótico, recolheram-se, de forma casualizada, 3 nódulos por planta para verificação da resistência ao(s) antibiótico(s) pela técnica da picada de nódulo e meio de cultura (Winarno e Lie, 1979). Todos os nódulos de cada planta foram recolhidos para determinação do seu

peso seco (peso constante a 70°C). As partes aéreas foram empacotadas em sacos de papel e colocadas na estufa a 70°C para determinação do seu peso seco.

Os dados obtidos foram analisados pelo teste t de Student comparando as médias das estirpes originais com as médias das estirpes mutantes usando o programa informático MSTAT-C (Michigan State University)

### **3.2.3.3. Avaliação comparativa da capacidade competitiva**

Os mutantes espontâneos resistentes a antibióticos obtidos foram avaliados quanto à sua capacidade de competirem com as estirpes de onde derivaram, de forma a determinar a possibilidade de serem usados em estudos de comportamento no solo, nomeadamente a de determinar a capacidade competitiva perante as estirpes nativas. A existência de desvios significativos da capacidade competitiva de mutantes em confronto com as estirpes originais, limitará o uso daqueles como forma de prever o comportamento de inoculantes seguindo a metodologia escolhida.

Os inóculos preparados para este estudo de competição em condições de laboratório foram obtidos de forma a estabelecer diferenças na representação de cada estirpe (original e mutante), tal como proposto por Bromfield e Jones (1979). Após a obtenção de uma suspensão densa de cada uma das estirpes foi feito o ajustamento da densidade óptica de modo a conferir alguma homogeneidade entre as 22 suspensões de células (11 originais e 11 mutantes) e estimar uma densidade populacional de aproximadamente  $10^8$  células por mililitro, seguindo-se diluições para contagem de viáveis em placas de inclusão com meio MLA. De cada uma das suspensões de células foi retirado um volume de amostra de modo a constituir uma mistura de estirpe original e mutante em 3 níveis de representação das estirpes, 1:1 (50% de cada) 1:10 (10% mutante, 90 % original) e 10:1 (90% mutante, 10 % original). Obtivemos assim, uma proporção esperada variável na representação da estirpe original e seu mutante no inóculo, a ser posteriormente estabelecida de forma precisa pela contagem de viáveis.

A inoculação de sementes foi realizada segundo o anteriormente descrito (3.2.2.2. e 3.2.2.3.), assim como o substrato, suporte e condições de crescimento. Cada plântula recebeu 2 ml de inóculo. Cada nível de mistura de estirpes foi inoculado em 10 plantas. O ensaio foi assim constituído por 11 emparelhamentos original/mutante, cada um deles em 3 níveis de representação, ou seja 33 tratamentos replicados 10 vezes. O período de crescimento foi de 6 semanas.

Após o período de crescimento, a parte aérea das plantas foi removida e as raízes lavadas de modo a retirar a areia. Seguiu-se uma higienização das raízes usando lixívia comercial diluída a 10%, sendo todas as raízes colocadas a -18°C até posterior análise. De cada uma das 10 plantas de cada tratamento foram picados 5 nódulos localizados na raiz principal, após desinfecção por imersão em peróxido de hidrogénio (3%, v/v) durante 3 minutos e lavagem em 3 passagens por água destilada estéril. Cada picada de nódulo foi transferida para meio MLA e meio MLA suplementado com o(s) antibiótico(s) referentes a cada uma das resistências dos tratamentos. O crescimento da picada de nódulo em meio MLA com antibiótico constituiu a evidencia da presença do mutante resistente no interior do nódulo e a proporção dos nódulos formados pelo mutante resistente uma medida da sua capacidade competitiva em relação à estirpe original.

A análise estatística dos dados obtidos foi feita recorrendo ao teste de  $\chi^2$  avaliando o desvio da proporção de nódulos ocupados pelos mutantes em relação à proporção observada do mutante no inóculo.

#### **3.2.4. Avaliação da capacidade competitiva em condições de campo**

Uma das características mais importantes das estirpes usadas como inoculantes é a sua capacidade de competir com sucesso com a população nativa na ocupação dos nódulos. Foram usados os mutantes espontâneos resistentes aos antibióticos como forma de identificar o inóculo em nódulos obtidos nas condições de campo.

Sementes de grão-de-bico da variedade “Elvar” foram inoculadas com uma suspensão densa de inóculo ( $10^9$  ufc ml<sup>-1</sup>) na noite anterior à instalação dos ensaios, mediante a introdução de 10 ml da suspensão de células no pequeno saco com as 60 sementes a distribuir em cada linha de sementeira. As sementes inoculadas foram distribuídas em regos com 6 m de comprimento distanciadas cerca de 10 cm umas das outras. Em cada uma das linhas foi usada apenas uma das estirpes marcadas com 3 repetições por estirpe. Para evitar contaminações cruzadas entre linhas, estas foram separadas de um metro de solo não perturbado e cada linha (tratamento) foi intercalada com a sementeira de linhas usando-se a Ervilha. A distribuição dos inóculos também foi feita de modo a que não ocorressem perfis de resistência semelhantes em linhas adjacentes. Foram usados cuidados de assepsia para evitar contaminações cruzadas, nomeadamente o

uso de novas luvas de látex em cada inóculo distribuído nas linhas e higienização com lixívia comercial de todos os utensílios usados no contacto com o solo.

A organização dos ensaios em cada um dos locais está representada nas Figuras 3.1., 3.2. e 3.3..

Antes da abertura dos regos foi realizada uma adubação com superfosfato 18% em toda a superfície do ensaio, usando o equivalente de 90 Kg de superfosfato por hectare.

A colheita das plantas para avaliação da ocupação de nódulos foi feita ao início da floração (Março de 1995), tendo sido recolhidas 10 plantas por linha. No laboratório, as raízes foram cuidadosamente lavadas tendo-se retirado 5 plantas por inóculo e repetição para colheita de nódulos. De cada uma destas plantas foram retirados aleatoriamente 10 nódulos de modo a que cada nódulo estivesse agarrado a um pequeno troço de raiz. Cada conjunto de 10 nódulos foi higienizado por imersão em lixívia comercial diluída 10% durante 5 minutos, lavados em 3 passagens por água destilada estéril e desinfectados por imersão em peróxido de hidrogénio (3%, V/V) durante 3 minutos e novamente lavados em 3 passagens por água destilada estéril.

Dado o grande número de nódulos a processar (superior a 2475), seria impraticável fazer a sua tipificação em tempo que não condicionasse a sua deterioração, pelo que se obteve por uma modificação do método de conservação proposto por Somasegaran e Hoben (1994). Tubos de 5 ml de tampa roscada foram preenchidos a cerca de um terço do seu volume com sílica-gel desidratada (azul), colocando-se por cima um pouco de algodão. Colocaram-se os nódulos desinfectados sobre o algodão, cobrindo-se com outro pequeno troço de algodão. O restante do tubo foi completamente preenchido com sílica-gel desidratada e hermeticamente rolhados. À medida que os nódulos vão desidratando, a sílica-gel vai hidratando e mudando de cor (rosa), quando tal acontecia os tubos foram abertos e a sílica-gel superficial substituída por uma devidamente desidratada.

Local - Beja - Herdade de Almocreva

Data de instalação - 21/12/94

Nº sementes/linha = 60

Quant. inóculo = 10 ml suspensão  $10^8$  ufcml<sup>-1</sup> /saco/180 sementes

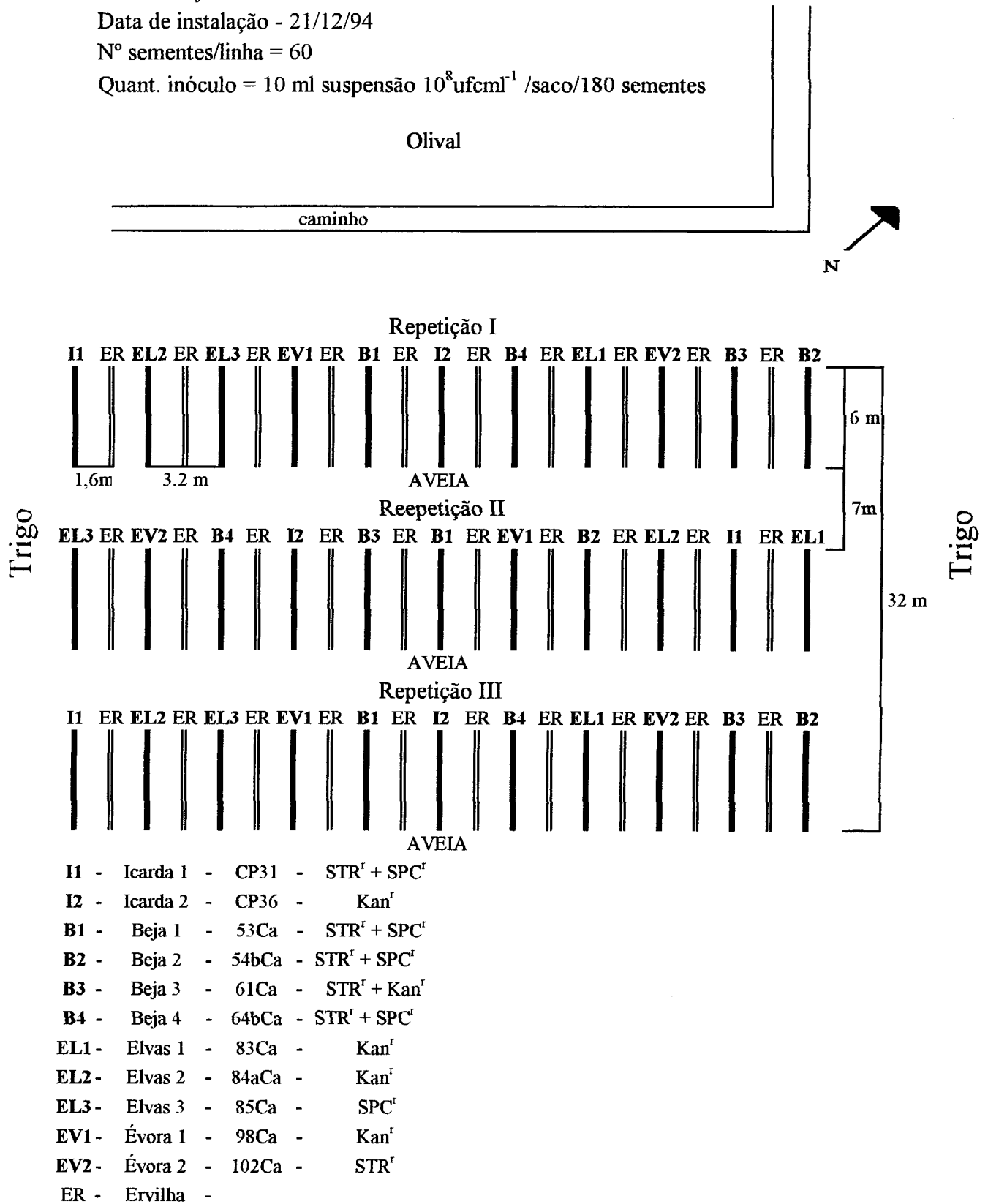


Figura 3.1. Organização dos ensaio de competição de estirpes em grão de bico.  
Herdade do Almocreva. Beja



Local -Elvas. Herdade das Casas Velhas

Data de instalação - 22/12/94

Nº sementes/linha = 60

Quantidade inóculo = 10 ml suspensão  $10^8$  ufcml<sup>-1</sup> /saco/180 sementes

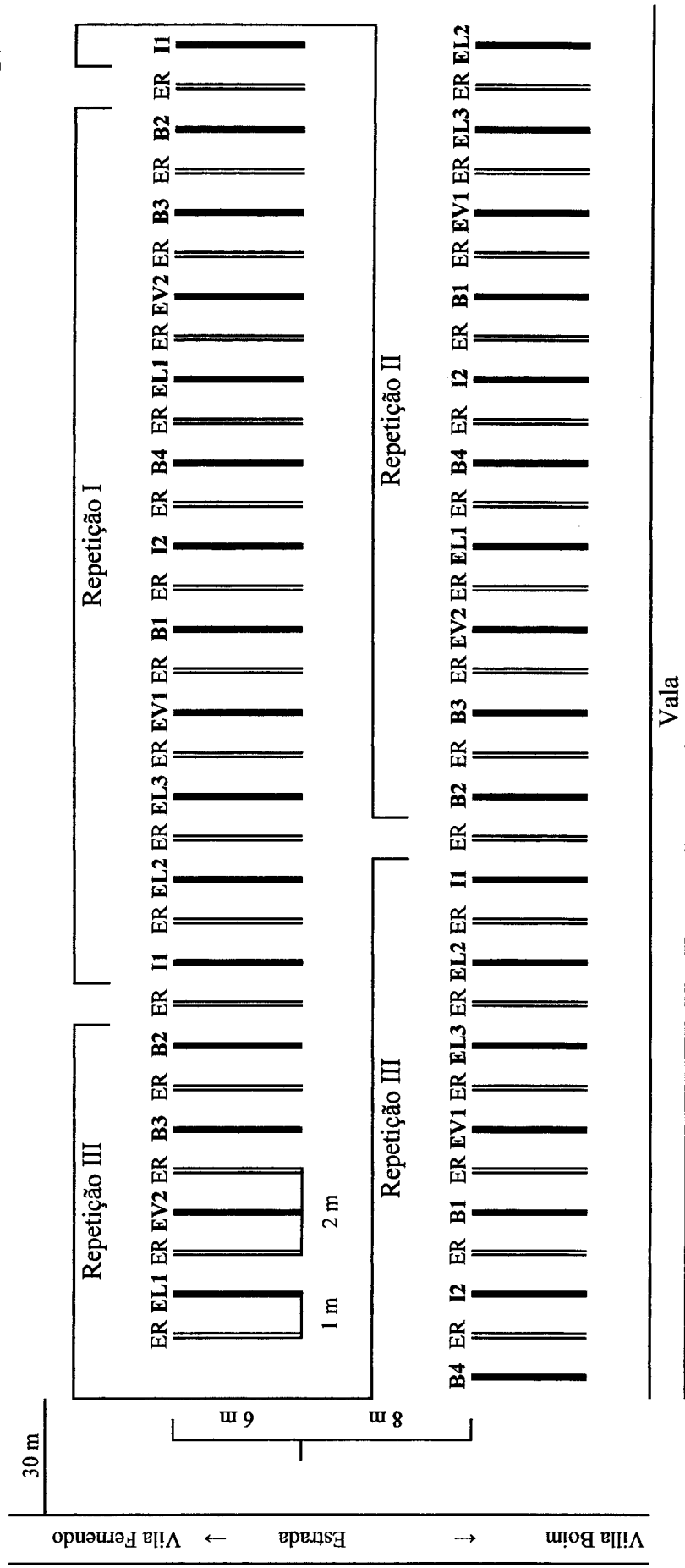
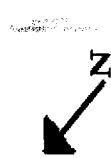


Figura 3.2. Organização do ensaio de competição de estirpes em grão de bico. Herdade das Casas Velhas. Elvas.

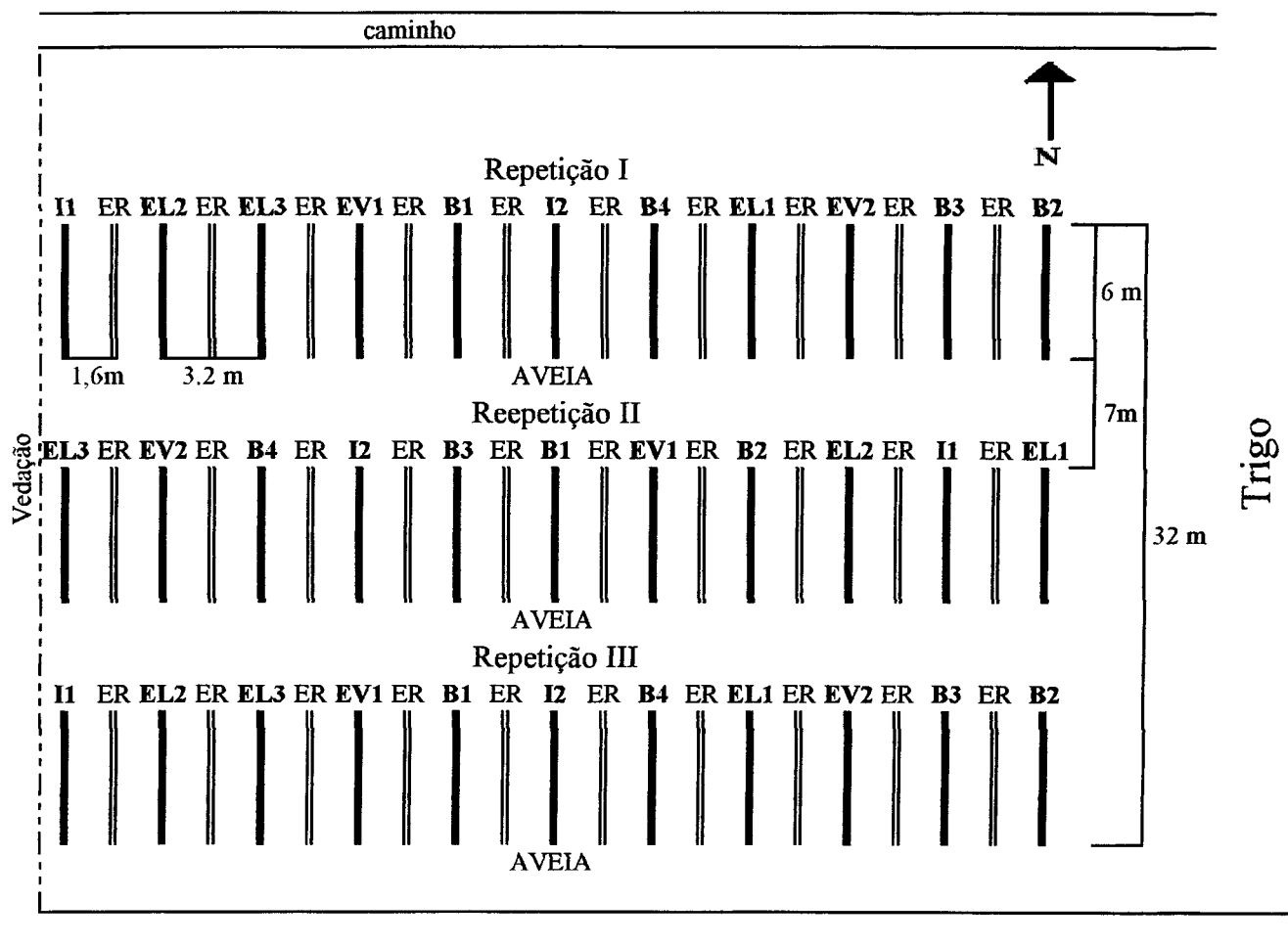


Local - Évora - Herdade Fundação Eugénio de Almeida

Data de instalação - 21/12/94

Nº sementes/linha = 60

Quantidade inóculo = 10 ml suspensão  $10^8$  ufcml<sup>-1</sup> /saco/180 sementes



I1	-	Icarda 1	-	CP31	-	STR <sup>r</sup> + SPC <sup>r</sup>
I2	-	Icarda 2	-	CP36	-	Kan <sup>r</sup>
B1	-	Beja 1	-	53Ca	-	STR <sup>r</sup> + SPC <sup>r</sup>
B2	-	Beja 2	-	54bCa	-	STR <sup>r</sup> + SPC <sup>r</sup>
B3	-	Beja 3	-	61Ca	-	STR <sup>r</sup> + Kan <sup>r</sup>
B4	-	Beja 4	-	64bCa	-	STR <sup>r</sup> + SPC <sup>r</sup>
EL1	-	Elvas 1	-	83Ca	-	Kan <sup>r</sup>
EL2	-	Elvas 2	-	84aCa	-	Kan <sup>r</sup>
EL3	-	Elvas 3	-	85Ca	-	SPC <sup>r</sup>
EV1	-	Évora 1	-	98Ca	-	Kan <sup>r</sup>
EV2	-	Évora 2	-	102Ca	-	STR <sup>r</sup>
ER	-	Ervilha	-		-	

**Figura3.3.** Organização dos ensaio de competição de estirpes em grão de bico.  
Herdade Fundação Eugénio de Almeida. Évora.

Quando se procedeu à avaliação dos ocupantes de nódulos, foram recolhidos de cada tubo 5 nódulos, colocados em água estéril durante a noite no frigorífico para re-hidratação, sendo seguidamente desinfectados por imersão em peróxido de hidrogénio (3%, V/V) durante 3 minutos e novamente lavados em 3 passagens por água destilada estéril.

A avaliação dos ocupantes de nódulos foi realizada segundo o descrito em 3.2.4.. A percentagem de nódulos ocupados por uma estirpe com crescimento no meio de cultura com o respectivo antibiótico foi considerada a medida da sua competitividade em relação às estirpes nativas presentes no solo.

### **Análise estatística dos resultados**

Como anteriormente, na análise da distribuição de nódulos e recuperação de inóculo nas zonas da raiz do trevo, realizaram-se testes não paramétricos testando-se hipóteses nulas sobre a distribuição dos dados aplicando os testes de Kruskal-Wallis e os testes bilaterais U de Mann-Whitney usando o programa *Statgraphics* 4.2 (STSC, Inc., Rockville, MD, USA). Estas análises visam esclarecer a importância de; a) Origem das estirpes na proporção de nódulos ocupados pelo inoculante, b) destino, isto é, dos locais onde foram introduzidas as estirpes, na proporção do inóculo recuperado, e c) estirpes em si afectarem a proporção de nódulos ocupados pelo inoculante.

Com o objectivo de fazer uma análise mais fina dos resultados, procedeu-se a um conjunto de análises para obter uma classificação das estirpes em função das suas origens e destinos de forma a compreender melhor a distribuição dos resultados nos 3 locais de ensaio. A análise discriminante usando os procedimentos DISAR e DIESEL de SPAD-S (Gueguen *et al.* 1996), a análise das correspondências usando o procedimento CORBI de SPAD-N (Lebart *et al.* 1996) e as classificações automáticas usando os procedimentos RECIP e PARTI-DECLA de SPAD-N (Lebart *et al.* 1996) permitirão uma classificação ou agrupamento das estirpes segundo as suas origens e destinos (locais de ensaio) em resultado da proporção da recuperação da estirpe inoculante.

Para além dos valores absolutos da recuperação das estirpes inoculantes nos diferentes locais de ensaio, a que podemos chamar intensidade de competição, é também importante verificar a forma como esta se distribui quer entre as plantas recolhidas, quer entre os locais, quer entre as repetições realizadas em cada local, isto é avaliar a variabilidade da competição. Para isso, usaram-se as mesmas técnicas para a análise da

intensidade de competição, mas usando como valores não a proporção de nódulos ocupados pelo inoculante mas sim o desvio padrão das amostras como medida da variabilidade. Assim, foi verificada, com base no mesmo tipo de análises, a competição medida pela sua intensidade e a competição pela sua variabilidade.

### 3.3. Resultados

#### 3.3.1. Populações nativas de *Mesorhizobium ciceri*.

As estimativas populacionais de *M. ciceri* avaliadas pela técnica da infecção de plantas com diluições de solo para determinação do Número Mais Provável (MPN) por grama de solo (Quadro 3.4), usando grão de bico de sementeira Outono/Inverno, variedade “Elvar”, revelaram colonizações diferentes em cada um dos solos testados. No solo de Beja encontramos populações da ordem de  $10^4$  unidades formadoras de nódulos por grama de solo, revelando uma população nativa elevada, apesar de há muitos anos não ser cultivado grão de bico na folha onde se realizaram os ensaios. Populações desta ordem de grandeza poderão resultar de boas condições de sobrevivência para estas bactérias dado este solo (Barro vermelho de calcários, Bvc) ser um solo de muito boas características quer no que respeita ao seu pH, textura, capacidade de retenção de água e teor de matéria orgânica (1,4%). Populações desta dimensão constituem um obstáculo à implantação de estirpes de rizóbio e resposta à inoculação de grão de bico.

No solo do local Évora, não foi detectada pela técnica usada qualquer planta nodulada em nenhuma das diluições de solo, pelo que a população nativa usando como planta armadilha grão de bico “Elvar”, será presumivelmente nula. No entanto, numa folha adjacente à utilizada para a realização deste ensaio, foi possível no ano anterior realizar isolamentos de rizóbio a partir de nódulos colhidos em plantas retiradas de uma cultura de grão de bico. Assim sendo, a população nativa estará presente, no entanto o seu número será reduzido, abaixo da capacidade de detecção da técnica quantitativa usada (populações inferiores a 10 por grama de solo). Neste solo, não seria de esperar populações elevadas para grão de bico dadas as características do solo, nomeadamente reacção ácida, textura ligeira, fraca capacidade de retenção para a água e baixo teor de matéria orgânica (0.8%), típicas dos solos Pmg (Pardos mediterrânicos de granitos) e por a cultura não ser tradicional na região Nestas condições recuperação de estirpes de rizóbio inoculado

(competição) estará facilitada pois as populações nativas presentes estarão em número insuficiente no solo para impedirem a nodulação por parte de inoculantes.

**Quadro 3.4.** Estimativas populacionais de *M. ciceri* nos solos e repetições dos locais de ensaio, avaliadas pela técnica de infecção de plantas para determinação do Número Mais Provável (MPN)

Local	Repetições	Diluições						Somatório +	Valor Estimado (m)	MPN gr <sup>-1</sup> de solo (ufn)
		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>			
Beja	Rep I	4	4	4	4	0	0	16	1700	1,7 x 10 <sup>4</sup>
		4	4	3	3	1	0	15	1000	1,0 x 10 <sup>4</sup>
	Rep II	4	3	3	1	0	0	11	100	1,0 x 10 <sup>3</sup>
		4	4	4	4	1	0	17	3100	3,1 x 10 <sup>4</sup>
	Rep III	4	4	4	4	2	0	18	5900	5,9 x 10 <sup>4</sup>
		4	4	3	4	0	0	15	1000	1,0 x 10 <sup>4</sup>
Elvas	Rep I	3	2	0	0	0	0	5	3,1	3,1 x 10
		4	3	1	0	0	0	8	17	1,7 x 10 <sup>2</sup>
	Rep II	2	2	0	0	0	0	4	1,7	1,7 x 10
		3	0	0	0	0	0	3	1	10
	Rep III	4	2	0	0	0	0	6	5,8	5,8 x 10
		4	3	0	0	0	0	7	10	1,0 x 10 <sup>2</sup>
Évora	Rep I	0	0	0	0	0	0	0	0	Não Detectável
		0	0	0	0	0	0	0	0	
	Rep II	0	0	0	0	0	0	0	0	
		0	0	0	0	0	0	0	0	
	Rep III	0	0	0	0	0	0	0	0	
		0	0	0	0	0	0	0	0	

O solo do local Elvas apresentou uma situação intermédia entre o local Beja e Évora com uma população nativa para grão de bico que varia entre 10 e 170 unidades formadoras de nódulos por grama de solo. Trata-se de uma população baixa revelando a ausência de

hospedeiro ao longo de muito tempo, possivelmente também algum constrangimento à implantação de estirpes, pois também no local Beja, o grão de bico há muitos anos que não é cultivado e apresenta populações muito superiores.

### 3.3.2. Selecção de mutantes espontâneos a antibióticos

No Quadro 3.5. observamos a sequencia de valores obtidos no processo de selecção de mutantes resistentes aos antibióticos. Assim numa primeira passagem da suspensão densa ( $10^9 \text{ ml}^{-1}$ ) pelo primeiro antibiótico, observou-se uma frequência de mutação que está de acordo com a espectável em estirpes de rizóbio (1 em  $10^5$  a 1 em  $10^7$ , Somasegaran e Hoben, 1994). A partir de colónias que retiveram resistência a  $125 \mu\text{g ml}^{-1}$ , foi feita a sua inoculação em meio com  $250 \mu\text{g ml}^{-1}$ . O grande número de colónias observado levou a que se procedessem a diluições seguidas de plaqueamento em meio com este segundo nível de antibiótico de modo a obter colónias individualizadas que permitissem o isolamento dos mutantes com o nível resistência pretendido. Esta situação é explicada pelo facto de a ocorrência da selecção de um mutante já com um nível apreciável de resistência lhe conferir resistências a níveis de antibiótico mais elevados, pelo menos numa grande parte da população obtida.

Para a selecção dos mutantes obtidos, quer para o seu uso apenas com resistência a um dos antibióticos, quer para a selecção de mutantes com resistência a dois antibióticos, foram escolhidas colónias das placas que apresentaram maior número de colónias na diluição para a selecção do nível máximo de resistência ( $250 \mu\text{g ml}^{-1}$ ).

De notar que a frequência, avaliada pela média do número de colónias obtido para as estirpes na exposição inicial ao antibiótico (10), aumentou quando as estirpes já apresentava uma resistência a um dos antibióticos (36).

**Quadro 3.5.** Colónias obtidas inoculando 0.1 ml de uma suspensão inicial de  $10^9$  células por ml. Valores assinalados representam a placa de onde se partiu para o passo seguinte na selecção para 2ª marcação ou uso do de mutante com resistência única.

Estirpe	1º Antibiótico	Placas	Nº colónias 125 µg ml <sup>-1</sup> antibiótico	Nº colónias 250 µg ml <sup>-1</sup> diluição 10 <sup>-6</sup> (média 2 placas)	2º Antibiótico	Nº colónias 250 µg ml <sup>-1</sup> 2º antibiótico	Perfil de resistencia				
53Ca	Estreptomina	1	11	<b>23</b>	Espectinomicina	45	STR <sup>r</sup> + SPC <sup>r</sup>				
		2	15	0,48		32					
		3	9	0,60		47					
54bCa	Estreptomina	1	10	<b>75</b>	Espectinomicina	38	STR <sup>r</sup> + SPC <sup>r</sup>				
		2	17	50		51					
		3	11	23		36					
61Ca	Estreptomina	1	21	5	Kanamicina	41	STR <sup>r</sup> + Kan <sup>r</sup>				
		2	15	32		29					
		3	6	<b>160</b>		25					
64bCa	Estreptomina	1	18	65	Espectinomicina	16	STR <sup>r</sup> + SPC <sup>r</sup>				
		2	13	53		20					
		3	9	<b>73</b>		18					
83Ca	Kanamicina	1	8	125	/		Kan <sup>r</sup>				
		2	6	90							
		3	4	<b>102</b>							
84aCa	Kanamicina	1	18	0,11			/		Kan <sup>r</sup>		
		2	25	<b>25</b>							
		3	13	23							
85Ca	Espectinomicina	1	11	<b>89</b>					/		SPC <sup>r</sup>
		2	23	67							
		3	15	88							
98Ca	Kanamicina	1	3	<b>70</b>							/
		2	8	0,61							
		3	11	0,76							
102Ca	Estreptomina	1	7	<b>54</b>	/						
		2	1	36							
		3	0								
CP31	Estreptomina	1	4	135			Espectinomicina	29			
		2	7	<b>194</b>				57			
		3	10	121				41			
CP36	Kanamicina	1	8	<b>164</b>					Kan <sup>r</sup>		
		2	6	126							
		3	5	148							
Média			10					36			

### 3.3.3. Avaliação comparativa da capacidade simbiótica

De uma maneira geral os mutantes espontâneos resistentes a antibióticos seleccionados não apresentaram diferenças no que respeita à sua capacidade simbiótica em relação às estirpes originais avaliada pelo peso seco da parte aérea, pelo peso seco de nódulos e pela actividade nitrogenásica medida pela redução do acetileno (Quadro 3.6.), apesar de detectarem variações significativas pontuais em alguns isolamentos resistentes aos antibióticos e apenas a alguns, não em todos, os parâmetros analisados. Assim e no que

**Quadro 3.6.** Eficiência Simbiótica de mutantes resistentes a antibióticos comparados com as suas estirpes originais. Valores seguidos de \* diferem significativamente da estirpe original para  $P \leq 0.05$ . Entre parêntesis Erro Padrão da Média.

Estirpes	Parte aérea		Nódulos		C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	
	Peso seco (mg)		Peso seco (mg)		(uMol/pl/hr)	
	Originais	Mutantes	Originais	Mutantes	Originais	Mutantes
<b>53Ca</b>	409 (22)	437 (26)	21 (4)	27 (3)	2,33 (0,45)	<b>4.88*(0,99)</b>
<b>54Ca</b>	398 (36)	398 (20)	26 (6)	32 (5)	4,4 (0,49)	<b>1.81*(0,39)</b>
<b>61Ca</b>	447 (26)	460 (33)	31 (6)	36 (5)	4,14 (0,75)	<b>2.23*(0,75)</b>
<b>64bCa</b>	422 (42)	402 (15)	27 (6)	39 (4)	6,46 (0,70)	<b>4.20*(0,60)</b>
<b>83Ca</b>	389 (23)	<b>465*(26)</b>	42 (5)	40 (5)	4,01 (0,60)	3,96 (0,77)
<b>84aCa</b>	405 (28)	367 (25)	46 (7)	<b>25*(4)</b>	3,24 (0,59)	<b>1.93*(0,19)</b>
<b>85Ca</b>	526 (40)	523 (55)	49 (7)	52 (8)	5,66 (0,94)	6,47 (1,50)
<b>98Ca</b>	774 (89)	592 (63)	68 (7)	53 (7)	4,9 (1,12)	3,73 (0,58)
<b>102Ca</b>	554 (47)	486 (34)	50 (7)	45 (5)	3,73 (0,65)	5,41 (0,76)
<b>CP31</b>	394 (15)	466 (37)	47 (6)	44 (7)	3,96 (0,77)	3,46 (0,68)
<b>CP36</b>	492 (54)	462 (46)	19 (3)	24 (3)	3,03 (0,78)	3,68 (0,79)

diz respeito ao peso seco da parte aérea, apenas se detectaram diferenças significativas na estirpe 83Ca (STR<sup>I</sup>), tendo esta inclusivamente revelado uma performance superior à da estirpe original. Em relação ao peso seco de nódulos, apenas uma das estirpes, 84aCa (Kan<sup>I</sup>), foi significativamente inferior à estirpe original, não tendo isso reflexos na produção de peso seco da parte aérea, mas com redução significativa na sua actividade nitrogenásica. Em relação a este ultimo parâmetro avaliado, actividade nitrogenásica,

observamos variações significativas em 5 dos 11 isolamentos testados, sendo quatro deles significativamente inferiores e um superior. No entanto este parâmetro, apesar de importante, revela apenas a actividade do aparelho enzimático fixador de azoto no momento da colheita e nas condições da análise, sendo considerado por vários autores, uma análise a ser confrontada com outras para a avaliação da capacidade simbiótica do par bactéria/hospedeiro em estudo (Vessey, 1994)

Assim, em termos gerais, apesar de existirem algumas diferenças da capacidade simbiótica entre mutantes e originais, estas ao não ocorrerem em todos os parâmetros usados, podemos considerar estes isolamentos mutantes espontâneos aos antibióticos como aptos para estudos de ecologia.

#### **3.3.4. Avaliação comparativa da capacidade competitiva**

No Quadro 3.7 apresenta-se os valores das populações usadas para inocular as plântulas, a proporção de nódulos ocupados pelos mutantes e os valores de  $\chi^2$  observados na comparação da proporção de nódulos formados pelo mutante e sua proporção no inóculo. Como é natural, as proporções original/mutante esperadas (1:10, 1:1, 10:1) no inóculo apresentaram desvios, pelo que as análises de  $\chi^2$  realizadas a cada par original/mutante foram baseadas na proporção de mutante de facto presente no inóculo e não naquela que se pretendia.

Para o conjunto das estirpes analisadas não parece existir uma marcada diferença entre isolamentos resistentes aos antibióticos e suas estirpes originais. Assim das 33 combinações possíveis (11 pares original / mutante em 3 níveis de proporção) 18 não mostraram diferenças significativas pelo teste do  $\chi^2$  entre originais e mutantes, e em 15 detectaram-se tais diferenças. Quer nas combinações que mostraram diferenças quer nas que não mostraram, encontramos pares em que a competição dos mutantes foi tanto superior como inferior ao esperado, embora estas diferenças apenas tenham sido elevadas para a da estirpe 64bCa em que a uma representação de 79% do mutante no inóculo, correspondeu apenas a 33,3% de nódulos formados e para a estirpe 85Ca com 70% no inóculo e 29,7% nos nódulos (Quadro 3.7). De notar que na proporção intermédia na representação de original e seu mutante, que se pretendia ser de 1:1 mas que obviamente apresentou algum desvio em relação ao pretendido quando se verificaram com

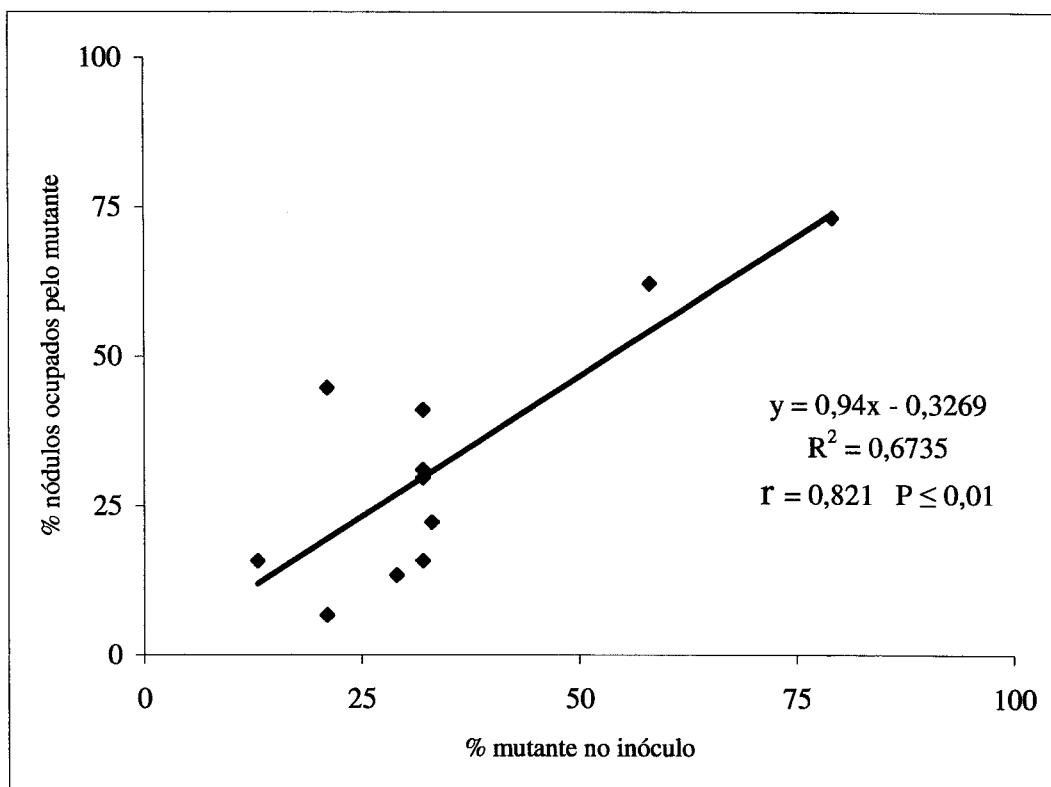


**Quadro 3.7.** Competição de mutantes versus estirpes originais em diferentes proporções no inóculo.  $P(\chi^2 \geq 10.828) = 0.001$ .  $\chi^2*$  - % mutante recuperado não difere da % esperada.

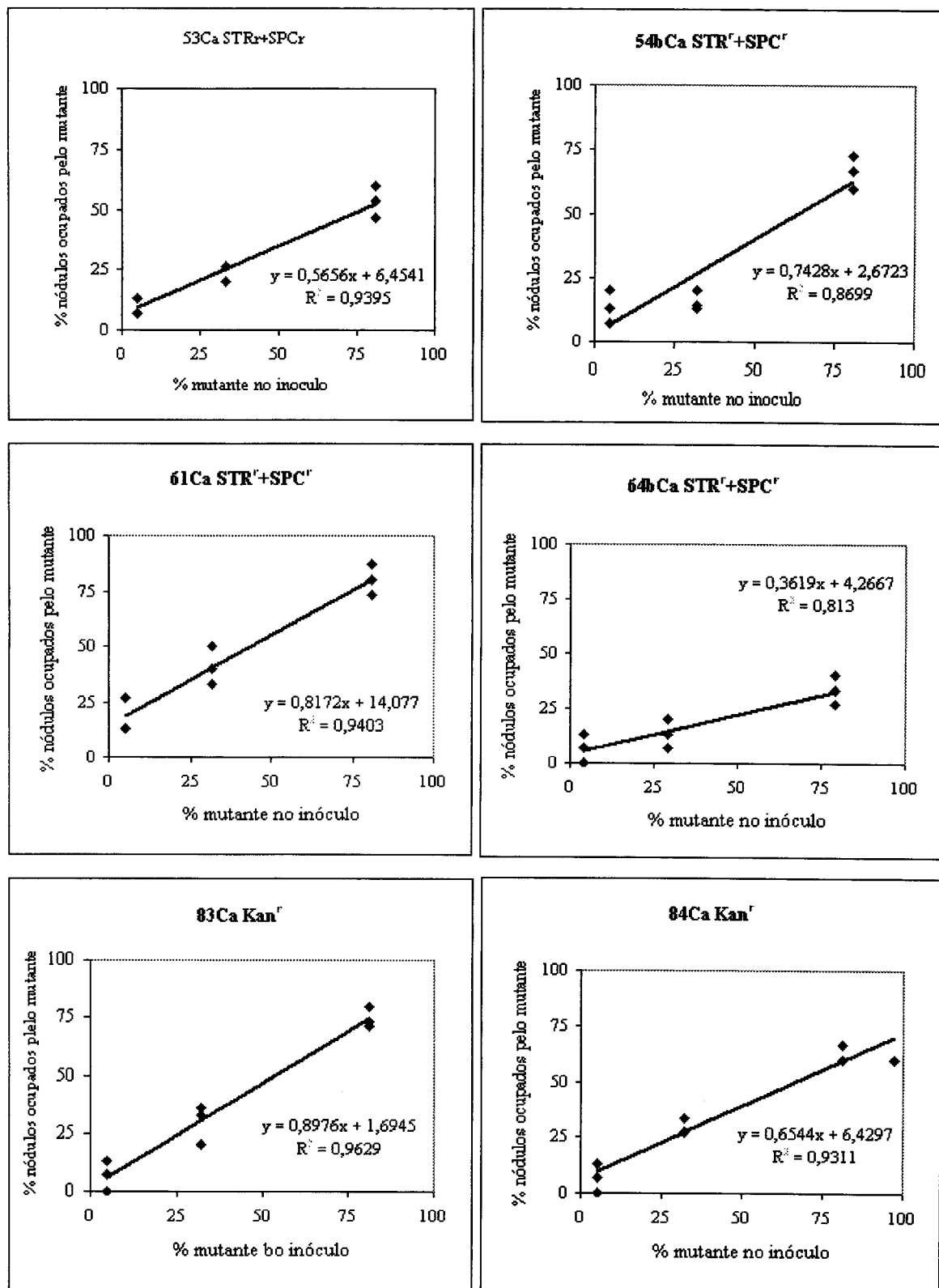
Estirpe	Resistência Antibiótico	População Original Contada x 10 <sup>8</sup> ufc ml <sup>-1</sup>	População Mutante Contada x 10 <sup>8</sup> ufc ml <sup>-1</sup>	Pop. Total Inoculada x 10 <sup>8</sup> ufc ml <sup>-1</sup>	Mutante no Inóculo %	Mutante Esperado no Inóculo %	Nódulos Ocupados Mutante %	Diferença na % entre inoc. e recuperado	$\chi^2$
53Ca	SPC <sup>r</sup> +STR <sup>r</sup>	6,43 ± 0,38	3,1 ± 0,65	6,10	5	10	11,1	6,1	<b>7,526*</b>
				4,77	33	50	22,2	-10,8	<b>4,840*</b>
				3,43	81	90	53,3	-27,7	51,272
54bCa	SPC <sup>r</sup> +STR <sup>r</sup>	3,88 ± 0,33	1,8 ± 0,25	3,67	5	10	13,3	8,3	15,249
				2,84	32	50	15,7	-16,3	11,861
				2,01	81	90	66,7	-14,3	12,592
61Ca	SPC <sup>r</sup> +Kan <sup>r</sup>	5,58 ± 0,68	2,6 ± 0,20	5,28	5	10	17,7	12,7	34,704
				4,09	32	50	41,0	9	<b>3,917*</b>
				2,90	81	90	80,0	-1	<b>0,036*</b>
64bCa	SPC <sup>r</sup> +STR <sup>r</sup>	2,15 ± 0,30	0,88 ± 0,60	2,02	4	10	6,7	2,7	<b>1,290*</b>
				1,52	29	50	13,3	-15,7	11,975
				1,01	79	90	33,3	-45,7	122,293
83Ca	Kan <sup>r</sup>	9,98 ± 0,58	4,8 ± 0,45	9,46	5	10	6,7	1,7	<b>0,527*</b>
				7,39	32	50	29,7	-2,3	<b>0,360*</b>
				5,32	81	90	74,7	-6,3	<b>2,829*</b>
84Ca	Kan <sup>r</sup>	10,7 ± 0,38	5,1 ± 0,55	10,14	5	10	6,7	1,7	<b>0,561*</b>
				7,90	32	50	31,0	-1	<b>0,075*</b>
				5,66	81	90	62,3	-18,7	22,961
85Ca	SPC <sup>r</sup>	3,5 ± 0,30	0,92 ± 0,40	3,24	3	10	0	0	93
				2,21	21	50	6,7	-14,3	12,144
				1,18	70	90	29,7	-40,3	79,016
98Ca	Kan <sup>r</sup>	1,17 ± 0,05	4,4 ± 0,35	1,49	29	10	42,3	13,3	<b>7,960*</b>
				2,79	79	50	73,3	-5,7	<b>1,932*</b>
				4,08	97	90	100,0	3	<b>2,955*</b>
102Ca	STR <sup>r</sup>	1,22 ± 0,03	1,7 ± 0,15	1,27	13	10	33,3	20,3	34,201
				1,46	58	50	62,2	4,2	<b>0,659*</b>
				1,65	93	90	100,0	7	<b>7,974*</b>
CP31	SPC <sup>r</sup> +STR <sup>r</sup>	9,15 ± 0,55	2,4 ± 0,15	8,48	3	10	17,7	14,7	79,978
				5,78	21	50	44,7	23,7	34,663
				3,08	70	90	100,0	30	42,361
CP36	Kan <sup>r</sup>	5,00 ± 0,20	0,78 ± 0,70	4,58	2	10	4,3	2,3	<b>4,129*</b>
				2,89	13	50	15,7	2,7	<b>0,404*</b>
				1,20	58	90	73,3	15,3	<b>9,176*</b>

as contagens em placa, existe uma muito boa proporcionalidade entre a recuperação de nódulos ocupados pelo mutante e a proporção real deste no inóculo (Figura 3.4.).

Uma observação detalhada, de cada um dos emparelhamentos original/mutante para cada nível de representação do mutante na população inoculada nas plantas, verificamos existir sempre uma relação positiva e significativa entre o aumento da proporção de mutante no inóculo e sua recuperação nos nódulos (Figura 3.5), pelo que podemos considerar estes mutantes como utilizáveis em estudos de ecologia de rizóbio em solos com populações nativas.



**Figura 3.4.** Relação entre % mutantes no inóculo e nódulos ocupados pelo mutante no nível intermédio de representação.



**Figura 3.5.** Relação entre proporção de mutante no inóculo e proporção de nódulos formados pelos mutantes em todos os pares original : mutante (continua)

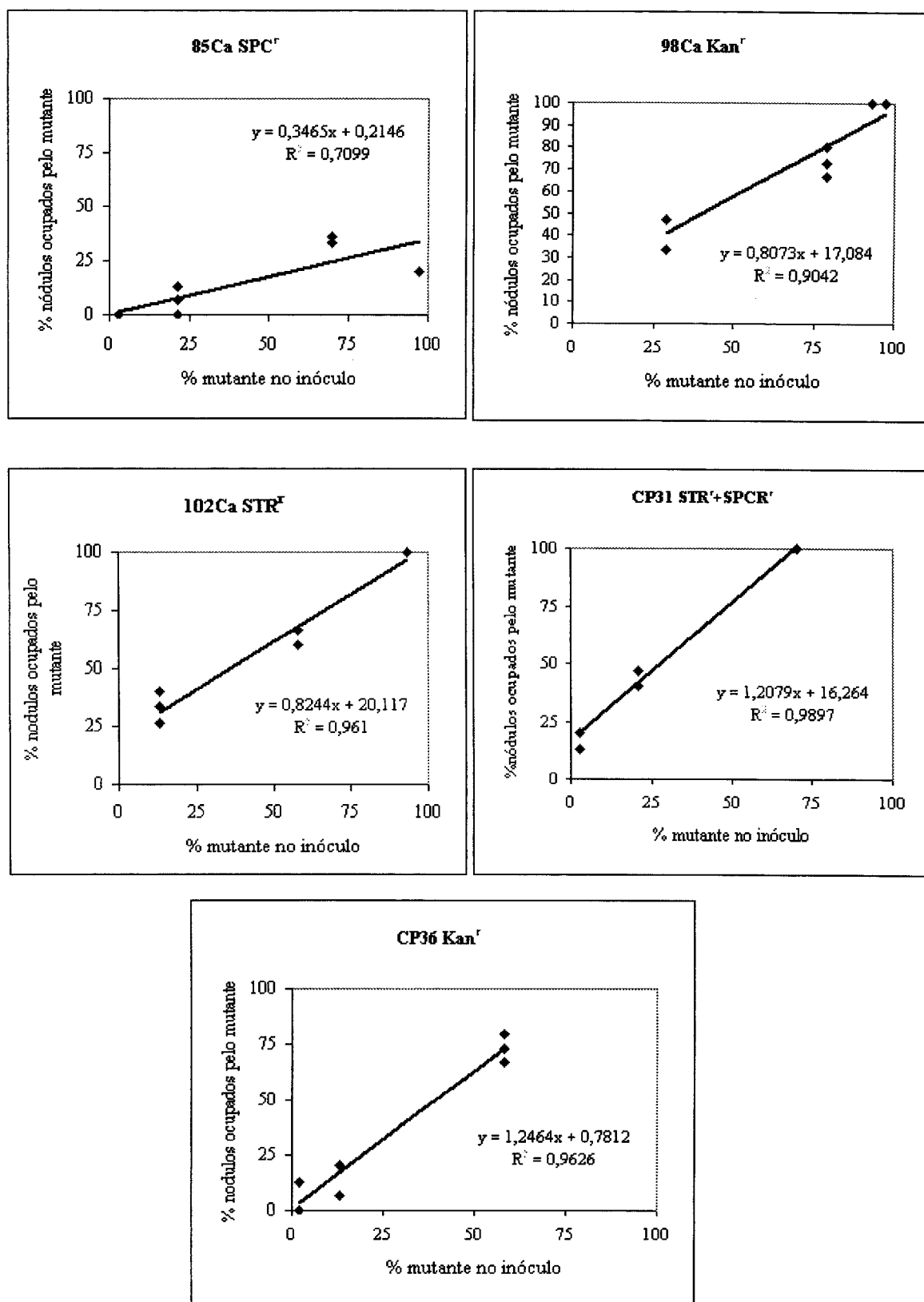


Figura 3.5. Continuação

### 3.3.5 Avaliação da capacidade competitiva em condições de campo (Competição – Intensidade)

Os resultados obtidos na recuperação de nódulos ocupados pelos inóculos resistentes a antibióticos que resultaram das colheita de plantas nos três locais de ensaio são considerados como uma medida da capacidade competitiva das estirpes em estudo quando introduzidas em solos de diferentes características e apresentando populações nativas de rizóbio para grão de bico muito diferentes. Os resultados obtidos (Quadro 3.8. e Figura 3.7.) permitem-nos desde já uma observação sumária do comportamento competitivo dos inóculos usados naquelas condições de ensaio.

Em primeiro lugar parece evidente que o conjunto dos onze inóculos teve um comportamento diferente em função dos locais onde foram introduzidas. Por exemplo o inóculo I2 (mutante resultante da estirpe CP 36 da colecção do ICARDA) teve uma capacidade competitiva muito diferente em função de locais onde foi introduzido (destino) variando a proporção de nódulos por si ocupados entre 78 % em Évora e 6% e 8% em Beja e Elvas respectivamente. O inóculo E2 não foi recuperado em nenhum dos locais de ensaio revelando-se assim uma estirpe pouco competitiva nas presentes condições de ensaio. Porém, outras estirpes tiveram um comportamento competitivo mais uniforme em todos os destinos, embora com variações assinaláveis, por exemplo o inóculo I1.

Por outro lado, parece ser visível uma tendência para que as estirpes oriundas de um dado local, competiam melhor nesse local, sendo que as estirpes de Beja têm uma aparente tendência para competir melhor em Beja do que em Elvas, o mesmo acontecendo com as estirpes oriundas do local Évora. Ou seja, os dados parecem indicar relações de capacidade competitiva envolvendo os locais de origem, os locais de destino e as características próprias de cada uma das estirpes testadas, com todas as interacções daí resultantes.

Impõe-se assim uma avaliação estatística que permita estabelecer as relações entre estirpes e locais de aplicação, de forma a conhecer os fenómenos subjacentes à competição de estirpes de rizóbio de grão de bico nestes solos com aptidão à cultura de grão de bico de sementeira Outono/Inverno. Dada a natureza binomial dos dados (dados em proporções onde um nódulo pode dar origem apenas a um de dois resultados, tem estirpe inoculante ou estirpe nativa) os pressupostos das análises de variância por métodos paramétricos dificilmente serão satisfeitos, tendo-se optado por métodos de análise não paramétricos, pela análise discriminante, análise das correspondências e classificações automáticas.

**Quadro 3.8.** Proporção média e erro padrão da média para os nódulos ocupados pelos inóculos nos locais de ensaio de Beja, Elvas e Évora.

Estirpe	Inóculo	Origem das Estirpes	Local de Destino	Código Combinação Inoc. x Local	Ocupação Nódulos %	SEM
53Ca	B1	Beja	Beja	B1B	43	1,2
54bCa	B2			B2B	45	1,1
61Ca	B3			B3B	83	1,4
64bCa	B4			B4B	70	2,9
83Ca	E1	Elvas		E1B	8	1,2
84aCa	E2			E2B	0	0,0
85Ca	E3			E3B	47	13,0
98Ca	V1	Évora		V1B	4	0,1
102Ca	V2			V2B	26	2,9
CP31	I1	ICARDA		I1B	66	0,2
CP36	I2			I2B	6	0,5
53Ca	B1	Beja		Elvas	B1E	51
54bCa	B2		B2E		19	1,0
61Ca	B3		B3E		15	1,2
64bCa	B4		B4E		56	6,6
83Ca	E1	Elvas	E1E		3	0,1
84aCa	E2		E2E		0	0,0
85Ca	E3		E3E		24	1,3
98Ca	V1	Évora	V1E		0	0,0
102Ca	V2		V2E		11	1,1
CP31	I1	ICARDA	I1E		51	1,4
CP36	I2		I2E		8	1,0
53Ca	B1	Beja	Évora		B1V	83
54bCa	B2			B2V	43	0,1
61Ca	B3			B3V	40	7,2
64bCa	B4			B4V	67	19,2
83Ca	E1	Elvas		E1V	24	1,4
84aCa	E2			E2V	0	0,0
85Ca	E3			E3V	81	0,0
98Ca	V1	Évora		V1V	69	2,5
102Ca	V2			V2V	63	5,1
CP31	I1	ICARDA		I1V	43	4,5
CP36	I2			I2V	78	4,5

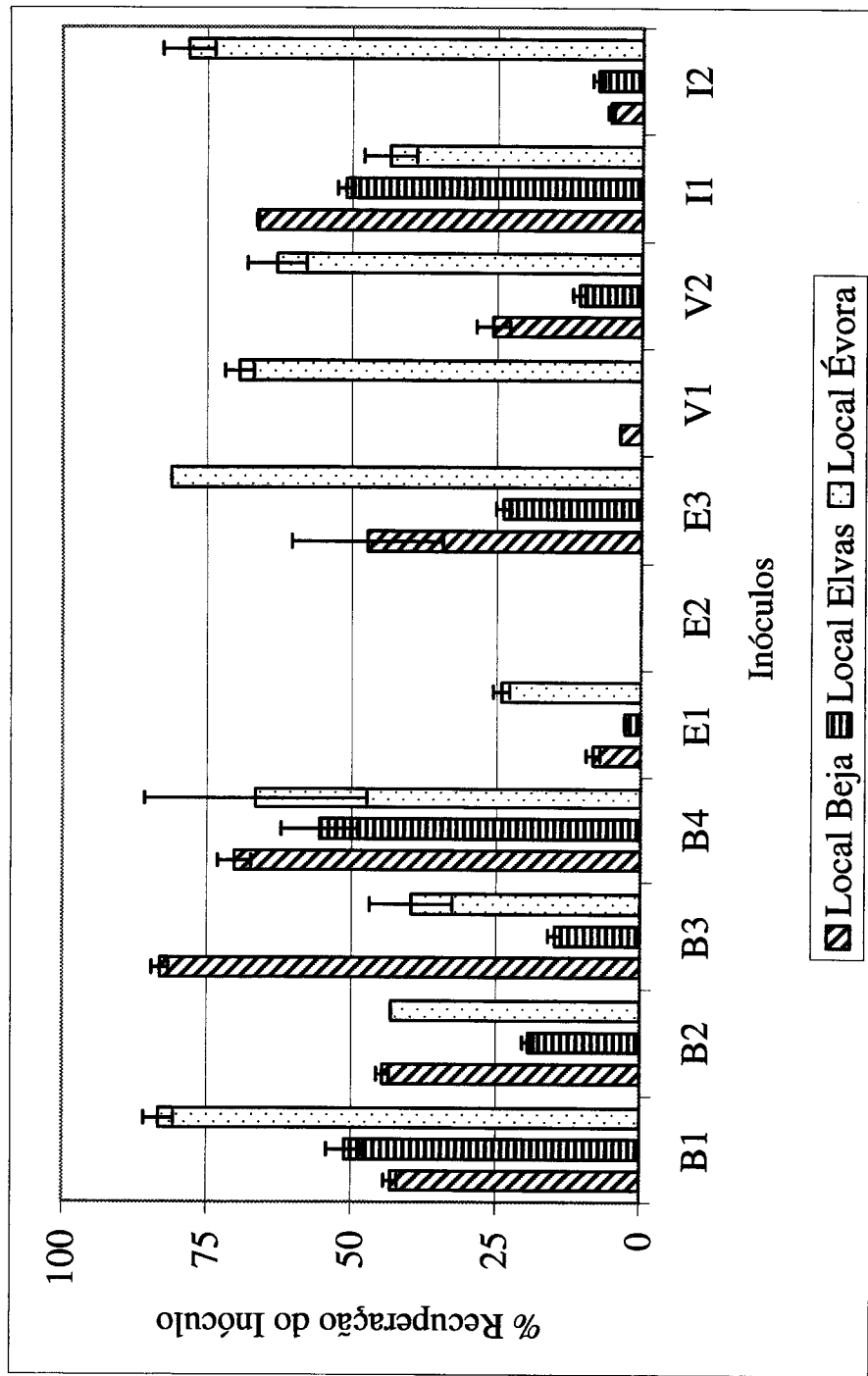


Figura 3.6. Representação gráfica da proporção de inóculo recuperado em cada um dos locais de ensaio. I representa o erro padrão da média.

### 3.3.5.1. Análises não paramétricas

#### 3.3.5.1.1. A origem das estirpes (independentemente dos destinos, repetições e plantas) afecta a competição?

Usando o teste de Kruskal-Wallis seguido de testes bilaterais independentes de U de Mann-Whitney encontraram-se diferenças significativas entre a competição das estirpes agrupadas de acordo com a sua origem ( $P=2.064 \times 10^{-11}$ ). Das 6 comparações realizadas entre pares de amostras só não havia diferenças significativas entre Beja e ICARDA ( $P=0.094$ ) e entre Elvas e Évora ( $P=0.120$ ); nas restantes houve sempre diferenças significativas ( $P \leq 0.036$ ).

**Quadro 3.9.** Proporção média da recuperação de inóculos de diferente origem independentemente de locais de ensaio (destinos), repetições e plantas. Para valores seguidos da mesma letra não há diferença significativa para  $P \leq 0,05$ , pelo teste de U de Mann-Whitney. Entre parêntesis, erros padrão da média.

Origem	n	mediana	média	
Beja	169	60	51.4 (2.9)	a
Elvas	118	0	21.1 (3.2)	b
Évora	81	0	27.5 (4.0)	b
ICARDA	79	25	42.6 (5.0)	a

Formam-se dois grupos, um de competição (% nódulos ocupados pelo inoculante) mais elevada com origem em Beja e ICARDA, outro de competição mais baixa com origem em Elvas e Évora (Quadro 3.9.).

Por razões que serão apresentadas posteriormente (3.3.5.2.), houve necessidade de não considerar em certas análises dos dados os indivíduos que tinham, em todas as variáveis, valores nulos de competição (E2B, E2E, E2V e V1E). Daí que se tenham feito os testes de Kruskal-Wallis e de U de Mann-Whitney para avaliar o efeito da não consideração daquelas variáveis. Tal como anteriormente há diferenças significativas entre a competição das estirpes agrupadas de acordo com a sua origem ( $P=2.096 \times 10^{-5}$ ). Das 6 comparações realizadas entre pares de amostras só havia diferenças significativas entre Beja e Elvas ( $P=6.112 \times 10^{-6}$ ) e entre Beja e Évora ( $P=5.634 \times 10^{-4}$ ); nas restantes nunca houve diferenças significativas ( $P > 0.05$ ).



**Quadro 3.10.** Proporção média da recuperação de inóculos de diferente origem independentemente de locais de ensaio (destinos) repetições e plantas não considerando as variáveis E2B, E2E, E2V e V1E. Para valores seguidos da mesma letra não há diferença significativa para  $P \leq 0,05$  pelo teste de U de Mann-Whitney. Entre parêntesis, erros padrão da média.

Origem	n	mediana	média	
Beja	169	60	51.4 (2.9)	a
Elvas	86	0	29.0 (4.0)	b
Évora	68	20	32.8 (4.5)	b
ICARDA	79	25	42.6 (5.0)	ab

Apesar de a origem das estirpes continuar a afectar significativamente a competição, os dois grupos mutuamente exclusivos que se formavam quando se consideravam os indivíduos E2B, E2E, E2V e V1E desaparecem (Quadro 3.10.), essencialmente devido a que as variáveis de valor nulo serem precisamente devidas a estirpes com origem em Elvas e Évora, o que faz aumentar a média da proporção de nódulos ocupados pelos inóculos daquela origem.

### 3.3.5.1.2. O destino das estirpes (independentemente da origem, repetições e plantas) afecta a competição?

Detectam-se diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de testes bilaterais independentes de U de Mann-Whitney ( $P=1.3111 \times 10^{-10}$ ). Das 3 comparações realizadas entre pares de amostras houve sempre diferenças significativas ( $P \leq 0.008$ ).

**Quadro 3.11.** Proporção média da recuperação de inóculos nos diferentes destinos independentemente da origem, repetições e plantas. Para valores seguidos da mesma letra não há diferença significativa para  $P \leq 0,05$  pelo teste de U de Mann-Whitney. Entre parêntesis, erros padrão da média.

Destino	n	mediana	média	
Beja	155	20	35.1 (3.1)	b
Elvas	149	0	22.9 (2.7)	c
Évora	143	60	55.4 (3.5)	a

Formam-se três grupos, um de competição mais elevada com destino Évora, um de competição intermédia com destino Beja e um de competição mais baixa com destino Elvas (Quadro 3.11.)

Não considerando os indivíduos que tinham em todas as variáveis valores nulos de competição (E2B, E2E, E2V e V1E), verificou-se, como anteriormente, haver diferenças significativas entre a competição das estirpes agrupadas de acordo com o seu destino ( $P=6.978 \times 10^{-9}$ ). Das 3 comparações realizadas pelo teste de U de Mann-Whitney entre pares de amostras houve sempre diferenças significativas entre os destinos ( $P \leq 0.034$ ).

**Quadro 3.12.** Proporção média da recuperação de inóculos nos diferentes destinos independentemente da origem, repetições e plantas, retirando da análise as variáveis E2B, E2E, E2V e V1E. Para valores seguidos da mesma letra não há diferença significativa para  $P \leq 0,05$  pelo teste de U de Mann-Whitney . Entre parêntesis, erros padrão da média.

Destino	n	mediana	média	
Beja	142	33.3	38.3 (3.2)	b
Elvas	124	20	27.6 (3.1)	c
Évora	136	63.8	58.2 (3.5)	a

Ou seja, considerando ou não os indivíduos com valores nulos de competição (E2B, E2E, E2V e V1E), formam-se os mesmos três grupos, um de competição mais elevada (destino Évora), um de competição intermédia (destino Beja) e um de competição mais baixa (destino Elvas), indicando Évora como o local onde a proporção de nódulos formados pelos inóculos, independentemente da sua origem, é maior, seguido de Beja e por último Elvas, sendo este o local de maior dificuldade de implantação de inóculos nas condições de ensaio.

### 3.3.5.1.3. Combinação origem / destino (independentemente das repetições e plantas) afecta a competição?

Os testes bilaterais independentes de U de Mann-Whitney detectam diferenças significativas entre a competição dos dois grupos de estirpes ( $P=0.010$ ), apresentando-se

no Quadro 3.13. os parâmetros das amostras analisadas.

**Quadro 3.13.** Proporção média da recuperação de nódulos para a combinação origem / destino iguais ou diferentes. Entre parêntesis, erros padrão da média.

Combinação origem / destino	n	mediana	média
origem e destino iguais	125	50	44.4 (3.3)
origem e destino diferentes	322	20	34.9 (2.3)

Não considerando os dados os indivíduos que tinham em todas as variáveis valores nulos de competição (E2B, E2E, E2V e V1E) continuam a ser detectadas diferenças significativas entre a competição dos dois grupos de estirpes ( $P=0.012$ ), apresentando-se no Quadro 3.14 os parâmetros das amostras analisadas.

**Quadro 3.14.** Proporção média da recuperação de nódulos para a combinação origem / destino iguais ou diferentes retirando da análise as variáveis E2B, E2E, E2V e V1E. Entre parêntesis, erros padrão da média.

Combinação origem / destino	n	mediana	média
origem e destino iguais	113	50	49.1 (3.4)
origem e destino diferentes	289	25	38.9 (2.4)

Ou seja, a proporção de nódulos ocupados pelos inóculos, com ou sem os indivíduos E2B, E2E, E2V e V1E, é superior quando a origem dos inóculos é idêntica à do local onde foram re-implantados, o que mostra a sua adaptação às condições dos locais de origem.

#### 3.3.5.1.4. Estirpes (independentemente da origem, destino, repetições e plantas) afectam a intensidade da competição?

Pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de testes bilaterais independentes de U de Mann-Whitney detectam-se significativas entre a competição das estirpes ( $P\approx 0$ ). Das 55 comparações realizadas entre pares de amostras em 20 não havia diferenças significativas ( $P\geq 0.068$ ) e em 35 havia ( $P\leq 0.049$ ).

**Quadro 3.15.** Proporção média da recuperação de inóculos (independentemente da origem, destino, repetições e plantas). As letras resultam do teste de U de Mann-Whitney. Entre parêntesis, erros padrão da média.

Inóculo	n	mediana	média	
B1	45	60	58.4 (5.5)	ab
B2	44	36.7	33.8 (4.2)	cd
B3	39	40	49.3 (6.3)	abc
B4	41	80	64.8 (6.2)	be
E1	42	0	8.7 (3.6)	f
E2	32	0	0 (0)	g
E3	44	50	48.4 (5.8)	ac
V1	43	0	25.6 (5.6)	d
V2	38	10	29.6 (5.8)	dh
I1	41	60	49.8 (6.9)	ace
I2	38	0	34.8 (7.1)	ch

Apesar de haver diferenças significativas entre as estirpes, com duas das estirpes (E1 e E2) a destacarem-se claramente das restantes, a proliferação de grupos com mais ou menos intersecções sugerem que as estirpes por si só não explicam as diferenças de competição observadas.

Retirando os indivíduos que tinham em todas as variáveis valores nulos de competição (E2B, E2E, E2V e V1E) e refazendo-se os testes de Kruskal-Wallis e os testes bilaterais independentes de U de Mann-Whitney detectam-se de novo diferenças significativas entre a competição das estirpes ( $P=2.062 \times 10^{-10}$ ). Das 45 comparações realizadas entre pares de amostras em 24 não havia diferenças significativas ( $P \geq 0.071$ ) e em 21 havia ( $P \leq 0.049$ ), com o aumento dos pares de amostras que não diferiam significativamente a resultar da retirada do indivíduo V1E, com valores nulos de competição em todas as variáveis.

Apesar de continuar a haver diferenças significativas entre as estirpes, agora naturalmente que só com uma das estirpes (E1) a destacar-se claramente das restantes, a proliferação de grupos com mais ou menos intersecções sugere que as estirpes por si só não explicam as diferenças de competição observadas quando a análise é feita sem as estirpes E2B, E2E, E2V e V1E.

**Quadro 3.16.** Proporção média da recuperação de inóculos (independentemente da origem, destino, repetições e plantas, retirando da análise as variáveis E2B, E2E, E2V e V1E. As letras resultam dos testes de U de Mann-Whitney. Entre parêntesis, erros padrão da média.

Inóculo	n	mediana	média	
B1	45	60	58.4 (5.5)	ab
B2	44	36.7	33.8 (4.2)	cd
B3	39	40	49.3 (6.3)	abc
B4	41	80	64.8 (6.2)	b
E1	42	0	8.7 (3.6)	f
E3	44	50	48.4 (5.8)	ac
V1	30	29.2	36.8 (7.2)	cd
V2	38	10	29.6 (5.8)	de
I1	41	60	49.8 (6.9)	abc
I2	38	0	34.8 (7.1)	ce

As estirpes que se destacam nesta análise, fazem-no pela negativa, isto é, apresentam capacidade competitiva nula (E2) ou baixa (E1), sendo que esta última apesar de recuperada nos nódulos o faz com proporções baixas inferiores a 10% à excepção do local Évora em que é recuperada em 24% dos nódulos (ver Figura 3.7)

Até aqui e pelas análises não paramétricas usando teste de Kruskal-Wallis seguido, se necessário, de testes bilaterais independentes de U de Mann-Whitney detectaram-se, de um modo geral, as seguintes situações na proporção de nódulos formados pelos inóculos:

**Origem das estirpes** – Formam-se dois grupos em que as estirpes com origem em Beja e ICARDA mostram maior recuperação de inóculo do que estirpes com origem em Elvas e Évora.

**Destino (locais de ensaio)** – Formam-se 3 grupos em que a proporção de inóculo recolhido é maior em Évora, seguido de Beja e por último Elvas

**Combinação origem / destino** – Estirpes com a origem e destino igual formam maior proporção de nódulos do que com origem e destinos diferentes.

**Estirpes** – Apesar de haver diferenças entre as estirpes, a proliferação de grupos não mutuamente exclusivos mostram interações não permitem explicar diferenças entre estirpes.

**Recuperação nula** – Os indivíduos com nula recuperação de inóculo nos nódulos, 3 têm origem em Elvas, 1 em Évora. No que se refere aos destino, 1 em Beja, 2 em Elvas e 1 em Évora

### 3.3.5.2. Análises discriminantes

Nas análises anteriores, a não consideração de indivíduos com todos os valores de competição nulos basicamente não altera as conclusões. Adicionalmente, nessas análises, procuraram-se diferenças globais, independentes de variações internas de cada grupo considerado. Assumindo que essas variações não afectam a competição (e portanto o resultado das análises e as conclusões) então os vários grupos terão características comuns que permitem discriminá-los uns dos outros. Ou seja, como exemplo, o grupo das estirpes cuja origem e destino é igual terão características de competição para o conjunto das repetições e plantas que permitem individualizá-lo e separá-lo (discriminá-lo) do grupo de estirpes cuja origem e destino são diferentes. Consequentemente, uma análise discriminante permitirá individualizar e separar grupos (classes).

Realizaram-se análises discriminantes para as várias hipóteses testadas probabilisticamente por métodos não paramétricos, tendo-se eliminado todas as variáveis de valor de competição igual a zero pois este tipo de análise não permite variáveis sempre com o mesmo valor.

Seguiu-se o método da árvore de decisão binária (Gueguen e Nakache 1988) usando os procedimentos DISAR e DISEL de SPAD-S (Gueguen et al. 1996), usando uma selecção aleatória de 66% dos indivíduos como grupo-base e os restantes indivíduos como grupo-teste e avaliando a qualidade da discriminação pela proporção de bem classificados e pela de mal classificados quer do grupo-base quer do grupo-teste.

A análise discriminante (quer por métodos não paramétricos como o da árvore de decisão binária quer por métodos paramétricos como a regressão) envolve naturalmente a identificação de um conjunto de regras de afectação de indivíduos a classes pré-estabelecidas de acordo com os seus perfis da distribuição de valores pelas variáveis que os caracterizam. Ou seja, cada variável terá que ter um significado comum para todos os indivíduos. As variáveis são, naturalmente e à partida, as 5 plantas de cada uma das 3 repetições. Tendo em conta o delineamento experimental não há qualquer correspondência entre plantas das várias repetições, sendo a sua numeração arbitrária,

isto é, nada há de especialmente mais comum entre as repetições ditas 1 de locais diferentes com a mesma estirpe e as repetições 1 e 2 de locais diferentes com a mesma estirpe nem, naturalmente, entre as plantas ditas 1 de repetições diferentes do mesmo local com a mesma estirpe e as plantas ditas 1 e 2 de repetições diferentes do mesmo local com a mesma estirpe.

Assim, foi necessário definir um critério que permitisse dar significado às variáveis utilizadas para caracterizar cada indivíduo. O critério seguido foi o da intensidade da competição ou seja, a proporção dos nódulos ocupados por uma dada estirpe. Para cada indivíduo (definido pela estirpe e destino) os valores de competição foram ordenados de forma decrescente do que resultaria à partida que, por exemplo a variável P1 (planta 1) representa, para todos os indivíduos, a variável em que a percentagem de nódulos ocupados por um inóculo é máxima e a variável P15 (planta 15) representa, para todos os indivíduos, a variável em que a proporção de nódulos ocupados pelo inóculo é mínima.

Naturalmente que esta opção implica uma organização dos dados que deixa de reconhecer um delineamento com 3 repetições de 5 plantas para cada combinação estirpe-destino, ou seja, quer a variabilidade intra-repetições quer a variabilidade inter-repetições desaparecem e permanece apenas a variabilidade total de cada combinação estirpe-destino. As 5 plantas em cada repetição de cada combinação estirpe-destino representam uma variação assumida como aleatória e ligada às próprias características do material em estudo e as 3 repetições de cada combinação estirpe-destino representam uma variação assumida como aleatória e ligada às características do local em estudo. Importava pois investigar qual a relação entre a variabilidade intra-repetições e a variabilidade inter-repetições para cada combinação estirpe-destino para avaliar qual a importância relativa da variabilidade inter-repetições dentro em cada combinação estirpe-destino.

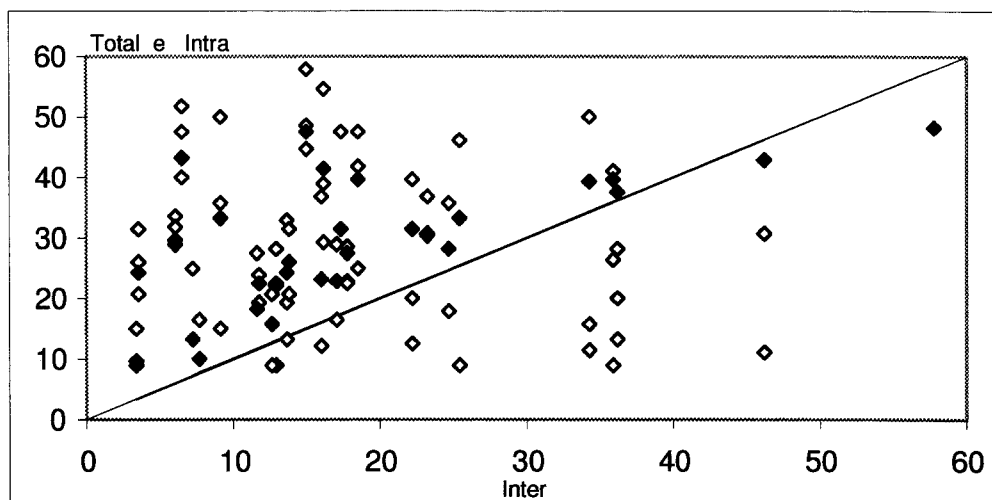
Para esse efeito houve que tomar decisões relativamente à forma de quantificar a variabilidade. À partida optou-se por estatísticas clássicas de dispersão, ou seja, baseadas na variância amostral. No entanto, sabendo-se que o valor assumido pela variância tende a aumentar com o aumento da média, interessava quantificar a variabilidade eliminando efeitos de escala associados à localização dos dados.

A eliminação do efeito de escala significa naturalmente que as medidas de dispersão obtidas são relativas a medidas de localização iguais, o que pode ser feito quer usando os dados originais quer transformando-os. No primeiro caso pode usar-se por

exemplo o coeficiente de variação (corrigido se houver amostras de tamanho diferente) ou a precisão relativa da média (obrigatoriamente para um nível de significância pré-definido se houver amostras de tamanho diferente); nos dois casos usa-se o desvio padrão como medida de dispersão e a divisão pela média significa centrar os dados para uma média unitária.

Alternativamente pode começar por se transformar os dados centrando-os para uma média nula (subtraindo a cada item o valor da média da amostra a que pertencia) e calcular a sua dispersão. Optou-se por esta segunda alternativa calculando-se seguidamente o desvio padrão das amostras transformadas de forma a manter a dispersão nas mesmas unidades que a localização.

Calculou-se então, para cada combinação estirpe-destino, um valor de desvio-padrão total (amostra constituída por todos os dados de cada combinação estirpe-destino), um valor de desvio-padrão inter-repetições (amostra constituída pelas 3 médias de cada combinação estirpe-destino) e 3 valores de desvio padrão intra-repetições (3 amostras cada uma constituída por todos os dados de cada repetição de cada combinação estirpe-destino).



**Figura 3.7.** Desvios-padrão centrados total e intra-repetições em função do desvio padrão centrado inter-repetições. A bissetriz, a contínuo, representa os valores esperados para a igualdade entre os desvios-padrão total e intra-repetições e os desvios-padrão inter-repetições. ♦ desvios-padrão total, ◇ desvios-padrão intra-repetições.

Não considerando, qualquer que seja o nível, valores de desvio padrão centrado nulos apresenta-se na Figura 3.7. a distribuição dos desvios-padrão intra-repetições e total em função dos desvios-padrão inter-repetições. O exame da figura mostra que em



geral o desvio padrão inter-repetições é inferior aos desvios padrão intra-repetições e total. Globalmente, isto acontece em 93% dos casos para o desvio padrão total e em 74% dos casos para o desvio padrão intra-repetições. Detalhando um pouco mais, em 57% das combinações estirpe-destino o desvio padrão inter-repetições é inferior a todos os valores intra-repetições correspondentes, em 11% dos casos a dois dos valores intra-repetições, em 25% dos casos só a um dos valores intra-repetições e em 7% dos casos a nenhum. Adicionalmente, do exame da Figura 3.7 é igualmente claro que a distribuição dos desvios padrão totais em relação aos desvios padrão inter-repetições reproduz muito bem a distribuição dos desvios padrão intra-repetições.

Em resumo, os níveis em que a variabilidade é maior são claramente intra-repetições e total, com uma boa equivalência entre ambos. Onde, é razoável aceitar que a opção intensidade da competição (proporção de nódulos ocupados pelo inóculo) para dar significado às variáveis, eliminando a variabilidade intra e sobretudo inter-repetições e mantendo a total, não deverá introduzir distorções importantes na análise a efectuar.

Tendo em conta as exigências da análise discriminante (quer por métodos não paramétricos como o da árvore de decisão binária quer por métodos paramétricos como a regressão) houve também que tomar decisões relativamente aos 33 dados em falta (44 se os indivíduos só com valores de 0% de competição para todas as variáveis fossem considerados, ou seja se E2B, E2E, E2V e V1E não tivessem sido retirados à partida). Após a reorganização dos dados por ordem decrescente de competição havia dados em falta em 5 das 15 variáveis o que implicava ou estimar valores para esses dados ou eliminar essas variáveis. Tendo em conta que uma das variáveis representava cerca de 58% dos dados em falta, optou-se por uma decisão mista, eliminando essa variável (naturalmente que a P15, última planta de cada ordenação) e estimando valores para os dados em falta pelo método iterativo assumindo independência entre colunas e matrizes de dados originais (Benzécri, 1976), por forma a simultaneamente conservar o máximo possível de variáveis minimizando a distorção dos perfis dos indivíduos, inevitável quando se estimam valores em falta.

No Quadro 3.17 apresentam-se os resultados das análises discriminantes segundo as classes pré definidas em relação à origem e destino das estirpes bem como uma das classes que resultou das análises não paramétricas efectuadas anteriormente.

No que se refere à origem das estirpes a consideração de apenas duas classes resultantes dos testes de Kruskal-Wallis seguido de testes bilaterais independentes de U

de Mann-Whitney (3.3.5.1.1.) melhora globalmente a sua discriminação quer em percentagens totais de boas classificações quer na ordenação das boas classificações das classes do grupo-base e do grupo-teste, nem por isso a qualidade da discriminação é particularmente elevada e muito menos a que seria de esperar se as diferenças detectadas anteriormente fossem independentes de perfis de competição particulares dos indivíduos que constituem cada classe. Apesar disso, parece haver uma boa indicação de que o conjunto das estirpes de Beja e ICARDA apresentam uma melhor capacidade competitiva quando comparadas com o conjunto das estirpes com origem em Elvas e Beja para os deferentes locais onde foram testadas.

Quanto à análise efectuada sobre as classes de destino, apesar da boa correspondência na ordenação das boas classificações das classes do grupo-base e do grupo-teste, a relativamente baixa qualidade da discriminação avaliada pelas percentagens de boas classificações sugere mais uma vez que a qualidade da discriminação não é particularmente elevada e muito menos a que seria de esperar se as diferenças detectadas anteriormente fossem independentes de perfis de competição particulares dos indivíduos que constituem cada classe. No entanto a tendência parece corroborar o anteriormente verificado em que o destino Évora foi aquele em que a recuperação de inóculo foi mais elevada e o destino Elvas o que maior dificuldade impôs à competição das estirpes.

Na consideração de duas classes (origem e destinos iguais, origem e destino diferente), apesar da boa correspondência na ordenação das boas classificações das classes do grupo-base e do grupo-teste, e da relativamente alta qualidade da discriminação avaliada pelas percentagens de boas classificações sugerir que a qualidade da discriminação é relativamente elevada e claramente a melhor de todos os critérios de classificação até agora examinados, ainda assim não é totalmente a que seria de esperar se as diferenças detectadas anteriormente fossem independentes de perfis recuperação de inóculo próprias dos indivíduos que constituem cada classe. No entanto a qualidade desta discriminação parece indicar que a competição de estirpes inoculantes parece ser beneficiada, se estas forem inoculadas em locais da sua origem, evidenciando a importância da adaptação dos rizóbios às condições ambientais como factor a ter em conta no problema da competição de inóculos e estirpes nativas.

Na análise discriminantes considerando as dez classes referentes aos inóculos usados, a qualidade da discriminação das estirpes é claramente a pior de todas, como de alguma forma seria de esperar tendo em contas as análises de Mann-Whitney

anteriormente realizadas.

O conjunto de análises discriminantes anteriores permite razoavelmente admitir a existência de diferenças importantes na proporção de recuperação de inóculos entre os indivíduos dentro de cada conjunto de classes consideradas. Tendo em conta que a melhor discriminação resultou da classificação de estirpes por origem e destino igual e por origem e destino diferente parece razoável admitir que mais do que a origem comum, o destino comum, a origem e destino igual ou diferente, os perfis de competição resultassem de respostas diferenciadas das estirpes àquele conjunto de caracterizações.

**Quadro 3.17.** Análise discriminante para a competição considerando as classes de origem, destino e estirpes, bem como as definidas nas análises não paramétricas.

<b>Origem das estirpes – 4 Classes – Beja, Elvas, Évora e ICARDA</b>		
Classificação	Grupo-base:	Grupo-teste:
Bem classificados	68.4 %	30 %
Mal classificados	31.6 %	70 %
Origem melhor (máximo)	Évora 100 %	Elvas 100 %
Origem pior (mínimo)	ICARDA 0 %	Évora e ICARDA 0 %
<b>Origem das estirpes – 2 Classes segundo análise de 3.3.5.1.1.</b>		
Classificação	Grupo-base:	Grupo-teste:
Bem classificados	79 %	60 %
Mal classificados	21 %	40 %
Origem melhor (máximo)	Beja e ICARDA 100 %	Beja e ICARDA 66.7 %
Origem pior (mínimo)	Elvas e Évora 42.9 %	Elvas e Évora 50 %
<b>Destino das Estirpes – 3 Classes - Beja, Elvas, Évora</b>		
Classificação	Grupo-base:	Grupo-teste:
Bem classificados	55 %	44.4 %
Mal classificados	45 %	55.6 %
Destino melhor (máximo)	Évora 85.7 %	Évora 100%
Destino pior (mínimo)	Elvas 0 %	Elvas 0 %
<b>Combinação Origem / Destino 2 Classes – Or. = Dest. e Or. ≠ Dest.</b>		
Classificação	Grupo-base:	Grupo-teste:
Bem classificados	94.7 %	70 %
Mal classificados	5.3 %	30 %
Or. ≠ Dest. melhor (máximo)	Or. ≠ Dest. 100 %	Or. ≠ Dest. 100 %
Or. = Dest. pior (mínimo)	Or. = Dest. 80 %	Or. = Dest. 0 %
<b>Estirpes – 10 Classes – Retirando E2</b>		
Classificação	Grupo-base:	Grupo-teste:
Bem classificados	42.1 %	20 %
Mal classificados	57.9 %	80 %
Estirpes melhor (máximo)	B1, B2, E1, I1 100 %	B2, I1 100%
Estirpes pior (mínimo)	B3, B4, E1, E3, V1, V2 0 %	B1, B3, B4, E1, E3, V1, V2 0%

### 3.3.5.3. Análise das correspondências

Os resultados das análises anteriores sugerem que a origem e destino igual ou diferente é claramente o critério de classificação que permite uma melhor discriminação entre as classes formadas, mas que ainda assim, não permite uma discriminação tão boa quanto seria de esperar se não houvesse indivíduos dentro de cada classe com perfis de competição diferenciados. Daí a necessidade de uma análise «mais fina», sem critérios de classificação pré-estabelecidos, considerando à partida todos os indivíduos como tendo perfis de competição (proporção de recuperação do inóculo) diferentes, procurando identificar e caracterizar os aspectos principais da estrutura do conjunto dos indivíduos e agrupá-los pelas semelhanças entre esses aspectos.

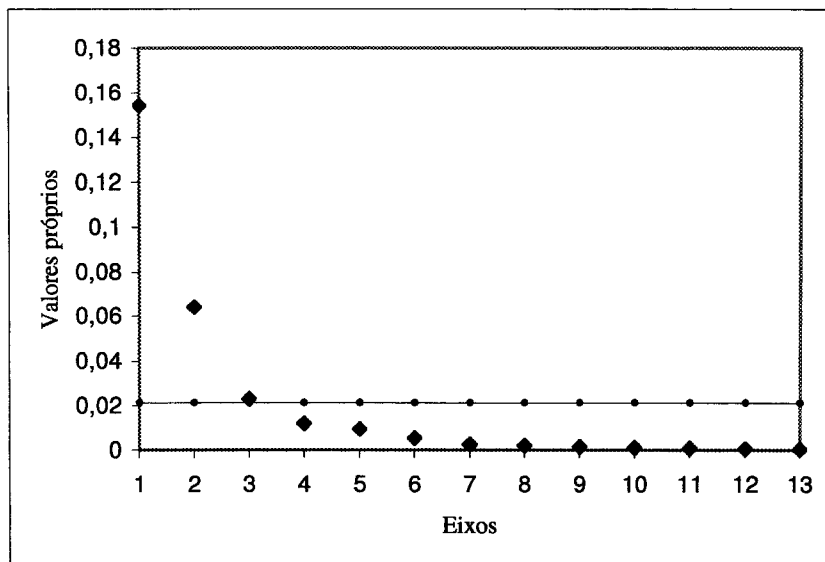
Para isso utilizaram-se as técnicas numéricas que constituem a análise das correspondências seguida de uma classificação automática das coordenadas dos indivíduos no espaço reduzido relevante identificado pela análise das correspondências.

A análise das correspondências foi feita usando o procedimento CORBI de SPAD-N (Lebart et al. 1996) com os dados organizados da mesma forma que nas análises discriminantes no que diz respeito ao significado das variáveis.

A escolha do número de eixos factoriais a reter foi feita tendo em conta os valores-teste (Lebart *et al.*, 2000) conjugado com o teste do “cascalho” (*scree test*, Johnson e Wichern, 1998) e com a comparação dos valores-próprios de cada eixo factorial com a média de todos os valores-próprios (quando todos os valores da matriz de dados original tendem para ser todos iguais ou são totalmente aleatórios, não há uma estrutura diferenciada e todos os valores-próprios tendem para o mesmo valor, isto é, são todos iguais ou quase).

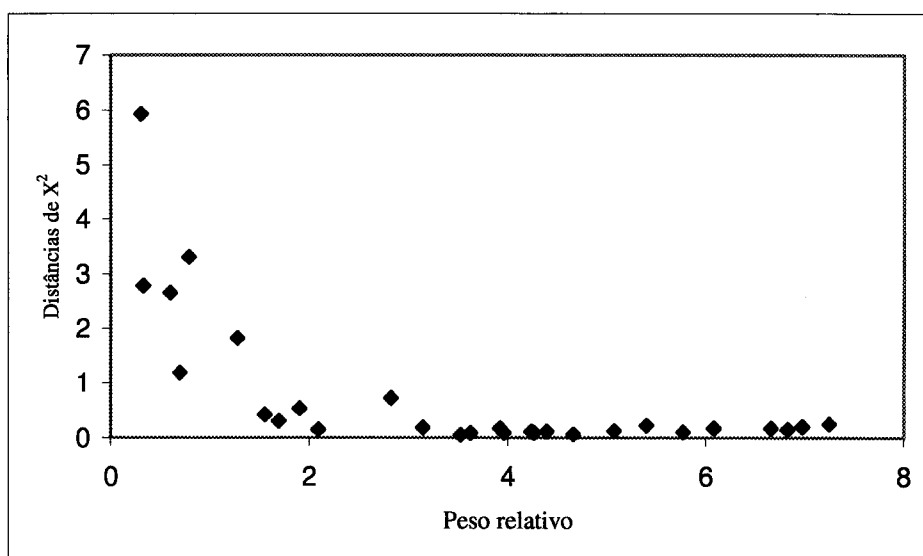
#### **Escolha dos factores a reter**

De acordo com os valores-teste só o primeiro eixo factorial deveria ser retido; de acordo com o teste do “cascalho” deveriam ser retidos os dois primeiros eixos factoriais, o mesmo acontecendo de acordo com a comparação com a média de todos os valores-próprios (Figura 3.8.). Assim, retiveram-se os dois primeiros eixos factoriais que representam em conjunto 78.7% da inércia total.



**Figura 3.8.** Valores próprios em função dos eixos factoriais. Linha contínua – média dos valores próprios.

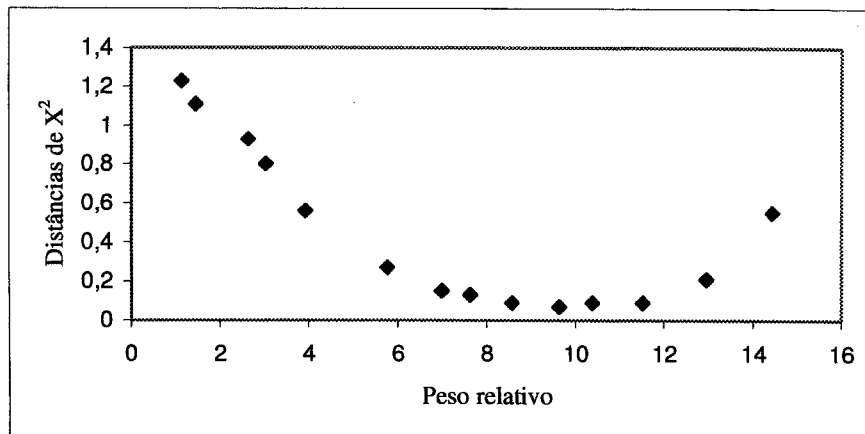
Uma análise gráfica da relação entre os pesos relativos e as distâncias de  $\chi^2$  dos indivíduos (Figura 3.9.) e das variáveis (Figura 3.10) torna clara a relação entre ambas, com a variabilidade a diminuir com o aumento do peso relativo embora com algumas oscilações sobretudo nos pesos relativos menores, ou seja, como seria de esperar tendo em conta que o peso está limitado superiormente, indivíduos com pesos relativos



**Figura 3.9.** Distância de  $\chi^2$  dos indivíduos em função do seu peso relativo.

elevados têm geralmente uma variabilidade relativamente pequena mas, mais importante, indivíduos com pesos relativos pequenos tendem a ter variabilidades elevadas.

Em contrapartida, nas variáveis (Figura 3.10.) a resposta é semelhante à dos indivíduos, invertendo-se para os valores mais elevados de peso relativo, revelando uma maior variabilidade na competição para pesos relativos mais elevados.



**Figura 3.10.** Distância de  $\chi^2$  das variáveis em função do seu peso relativo.

Considerando só os dois primeiros eixos factoriais (Figura 3.9), os cinco indivíduos que mais contribuem para o primeiro eixo são, por ordem decrescente de contribuição, E1V, B1V, I2E, B3B e I1V (representando cerca de 42% do «significado» deste eixo) e os cinco indivíduos que mais contribuem para o segundo eixo são, também por ordem decrescente de contribuição, I2E, B4V, E1E, B1V e I1B (representando cerca de 45% do «significado» deste eixo). De notar que, se todos os indivíduos tivessem a mesma contribuição para a construção dos eixos, 5 indivíduos contribuiriam unicamente com cerca de 17%.

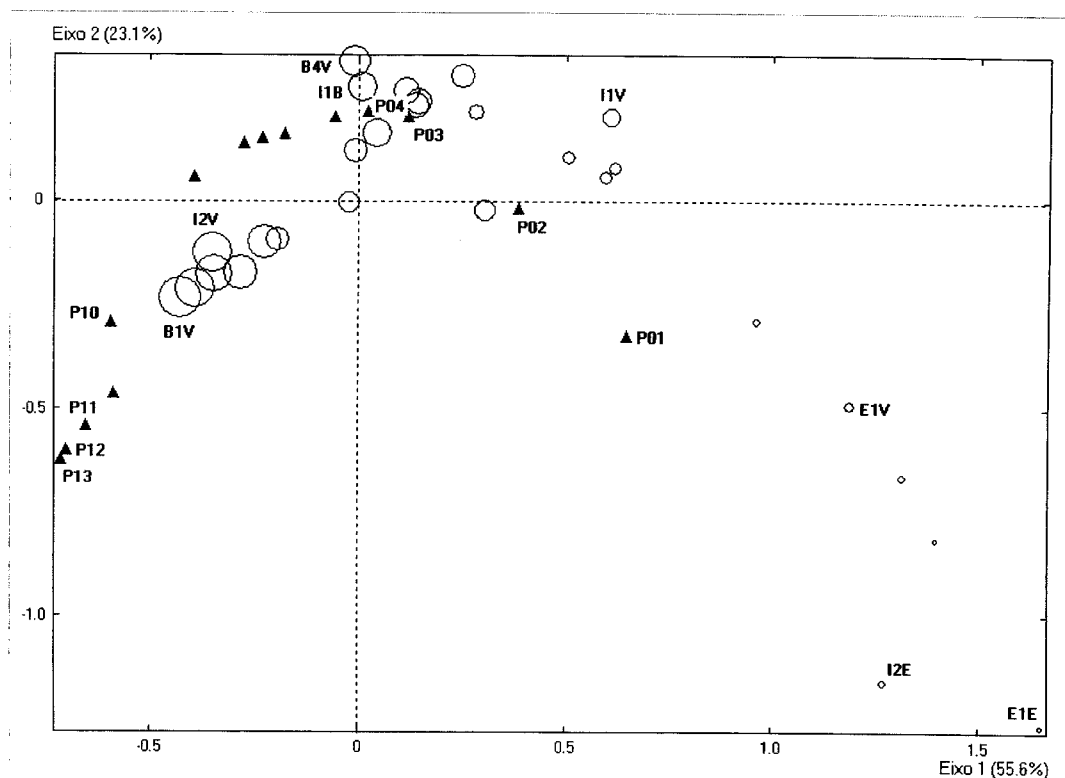
Analogamente, as cinco variáveis que mais contribuem para o primeiro eixo são, por ordem decrescente de contribuição, P01, P02, P10, P12 e P11 (representando cerca de 78% do «significado» deste eixo) e as seis variáveis (há duas com contribuições iguais), que mais contribuem para o segundo eixo são, também por ordem decrescente de contribuição, P01, P12, P11, P13 e P04 e P03 (representando cerca de 76% do «significado» deste eixo). De notar que, se todas as variáveis tivessem a mesma contribuição para a construção dos eixos, 5 variáveis contribuiriam unicamente com

cerca de 36% (43% no caso de 6 variáveis).

Na Figura 3.11. apresenta-se a distribuição dos indivíduos (pares estirpe/destino) e variáveis (plantas) nos 2 primeiros eixos factoriais, com o tamanho dos círculos proporcional ao peso relativo dos indivíduos. O exame da figura revela que há uma relação genericamente parabólica entre as coordenadas dos indivíduos e das variáveis (um pouco menos clara), implicando desde logo uma relação geral de 2º grau entre os dois primeiros eixos. Esta relação, conhecida como efeito de Guttman (Lebart *et al.*, 2000), traduz a existência de uma redundância das variáveis, ou seja, grosso modo, que do conhecimento de uma qualquer das linhas da matriz de dados (indivíduos) se pode deduzir genericamente uma qualquer das colunas (variáveis) e portanto que a informação da matriz de dados originais está quase toda representada no primeiro eixo, tal como seria de esperar da forma como as variáveis foram construídas e é consistente com o facto de só o primeiro eixo ter sido retido pelos valores-teste. Como é normal quando se verifica o efeito de Guttman, o primeiro eixo opõe os valores extremos reflectindo uma ordenação por proporção de nódulos ocupados pelo inóculo em cada planta (intensidade da competição). O segundo eixo, útil para afinar a interpretação do primeiro, evidencia globalmente, mais uma vez como é normal quando se verifica o efeito de Guttman, uma oposição entre os valores extremos de competição e os intermédios.

Detalhando um pouco mais e tendo apenas em conta os indivíduos que mais caracterizam o primeiro eixo factorial (E1V, B1V, I2E, B3B e I1V), os indivíduos são ordenados no primeiro eixo basicamente de acordo quer com um gradiente decrescente (da esquerda para a direita) de peso relativo quer crescente de distância de  $\chi^2$ . Em contrapartida, tendo em conta a figura e os indivíduos que mais caracterizam o segundo eixo factorial (I2E, B4V, E1E, B1V e I1B) os indivíduos são ordenados no segundo eixo basicamente de acordo com um gradiente crescente (de cima para baixo) de distância de  $\chi^2$  quebrando-se por vezes a correspondência directa com o peso relativo.

Tendo em conta só as variáveis que mais caracterizam o primeiro eixo factorial (P01, P02, P10, P12 e P11), estas são ordenadas, no primeiro eixo basicamente, de acordo quer com um gradiente crescente (da esquerda para a direita) de peso relativo quer decrescente de distância de  $\chi^2$ , de forma simétrica ao que acontecia com os indivíduos.



**Figura 3.11.** Representação dos indivíduos (círculos) e variáveis (triângulos) nos dois primeiros eixos factoriais, com indicação dos indivíduos e variáveis que caracterizam os dois eixos.

Em contrapartida, tendo em conta as variáveis que mais caracterizam o segundo eixo factorial (I2E, B4V, E1E, B1V e I1B) os indivíduos são ordenados no segundo eixo basicamente de acordo com um gradiente crescente (de cima para baixo) de distância de  $\chi^2$  quebrando-se por vezes a correspondência directa com o peso relativo.

Considerando a Figura 3.6. e relacionando com o critério de ordenação usado na análise das correspondências, verifica-se que os melhores e piores indivíduos (estirpe/destino) e as plantas com melhor e pior recuperação da estirpe inoculante são os que mais contribuem para a formação dos eixos e explicação dos resultados.

#### 3.3.5.4. Classificações automáticas

Finalmente, procedeu-se a classificações automáticas com base nas coordenadas dos dois primeiros eixos factoriais. Todas as classificações foram feitas usando o



procedimento RECIP de SPAD-N (Lebart et al. 1996). A partir do dendrograma obtido realizaram-se diversas partições de acordo com critérios descritos a seguir usando o procedimento PARTI-DECLA de SPAD-N (Lebart et al. 1996). A classificação foi feita pelo método hierárquico.

#### 3.3.5.4.1. Partição em quatro classes (Origem das estirpes)

Partição em quatro classes para comparar a constituição esperada de cada classe se as estirpes com a mesma origem tiverem características comuns que permitem distingui-las umas das outras com a constituição observada das mesmas classes.

Na Figura 3.12. representa-se o resultado desta classificação representando com a mesma cor as células que deveriam pertencer à mesma classe e com números a classe a que de facto pertencem (a cinzento, classe com todas as amostras com competição igual a zero).

Parece evidente que há uma fraca correspondência entre o esperado e o observado, confirmando o que já se tinha concluído anteriormente através da análise discriminante.

Inóculos	Beja	Elvas	Évora
Beja 1	1	3	1
Beja 2	3	2	3
Beja 3	1	2	2
Beja 4	1	3	3
Elvas 1	4	4	4
Elvas 2			
Elvas 3	3	3	1
Évora 1	4		1
Évora 2	2	4	3
ICARDA 1	3	3	2
ICARDA 2	4	4	1

**Figura 3.12.** Distribuição esperada e observada da origem das estirpes (Beja, Elvas, Évora e ICARDA).

**3.3.5.4.2. Partição em duas classes de origem idêntica segundo 3.3.5.1.1.**

Partição em duas classes para comparar a constituição esperada de cada classe se as estirpes com a mesma origem tiverem características comuns que permitem distingui-las umas das outras com a constituição observada das mesmas classes, com as classes esperadas a serem definidas pelo resultado dos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

Na Figura 3.13. representa-se o resultado desta classificação representando com a mesma cor as células que deveriam pertencer à mesma classe e com números a classe a que de facto pertencem (a cinzento, classe com todas as amostras com competição igual a zero).

Inóculos	Beja	Elvas	Évora
Beja 1	1	2	1
Beja 2	2	2	2
Beja 3	1	2	2
Beja 4	1	2	2
Elvas 1	2	2	2
Elvas 2			
Elvas 3	2	2	1
Évora 1	2		1
Évora 2	2	2	2
ICARDA 1	2	2	2
ICARDA 2	2	2	1

**Figura 3.13.** Distribuição esperada e observada da origem das estirpes (Beja e ICARDA, Elvas e Évora), considerando as classes resultado dos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

Tal como anteriormente, parece evidente que há uma fraca correspondência entre o esperado e o observado, confirmando o que já se tinha concluído através da análise discriminante.

**3.3.5.4.3. Partição em duas classes (Origem e destino igual ou diferente)**

Partição em duas classes para comparar a constituição esperada de cada classe se a origem e destino das estirpes fosse igual ou diferente.

Na Figura 3.14. representa-se o resultado desta classificação representando com a mesma cor as células que deveriam pertencer à mesma classe e com números a classe a que de facto pertencem (a cinzento, classe com todas as amostras com competição igual a zero). Mais uma vez, e de forma mais intensa do que anteriormente através da análise discriminante, parece evidente que há uma fraca correspondência entre o esperado e o observado.

Inóculos	Beja	Elvas	Évora
Beja 1	1	2	1
Beja 2	2	2	2
Beja 3	1	2	2
Beja 4	1	2	2
Elvas 1	2	2	2
Elvas 2			
Elvas 3	2	2	1
Évora 1	2		1
Évora 2	2	2	2
ICARDA 1	2	2	2
ICARDA 2	2	2	1

**Figura 3.14.** Distribuição esperada e observada da origem e destino das estirpes ser igual ou diferente.

**3.3.5.4.4. Partição em dez classes (Estirpes)**

Partição em dez classes para comparar a constituição esperada de cada classe se cada estirpe tiver características que permitam distingui-las das restantes com a constituição observada das mesmas classes.

Na Figura 3.15. representa-se o resultado desta classificação representando com a mesma cor as células que deveriam pertencer à mesma classe e com números a

classe a que de facto pertencem (a cinzento, classe com todas as amostras com competição igual a zero). Mais uma vez, e de forma tão ou mais intensa do que anteriormente através da análise discriminante, parece evidente que há uma fraca correspondência entre o esperado e o observado.

Inóculos	Beja	Elvas	Évora
Beja 1	2	7	1
Beja 2	5	4	5
Beja 3	1	4	3
Beja 4	2	5	6
Elvas 1	9	10	8
Elvas 2			
Elvas 3	7	7	1
Évora 1	9		1
Évora 2	4	8	7
ICARDA 1	6	7	4
ICARDA 2	9	10	1

**Figura 3.15.** Distribuição esperada e observada para as estirpes.

#### 3.3.5.4.5. Melhor partição possível.

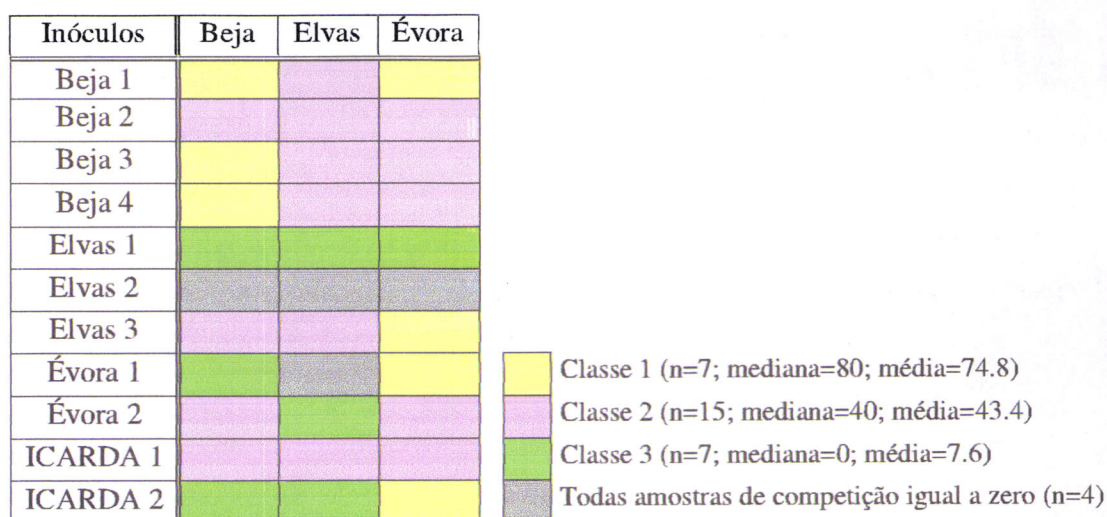
A melhor partição possível é a que origina 3 classes, que não correspondem, ao esperado para os destinos, apresentando-se na Figura 3.16. o seu resultado, com células da mesma cor a pertencerem à mesma classe. A melhor partição possível corresponde à maximização da razão de inércia inter-classes/inércia total e simultânea minimização no número de classes formado.

Para avaliação da qualidade desta classificação realizou-se uma análise discriminante classificando os indivíduos de acordo com o resultado da partição em três classes, seguindo os procedimentos descritos anteriormente.

Quer no grupo-base quer no grupo-teste todos os indivíduos foram bem classificados. Tendo em conta que o eixo com maior explicação pode ser indiferentemente caracterizado pelo peso relativo e pela distância de  $\chi^2$  e dada a correspondência geral entre o peso relativo e medidas de localização como a média e mediana, optou-se por caracterizar cada classe por estas últimas.

Recorrendo a técnicas simples, comuns a métodos de análise em controlo de qualidade (Montgomery, 1991), determinou-se em primeiro lugar o intervalo de confiança de 95% para a média da competição de todas as amostras (38.8 a 46.8%) e comparou-se a média dos indivíduos de cada classe com esse intervalo de confiança. Assim, na classe 1 a competição é claramente superior ao que seria de esperar de uma distribuição equitativa da competição por todos os indivíduos e variáveis, na classe 3 a competição é claramente inferior ao que seria de esperar de uma distribuição equitativa da competição por todos os indivíduos e variáveis, com a classe 2, intermédia, e com a competição a corresponder ao que seria de esperar de uma distribuição equitativa da competição por todos os indivíduos e variáveis.

Procedendo de forma análoga para cada variável, os indivíduos da classe 1 têm, para cada uma das 14 variáveis, uma proporção de nódulos ocupados pelo inóculo, superior ao que seria de esperar de uma distribuição equitativa da competição em cada uma das variáveis, os indivíduos da classe 3 têm, para cada uma das 14 variáveis, uma competição inferior ao que seria de esperar de uma distribuição equitativa da competição em cada uma das variáveis, e os indivíduos da classe 2 têm para a maioria das variáveis a competição que seria de esperar de uma distribuição equitativa da competição em cada uma das variáveis, embora nas plantas com menor competição (P11, P12, P13 e P14) a competição seja inferior à que seria de esperar.



**Figura 3.16.** Resultado da melhor classificação possível.

Pela análise da Figura 3.16. verificamos que no local Beja apenas estirpes de Beja

(3 em 4) são classificadas como de classe 1 (% de nódulos ocupados pelo inóculo claramente superior ao que seria de esperar de uma distribuição equitativa). No local Évora uma estirpe de cada origem foi classificada como de classe 1. No local Elvas nenhuma das 11 estirpes foi classificada como de classe 1, sendo 6 classificadas como de classe 2 (% de nódulos ocupados pelo inóculo a corresponder ao que seria de esperar de uma distribuição equitativa por todos os indivíduos e variáveis), 3 classificadas como classe 3 (% de nódulos ocupados pelo inóculo claramente inferior ao que seria de esperar de uma distribuição equitativa por todos os indivíduos e variáveis) e duas sem qualquer recuperação de nódulos ocupados pelo inoculante, denotando dificuldades do local na implantação de estirpes.

### 3.3.5.5. Validação das classificações

Com o objectivo de avaliar a estabilidade das classificações e dos constituintes de cada classe, procedeu-se de igual modo na obtenção da melhor classificação possível, refizeram-se as classificações, removendo de cada vez uma das repetições do local de ensaio, isto é, remover as 15 plantas que correspondem a cada repetição de campo. Assim, usando a melhor classificação possível com as três repetições como referencia, podemos verificar para cada uma das três restantes classificações qual a diferença provocada por retirar uma repetição. A repetição que causar classificações mais “diferentes”, será uma repetição com características muito próprias e portanto passível e evidencias diferenças no próprio local de ensaio. Por outro lado é possível verificar quais são os tratamentos (combinação estirpes/destino que se mantêm no mesmo tipo de grupo independentemente da ausência dos dados referentes a repetições. Estas combinações serão mais estáveis, isto é, menos sujeitas a diferenças introduzidas pela repetição e portanto as conclusões relativamente a elas serão mais seguras (Figura 3.17.).

Por exemplo, B1V (estirpe B1 em Évora) aparece sempre no grupo de excesso e E1B, E1E, E1V aparece sempre no grupo de deficit (sendo que ter 0% é o máximo de deficit), são portanto resultados estáveis e o comportamento dessas estirpes naqueles locais é minimamente afectado pelas diferenças que possam ter existido entre repetições. Pelo contrário, V2V está no equitativo para as 3 repetições, aparece no grupo de excesso quando não se usa a repetição 1, no deficit quando não de usa a repetição 2 e no equitativo quando não de usa a repetição 3, sendo então uma estirpe cujo

comportamento naquele local (Évora) varia fortemente com as diferenças que possam ter existido nas repetições.

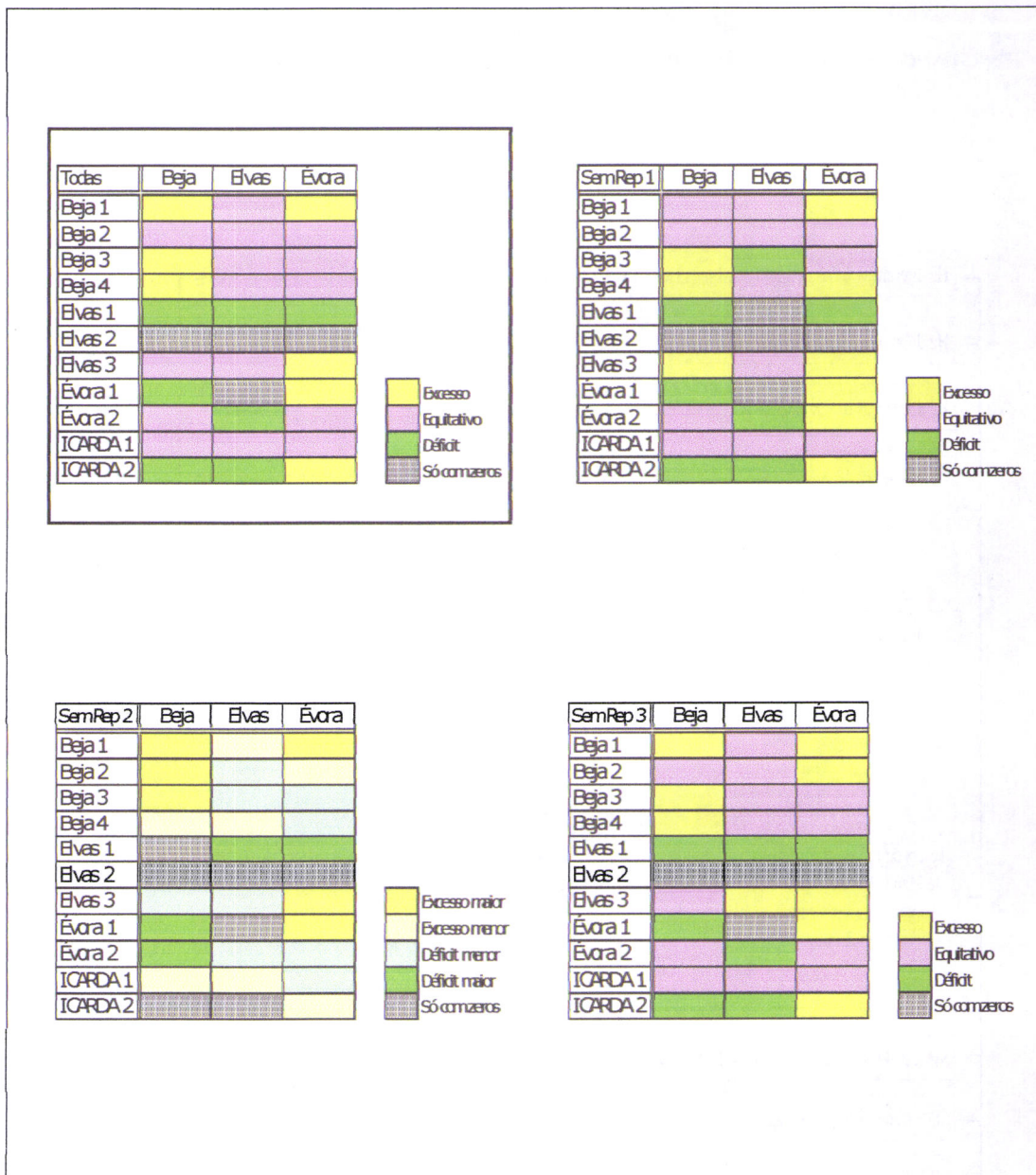
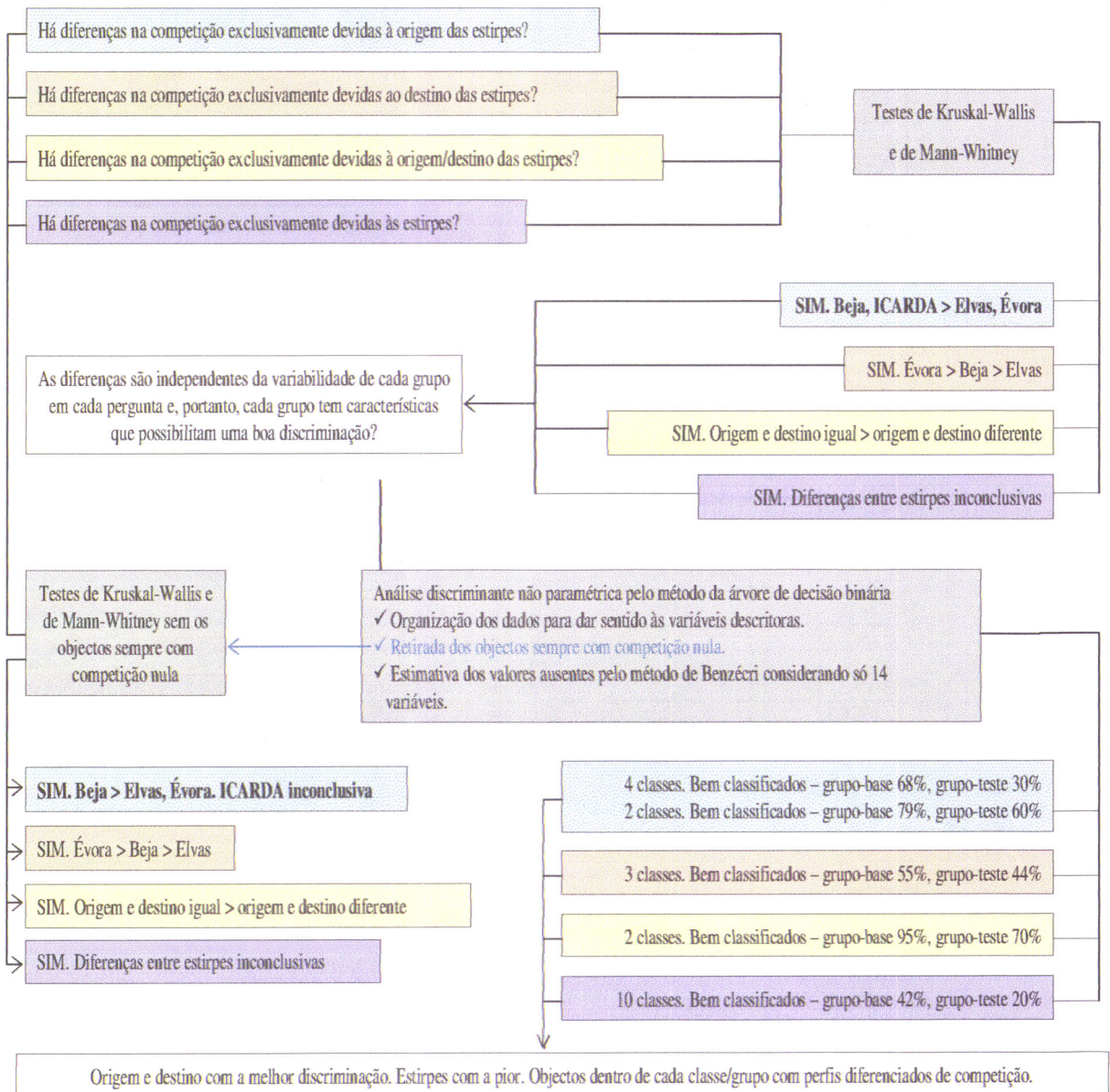


Figura 3.17. Validação das classificações automáticas. Efeito nas melhores classificações ao retirar uma das repetições.

### 3.3.5.6. Resumo final das análises realizadas

Em resumo, na Figura 3.19. apresenta-se um esquema simplificado dos métodos estatísticos usados bem como o essencial das indicações fornecidas pela análise dos dados.



**Figura 3.18.** Organização geral da análise e métodos estatísticos usados no ensaio de competição em condições de campo.



### 3.3.6. Variabilidade da Competição

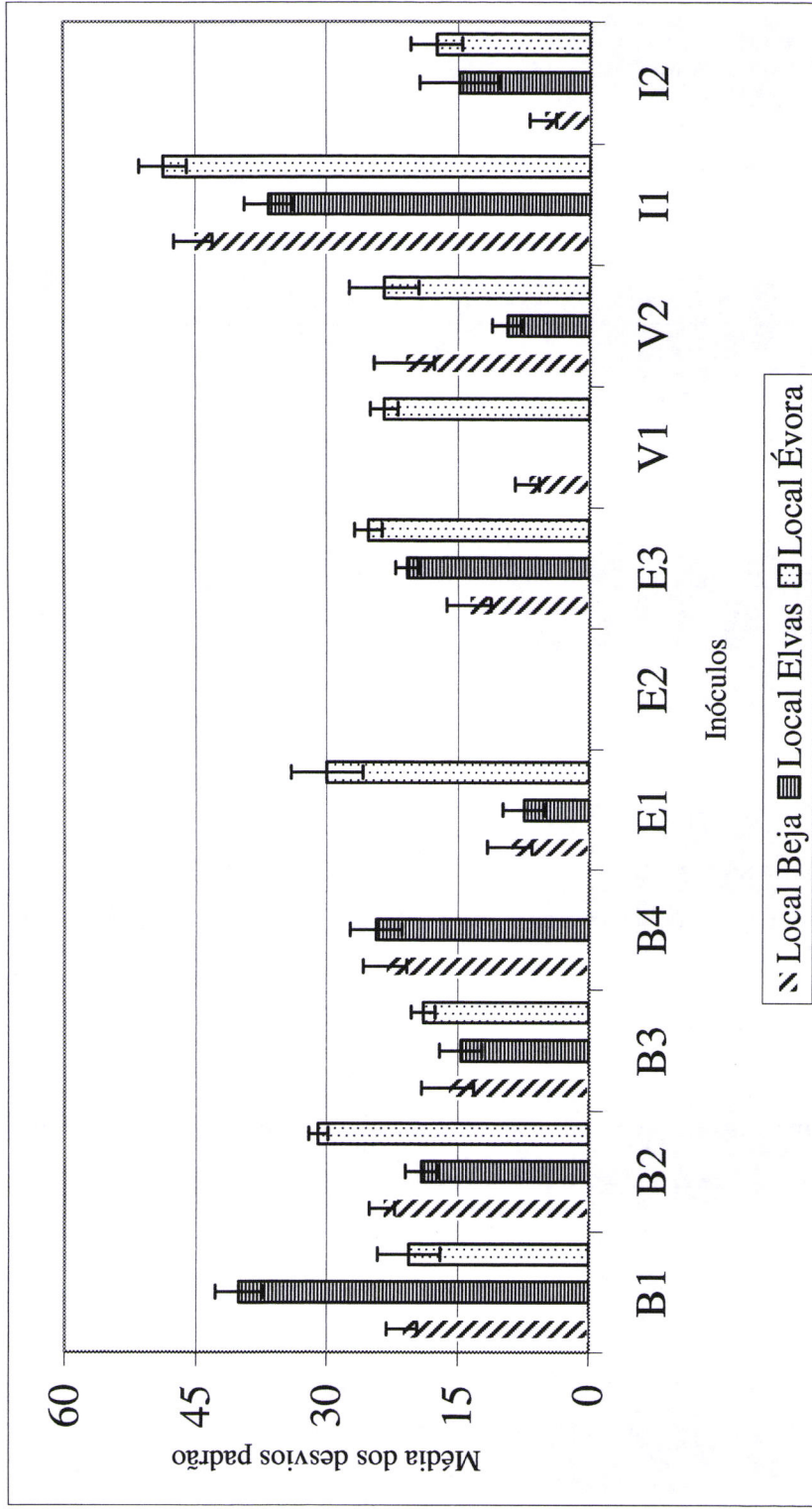
Até agora toda a análise incidiu sobre o valor da proporção de nódulos ocupados pelos inóculos nos três locais de ensaio (Intensidade da competição). No entanto, além do estudo da proporção de nódulos ocupados pelo inóculo, poderá ser importante saber como é que a esses valores de recuperação de inóculo se distribuem e, portanto, investigar a competição não em termos da proporção de nódulos ocupados pelos inóculos, mas sim na variabilidade com que a capacidade competitiva dos inóculos ocorre nos locais de ensaio, tanto mais que se verificou anteriormente parecer haver alguma relação nas combinações origem/destino envolvendo as estirpes com origem em Beja e a localização preferencial da variabilidade inter-repetições (3.3.5.2.).

Adoptar-se-á de novo o desvio padrão das amostras centradas com média nula como medida de variabilidade. Tendo em conta que anteriormente se detectou que a variabilidade se localiza essencialmente intra-repetições, faz todo o sentido considerar as repetições dentro de cada combinação estirpe-destino como a unidade base para estimar a variabilidade.

Tendo em conta o delineamento experimental isto conduz à existência de somente 3 variáveis para descrever os 30 indivíduos (combinações estirpes-destino), muito longe da situação que ocorria na análise da competição em termos da sua intensidade (% nódulos ocupados pelo inóculo) e da que seria desejável. Este facto conduziu à opção de re-amostrar os dados dentro de cada repetição de cada combinação estirpes-destino pelo método de *jackknife*, calculando  $n$  desvios-padrão para cada repetição de cada combinação estirpes-destino, removendo um valor de intensidade de competição de cada vez (Efron 1982). Este procedimento corresponde a considerar que em vez de 5 plantas por repetição se poderiam ter amostrado só 4 e portanto, como as 5 plantas recolhidas foram seleccionadas aleatoriamente, qualquer uma delas poderia não ter sido recolhida. O cálculo dos desvios-padrão foi feito de forma idêntica ao realizado para a análise da variabilidade intra-repetições, inter-repetições e total (3.3.5.2.), ou seja com centragem dos dados de intensidade de competição a média nula após se proceder ao *jackknife*. Todos os procedimentos de análise posteriores foram os seguidos em 3.3.5.1. a 3.3.5.6., apresentando-se seguidamente apenas os resultados julgados mais relevantes para a discussão, nomeadamente os resultados das análises não paramétricas retirando todos os indivíduos com variabilidade nula e finalmente o resultado da melhor classificação possível da variabilidade dos inóculos nos diferentes destinos.

**Quadro 3.18.** Média dos desvios padrão e erro padrão da média como medida da variabilidade da competição nos diferentes locais de ensaio, Beja, Elvas e Évora.

Estirpes	Inóculo	Origem das Estirpes	Local de Destino	Código Combinação Inoc. X Local	Média Desvios Padrão	SEM
53Ca	B1	Beja	Beja	B1B	21,4	1,8
54bCa	B2			B2B	23,7	1,5
61Ca	B3			B3B	16,2	3,0
64bCa	B4			B4B	23,3	2,5
83Ca	E1	Elvas		E1B	9,1	2,5
84aCa	E2			E2B	0	0
85Ca	E3			E3B	13,8	2,5
98Ca	V1	Évora		V1B	7,1	1,4
102Ca	V2			V2B	21,1	3,4
CP31	I1	ICARDA		I1B	45,2	2,2
CP36	I2			I2B	5,4	1,5
53Ca	B1	Beja		Elvas	B1E	40,1
54bCa	B2		B2E		19,2	1,8
61Ca	B3		B3E		14,7	2,4
64bCa	B4		B4E		24,4	3,0
83Ca	E1	Elvas	E1E		7,4	2,4
84aCa	E2		E2E		0	0
85Ca	E3		E3E		20,8	1,4
98Ca	V1	Évora	V1E		0	0
102Ca	V2		V2E		9,3	1,8
CP31	I1	ICARDA	I1E		36,6	2,8
CP36	I2		I2E		14,8	4,5
53Ca	B1	Beja	Évora		B1V	20,6
54bCa	B2			B2V	30,9	1,1
61Ca	B3			B3V	19,0	1,3
64bCa	B4			B4V	0	0
83Ca	E1	Elvas		E1V	30,0	4,1
84aCa	E2			E2V	0	0
85Ca	E3			E3V	25,3	1,6
98Ca	V1	Évora		V1V	23,4	1,6
102Ca	V2			V2V	23,4	4,0
CP31	I1	ICARDA		I1V	48,7	2,7
CP36	I2			I2V	17,4	2,9



**Figura 3.19.** Representação gráfica da média dos desvios padrão, representando a variabilidade da competição dos diferentes inóculos em cada um dos locais de ensaio. I representa o erro padrão da média.

### 3.3.6.1. A origem das estirpes (independentemente dos destinos, repetições e plantas) afecta a variabilidade da competição?

**Quadro 3.19.** Variabilidade na recuperação de inóculos de diferente origem independentemente de locais de ensaio (destinos) repetições e plantas não considerando as variáveis E2B, E2E, E2V, B4V e V1E. Para valores seguidos da mesma letra não há diferença significativa para  $P \leq 0,05$  pelo teste de U de Mann-Whitney. Entre parêntesis, erros padrão da média.

Origem	n	mediana	média	
Beja	163	22.2	23.1 (1.1)	a
Elvas	90	18.8	17.1 (1.6)	b
Évora	75	14.4	16.9 (1.8)	b
ICARDA	90	27.0	28.0 (2.3)	a

Usando o teste de Kruskal-Wallis nos dados referentes à origem das estirpes retirando as variáveis de valores nulos de desvio padrão (E2B, E2E, E2V, B4V e V1E) detectam-se diferenças significativas na variabilidade da competição das estirpes agrupadas de acordo com a sua origem ( $P=5.884 \times 10^{-3}$ ). Das 6 comparações realizadas entre pares de amostras pelo teste U de Mann-Whitney só não havia diferenças significativas entre Elvas e Évora ( $P=0.588$ ) e entre Beja e ICARDA ( $P=0.100$ ); nas restantes houve sempre diferenças significativas ( $P \leq 4.443 \times 10^{-3}$ ), ou seja, formam-se dois grupos, um de variabilidade mais elevada (origem Beja e ICARDA) e um de variabilidade baixa (origem Elvas e Évora). Comparando com o que aconteceu na intensidade da competição (3.3.5.1.1) e apesar de aí os grupos formados não serem mutuamente exclusivos, a tendência parece manter-se, isto é, os inóculos mais competitivos agrupados pela sua origem, revelam-se os de maior variabilidade na proporção com que ocupam os nódulos quer se considerem ou não os indivíduos com valores nulos de recuperação de inóculo ou de desvio padrão.

**3.3.6.2. O destino das estirpes (independentemente da origem, repetições e plantas) afecta a variabilidade da competição?**

**Quadro 3.20.** Variabilidade na recuperação de inóculos de diferentes destinos, independentemente da origem, repetições e plantas não considerando as variáveis E2B, E2E, E2V, B4V e V1E. Para valores seguidos da mesma letra não há diferença significativa para  $P \leq 0,05$  pelo teste de U de Mann-Whitney. Entre parêntesis, erros padrão da média.

Destino	n	mediana	média	
Beja	150	16.7	18.6 (1.3)	b
Elvas	135	20.6	20.8 (1.5)	b
Évora	133	25.0	26.6 (1.5)	a

Os testes de Kruskal-Wallis detectam diferenças significativas entre a variabilidade da competição das estirpes agrupadas de acordo com o seu destino ( $P=0.020$ ). Nas 3 comparações realizadas entre pares de amostras pelo teste de U de Mann-Whitney, só não houve diferenças significativas entre os destinos Beja e Elvas ( $P=0.373$ ), com estes a diferirem significativamente do destino Évora ( $P \leq 0.009$ ). Ou seja, não considerando os indivíduos com valores nulos de desvio padrão (E2B, E2E, E2V, B4V e V1E) formam-se dois grupos, um de variabilidade mais elevada (destino Évora), e outro de variabilidade mais baixa (destinos Beja e Elvas).

Como anteriormente em relação á origem dos inóculos, o local de maior variabilidade na implantação dos inóculos (destino), também foi o local de maior proporção de recuperação dos inóculos (3.3.5.1.2.).

**3.3.6.3. Combinação origem / destino (independentemente das repetições e plantas) afecta a variabilidade da competição?**

Não foram detectadas diferenças significativas pelos testes bilaterais independentes de U de Mann-Whitney entre a combinação origem / destino dos dois grupos de inóculos ( $P=0.331$ ). Ou seja, a aplicação de inóculos de uma dada origem no seu local de origem ou em local diferente parece não interferir na variabilidade da

recuperação dos inóculos, ao contrário do verificado para a proporção da recolha de inóculo no ano da sua aplicação (competição – intensidade), onde a introdução de inóculos no local de sua origem ocasiona uma recuperação de inóculo significativamente superior à sua aplicação noutra local dos testados (3.3.5.1.3.).

**Quadro 3.21.** Variabilidade na recuperação de inóculo para a combinação origem / destino igual ou diferente, não considerando as variáveis E2B, E2E, E2V, B4V e V1E.

Combinação origem / destino	n	mediana	média
origem e destino iguais	120	20.9	20.0 (1.2)
origem e destino diferentes	298	19.9	22.7 (1.1)

#### 3.3.6.4. Estirpes (independentemente da origem, destino, repetições e plantas) afectam a variabilidade da competição?

Importa agora avaliar se as estirpes, independentemente da sua origem ser ou não idêntica ao seu destino, das repetições e das plantas, afectam a variabilidade da sua recuperação, isto é, tentar detectar estirpes cuja variabilidade na sua recuperação se afaste das restantes, pois estirpes de comportamento mais homogêneo nas diferentes condições do presente ensaio, poderão ser estirpes com características interessantes a serem usadas como inóculos em condições de uso agronómico.

Tal como até aqui, realizaram testes de Kruskal-Wallis seguido de testes bilaterais independentes de U de Mann-Whitney. Detectam-se diferenças significativas entre a variabilidade da competição das estirpes ( $P=1.665 \times 10^{-15}$ ). Das 45 comparações realizadas entre pares de amostras em 20 não havia diferenças significativas ( $P \geq 0.053$ ) e em 25 havia ( $P \leq 0.041$ ), com o aumento dos pares de amostras que não diferiam significativamente a resultar sobretudo da retirada do indivíduo E2, com valores nulos de desvio padrão em todas as variáveis

**Quadro 3.22.** Variabilidade na recuperação de inóculo para as estirpes (independentemente da origem, destino, repetições e plantas, retirando da análise as variáveis E2B, E2E, E2V e V1E. As letras resultam dos testes de U de Mann-Whitney. Entre parêntesis, erros padrão da média.

	n	mediana	média	
B1	45	23.6	27.4 (2.5)	acd
B2	45	25.2	24.6 (1.4)	ac
B3	43	16.6	16.5 (1.9)	bdeg
B4	30	22.2	23.9 (2.6)	acde
E1	45	0	15.5 (2.8)	bdeg
E3	45	21.7	19.9 (1.6)	abcde
V1	30	16.7	15.3 (2.1)	bdeg
V2	45	14.1	18.0 (2.6)	bcdeg
I1	45	47.9	43.5 (2.1)	f
I2	45	0	12.6 (2.6)	beg

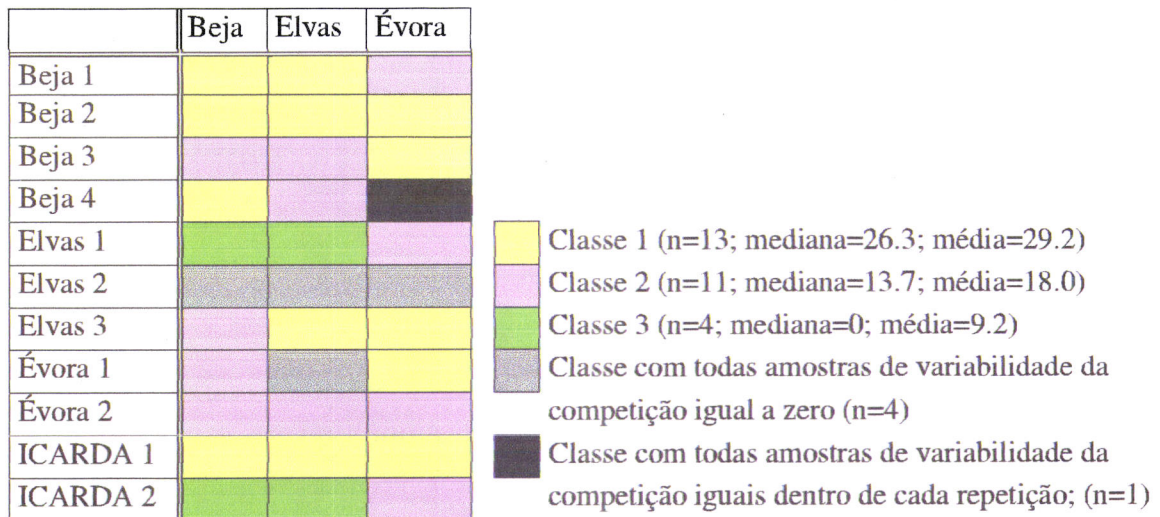
Apesar de continuar a haver diferenças significativas entre as estirpes, com uma das estirpes (I1) a destacar-se claramente das restantes por excesso, a proliferação de grupos com mais ou menos intersecções sugere que as estirpes por si só não explicam as diferenças de competição observadas quando a análise é feita sem as estirpes E2B, E2E, E2V, B4V e V1E.

### 3.6.5. Melhor partição possível

Como anteriormente, realizaram-se todas as análises para a determinação das coordenadas dos eixos factoriais e tendo-se verificado os pressupostos deste tipo de análise, apresenta-se agora o resultado da melhor partição possível. A melhor partição possível é a que origina 3 classes, que não correspondem, como anteriormente, ao esperado para as origens tendo em conta as análises de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney considerando ou não os indivíduos E2B, E2E, E2V, B4V e V1E, nem para os destinos. Apresentando-se na Figura 3.20 o seu resultado, com células da mesma cor a pertencerem à mesma classe (a cinzento, classe com todas as amostras com competição igual a zero; a preto o caso particular de B4E).

Para avaliação da qualidade desta classificação realizou-se uma análise

discriminante classificando os indivíduos de acordo com o resultado da partição em três classes, seguindo os procedimentos descritos anteriormente. Quer no grupo-base quer no grupo-teste todos os indivíduos foram bem classificados. Tendo em conta que o eixo com maior explicação pode ser indiferentemente caracterizado pelo peso relativo e pela distância de  $\chi^2$  e dada a correspondência geral entre o peso relativo e medidas de localização como a média e mediana, optou-se por caracterizar cada classe por estas últimas.



**Figura 3.20.** Resultado da melhor classificação possível.

Determinou-se em primeiro lugar o intervalo de confiança de 95% para a média da variabilidade da competição de todas as amostras (20.5 a 23.8%) e comparou-se a média dos indivíduos de cada classe com esse intervalo de confiança. Assim, na classe 1 a variabilidade da competição é superior ao que seria de esperar de uma distribuição equitativa da variabilidade da competição por todos os indivíduos e variáveis e nas classes 2 e 3 a variabilidade da competição é inferior ao que seria de esperar de uma distribuição equitativa da variabilidade da competição por todos os indivíduos e variáveis, com a classe 3 com uma variabilidade extremamente baixa.

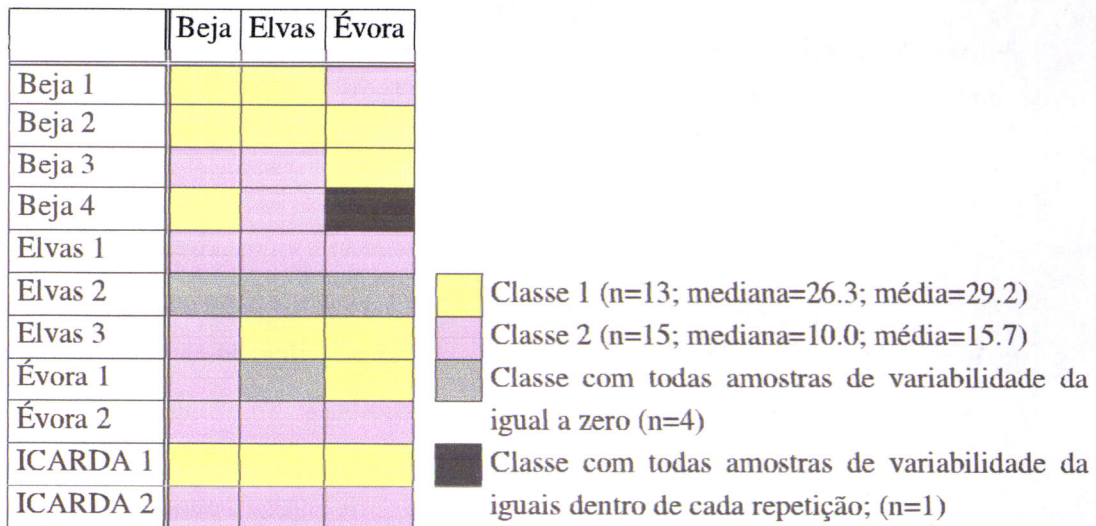
Só as estirpes Beja 2, Évora 2 e ICARDA 1 mantêm uniformidade na classe a que pertencem em todos os destinos, com a primeira e última destas estirpes a pertencerem à classe de variabilidade da competição, superior ao que seria de esperar de uma distribuição equitativa e constituindo mais de metade dos indivíduos dessa classe, e a estirpe Évora 2 pertencente à classe de variabilidade da competição inferior (mas



intermédia) ao que seria de esperar de uma distribuição equitativa.

Adicionalmente, e tendo em conta que ainda que distintas, as classes 2 e 3 têm ambas variabilidades de competição inferiores ao que seria de esperar de uma distribuição equitativa, apresenta-se na Figura 3.21. o resultado da junção dessas classes numa única, passando assim a haver uma classe de variabilidade da competição acima e outra abaixo do que seria de esperar de uma distribuição equitativa.

Tendo em conta que o algoritmo de classificação usado uma vez terminado o processo de classificação não prevê a re-afecção de indivíduos a outras classes pré-existentes, naturalmente que esta nova classificação «artificial» resulta idêntica à classificação em duas classes feita anteriormente para comparar 1) a constituição esperada de cada classe se as estirpes com a mesma origem tiverem características comuns que permitem distingui-las umas das outras com a constituição observada das mesmas classes, com as classes esperadas a serem definidas pelo resultado dos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney excluindo E2B, E2E, E2V, B4V e V1E e 2) a constituição esperada de cada classe se a origem e destino das estirpes fosse igual ou diferente.



**Figura 3.21.** Resultado da junção das duas classes de menor variabilidade da competição obtidas da melhor classificação possível.

As melhores classificações obtidas com os dados de competição das estirpes comparadas com as melhores classificações da variabilidade da recuperação de inóculo nos diferentes locais, verifica-se que os inóculos mais competitivos, apresentam

também maior variabilidade na sua recuperação. Assim, 4 das 7 combinações estirpe/local de competição superior ao que seria de esperar de uma distribuição equitativa, correspondem a combinações de variabilidade da competição é superior ao que seria de esperar de uma distribuição equitativa da variabilidade distribuída por todos os indivíduos e variáveis.

### 3.4. Discussão

Os inóculos usados nos ensaios de campo resultantes da selecção de mutantes espontâneos resistentes a antibióticos, revelaram-se capazes e apropriados ao desenvolvimento do presente estudo. Sendo possível ocorrerem alterações na capacidade simbiótica e competitiva, resultantes da mutação que confere resistência aos antibióticos (Amarger, 1981; Bromfield e Jones, 1978; Pankhurst, 1977), os resultados indicam que nestas estirpes de *M. ciceri* e com os antibióticos usados, a intensidade de tais alterações terá sido reduzida. Os níveis atingidos na recuperação de inóculo nos nódulos recolhidos em plantas nas diferentes condições de ensaio de campo, quer no ano da sua inoculação quer no ano seguinte, mostram que estes inóculos foram recuperáveis e mantiveram a característica que os permitiu identificar como ocupantes de nódulos. Se alguma alteração houve na capacidade competitiva em relação às estirpes originais, os resultados obtidos nos ensaios de campo terão sido uma subestima do que realmente se obteria usando a estirpes originais.

O uso de grão de bico de sementeira antecipada Outono/Inverno (variedade “Elvar”) como planta armadilha usada nas estimativas populacionais de rizóbio para este hospedeiro, revelou que, apesar ser uma variedade objecto de melhoramento recente e da alteração da época tradicional da cultura, os solos usados albergam populações nativas em número variável e que nodulam com sucesso este hospedeiro.

As populações nativas estimadas nos três locais de ensaio permitiram condições de competição diferenciadas para estirpes usadas como inoculantes, sendo a população nativa no solo do local Beja muito superior à do local Elvas e esta por sua vez muito superior à do local Évora. Assim, e sendo a dimensão da população nativa o principal obstáculo à nodulação de hospedeiros por parte de estirpes inoculantes (Somasegaran *et al.*, 1988; Thies *et al.*, 1991; Roughley *et al.*, 1993; Brockwell e Bottomley, 1995; Date, 2000), esperaríamos encontrar grandes limitações na ocupação de nódulos pelos

inóculos no local Beja, reduzidas no local Évora, sendo o local Elvas uma situação intermédia do ponto de vista da limitação da nodulação por parte de inóculos. Estas populações nativas de diferente dimensão nos locais avaliados, podem resultar de características dos solos. Assim, o solo de Beja, com maior teor de minerais de argila, maior capacidade de retenção para a água e pH favorável será local com melhores condições de sobrevivência para populações de rizóbio, ao contrário do solo de Évora que por ser de textura ligeira e pH tendendo para a acidez, as condições de sobrevivência de populações residentes são menos favoráveis (Bushby e Marshall, 1977). O solo de Elvas, apesar de aparentemente ter boas condições de colonização por rizóbios, revelou-se problemático na implantação de estirpes e nas populações nativas presentes.

Os resultados obtidos na proporção de nódulos ocupados pelos inóculos nos 3 locais de ensaio, mostram um comportamento onde se revelam efeitos quer inerentes aos solos dos locais de ensaio, quer das próprias estirpes. Exemplo destas variações é dado pela proporção de nódulos ocupados pelo inóculo I2 (resultante da estirpe ICARDA CP36), que ocupou 78% dos nódulos no local Évora, 6% em Beja e 8% em Elvas. Surpreendentemente, o local Elvas, revelou-se como o mais difícil na implantação da generalidade dos inóculos usados, incluindo os que tinham origem em isolamentos realizados em local próximo do talhão de ensaio, não existindo no local aparentes constrangimentos de natureza física ou química ao crescimento de grão de bico (Almeida, 1998).

Agrupando os inóculos pela sua origem, independentemente dos 3 locais de ensaio, formaram-se dois grupos de diferente capacidade competitiva; um de capacidade competitiva elevada (43 – 51 % de nódulos ocupados pelo inóculo) constituído por estirpes de Beja e ICARDA e outro de capacidade competitiva mais baixa (21 – 28 % de nódulos ocupados pelo inóculo) constituído por estirpes de Elvas e Évora. Independentemente dos inóculos, os locais de destino mostraram diferenças significativas na proporção de nódulos ocupados pelos inóculos, sendo sua recuperação média de 58% em Évora, 38% em Beja e de 28% em Elvas, mostrando claramente o efeito da dimensão das populações nativas encontradas nos solos dos locais de ensaio. O local Elvas, como já referido, mostrou limitações na implantação dos inóculos quer com origem em Elvas quer com outras origens, realçado pelo facto de nas recuperações nulas de inóculo, 3 em 4 serem de estirpes oriundas de Elvas e no que se refere aos destinos, duas das recuperações nulas ocorrem em Elvas, uma em Beja e outra em Évora.

Sendo a origem das estirpes usadas como inóculos correspondente (excepto ICARDA) aos locais onde se instalaram os ensaios (destino) verificou-se que a introdução de estirpes em solos da sua origem permite uma recuperação do inóculo (49%) significativamente superior à recuperação do inóculo em local diferente da sua origem (39%), o que pode ser importante na escolha de inóculos a implantar, principalmente em solos ácidos e onde se faça sentir pressão competitiva por parte de estirpes nativas (Vargas e Graham, 1988; Howieson *et al.*, 1988). Estes resultados estão de acordo com as observações de Abril *et al.* (1997), que mostram que a inoculação de grão de bico com estirpes nativas bem adaptadas às condições locais, resulta numa melhor resposta à inoculação quando comparada com a resposta à inoculação por estirpes exóticas.

Usando os dados obtidos com a proporção de nódulos ocupados por cada um dos inóculos (11) em cada um dos locais de ensaio (3) com 3 repetições por local, 5 plantas analisadas por inóculo, foi possível realizar análises discriminantes e análises das correspondências seguidas de classificações automáticas de modo a tentar estabelecer relações de correspondência entre locais de mais fácil implantação de estirpes, características da própria estirpe e seu local de origem.

A necessária reorganização dos dados para a análise discriminante, resultou claro que a variabilidade intra-repetições na proporção de nódulos ocupados pelos inóculos à bastante superior à variabilidade inter-repetições, constatação importante no delineamento experimental em ensaios de campo para a avaliação da competitividade de estirpes de rizóbio, em consonância com o verificado no ensaio com trevo subterrâneo e de acordo com Young *et al.* (1987), ao estudar a variação de grupos electroforéticos de *R. leguminosarum* entre plantas e locais.

As classificações automáticas, nomeadamente a que resulta da melhor classificação possível, indica-nos, como seria de esperar, que no local Beja, apenas estirpes originárias deste local pertencem a uma classe de competição superior ao que seria de esperar de uma distribuição equitativa da proporção de nódulos ocupados pelo inóculo, isto é, pertencentes a uma classe mais competitiva. O local Évora, também como seria de esperar, dada a dimensão da população nativa presente, é o local onde a proporção de nódulos ocupados pelo inóculo é superior ao esperado de uma distribuição equitativa na presença de inóculo nos nódulos, onde é possível detectar 4 das 11 estirpes como apresentando uma proporção de nódulos por si ocupados superior ao que seria de esperar de uma distribuição equitativa entre as estirpes na ocupação de nódulos.

Em relação à variabilidade de competição medida pelos valores de desvio padrão centrados à média nula, os dados revelaram que a variabilidade está relacionada com o aumento da proporção de nódulos ocupados pelo inóculo, quer se agrupem as estirpes pela sua origem, quer se agrupem pelos destinos, tal como acontecia com os valores de proporção de nódulos ocupados pelo inóculo, não tendo sido detectadas diferenças significativas na variabilidade quer se apliquem as estirpes no seu local de origem quer em local diferente. No entanto, parece existir para os locais Beja e Elvas uma relação positiva entre proporção de recolha de inóculo e variabilidade, não sendo tão clara no solo do local Évora.

Os resultados da melhor classificação possível para a variabilidade da competição, permitem detectar estirpes que, apesar de muito competitivas, apresentam elevada variabilidade na proporção de nódulos si ocupados, o que mostra, por um lado o efeito da importância para a nodulação das condições na rizosfera e, por outro, a importância da escolha de inoculantes que mostrem capacidade competitiva estável numa gama alargada de condições ambientais. Por exemplo, o inóculo B1 (estirpe 53Ca isolada no solo de Beja) muito competitiva no local Beja e Évora, variabilidade superior em Beja e inferior à que seria de esperar de uma distribuição equitativa da variabilidade, em Évora. Ou seja, a variabilidade da competição de certas estirpes também está relacionada com a dimensão da população nativa, em que estirpes mais competitivas apresentam maior estabilidade na sua presença nos nódulos em locais com menor população nativa.. Por outro lado, o inóculo I1 (estirpe CP31 da colecção ICARDA) mostrou capacidade competitiva correspondente ao que seria de esperar de uma distribuição equitativa, logo de mediana capacidade competitiva, nos três locais de ensaio, apresentando uma variabilidade superior ao que seria de esperar em todo os locais ensaiados, o que pode estar relacionado com o facto de se tratar de uma estirpe exótica.

Com os dados disponibilizados com este ensaio, e usando os resultados obtidos das classificações automáticas (principalmente da melhor classificação possível), na situação escolher uma estirpe para inocular grão de bico em Beja, teria necessariamente de escolher uma estirpe altamente competitiva, pelo que das três estirpes com esta característica no local Beja, escolheria o inóculo B3 (estirpe 61Ca de origem em solo de Beja) por ser aquele que apresenta maior estabilidade no comportamento competitivo, isto é, de variabilidade inferior à que seria de esperar de uma distribuição equitativa por todos os indivíduos e variáveis considerados na análise.



**4. Persistência de estirpes *Mesorhizobium ciceri* em variedades de grão de bico de sementeira Outono/Inverno**





#### 4.1. Introdução

A persistência de uma estirpe inoculante pode ser definida como a sua capacidade de sobreviver e de se manter no solo em números adequados à nodulação do seu hospedeiro (Brockwell, 1968). Esta característica das estirpes está fortemente relacionada quer com a capacidade competitiva, pois é importante formar nódulos para se manter no solo, quer com a sua competência saprofítica, isto é, com a capacidade de se manter no solo mesmo na ausência do hospedeiro.

Nas nossas condições de sequeiro, a generalidade das leguminosas como de outras plantas, apresentam um ciclo anual que culmina com a produção da semente e senescência da planta, voltando-se a iniciar o ciclo com o surgimento das primeiras chuvas no Outono. Nestas condições, durante o período estival, os hospedeiros não estão presentes e as bactérias terão de sobreviver, não apenas à ausência daquele mas também às condições particularmente adversas, nomeadamente de temperatura e de escassez de água.

A manutenção de uma estirpe inoculante no solo (persistente) tem sido encarada como uma característica desejável para os inóculos usados em leguminosas pascícolas, dado que a normal auto-regeneração de pastagens permanentes permitiria que estirpes persistentes garantissem a nodulação ao longo do período de vida útil da pastagem (4 a 6 anos) sem necessidade de nova inoculação. Já no que diz respeito a leguminosas grão, que normalmente entram num ciclo de rotação de culturas de duração variável, a persistência de uma estirpe inoculante pode ser, ou não, uma característica desejável em função de vários factores como a presença e abundância de estirpes nativas. Assim, em solos onde estas estejam presentes, as condições de competição e persistência, estão confrontadas com estirpes perfeitamente adaptadas às condições do local (Bohlool *et al.*, 1992; Brockwell e Bottomley, 1995). Já na situação de solos com baixas ou nulas populações nativas, a persistência de inoculantes pode constituir um factor limitativo, quer à nodulação de novas variedades de hospedeiro e, portanto com diferentes características genéticas e logo de especificidade simbiótica, quer à introdução de novas estirpes mais adaptadas na sua capacidade fixadora de azoto com variedades introduzidas que encontram no solo estirpes adaptadas que constituem um factor de pressão competitiva.

Obaton *et al.* (2002), ao estudar o comportamento de estirpes de *B. japonicum* introduzidas em França (onde não ocorrem populações nativas de rizóbio para *Glycine*

*max*) 20 anos antes, com subsequentes introduções de novas estirpes nos mesmos talhões, verificou que essas estirpes ocupavam ainda, num dos talhões de ensaio, 32% dos nódulos formados, tendo sido também observadas variações na eficácia simbiótica das estirpes há muito introduzidas e ainda presentes no solo.

Estas estirpes persistentes a longo prazo, também ditas de naturalizadas podem constituir uma barreira à implantação de novas estirpes e tornarem-se ineficazes quer em simbiose com os hospedeiros com os quais foram inicialmente seleccionadas quer para hospedeiros objecto de recente melhoramento genético (Beck, 1992), pelo que a introdução de estirpes inoculantes nestas condições terá de ser muito criteriosa.

No presente estudo, estamos perante uma destas situações, tendo solos com níveis populacionais de rizóbio para grão de bico muito diferentes (como vimos, variando da ausência a valores da ordem de  $10^4$  g<sup>-1</sup> de solo), hospedeiro objecto de melhoramento recente e alteração da época de sementeira logo de condições para a nodulação. Justifica-se assim este ensaio de persistência das estirpes disponíveis, de modo a avaliar a sua implantação nas condições anteriormente descritas.

## **4.2. Material e métodos**

### **4.2.1. Instalação do ensaio de persistência**

O ensaio de persistência foi instalado nos precisos locais onde foram instalados os ensaios de competição. No final do Verão de 1996 todo o talhão de ensaio foi limpo de material vegetal seco, usando uma moto-roçadora, de modo a limpar o solo causando o mínimo de perturbação neste. Após as primeiras chuvas, todo o talhão de ensaio foi pulverizado com herbicida sistémico não residual (Glifosato 360 g l<sup>-1</sup>), para controlo de infestantes emergentes usando uma solução de 1% de herbicida à dose de 400 litros por hectare. No final de Novembro, foram abertos regos de sementeira nos precisos locais onde no ano anterior foram instaladas as linhas com grão de bico inoculado, assim como as linhas intercalares com ervilha. A abertura dos regos foi feita com um abre-regos manual, tendo-se o cuidado de o limpar, lavar com água e desinfectar com lixívia comercial, sempre que se mudava de rego, de modo a evitar contaminações entre regos. Também o operador, sempre que mudava de rego, passava as botas por lixívia comercial. Em todo este processo, a tráfego sobre os talhões de ensaio foi reduzido ao mínimo.

A sementeira do ensaio foi feita com semente desinfectada, como em 3.2.2.2.. Tal como no ensaio de competição, foram usadas 60 sementes por rego. Todo o material usado para tapar regos foi sempre desinfectado na mudança de rego.

### **4.2.2. Quantificação de populações nativas de *M. ciceri***

#### **4.2.2.1. Colheita de amostras de solo**

No dia da instalação dos ensaios de persistência, recolheram-se amostras de solo para a quantificação da população nativa, procedendo-se tal como em 3.2.2.1., mas tendo o cuidado de fazer a colheita na entrelinha, de modo a não colher nos locais onde foi semeado grão inoculado.

#### **4.2.2.2. Diluições de solo e inoculação de plântulas, condições de crescimento e estimativa populacional**

Os procedimentos foram os descritos em 3.2.2.2., 3.2.2.3 e 3.2.2.4.

#### **4.2.2.3. Avaliação da persistência em condições de campo**

A colheita das plantas para avaliação da ocupação de nódulos foi feita ao início da floração (Março de 1996), tendo sido recolhidas 10 plantas por linha. Todos os procedimentos posteriores foram feitos como descrito em 3.2.4.

A avaliação dos ocupantes de nódulos foi realizada segundo o descrito em 3.2.4.. A percentagem de nódulos ocupados por uma estirpe com crescimento no meio de cultura com o respectivo antibiótico foi considerada a medida da persistência em relação às estirpes nativas presentes no solo.

### 4.3. Resultados

#### 4.3.1. Populações nativas de *Mesorhizobium ciceri*

As estimativas populacionais de *M. ciceri* determinadas para este segundo ano de ensaio neste local, mantiveram basicamente o mesmo padrão do encontrado no ano anterior. De notar que as amostras de solo foram recolhidas no espaço da entrelinha, pelo que se algum efeito houve na população presente no solo, resultante da inoculação realizada no ano anterior e pelo crescimento da planta hospedeira, este restringiu-se apenas à linha, não se estendendo, pelo menos de forma perceptível, às entrelinhas. No Quadro 4.1. apresentam-se os valores dessas populações.

**Quadro 4.1.** Estimativas populacionais de *M. ciceri* nos solos e repetições dos locais de ensaio, avaliadas pela técnica de infecção de plantas para determinação do Número Mais Provável (MPN), no segundo ano de ensaio (ensaio de persistência).

Local	Repetições	Diluições						Soma +	Valor estimado (m)	MPN gr <sup>-1</sup> Solo (ufn)
		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>			
Beja	Rep I	4	4	3	3	1	0	15	1000	1,0 x 10 <sup>4</sup>
		4	4	4	4	0	0	16	1700	1,7 x 10 <sup>4</sup>
	Rep II	4	4	4	4	2	0	18	5800	5,8 x 10 <sup>4</sup>
		4	4	4	3	3	1	19	10000	1,0 x 10 <sup>5</sup>
	Rep III	4	3	4	4	2	0	17	3100	3,1 x 10 <sup>4</sup>
		4	4	4	3	3	0	18	5800	5,1 x 10 <sup>4</sup>
Elvas	Rep I	4	3	0	0	0	0	7	10	1,0 x 10 <sup>2</sup>
		4	3	1	0	0	0	8	17	1,7 x 10 <sup>2</sup>
	Rep II	4	4	2	1	0	0	11	100	1,0 x 10 <sup>3</sup>
		4	4	1	0	0	0	9	31	3,1 x 10 <sup>2</sup>
	Rep III	4	4	0	0	0	0	8	17	1,7 x 10 <sup>2</sup>
		4	2	0	0	0	0	6	5,8	5,8 x 10 <sup>4</sup>
Évora	Rep I	0	0	0	0	0	0	0	0	Não detectável
		0	0	0	0	0	0	0	0	
	Rep II	0	0	0	0	0	0	0	0	
		0	0	0	0	0	0	0	0	
	Rep III	0	0	0	0	0	0	0	0	
		0	0	0	0	0	0	0	0	

#### 4.3.2. Capacidade competitiva das estirpes introduzidas no ano anterior

A persistência das estirpes, medida pela proporção de nódulos ocupados pelos inóculos 18 meses após a sua introdução, revelou-se variável entre locais de ensaio, estirpes e origem das estirpes.

No Quadro 4.2. apresentam-se os resultados da proporção média de recuperação dos inóculos nos diferentes locais. No local Beja, a generalidade dos inóculos com origem em estirpes isoladas em solo deste local, revelou capacidade de persistir neste solo, com valores de recuperação a variar entre 16 e 52% de nódulos ocupados pelo inóculo. As estirpes originárias de outros locais, revelaram valores de recuperação baixos, não tendo sido recuperado o inóculo V2 (estirpe 102Ca, de origem Évora), pelo que este não persistiu nas condições do solo de Beja. Em contrapartida no local Évora, as recuperações de inóculo são muito elevadas para a generalidade dos inóculos, embora 2 dos inóculos apresentem valores muito baixos. No local Elvas, as dificuldades na recuperação de inóculo mantiveram-se tal como verificado para a competição, não se tendo recuperado cinco dos onze inóculos usados. De realçar o facto de duas das três estirpes originárias de solo do local Elvas não terem sido recuperadas e a única detectada (E2) ocupou apenas 7 % dos nódulos.

Na Figura 4.2. representa-se graficamente a proporção de nódulos ocupados pelos inóculos no ano da sua inoculação (competição) e no ano seguinte (persistência) Podemos verificar que os valores de persistência estão fortemente relacionados com os valores de competição, existindo uma forte influência dos locais e das estirpes. As estirpes originárias de Beja, boas competidoras naquele local, apresentam valores de persistência próximos dos de competição, com excepção do inóculo B3, revelando naturalmente a boa implantação destas estirpes no seu local de origem. As estirpes com outras origens tiveram, como seria de esperar, uma redução da sua recuperação no segundo ano neste local de Beja. Já no solo do local Évora, os valores de persistência da generalidade das estirpes está próximo dos seus valores de competição, tendo inclusivamente sido superiores no caso de algumas estirpes, o que mostra o sucesso da sua implantação neste local. No local Elvas, á excepção do inóculo V2, todos os outros tiveram valores de persistência inferiores aos de competição. Nos resultados apresentados há , no entanto, uma estirpe com um comportamento único, já que não foi recuperada no ano da introdução nos três locais, surgindo agora presente nos nódulos recolhidos nos três locais de ensaio, tendo inclusivamente ocupado 18% dos nódulos no

local Beja, local de maior dificuldade na implantação de estirpes oriundas de outros locais.

**Quadro 4.2.** Proporção média e erro padrão da média para os nódulos ocupados pelos inóculos no locais de ensaio de Beja, Elvas e Évora no ano seguinte à sua introdução.

Estirpe	Inóculo	Origem das Estirpes	Local de Destino	Código Combinação Inoc x Local	Ocupação Nódulos %	SEM	
53Ca	B1	Beja	Beja	B1B	48	9.6	
54bCa	B2			B2B	35	5.5	
61Ca	B3			B3B	16	3.4	
64bCa	B4			B4B	52	6.1	
83Ca	E1	Elvas		E1B	2	1.5	
84aCa	E2			E2B	18	1.9	
85Ca	E3			E3B	3	1.4	
98Ca	V1	Évora		V1B	1	1.4	
102Ca	V2			V2B	0	0	
CP31	I1	ICARDA		I1B	15	3.0	
CP36	I2			I2B	1	1.5	
53Ca	B1	Beja		Elvas	B1E	7	1.2
54bCa	B2				B2E	12	1.6
61Ca	B3				B3E	0	0
64bCa	B4				B4E	25	5.8
83Ca	E1	Elvas			E1E	0	0
84aCa	E2		E2E		7	1.7	
85Ca	E3		E3E		0	0	
98Ca	V1	Évora	V1E		0	0	
102Ca	V2		V2E		33	5.1	
CP31	I1	ICARDA	I1E		17	2.3	
CP36	I2		I2E		0	0	
53Ca	B1	Beja	Évora		B1V	93	4.5
54bCa	B2				B2V	85	5.1
61Ca	B3				B3V	1	1.3
64bCa	B4				B4V	80	7.4
83Ca	E1	Elvas			E1V	23	3.4
84aCa	E2			E2V	9	1.9	
85Ca	E3			E3V	79	3.3	
98Ca	V1	Évora		V1V	54	8.3	
102Ca	V2			V2V	41	9.3	
CP31	I1	ICARDA		I1V	27	2.4	
CP36	I2			I2V	87	6.2	

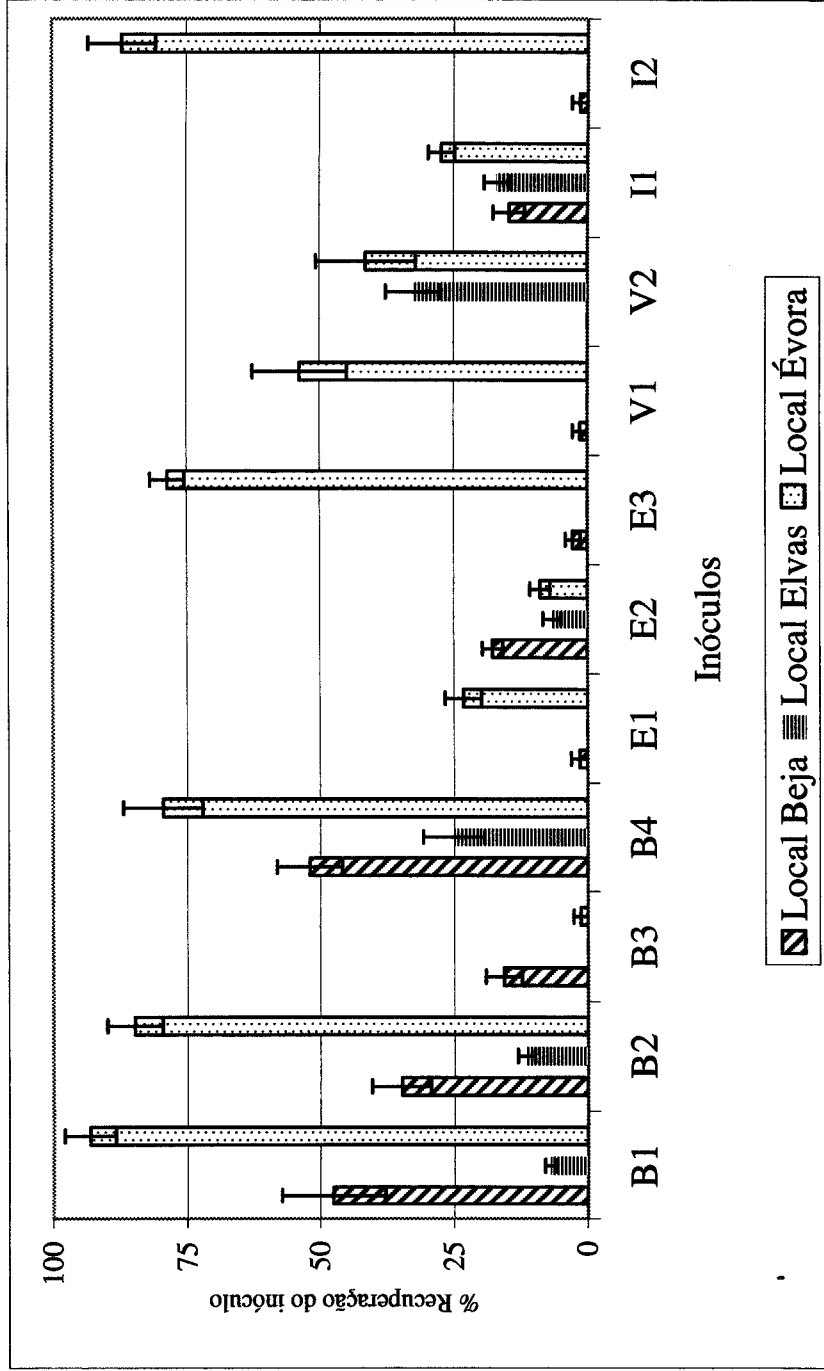


Figura 4.1. Representação gráfica da proporção média de inóculo recuperado em cada um dos locais de ensaio, 18 meses após inoculação das sementes. I representa o erro padrão da média.



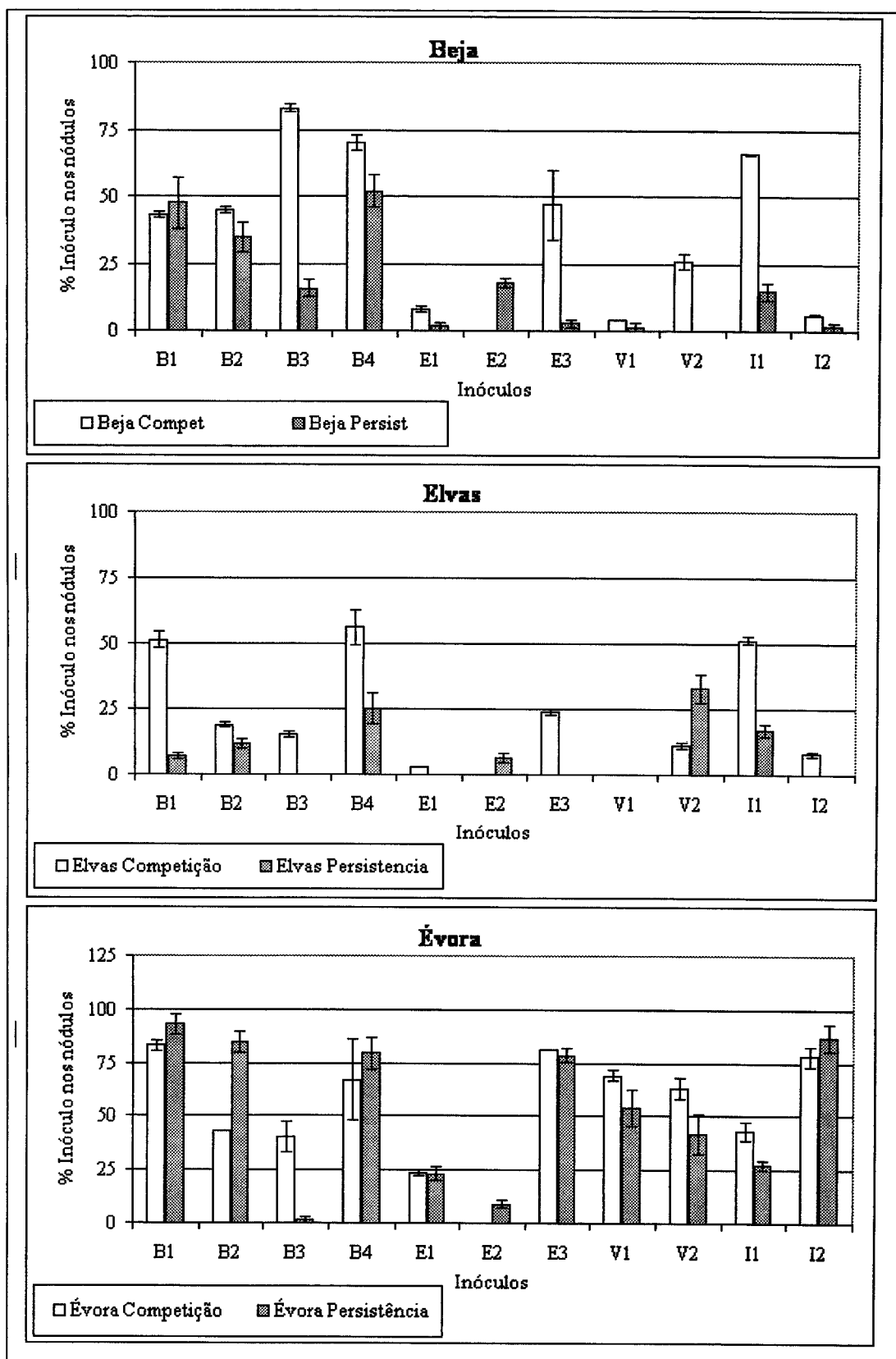


Figura 4.2 Representação gráfica da proporção média de inóculo em cada um dos locais de ensaio representando os valores de competição e persistência. I representa o erro padrão da média.

### 4.3.3. Análises não paramétricas

#### 4.3.3.1. A origem das estirpes (independentemente dos destinos, repetições e plantas) afecta a persistência?

Detectam-se diferenças significativas na recuperação de inóculos agrupadas de acordo com a sua origem ( $P=1.275 \times 10^{-6}$ ) através do teste de Kruskal-Wallis. Das 6 comparações realizadas entre pares de amostras pelos testes bilaterais independentes de U de Mann-Whitney, só não havia diferenças significativas entre Beja e ICARDA ( $P=0.055$ ), Elvas e Évora ( $P=0.221$ ) e entre Évora e ICARDA ( $P=0.273$ ); nas restantes houve sempre diferenças significativas ( $P \leq 0.021$ ).

**Quadro 4.3.** Proporção média da recuperação de inóculos de diferente origem independentemente de locais de ensaio, repetições e plantas. Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente para  $P \leq 0,05$ , pelo teste de U de Mann-Whitney. Entre parêntesis, erros padrão da média.

Origem	n	mediana	média	
Beja	176	25	36.6 (2.9)	a
Elvas	131	0	15.5 (2.4)	b
Évora	88	0	20.4 (3.2)	bc
ICARDA	71	0	26.7 (4.2)	ac

Formam-se três grupos não mutuamente exclusivos, respectivamente Beja e ICARDA, Elvas e Évora, Évora e ICARDA, que se não permitem tirar conclusões claras sobre a importância da origem comum na recuperação de nódulos ocupados pelo inóculo, ao menos organizando-se de acordo com um gradiente de média de recuperação mas não de medianas, sugerindo em todo o caso, que a origem das estirpes por si só não explica as diferenças de recuperação de inóculo observadas.

Como anteriormente, houve necessidade de não considerar, em certas análises dos dados, os indivíduos que tinham em todas as variáveis valores nulos de recuperação do inóculo (V2B, B3E, E1E, E3E, V1E,). Daí que se tenham feito os testes de Kruskal-Wallis e de U de Mann-Whitney para avaliar o efeito da não consideração daquelas variáveis. Tal como anteriormente há diferenças significativas entre origens na recuperação

dos inóculos agrupados de acordo com a sua origem ( $P=8.755 \times 10^{-8}$ ). Das 6 comparações realizadas entre pares de amostras só não havia diferenças significativas entre Beja e Évora ( $P=0.628$ ) e entre Elvas e ICARDA ( $P=0.079$ ); nas restantes houve sempre diferenças significativas ( $P \leq 9.374 \times 10^{-3}$ ).

**Quadro 4.4.** Proporção média da recuperação de inóculos de diferente origem independentemente de locais de ensaio, repetições e plantas não considerando as variáveis V2B, B3E, E1E, E3E, V1E,. Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente para  $P \leq 0,05$ , pelo teste de U de Mann-Whitney. Entre parêntesis, erros padrão da média.

Origem	n	mediana	média	
Beja	161	33.3	40.1 (3.0)	a
Elvas	117	0	17.4 (2.6)	b
Évora	44	40	40.8 (4.8)	a
ICARDA	71	0	26.7 (4.2)	b

Apesar de continuar a haver diferenças significativas entre as origens, com as sobreposições dos grupos a desaparecerem quando se retiram os indivíduos V2B, B3E, E1E, E3E, V1E, formando-se um grupo de maior proporção de recuperação de inóculo em relação à sua origem (Beja e Évora) e um grupo de menores (Elvas e ICARDA).

#### 4.3.3.2. O destino das estirpes (independentemente da origem, repetições e plantas) afecta a intensidade da persistência?

Usando o teste de Kruskal-Wallis seguido de testes bilaterais independentes de U de Mann-Whitney. Há diferenças significativas entre a recuperação de nódulos ocupados por inóculos agrupados de acordo com o seu destino ( $P \approx 0$ ). Das 3 comparações realizadas entre pares de amostras houve sempre diferenças significativas ( $P \leq 0.012$ ).

**Quadro 4.5.** Proporção média da recuperação de inóculos nos diferentes destinos independentemente da origem, repetições e plantas. Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente para  $P \leq 0,05$ , pelo teste de U de Mann-Whitney. Entre parêntesis, erros padrão da média.

Destino	n	mediana	média	
Beja	164	0	17.0 (2.0)	b
Elvas	147	0	9.6 (1.5)	c
Évora	155	60	51.4 (3.3)	a

Formam-se três grupos, um de recuperação de inóculo mais elevada (destino Évora), um de intermédia (destino Beja) e um de recuperação mais baixa (destino Elvas).

Não considerando os indivíduos que tinham em todas as variáveis valores nulos de presença do inóculo (V2B, B3E, E1E, E3E, V1E,) e ao refazerem-se os testes de Kruskal-Wallis e de U de Mann-Whitney, continua a detectarem-se diferenças significativas entre destinos na recuperação de ( $P=1.998 \times 10^{-15}$ ). No entanto, e ao contrário de anteriormente, nem sempre houve diferenças significativas nas 3 comparações realizadas entre pares de amostras, com Beja e Elvas a não diferirem ( $P=0.081$ ) enquanto que o destino Évora diferia significativamente dos dois restantes ( $P \leq 1.511 \times 10^{-10}$ ).

**Quadro 4.6.** Proporção média da recuperação de inóculos nos diferentes destinos independentemente de locais de ensaio, repetições e plantas não, considerando as variáveis V2B, B3E, E1E, E3E, V1E, I2E. Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente para  $P \leq 0,05$ , pelo teste de U de Mann-Whitney. Entre parêntesis, erros padrão da média.

Destino	n	mediana	média	
Beja	135	0	20.7 (2.3)	b
Elvas	103	0	13.6 (2.0)	b
Évora	155	60	51.4 (3.3)	a

Não considerando os indivíduos V2B, B3E, E1E, E3E, V1E, passam a formar-se apenas dois grupos, o de recuperação de inóculo mais elevado (destino Évora) e o de recuperação mais baixa mais baixa (destino Beja e Elvas).

**4.3.3.3. Combinação origem / destino (independentemente das repetições e plantas) afecta a persistência?**

Não se detectaram diferenças significativas entre inóculos agrupados de acordo com a combinação origem/destino usando o teste de U de Mann-Whitney ( $P=0.088$ ), isto é, a origem e destino igual ou diferente, não implica diferente recuperação dos inóculos (Quadro 4.7.).

**Quadro 4.7.** Proporção média de recuperação de inóculo para a combinação origem / destino iguais ou diferentes. Entre parêntesis, erros padrão da média.

Combinação origem/destino	n	mediana	média
origem e destino iguais	133	20	28.1 (2.7)
origem e destino diferentes	333	0	25.3 (2.0)

A não consideração dos indivíduos que tinham em todas as variáveis valores nulos de recuperação de inóculo (V2B, B3E, E1E, E3E, V1E), não alterou os resultados da aplicação dos testes bilaterais de U de Mann-Whitney, não havendo diferenças significativas ( $P=0.372$ ) na recuperação de inóculo entre os dois grupos (Quadro 4.8).

**Quadro 4.8.** Proporção média da recuperação de inóculo para a combinação origem / destino iguais ou diferentes retirando da análise as variáveis V2B, B3E, E1E, E3E e V1E. Entre parêntesis, erros padrão da média

Combinação origem/destino	n	mediana	média
Igual	119	20	31.4 (2.9)
Diferente	274	20	30.8 (2.3)

Pelo observado, a recuperação de inóculos, com ou sem os indivíduos V2B, B3E, E1E, E3E e V1E, não difere quer tenham sido ou não introduzidos nos locais da sua origem.

**4.3.3.4. Inóculos (independentemente da origem, destino, repetições e plantas) afectam a persistência?**

Usando o teste de Kruskal-Wallis seguido de testes bilaterais independentes de U de Mann-Whitney detectaram-se diferenças significativas entre inóculos na sua persistência dos ( $P=2.442 \times 10^{-15}$ ). Das 55 comparações realizadas entre pares de amostras em 23 não havia diferenças significativas ( $P \geq 0.096$ ) e em 32 havia ( $P \leq 0.042$ ).

**Quadro 4.9.** Proporção média da recuperação de inóculo independentemente da origem, destino, repetições e plantas. As letras resultam do teste de U de Mann-Whitney. Entre parêntesis, erros padrão da média.

Inóculo	n	mediana	média	
B1	44	40	50.5 (6.2)	a
B2	43	33.3	42.5 (5.8)	a
B3	45	0	5.2 (2.1)	b
B4	44	50	49.2 (5.4)	a
E1	43	0	8.2 (2.8)	bc
E2	44	0	10.5 (2.2)	cde
E3	44	0	27.7 (5.8)	def
V1	45	0	17.6 (4.8)	bdg
V2	43	20	23.3 (4.3)	fgh
I1	44	0	19.1 (3.5)	deh
I2	27	0	39.1 (9.1)	ae

Apesar de haver diferenças significativas entre os inóculos, sem que nenhum deles se destaque claramente dos restantes, a proliferação de grupos com mais ou menos intersecções sugere que as estirpes por si só não explicam as diferenças de recuperação observadas.

Como anteriormente, houve necessidade de não considerar em certas análises dos dados os indivíduos que tinham em todas as variáveis valores nulos de recuperação de inóculo (V2B, B3E, E1E, E3E e V1E,). Daí que se tenham feito os testes de Kruskal-Wallis e os testes bilaterais independentes de U de Mann-Whitney para avaliar o efeito da

não consideração daquelas variáveis.

Há de novo diferenças significativas entre proporção de nódulos ocupados pelos inóculos ( $P=8.389 \times 10^{-12}$ ). Das 55 comparações realizadas entre pares de amostras em 28 não havia diferenças significativas ( $P \geq 0.070$ ) e em 27 havia ( $P \leq 0.042$ ).

**Quadro 4.10.** Proporção média da recuperação de nódulos ocupados por inóculos independentemente da origem, destino, repetições e plantas, retirando da análise as variáveis V2B, B3E, E1E, E3E e V1E. As letras resultam do teste de U de Mann-Whitney. Entre parêntesis o erros padrão da média.

Inóculos	n	mediana	média	
B1	44	40	50.5 (6.2)	a
B2	43	33.3	42.5 (5.8)	a
B3	30	0	7.8 (3.0)	b
B4	44	50	49.2 (5.4)	a
E1	29	0	12.1 (4.0)	bc
E2	44	0	10.5 (2.2)	bcd
E3	44	0	27.7 (5.8)	bef
V1	15	60	52.7 (9.1)	a
V2	29	33.3	34.6 (5.3)	ae
I1	44	0	19.1 (3.5)	cf
I2	27	0	39.1 (9.1)	adef

Apesar de continuar a haver diferenças significativas entre inóculos, de novo sem que nenhuma deles se destaque claramente dos restantes, a proliferação de grupos com mais ou menos intersecções sugere que os inóculos (estirpes) por si só, não explicam as diferenças na sua recuperação observadas quando a análise é feita sem as estirpes V2B, B3E, E1E, E3E e V1E.

Até aqui e pelas análises não paramétricas usando teste de Kruskal-Wallis seguido, se necessário, de testes bilaterais independentes de U de Mann-Whitney detectaram-se, de um modo geral, as seguintes situações na proporção de nódulos formados pelos inóculos na avaliação da sua persistência:

**Origem das estirpes** – Retirando das análises os valores nulos de recuperação dos

inóculos formam-se 2 grupos, um de maior persistência com estirpes de origem em Beja e Évora, e outro de menor persistência com origem em ICARDA e Elvas.

**Destino (locais de ensaio)** – Considerando os valores nulos de recuperação dos inóculos detectam-se diferenças entre os 3 locais, sendo a persistência das estirpes em Évora maior do que em Beja e neste local maior do que em Elvas. A não consideração dos indivíduos com valores nulos de recuperação os dois anteriores grupos juntam-se num só que difere significativamente do local Évora.

**Combinação origem / destino** – A combinação de estirpes de origem igual ou diferente ao do destino não afecta a proporção de nódulos ocupados pelo inóculo quer se usem ou não os indivíduos de recuperação nula.

**Estirpes** – Apesar de haver diferenças entre as estirpes, a proliferação de grupos não mutuamente exclusivos mostram interações não permitem explicar diferenças entre estirpes.

**Recuperação nula** – Doss indivíduos com nula recuperação de inóculo nos nódulos, 3 têm origem em Elvas, 1 em Évora e 1 em Beja. No que se refere aos destino, 1 em Beja, 4 em Elvas e 0 em Évora.

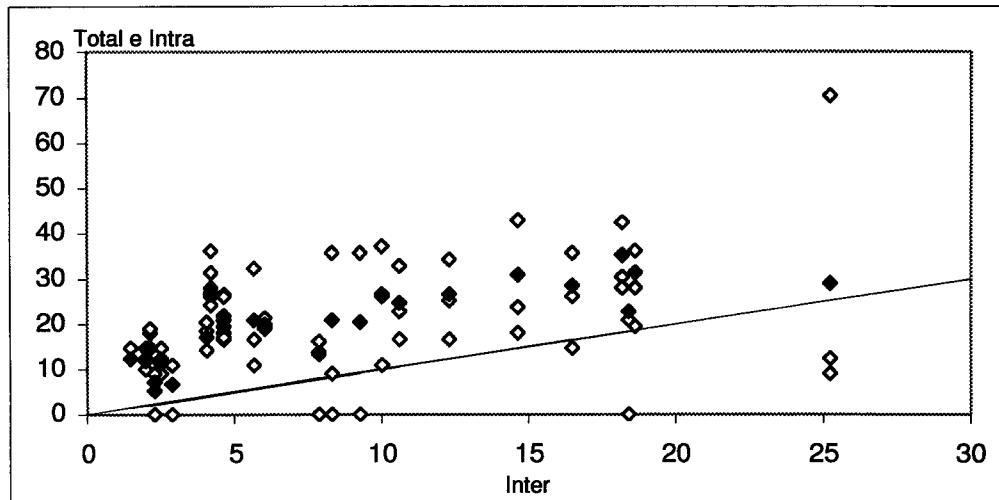
#### 4.3.4. Análises discriminantes

Nas análises anteriores, a não consideração de indivíduos com todos os valores de intensidade da persistência nulos basicamente não altera as conclusões, com a excepção do agrupamento dos indivíduos pelo destino. Adicionalmente, nessas análises, procuraram-se diferenças globais, independentes de variações internas de cada grupo considerado. Assumindo que essas variações não afectam a recuperação dos inóculos 18 meses após a sua introdução (e portanto o resultado das análises e as conclusões) então os vários grupos terão características comuns que permitem discriminá-los uns dos outros. Ou seja, como exemplo, os inóculos aplicados em Évora terão características de persistência para o conjunto das repetições e plantas que permitem individualizá-los e separá-los (discriminá-los) em relação ao seu comportamento quando aplicados em Elvas e Beja. Consequentemente, uma análise discriminante permitirá individualizar e separar grupos (classes).

Assim realizaram-se análises discriminantes para as várias hipóteses testadas probabilisticamente por métodos não paramétricos.



Usando os mesmos critérios expostos em 3.3.5.2., fizeram-se os cálculos para cada combinação estirpe-destino, um valor de desvio-padrão total (amostra constituída por todos os dados de cada combinação estirpe-destino), um valor de desvio-padrão inter-repetições (amostra constituída pelas 3 médias de cada combinação estirpe-destino) e 3 valores de desvio padrão intra-repetições (3 amostras cada uma constituída por todos os dados de cada repetição de cada combinação estirpe-destino).



**Figura 4.3.** Desvios-padrão total e intra-repetições em função do desvio-padrão inter-repetições. A contínuo, valores esperados para a igualdade entre os desvios-padrão total e intra-repetições e os desvios-padrão inter-repetições. ♦ desvios-padrão total, ◇ desvios-padrão intra-repetições.

Não considerando valores de desvio padrão nulos simultaneamente em todos os níveis, apresenta-se na Figura 4.3. a distribuição dos desvios-padrão intra-repetições e total em função dos desvios-padrão inter-repetições. Do exame da figura é claro que, salvo raras exceções, o desvio padrão inter-repetições é inferior aos desvios padrão intra-repetições e total. Globalmente, isto acontece em todos os casos para o desvio padrão total e em 83% dos casos para o desvio padrão intra-repetições. Detalhando um pouco mais, em 63% das combinações estirpe-destino o desvio padrão inter-repetições é inferior a todos os valores intra-repetições correspondentes, em 19% dos casos a dois dos valores intra-repetições e em 19% dos casos só a um dos valores intra-repetições.

Os níveis em que a variabilidade é maior são claramente intra-repetições e total, com uma boa equivalência entre ambos. Donde, é razoável aceitar que a opção referente aos valores de recuperação do inóculo (intensidade da persistência) para dar significado às variáveis, eliminando a variabilidade intra e sobretudo inter-repetições e mantendo a total

não deverá introduzir distorções importantes na análise a efectuar.

Tendo em conta as exigências da análise discriminante (quer por métodos não paramétricos como o da árvore de decisão binária quer por métodos paramétricos como a regressão) houve também que tomar decisões relativamente aos 12 dados em falta. Após a reorganização dos dados por ordem decrescente de intensidade de persistência havia dados em falta em 3 das 15 variáveis o que implicava ou estimar valores para esses dados ou eliminar essas variáveis. Tendo em conta o relativamente pequeno número de dados em falta (pelo menos quando comparado com a análise referente aos dados de competição) optou-se por estimar valores para os dados em falta pelo método descrito em 3.3.5.2..

No Quadro 4.11. apresentam-se os resultados das análises discriminantes segundo as classes pré definidas em relação à origem e destino das estirpes bem como das classes que resultaram das análises não paramétricas efectuadas anteriormente.

No que se refere à origem das estirpes a consideração de apenas duas classes resultantes dos testes de Kruskal-Wallis seguido de testes bilaterais independentes de U de Mann-Whitney (4.3.2.1.) melhora globalmente sua discriminação quando comparada com a obtida considerando as 4 classes de origem de estirpes quer em percentagens totais de boas classificações quer na ordenação das boas classificações das classes do grupo-base e do grupo-teste, nem por isso a qualidade da discriminação é particularmente elevada e muito menos a que seria de esperar se as diferenças detectadas anteriormente fossem independentes de perfis de recuperação do inóculo particulares dos indivíduos que constituem cada classe.

Em relação aos locais de implantação (destino) a não consideração na análise discriminante dos indivíduos com valores de recuperação de inóculo nulos, melhorar globalmente a sua discriminação quer em percentagens totais de boas classificações quer na ordenação das boas classificações das classes do grupo-base e do grupo-teste, nem por isso a qualidade da discriminação é particularmente elevada e muito menos a que seria de esperar se as diferenças anteriormente detectadas fossem independentes de perfis de recuperação do inóculo características dos indivíduos que constituem cada classe, embora a consideração de 2 classes tenha resultado em boas classificações quer no grupo-base quer no grupo-teste.

Considerando a combinação origem/destino das estirpes, apesar de não se terem detectado diferenças significativas pelo teste de U de Mann-Whitney, a relativamente alta qualidade da discriminação, avaliada pelas percentagens de boas classificações, está ao nível da encontrada para 2 classes de destino das estirpes, ainda assim não é totalmente a

**Quadro 4.11.** Análise discriminante para a persistência considerando as classes de origem, destino e estirpes, bem como as definidas pelas análises não paramétricas.

<b>Origem das estirpes – 4 Classes – Beja, Elvas, Évora e ICARDA</b>		
Classificação	Grupo-base:	Grupo-teste:
Bem classificados	58.8 %	30 %
Mal classificados	41.2 %	70 %
Origem melhor (máximo)	Elvas 100 %	Elvas 66.7 %
Origem pior (mínimo)	Évora e ICARDA 0 %	Évora e ICARDA 0 %
<b>Origem das estirpes – 2 Classes segundo análise de 4.3.2.1.</b>		
Classificação	Grupo-base:	Grupo-teste:
Bem classificados	66.7 %	88.9 %
Mal classificados	33.3 %	11.1 %
Origem melhor (máximo)	Elvas e ICARDA 88.9 %	Elvas e ICARDA 100 %
Origem pior (mínimo)	44.4 %	Beja e Évora 80 %
<b>Destino das Estirpes – 3 Classes - Beja, Elvas, Évora</b>		
Classificação	Grupo-base:	Grupo-teste:
Bem classificados	61.1 %	66.7 %
Mal classificados	38.9 %	33.3 %
Destino melhor (máximo)	Beja 100 %	Beja 100 %
Destino pior (mínimo)	Elvas 0 %	Elvas 0 %
<b>Destino das Estirpes – 2 Classes segundo análise de 4.3.2.2.</b>		
Classificação	Grupo-base:	Grupo-teste:
Bem classificados	83.3 %	77.8 %
Mal classificados	16.7 %	22.2 %
Destino melhor (máximo)	Beja e Elvas 100 %	Beja e Elvas 83.3 %
Destino pior (mínimo)	Évora 57.1 %	Évora 66.7 %
<b>Combinação Origem / Destino 2 Classes – Or. = Dest. e Or. ≠ Dest.</b>		
Classificação	Grupo-base:	Grupo-teste:
Bem classificados	94.4 %	77.8 %
Mal classificados	5.6 %	22.2 %
Or. ≠ Dest. melhor (máximo)	Or. ≠ Dest. 100 %	Or. = Dest. 100 %
Or. = Dest. pior (mínimo)	Or. = Dest. 80 %	Or. Dest. ≠ 66.7 %
<b>Estirpes – 11 Classes</b>		
Classificação	Grupo-base:	Grupo-teste:
Bem classificados	58.8 %	10 %
Mal classificados	41.2 %	90 %
Estirpes melhor (máximo)	B1, B4, E2, E3, I1 100 %	E2 100 %
Estirpes pior (mínimo)	B2, B3, E1, V1, V2, I2 0 %	B1, B2, B3, B4, E1, E3, V1, V2, I1, I2 0 %

que seria de esperar, se as diferenças detectadas anteriormente fossem independentes de perfis de recuperação de inóculo características dos indivíduos que constituem cada classe.

Como de alguma forma seria de esperar tendo em conta as análises de Mann-Whitney realizadas, a qualidade da discriminação das estirpes (inóculos) é claramente a pior de todas (Quadro 4.11).

O conjunto de análises discriminantes anteriores permite razoavelmente admitir a existência de diferenças importantes nos perfis de recuperação de inóculo (persistência) entre os indivíduos dentro de cada conjunto de classes consideradas. Tendo em conta que as melhores discriminações resultaram da classificação de inóculos por a) origem e destino igual e por origem e destino diferente e b) por duas classes de destino, parece razoável admitir que mais do que a origem comum, o destino comum, a origem e destino igual ou diferente, os perfis de recuperação dos inóculos nestas condições (persistência) resultassem de respostas diferenciadas dos inóculos àquele conjunto de caracterizações.

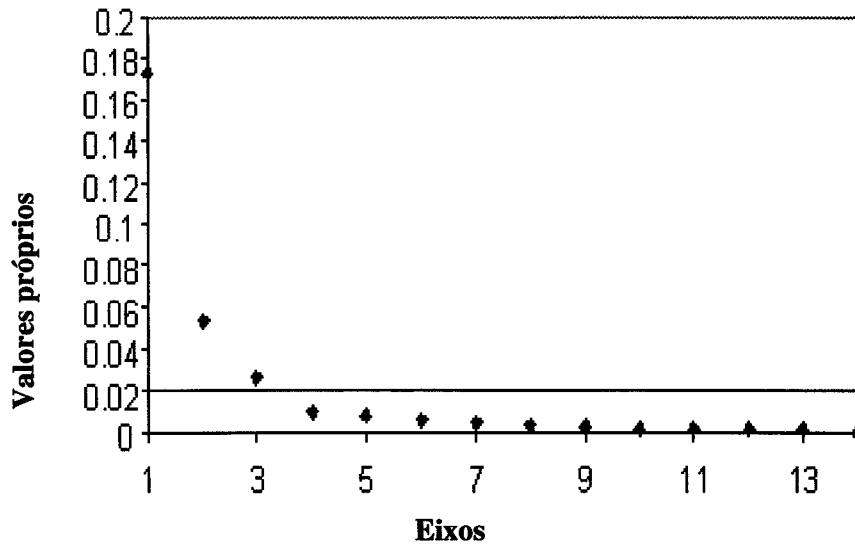
#### **4.3.5. Análise das correspondências**

Os resultados das análises anteriores sugerem que a origem das estirpes e destino (locais de implantação) igual ou diferente e duas classes de destino são claramente os critérios de classificação que permitem uma melhor discriminação entre as classes formadas, mas que ainda assim, não permitem uma discriminação tão boa quanto seria de esperar se não houvesse indivíduos dentro de cada classe com perfis de recuperação de inóculo (persistência) diferenciados. Daí a necessidade de uma análise «mais fina», sem critérios de classificação pré-estabelecidos, considerando à partida todos os indivíduos como tendo perfis de recuperação de inóculo (persistência) diferentes, procurando identificar e caracterizar os aspectos principais da estrutura do conjunto dos indivíduos e agrupá-los pelas semelhanças entre esses aspectos. Para isso usaram-se os procedimentos já anteriormente descritos em 3.3.5.3..

#### **Escolha dos factores a reter**

De acordo com os valores-teste só o primeiro eixo factorial deveria ser retido; de acordo com o teste do «cascalho», embora de uma forma menos clara do que verificado para a competição (3.3.5.4.), deveriam ser retidos os dois primeiros eixos factoriais o

mesmo acontecendo de acordo com a comparação com a média de todos os valores-próprios (ver Figura 4.4.).



**Figura 4.4.** Valores próprios em função dos eixos factoriais. Linha contínua – média dos valores próprios.

Assim, retiveram-se os dois primeiros eixos factoriais que representam em conjunto 78.5% da inércia total.

Uma análise gráfica da relação entre os pesos relativos e as distâncias de  $\chi^2$  dos indivíduos (Figura 4.5.) e das variáveis (Figura 4.6.) torna clara a relação entre ambas, com a variabilidade a diminuir com o aumento do peso relativo embora com algumas oscilações sobretudo nos pesos relativos menores, ou seja, como seria de esperar tendo em conta que o peso está limitado superiormente, indivíduos com pesos relativos elevados têm geralmente uma variabilidade relativamente pequena mas, mais importante, indivíduos com pesos relativos muito pequenos tendem a ter variabilidades elevadas. Em contrapartida, nas variáveis (Figura 4.6.) a resposta é semelhante à dos indivíduos, invertendo-se para os valores mais elevados de peso relativo, revelando uma maior variabilidade na persistência para pesos relativos mais elevados.

Considerando só os dois primeiros eixos factoriais, os cinco indivíduos que mais contribuem para o primeiro eixo são, por ordem decrescente de contribuição, B1V, E3E, I1B, B2V e B3B (representando cerca de 45% do «significado» deste eixo) e os cinco

indivíduos que mais contribuem para o segundo eixo são, também por ordem decrescente de contribuição, E3E, B1V, E1B, B3V e I2B (representando cerca de 76% do «significado» deste eixo). De notar que, se todos os indivíduos tivessem a mesma contribuição para a construção dos eixos, 5 indivíduos contribuiriam unicamente com cerca de 19%.

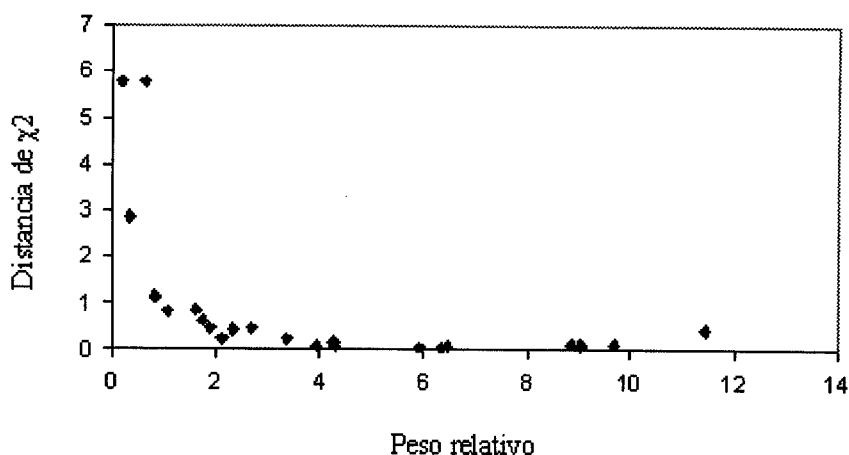


Figura 4.5. Distância de  $\chi^2$  dos indivíduos em função do seu peso relativo.

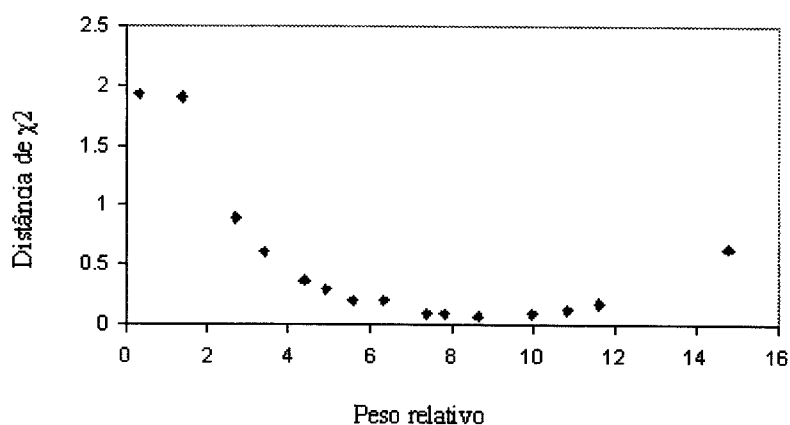
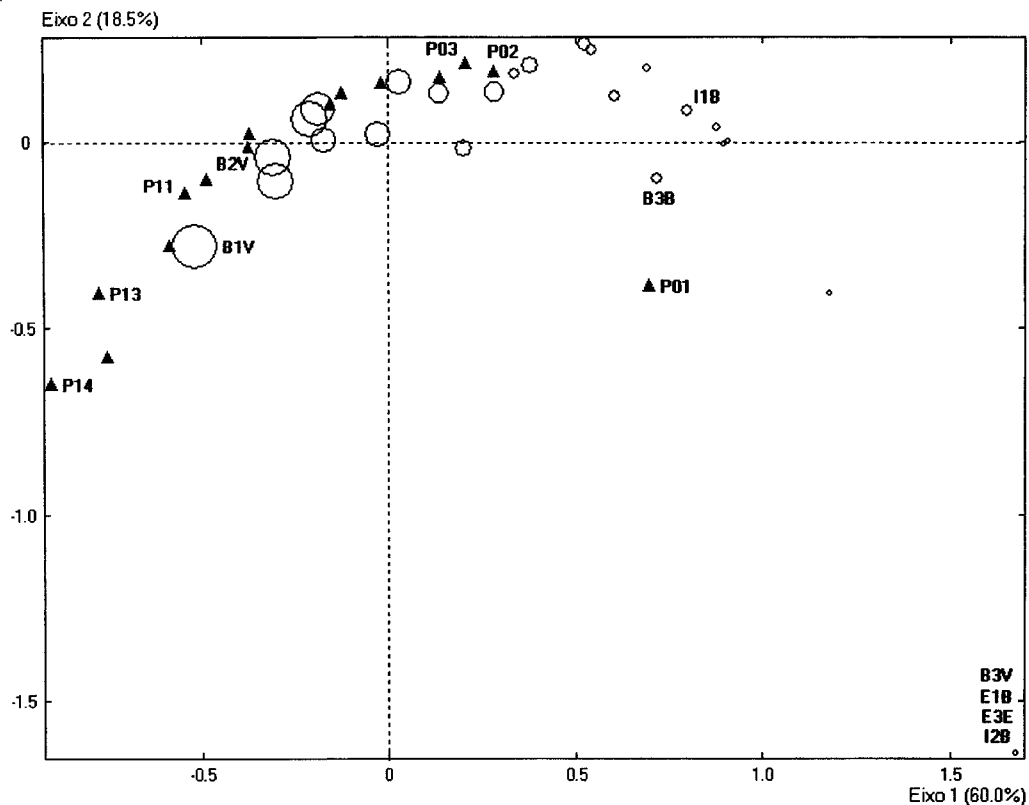


Figura 4.6. Distância de  $\chi^2$  das variáveis em função do seu peso relativo.

Analogamente, as variáveis que contribuem para o primeiro eixo são, por ordem decrescente de contribuição, P01, P13 e P11 (representando cerca de 58% do «significado» deste eixo) e as cinco variáveis que mais contribuem para o segundo eixo são, também por ordem decrescente de contribuição, P01, P14, P03, P13 e P02 (representando cerca de 76% do «significado» deste eixo). De notar que, se todas as variáveis tivessem a mesma contribuição para a construção dos eixos, 5 variáveis contribuiriam unicamente com cerca

de 33% (20% no caso de 3 variáveis).

Na Figura 4.7. apresenta-se a distribuição dos indivíduos e variáveis nos 2 primeiros eixos factoriais, com o tamanho dos círculos proporcional ao peso relativo dos indivíduos. Tal como o verificado na análise das correspondências feita para a competição (3.3.5.3.), também aqui há uma relação genericamente parabólica entre as coordenadas dos indivíduos e das variáveis, implicando desde logo uma relação geral de 2º grau entre os dois primeiros eixos, ou seja verifica-se o efeito de Guttman.



**Figura 4.7.** Representação dos indivíduos (círculos) e variáveis (triângulos) nos dois primeiros eixos factoriais, com indicação dos indivíduos e variáveis que caracterizam os dois eixos.

Tendo em conta só os indivíduos que mais caracterizam o primeiro eixo factorial (B1V, E3E, I1B, B2V e B3B), os indivíduos são ordenados no primeiro eixo basicamente de acordo quer com um gradiente decrescente (da esquerda para a direita) de peso relativo quer crescente de distância de  $\chi^2$ . Em contrapartida, tendo em conta a figura e os indivíduos que mais caracterizam o segundo eixo factorial (E3E, B1V, E1B, B3V e I2B) os indivíduos são ordenados no segundo eixo basicamente de acordo com a distância de  $\chi^2$ .

Tendo em conta só as variáveis que caracterizam o primeiro eixo factorial (P01, P13 e P11), são ordenados basicamente de acordo com um gradiente crescente (da direita para a esquerda) de peso relativo quebrando-se a correspondência directa com a distância de  $\chi^2$ . Em contrapartida, tendo em conta as variáveis que mais caracterizam o segundo eixo factorial (P01, P14, P03, P13 e P02) serem ordenados no segundo eixo de acordo com um gradiente crescente (de baixo para cima) de distância de  $\chi^2$  quebrando-se por vezes a correspondência directa com o peso relativo.

#### **4.3.6. Classificações automáticas**

Por último, procedeu-se a classificações automáticas com base nas coordenadas dos dois primeiros eixos factoriais. Todas as classificações foram feitas usando o procedimento RECIP de SPAD-N (Lebart et al. 1996). A partir do dendrograma obtido realizaram-se diversas partições de acordo com critérios descritos a seguir usando o procedimento PARTI-DECLA de SPAD-N (Lebart et al. 1996). A classificação foi feita pelo método hierárquico.

##### **4.3.6.1. Partição em quatro classes**

Partição em quatro classes para comparar a constituição esperada de cada classe se as estirpes com a mesma origem tiverem características comuns que permitem distingui-las umas das outras com a constituição observada das mesmas classes.

Na Figura 4.8. representa-se o resultado desta classificação representando com a mesma cor as células que deveriam pertencer à mesma classe e com números a classe a que de facto pertencem (a cinzento, classe com todas as amostras com persistência igual a zero; a preto I2E para o qual não havia quaisquer dados).



	Beja	Elvas	Évora
Beja 1	1	4	2
Beja 2	1	4	2
Beja 3	4		3
Beja 4	2	4	2
Elvas 1	3		4
Elvas 2	1	4	4
Elvas 3	4		2
Évora 1	3		1
Évora 2		1	1
ICARDA 1	4	4	4
ICARDA 2	3		2

**Figura 4.8.** Partição em 4 classes. Distribuição esperada e observada da origem das estirpes (Beja, Elvas, Évora e ICARDA).

Parece evidente que há uma fraca correspondência entre o esperado e o observado, confirmando o que já se tinha concluído anteriormente através da análise discriminante.

#### 4.3.6.2. Partição em duas classes (origem idêntica)

Partição em duas classes para comparar a constituição esperada de cada classe se as estirpes com a mesma origem tiverem características comuns que permitem distingui-las umas das outras com a constituição observada das mesmas classes, com as classes esperadas a serem definidas pelo resultado dos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney não considerando os indivíduos V2B, B3E, E1E, E3E, V1E (4.3.2.1.).

Na Figura 4.9. representa-se o resultado desta classificação representando com a mesma cor as células que deveriam pertencer à mesma classe e com números a classe a que de facto pertencem (a cinzento, classe com todas as amostras com persistência igual a zero; a preto I2E para o qual não havia quaisquer dados).

Tal como anteriormente, parece evidente que há uma fraca correspondência entre o esperado e o observado, confirmando o que já se tinha concluído através da análise discriminante.

	Beja	Elvas	Évora
Beja 1	1	2	1
Beja 2	1	2	1
Beja 3	2		2
Beja 4	1	2	1
Elvas 1	2		2
Elvas 2	2	2	2
Elvas 3	2		1
Évora 1	2		1
Évora 2		2	2
ICARDA	2	2	2
ICARDA	2		1

**Figura 4.9.** Partição em duas classes. Distribuição esperada e observada da origem das estirpes (Beja+Évora, Elvas+ICARDA).

#### 4.3.6.3. Partição em três classes (destinos idênticos)

Partição em três classes para comparar a constituição esperada de cada classe se as estirpes com o mesmo destino tiverem características comuns que permitem distingui-las umas das outras com a constituição observada das mesmas classes, com as classes esperadas a serem definidas pelo resultado dos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney não considerando os indivíduos V2B, B3E, E1E, E3E, V1E, I2E.

Na Figura 4.10. representa-se o resultado desta classificação representando com a mesma cor as células que deveriam pertencer à mesma classe e com números a classe a que de facto pertencem (a cinzento, classe com todas as amostras com persistência igual a zero; a preto I2E para o qual não havia quaisquer dados).

Parece evidente que há uma fraca correspondência entre o esperado e o observado, confirmando o que já se tinha concluído anteriormente através da análise discriminante

	Beja	Elvas	Évora
Beja 1	1	3	1
Beja 2	3	3	1
Beja 3	3		2
Beja 4	1	3	1
Elvas 1	2		3
Elvas 2	3	3	3
Elvas 3	3		1
Évora 1	3		1
Évora 2		3	3
ICARDA 1	3	3	3
ICARDA 2	2		1

**Figura 4.10.** Partição em 3 classes. Distribuição esperada e observada do destino das estirpes (Beja, Elvas e Évora).

#### 4.3.6.4. Partição em duas classes (destinos idênticos)

Partição em duas classes para comparar a constituição esperada de cada classe se as estirpes com o mesmo destino tiverem características comuns que permitem distingui-las

	Beja	Elvas	Évora
Beja 1	1	2	1
Beja 2	1	2	1
Beja 3	2		2
Beja 4	1	2	1
Elvas 1	2		2
Elvas 2	2	2	2
Elvas 3	2		1
Évora 1	2		1
Évora 2		2	2
ICARDA 1	2	2	2
ICARDA 2	2		1

**Figura 4.11.** Partição em duas classes. Distribuição esperada e observada do destino das estirpes (Beja+Elvas, Évora).

umas das outras com a constituição observada das mesmas classes, com as classes esperadas a serem definidas pelo resultado dos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney não considerando os indivíduos V2B, B3E, E1E, E3E, V1E (4.3.2.2.). Na Figura 4.11. representa-se o resultado desta classificação representando com a mesma cor as células que deveriam pertencer à mesma classe e com números a classe a que de facto pertencem (a cinzento, classe com todas as amostras com persistência igual a zero; a preto I2E para o qual não havia quaisquer dados).

Tal como anteriormente, parece evidente que há uma fraca correspondência entre o esperado e o observado, confirmando o que já se tinha concluído através da análise discriminante.

#### 4.3.6.5. Partição em duas classes (origem e destino igual ou diferente)

Partição em duas classes para comparar a constituição esperada de cada classe se a origem e destino das estirpes fosse igual ou diferente.

Na Figura 4.12. representa-se o resultado desta classificação representando com a mesma cor as células que deveriam pertencer à mesma classe e com números a classe a que de facto pertencem (a cinzento, classe com todas as amostras com persistência igual a zero; a preto I2E para o qual não havia quaisquer dados).

	Beja	Elvas	Évora
Beja 1	1	2	1
Beja 2	1	2	1
Beja 3	2		2
Beja 4	1	2	1
Elvas 1	2		2
Elvas 2	2	2	2
Elvas 3	2		1
Évora 1	2		1
Évora 2		2	2
ICARDA 1	2	2	2
ICARDA 2	2		1

**Figura 4.12.** Partição em 2 classes. Distribuição esperada e observada da origem e destino das estirpes ser igual ou diferente.

Mais uma vez, e de forma mais intensa do que anteriormente através da análise discriminante, parece evidente que há uma fraca correspondência entre o esperado e o observado.

#### 4.3.6.6. Partição em onze classes (inóculos)

Partição em onze classes para comparar a constituição esperada de cada classe se cada estirpe tiver características que permitam distingui-las das restantes com a constituição observada das mesmas classes.

	Beja	Elvas	Évora
Beja 1	1	11	6
Beja 2	2	9	5
Beja 3	11		7
Beja 4	4	9	4
Elvas 1	7		9
Elvas 2	8	11	11
Elvas 3	10		5
Évora 1	7		2
Évora 2		3	8
ICARDA 1	11	9	4
ICARDA 2	7		8

**Figura 4.13.** Partição em 11 classes. Distribuição esperada e observada das estirpes.

Na Figura 4.13. representa-se o resultado desta classificação representando com a mesma cor as células que deveriam pertencer à mesma classe e com números a classe a que de facto pertencem (a cinzento, classe com todas as amostras com persistência igual a zero; a preto I2E para o qual não havia quaisquer dados).

Mais uma vez, e de forma tão ou mais intensa do que anteriormente através da análise discriminante, parece evidente que há uma fraca correspondência entre o esperado e o observado.

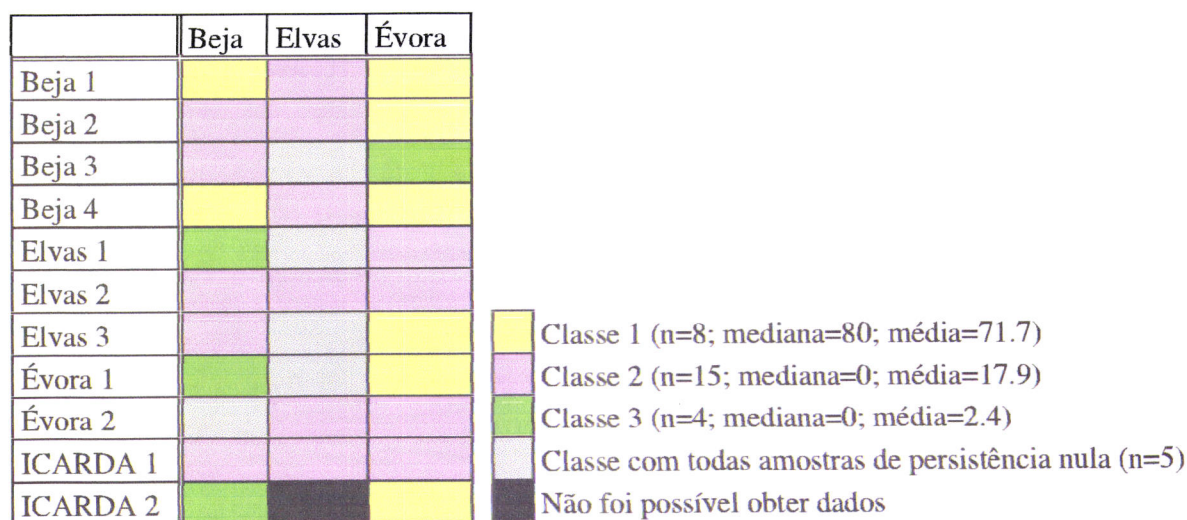
#### 4.3.6.7. Melhor partição possível

A melhor partição possível é a que origina 3 classes, que não correspondem, como se viu, ao esperado para a origem das estirpes, com as classes esperadas a serem definidas pelo resultado dos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney não considerando os indivíduos V2B, B3E, E1E, E3E, V1E, e para os destinos, apresentando-se na Figura 4.14. o seu resultado, com células da mesma cor a pertencerem à mesma classe (a cinzento, classe com todas as amostras com persistência igual a zero; a preto I2E para o qual não havia quaisquer dados).

Para avaliação da qualidade desta classificação realizou-se uma análise discriminante classificando os indivíduos de acordo com o resultado da partição em três classes, seguindo os procedimentos descritos anteriormente.

No grupo-base todos os indivíduos foram bem classificados enquanto no grupo-teste só um dos indivíduos da classe 2 foi mal classificado (no caso o indivíduo V2V, o de maior persistência desta classe, atribuído à classe 1).

Tendo em conta que o eixo com maior explicação pode ser indiferentemente caracterizado pelo peso relativo e pela distância de  $\chi^2$ , mas sobretudo pelo peso relativo e dada a correspondência geral entre o peso relativo e medidas de localização como a média e mediana, optou-se por caracterizar cada classe por estas últimas.



**Figura 4.14.** Resultado da melhor classificação possível.

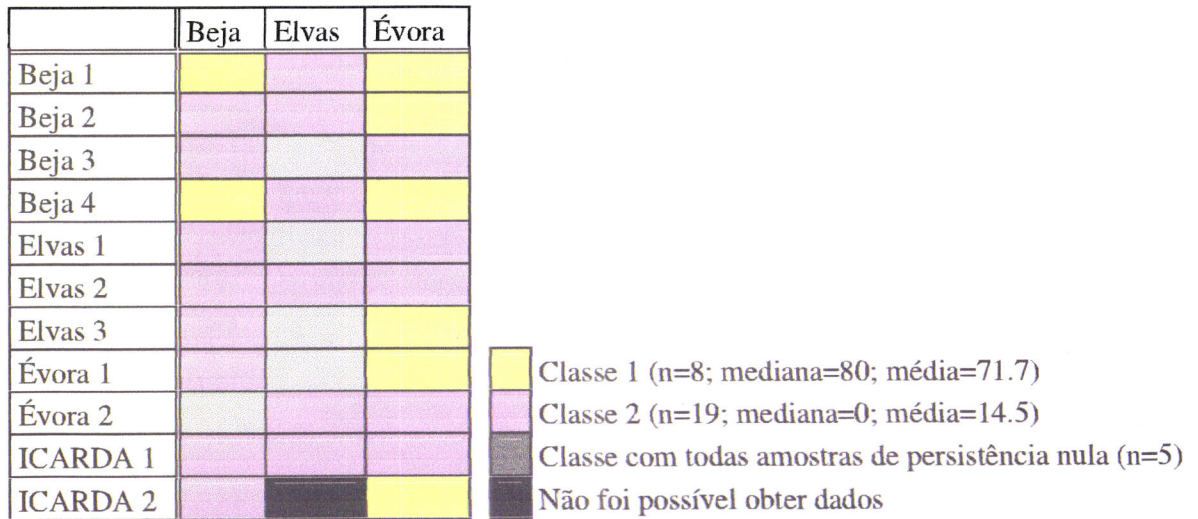
Recorrendo a métodos simples, usadas nas técnicas de controlo de qualidade (Montgomery, 1991), determinou-se em primeiro lugar o intervalo de confiança de 95% para a média da persistência de todas as amostras (27.4 a 34.5%) e comparou-se a média dos indivíduos de cada classe com esse intervalo de confiança. Assim, na classe 1 a persistência é claramente superior ao que seria de esperar de uma distribuição equitativa da persistência por todos os indivíduos e variáveis, na classe 2 a persistência é claramente inferior ao que seria de esperar de uma distribuição equitativa da persistência por todos os indivíduos e variáveis, tal como na classe 3, ainda com maior intensidade.

De notar que os 4 indivíduos que constituem a classe 3 são aqueles que na representação gráfica dos dois primeiros eixos resultantes da análise das correspondências (Figura 4.7.) apareciam isolados mas com as mesmas coordenadas factoriais.

Procedendo de forma análoga para cada variável, os indivíduos da classe 1 têm para as 8 variáveis de maior persistência valores superiores ao que seria de esperar de uma distribuição equitativa da persistência em cada uma das variáveis e para as 4 variáveis de menor persistência valores inferiores ao que seria de esperar; os indivíduos da classe 2 têm sempre (com excepção da variável de maior persistência) valores de persistência inferiores ao que seria de esperar de uma distribuição equitativa da persistência em cada uma das variáveis, quase sempre com valores de persistência não nulos; os indivíduos da classe 3 têm, para cada uma das 15 variáveis, uma persistência inferior ao que seria de esperar de uma distribuição equitativa da persistência em cada uma das variáveis, com valores nulos de persistência em todas as variáveis menos uma.

De notar que os indivíduos sempre ou quase sempre de persistência nula (todos os da classe 3 e E1E, V1B, V2B, B3E e V1E) são preferencialmente de destinos Beja e Elvas, que no destino Elvas não há nenhum indivíduo da classe de persistência elevada (classe 1) e que os indivíduos de persistência elevada (classe 1) são maioritariamente do destino Évora.

Adicionalmente, e tendo em conta que, apesar de distintas, as classes 2 e 3 têm ambas variabilidades de competição inferiores ao que seria de esperar de uma distribuição equitativa, apresenta-se na Figura 4.15. o resultado da junção dessas classes numa única, passando assim a haver uma classe de variabilidade da competição acima e outra abaixo do que seria de esperar de uma distribuição equitativa



**Figura 4.15.** Resultado da junção das duas classes de menor intensidade de persistência obtidas da melhor classificação possível.



#### 4.3.8. Variabilidade da Persistência

Tal como aconteceu no estudo referente à avaliação da competição através da proporção de nódulos ocupados pelos inóculos, também agora na avaliação da persistência dos inóculos nos locais de ensaio é importante conhecer a variabilidade da sua recuperação cerca de 18 meses após a sua introdução, isto, num segundo ciclo de crescimento do hospedeiro. Tal como na competição também no estudo da persistência verificou-se haver uma relação entre origem das estirpes de Beja e a localização preferencial da variabilidade inter-repetições (4.3.3.).

Adoptar-se-á de novo o desvio padrão das amostras como medida de variabilidade. Tendo em conta que se viu anteriormente que a variabilidade se localiza essencialmente intra-repetições, faz todo o sentido considerar as repetições dentro de cada combinação estirpe-destino como a unidade base para estimar a variabilidade.

A metodologia usada para a medida da variabilidade da persistência, nomeadamente referente ao cálculo dos desvios padrão com centragem dos dados de variabilidade de competição a média nula após utilização do método de *jackknife*, tal como descrito em 3.3.6. . Todos os procedimentos posteriores e análises realizadas correspondem aos seguidos em 4.3.2.1. a 4.3.6.7., apresentando-se seguidamente apenas os resultados julgados mais relevantes para a discussão, nomeadamente os resultados das análises não paramétricas retirando todos os indivíduos com variabilidade nula e finalmente o resultado da melhor classificação possível da variabilidade de persistência dos inóculos nos diferentes destinos.

**Quadro 4.12.** Média dos desvios padrão e erro padrão da média como medida da variabilidade da persistência nos diferentes locais de ensaio, Beja, Elvas e Évora

Estirpe	Inóculo	Origem das Estirpes	Local de Destino	Código Combinação Inoc x Local	Média Desvios Padrão	SEM
53Ca	B1	Beja	Beja	B1B	25,0	2,5
54bCa	B2			B2B	26,9	3,0
61Ca	B3			B3B	16,3	2,8
64bCa	B4			B4B	25,2	2,0
83Ca	E1	Elvas		E1B	0,0	1,5
84aCa	E2			E2B	19,7	1,2
85Ca	E3			E3B	10,0	1,3
98Ca	V1	Évora		V1B	0	0
102Ca	V2			V2B	0	0
CP31	I1	ICARDA		I1B	20,0	2,0
CP36	I2			I2B	0,0	1,2
53Ca	B1	Beja		Elvas	B1E	12,5
54bCa	B2		B2E		12,5	1,9
61Ca	B3		B3E		0	0
64bCa	B4		B4E		20,4	2,9
83Ca	E1	Elvas	E1E		0,0	0,0
84aCa	E2		E2E		12,5	1,4
85Ca	E3		E3E		0,0	4,7
98Ca	V1	Évora	V1E		0,0	0,0
102Ca	V2		V2E		25,2	2,4
CP31	I1	ICARDA	I1E		19,1	2,2
CP36	I2		I2E		0	0
53Ca	B1	Beja	Évora		B1V	10,0
54bCa	B2			B2V	19,1	1,7
61Ca	B3			B3V	0,0	1,2
64bCa	B4			B4V	25,0	3,5
83Ca	E1	Elvas		E1V	30,0	1,6
84aCa	E2			E2V	13,1	1,4
85Ca	E3			E3V	19,7	1,0
98Ca	V1	Évora		V1V	30,0	2,2
102Ca	V2			V2V	30,0	2,3
CP31	I1	ICARDA		I1V	26,3	1,7
CP36	I2			I2V	10,4	6,6

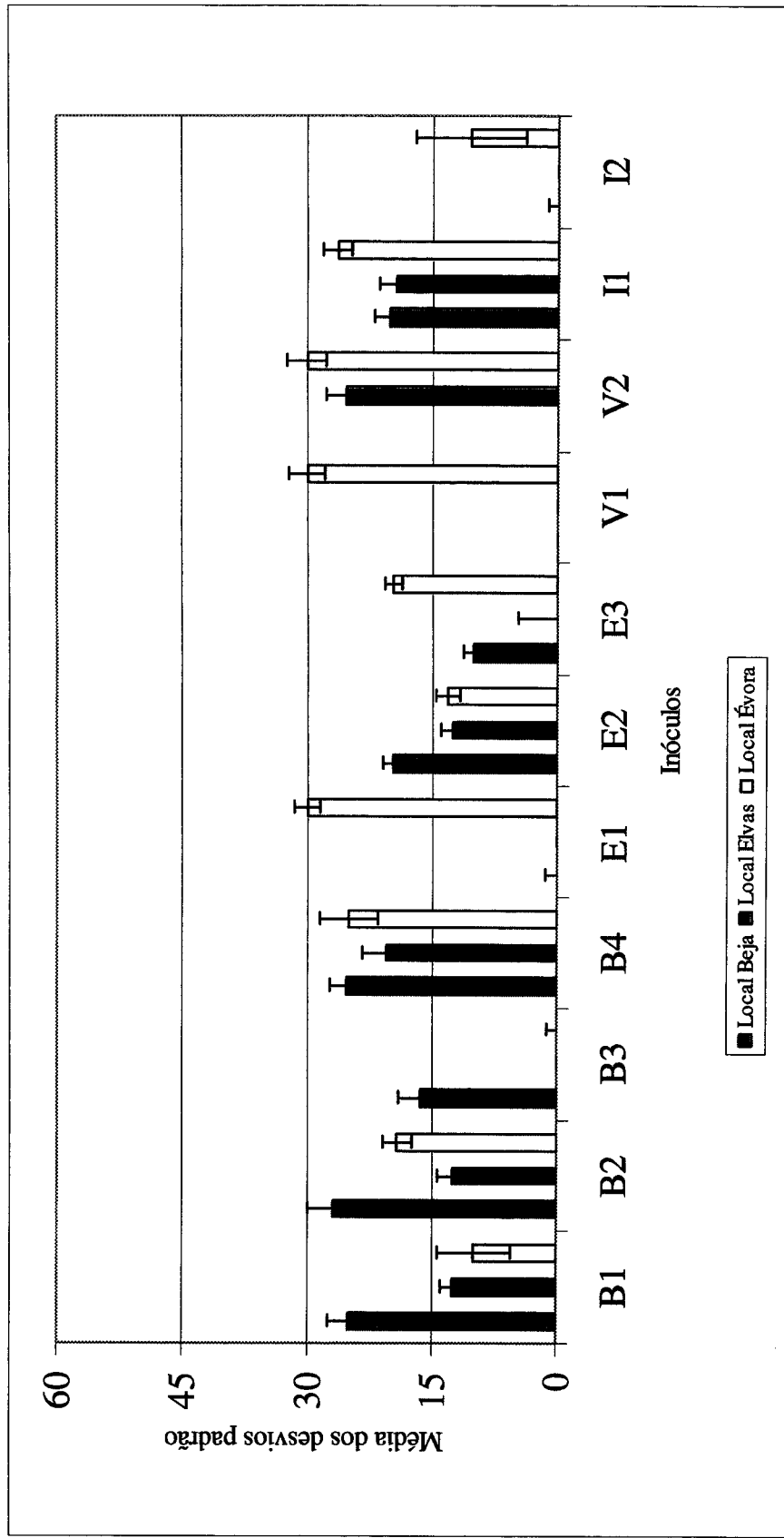


Figura 4.16. Representação gráfica da média dos desvios padrão, representando a variabilidade da persistência dos diferentes inóculos em cada um dos locais de ensaio. I representa o erro padrão da média

**4.3.8.1. A origem das estirpes (independentemente dos destinos, repetições e plantas) afecta a variabilidade da persistência?**

Não considerando os indivíduos que tinham em todas as variáveis valores nulos de desvio padrão (V1B, V2B,B3E,E1E e V1E), os testes de Kruskal-Wallis detectaram diferenças significativas entre a variabilidade da persistência das estirpes agrupadas de acordo com a sua origem ( $P=1.746 \times 10^{-9}$ ). Das 6 comparações realizadas entre pares de amostras pelo teste U de Mann-Whitney, só não havia diferenças significativas entre Beja e ICARDA ( $P=0.473$ ); nas restantes houve sempre diferenças significativas ( $P \leq 0.024$ ).

**Quadro 4.13.** Variabilidade na recuperação de inóculos de diferente origem independentemente de locais de ensaio (destinos) repetições e plantas não considerando as variáveis V1B, V2B,B3E,E1E e V1E. Para valores seguidos da mesma letra não há diferença significativa para  $P \leq 0,05$  pelo teste de U de Mann-Whitney. Entre parêntesis, erros padrão da média.

Origem	n	mediana	média	
Beja	165	16.3	17.1 (1.0)	b
Elvas	120	12.5	13.4 (1.0)	c
Évora	45	30.0	28.5 (1.4)	a
ICARDA	73	19.7	18.9 (1.8)	b

A formação de grupos mutuamente exclusivos indica que se formam 3 grupos, um de variabilidade da persistência elevada (Évora), um de variabilidade reduzida (Elvas) e um terceiro intermédio (Beja e ICARDA).

**4.3.8.2. O destino das estirpes (independentemente da origem, repetições e plantas) afecta a variabilidade da persistência?**

Não considerando indivíduos que tinham em todas as variáveis valores nulos de desvio padrão (V1B, V2B,B3E,E1E e V1E), os testes de Kruskal-Wallis e de U de Mann-Whitney verificaram haver diferenças significativas entre a variabilidade da persistência das estirpes agrupadas de acordo com o seu destino ( $P=2.884 \times 10^{-3}$ ). Como anteriormente, nas 3 comparações realizadas entre pares de amostras só não houve diferenças significativas entre os destinos Beja e Elvas ( $P=0.520$ ), com os destinos Beja e Elvas a diferirem significativamente do destino Évora ( $P \leq 1.641 \times 10^{-3}$ ).

**Quadro 4.14.** Variabilidade na recuperação de inóculos de diferentes destinos, independentemente da origem, repetições e plantas não considerando as variáveis V1B, V2B,B3E,E1E e V1E. Para valores seguidos da mesma letra não há diferença significativa para  $P \leq 0,05$  pelo teste de U de Mann-Whitney. Entre parêntesis, erros padrão da média

Destino	n	mediana	média	
Beja	135	16.3	15.9 (1.0)	b
Elvas	105	14.4	14.5 (1.1)	b
Évora	163	20.0	21.0 (1.1)	a

Formar-se dois grupos, um de variabilidade mais elevada (destino Évora), e outro de variabilidade mais baixa (destinos Beja e Elvas), ou seja, as estirpes com origem em Évora apresentam maior variabilidade em relação às outras origens e o destino em Évora apresenta-se como aquele em que a variabilidade na persistência de todos os inóculos é maior.

**4.3.8.3. Combinação origem / destino (independentemente das repetições e plantas) afecta a variabilidade da persistência?**

Detectam-se diferenças significativas entre a variabilidade da competição dos dois grupos de estirpes ( $P=6.810 \times 10^{-6}$ ) pelos testes bilaterais de U de Mann-Whitney, não considerando os dados dos indivíduos que tinham em todas as variáveis valores nulos de desvio padrão (V1B, V2B, B3E, E1E e V1E).

**Quadro 4.15.** Variabilidade na recuperação de inóculo para a combinação origem / destino igual ou diferente, não considerando as variáveis V1B, V2B, B3E, E1E e V1E.

Combinação origem / destino	n	mediana	média	
origem e destino iguais	120	20.6	22.0 (1.2)	a
origem e destino diferentes	283	14.4	15.7 (0.8)	b

A não existência de diferenças significativas entre os grupos de estirpes agrupados pela igualdade ou diferença das suas origens e destinos detectada na persistência das estirpes, medida pela proporção na recuperação de inóculos, altera-se agora, detectando-se diferenças significativas entre aqueles grupos. A maior variabilidade de persistência detectada para a combinação origem/destino igual pode revelar que aquilo que era uma vantagem na competição pois as estirpes assim agrupadas tinham melhores recuperações, alterou-se na análise referente á persistência, voltando agora a mostrar diferenças, o que revela que as combinações mais competitivas têm variações relacionadas com o tempo em que decorre desde a sua implantação.

**4.3.8.4. Estirpes (independentemente da origem, destino, repetições e plantas) afectam a variabilidade da persistência?**

O teste de Kruskal-Wallis, aplicado aos valores de variabilidade de persistência dos inóculos retirando das análises dados os indivíduos que tinham em todas as

variáveis valores nulos de desvio padrão (V1B, V2B, B3E, E1E e V1E), detectou diferenças significativas na variabilidade da sua persistência ( $P=7.772 \times 10^{-16}$ ). Das 55 comparações realizadas entre pares de amostras em 20 não havia diferenças significativas ( $P \geq 0.052$ ) e em 35 havia ( $P \leq 0.031$ ).

**Quadro 4.16.** Variabilidade na recuperação de inóculo para as estirpes (independentemente da origem, destino, repetições e plantas, retirando da análise as variáveis V1B, V2B, B3E, E1E e V1E. As letras resultam dos testes de U de Mann-Whitney. Entre parêntesis, erros padrão da média.

	n	mediana	média	
B1	45	13.1	16.8 (1.9)	ab
B2	45	14.4	16.6 (1.6)	a
B3	30	10.0	11.0 (2.2)	c
B4	45	21.7	21.8 (1.8)	de
E1	30	12.5	15.4 (2.5)	abcd
E2	45	13.1	13.7 (0.8)	ab
E3	45	10.0	12.0 (1.9)	bc
V1	15	30.0	33.2 (2.2)	f
V2	30	26.7	26.2 (1.6)	ef
I1	45	23.1	22.9 (1.3)	de
I2	28	10.0	12.6 (4.0)	c

Apesar de continuar a haver diferenças significativas entre as estirpes, sem nenhuma a destacar-se claramente das restantes por excesso, a proliferação de grupos com mais ou menos intersecções, sugere que as estirpes por si só não explicam as diferenças de variabilidade da persistência observadas quando a análise é feita sem os indivíduos V1B, V2B, B3E, E1E e V1E.

#### 4.3.8.5. Melhor partição possível

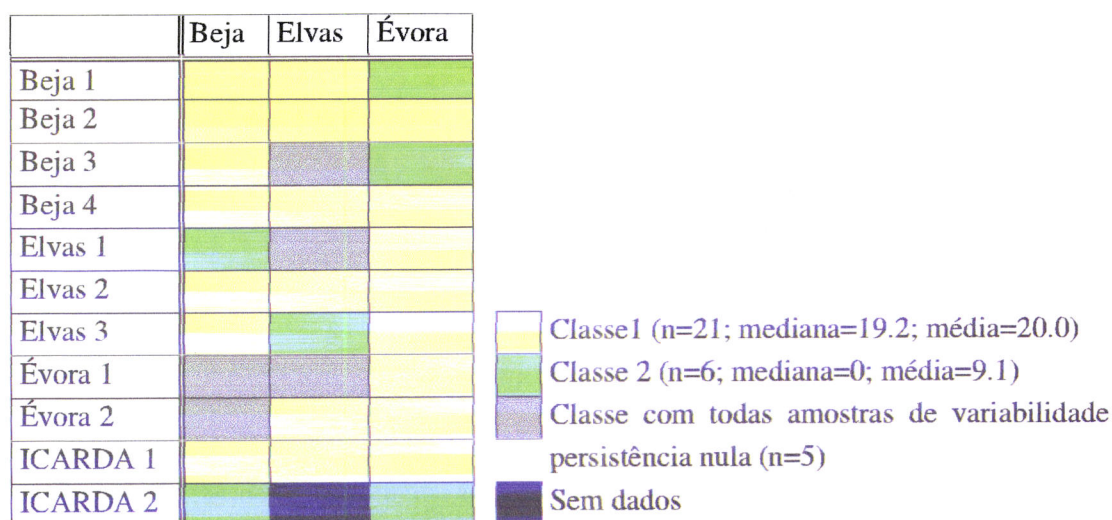
A melhor partição possível é a que origina 2 classes, que estão de acordo com os resultados das análises de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney para as origens e destinos iguais ou diferentes e para os destinos, não considerando os indivíduos V1B, V2B, B3E, E1E e V1E, apresentando-se na Figura 4.18 o seu resultado, com células da

mesma cor a pertencerem à mesma classe (a cinzento, classe com todas as amostras com competição igual a zero; a preto o caso particular de I2E).

Para avaliação da qualidade desta classificação realizou-se uma análise discriminante classificando os indivíduos de acordo com o resultado da partição em duas classes, seguindo os procedimentos descritos anteriormente.

No grupo-base 94.4% dos indivíduos foram bem classificados (máximo 100% na classe 1, mínimo 92.9% na classe 2) enquanto no grupo-teste todos os indivíduos foram bem classificados.

Tendo em conta que os eixos com maior explicação pode ser indiferentemente caracterizado pelo peso relativo e pela distância de  $\chi^2$  e dada a correspondência geral entre o peso relativo e medidas de localização como a média e mediana, optou-se por caracterizar cada classe por estas últimas.



**Figura 4.17** Resultado da melhor classificação possível.

Como anteriormente, determinou-se em primeiro lugar o intervalo de confiança de 95% para a média da variabilidade da persistência de todas as amostras (16.3 a 18.8%) e comparou-se a média dos indivíduos de cada classe com esse intervalo de confiança. Assim, na classe 1 a variabilidade da persistência é superior ao que seria de esperar de uma distribuição equitativa da variabilidade da persistência por todos os indivíduos e variáveis e na classe 2 a variabilidade da persistência é inferior ao que seria de esperar de uma distribuição equitativa da variabilidade da persistência por todos os indivíduos e variáveis.



De notar que a na generalidade dos locais de ensaio e inóculos, a variabilidade da persistência é superior ao que seria de esperar de uma distribuição equitativa, sendo as exceções os indivíduos B1V, B3V,E1B,E3E, I2B e I2V, de variabilidade de persistência inferior ao que seria de esperar. Nestes pares estirpe/destino encontramos valores de competição, persistência e variabilidade de persistência muito variados. No entanto o inóculo B1 e I2, quando introduzidos no local Évora, a sua recuperação nos nódulos é muito elevada quer no ano da inoculação quer no seguinte, isto é, têm um comportamento competitivo e persistente elevado mas apresentando uma variabilidade da persistência inferior ao que seria de esperar de uma distribuição equitativa, pelo que podemos considerar que estas duas estirpes se implantaram com sucesso naquele local.

#### 4.4. Discussão

Ao se agruparem as estirpes pela sua origem, verifica-se que a origem Beja e ICARDA apresentam valores de persistência significativamente superiores aos valores das estirpes com origem em Elvas e Évora, tal como acontecia com a competição, no entanto, estas origens não se agrupam de mesma forma quando avaliamos a sua variabilidade da persistência, em que as estirpes com origem em Évora, não sendo muito persistentes, apresentam uma variabilidade na sua implantação significativamente superior em relação às estirpes com outras origens.

Os resultados obtidos para a persistência das estirpes, tal como na competição, são fortemente influenciados pelas características dos locais de implantação, principalmente em relação à dimensão das populações nativas presentes (Slattery e Coventry, 1999). Assim, no local Évora a persistência global das estirpes é significativamente superior aos restantes locais, o que certamente terá implicações nos critérios de escolha de estirpes a usar como inóculo de grão de bico em solos com as características deste local Évora. O local Elvas mostra valores de implantação das estirpes muito baixos (tanto na competição como na persistência), possuindo uma pequena população nativa, revela no entanto algum constrangimento à nodulação e colonização de solo por rizóbio para grão de bico, embora não tenham sido detectados neste solo limitações físicas ou químicas à cultura deste hospedeiro (Almeida, 1998).

O efeito positivo detectado para a competição resultante da introdução de estirpes em solo idêntico ao da sua origem, não se manteve para os valores de

persistência das estirpes, indicando a importância das suas características próprias, nomeadamente de sobrevivência na ausência do hospedeiro. O inóculo E3 (estirpe 85Ca com origem em Elvas), teve capacidade competitiva e de persistência reduzidas no seu local de origem mas revelou-se como uma das melhores quando introduzida no solo do local Évora. Por outro lado, no solo do local Beja, a persistência das estirpes está fortemente relacionada com a sua origem nesse local.

A análise dos dados obtidos nos ensaios usando as das correspondências seguidas das classificações automáticas, permitiram agrupar as estirpes nos diferentes locais, confirmando as observações realizadas. Assim, das oito classes que têm valores de persistência superiores ao que seria de esperar de uma distribuição equitativa da recuperação de inóculos nas plantas, seis encontram-se no local Évora, duas em Beja e nenhuma em Elvas. A identificação desta classe no local Beja apenas ocorre para estirpes originárias de solo do local Beja, o que mostra a importância da origem das estirpes quando implantadas em solo onde se faz sentir pressão competitiva por parte de estirpes nativas. Em oposição, e confirmando estas observações, das quatro classes em que a persistência é inferior ao que seria de esperar de uma distribuição equitativa dos inóculos nas plantas, três são do local Beja.

Como é natural, no ano seguinte à aplicação de um inóculo, a presença das estirpes no solo é mais dispersa, quanto mais não seja, pelo facto de deixarem de estar em local privilegiado para a nodulação, resultante da sua presença em número elevado à superfície da semente, pelo que os valores da variabilidade de persistência são mais elevados, sendo no estudo presente, distribuídos por 21 classes de elevada variabilidade em 32 possíveis. Mesmo nestas circunstâncias é importante conhecer a variabilidade das estirpes na ocupação de nódulos, pois isto revela a sua homogeneidade de comportamento nas diferentes condições de solo para a nodulação.

A persistência de estirpes inoculantes é um factor importante em programas de inoculação de leguminosas grão. As respostas à inoculação são frequentes quando se introduz pela primeira vez uma estirpe em solo com pequenas populações nativas (Thies et al., 1991). A implantação destes inoculantes nos locais de destino, transformando-os em estirpes naturalizadas, conduzem, com frequência, à inexistência de respostas à inoculação da cultura em anos posteriores (Dunningan et al., 1984; Ellis et al., 1984). Os resultados aqui apresentados mostram que no local Évora com pequena população nativa presente, apenas um dos inóculos (B3) não forma nódulos em quantidade apreciável no ano seguinte ao da sua implantação, pelo que todos os outros

se implantaram, podendo constituir uma população naturalizada naquele local. Inoculações subsequentes enfrentarão uma pressão competitiva por parte destas estirpes naturalizadas, comprometendo respostas positivas á inoculação de grão de bico. Isto mostra a importância da utilização criteriosa de inóculos em solos com pequenas populações nativas.





## **5. Considerações Finais**



## 5. Considerações Finais

A implantação de estirpes de rizóbio em diferentes condições edafo-climáticas depende de vários factores, desde logo, o tipo de uso agrícola do hospedeiro, das características das estirpes e das condições ambientais para a nodulação.

No caso do uso de inoculantes para trevo subterrâneo e dadas as elevadas populações nativas frequentemente detectadas em muitos solos, a capacidade competitiva dos inóculos para a ocupação de nódulos, é factor de grande importância na implantação de rizóbios, particularmente na presença de factores adversos do solo. Assim, os resultados aqui expostos mostram que uma estirpe originária de solo ácido com toxicidade de alumínio foi mais competitiva, em comparação com outra estirpe isolada de um solo sem aquelas limitações, quando aplicada num solo de pH ácido, toxicidade de manganês e elevada população nativa.

A distribuição dos nódulos e principalmente da estirpe inoculante na raiz de trevo depende das condições ambientais no momento da nodulação e das características das cultivares, tendo-se verificado que a recuperação do inóculo é diferente entre variedades em certas zonas das raiz, pelo que amostragens de nódulos, para avaliação dos seus ocupantes, dirigidas a locais definidos na raiz, poderão introduzir factores de erro importantes na avaliação da capacidade competitiva e implantação de inóculos. O estudo da variabilidade entre e intra-repetições mostra a importância que cada planta *per se* exerce quer nos padrões de nodulação quer na recuperação de inóculos.

O estudo referente à implantação de inóculos para grão de bico mostrou a importância da dimensão das populações nativas presentes no solo e da origem e destino dos inóculos quer na capacidade competitiva quer na persistência. Como vários autores referem, também nós constatamos que a introdução de estirpes exóticas enfrenta dificuldades na sua implantação em solos que alberguem populações nativas de nível elevado. Os resultados obtidos que estirpes introduzidas em solos sem limitações ao crescimento do hospedeiro e sem populações nativas, implantam-se com facilidade e são facilmente recolhidos em ano subsequente ao da sua introdução.

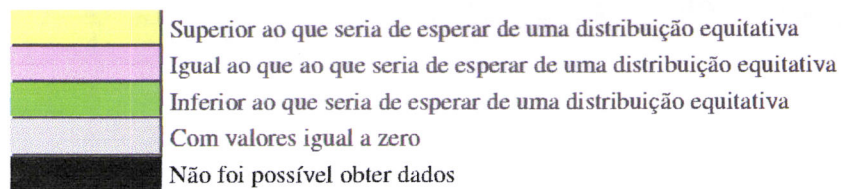
Conjugando todas as informações recolhidas sobre o comportamento das estirpes de rizóbio para grão de bico, nas presentes condições de ensaio, no que se refere à sua capacidade competitiva e à sua persistência nos locais de ensaio, associando a variabilidade com que estas características do comportamento das estirpes ocorre, podemos encontrar critérios de classificação com vista à escolha de inóculos a serem usados na

cultura de leguminosas. Usando a situação aqui apresentada, resultante da necessidade de inocular grão de bico para sementeira de Outono/Inverno, tendo em conta que os solos do Alentejo possuem populações nativas de dimensão variável, que estirpes inoculantes deverão ser usadas? Se optarmos pela estirpe exótica CP36 (I2) pertencente à colecção do ICARDA, e a inocularmos num solo com as características do local Évora, podemos esperar uma boa ocupação de nódulos por essa estirpe (classe 1, Figura 3.17), alguma estabilidade nessa ocupação de nódulos (classe 2, Figura 3.20), elevada persistência (classe 1, Figura 4.14) e baixa variabilidade na persistência (classe 2, Figura 4.18), ou seja, a estirpe implantou-se neste local, é competitiva, constituindo no futuro um obstáculo à implantação de novas estirpes, e possibilitando nodulações com capacidade fixadora de azoto variável sempre que o genótipo do hospedeiro varie, isto é, quando se usarem novas variedades de hospedeiro. Já a utilização da estirpe 61Ca (B3) isolada em solo do local Beja, seria de esperar uma competição mediana (classe 2 com cerca de 40% dos nódulos ocupados por esta estirpe), com variabilidade na ocupação de nódulos acima do esperado (classe 1), de persistência abaixo do esperado (classe 3) e variabilidade na persistência abaixo do esperado (classe 2), ou seja, estaríamos na presença de um inóculo que ocuparia um número apreciável de nódulos, embora com variabilidade no local, mas que não comprometeria a futura introdução de novos inoculantes e novas variedades de hospedeiro. A introdução de inóculos para grão de bico no solo do local Beja com base no até aqui exposto, a estirpe eleita seria também a B3 (61Ca), pois é muito competitiva neste local, estável na capacidade competitiva, mediana na persistência e com variabilidade local na persistência.

Seguindo este raciocínio, podemos estabelecer critérios (obviamente os aqui analisados) para a escolha de estirpes para a inoculação de leguminosas. Concretamente para o grão de bico, necessitamos de estirpes que, para além de alta eficácia na fixação de  $N_2$ , sejam competitivas, pouco persistentes no solo e com estabilidade local na manifestação destas características. Já para a implantação de pastagens permanentes à base de leguminosas de sementeira natural, os critérios de escolha para além de outros, seriam a de elevada capacidade competitiva e uma elevada persistências em diferentes condições edafo-climáticas. Nesta perspectiva, a da escolha de estirpes para a inoculação de leguminosas, a informação da análise das classificações automáticas aplicadas aos pares estirpe/destino, podemos impor critérios de ordenamento e organizar a informação com vista à escolha de estirpes para diferentes situações ( Figura 4.18).



Estirpes	Locais	Competição	Variabilidade Competição	Persistência	Variabilidade Persistência
Beja 1	Beja				
Beja 4	Beja				
Beja 1	Évora				
Elvas 3	Évora				
Évora 1	Évora				
<b>ICARDA 2</b>	<b>Évora</b>				
<b>Beja 3</b>	<b>Beja</b>				
Beja 2	Évora				
Beja 4	Évora				
Beja 2	Beja				
Elvas 3	Beja				
ICARDA 1	Beja				
Beja 1	Elvas				
Beja 2	Elvas				
Beja 4	Elvas				
ICARDA 1	Elvas				
Évora 2	Évora				
ICARDA 1	Évora				
<b>Beja 3</b>	<b>Évora</b>				
Évora 2	Beja				
Beja 3	Elvas				
Elvas 3	Elvas				
Évora 2	Elvas				
Elvas 1	Évora				
Elvas 1	Beja				
Évora 1	Beja				
ICARDA 2	Beja				
Elvas 1	Elvas				
ICARDA 2	Elvas				
Elvas 2	Beja				
Elvas 2	Elvas				
Elvas 2	Évora				
Évora 1	Elvas				



**Figura 4.18.** Junção das classificações automáticas para a competição, variabilidade de competição, persistência e variabilidade de persistência, com ordenação decrescente das classes de competição. Assinalados exemplos referido no texto.

## **6. Referências Bibliográficas**



- Abril, A., Ryan, A., e Carreras, J. (1997). Inoculation of chickpeas with *Rhizobium* sp. native to the province of Cordoba, Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* **29**:24–31.
- Almeida, M. V. M. F. (1998). Ensaios de fertilização em leguminosas para grão de Outono-Inverno. Tese de Licenciatura. Universidade de Évora.
- Almendras, A.S., Bottomley, O.J. (1987). Influence of lime and phosphate on nodulation of soil-grown *Trifolium subterraneum* L. by indigenous *Rhizobium trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**: 2090-2097.
- Amara, D. S., Miller, R. H. (1986). Effect of moisture and salt stress on selected *Rhizobium phaseoli* strains. *MIRCEN Journal*, **2**:373:382.
- Amarger, N. (1981). Competition for nodule formation between effective and ineffective strains of *Rhizobium meliloti*. *Soil Biol. Biochem.* **13**:475–80.
- Ames, P., Bergman, K. (1981). Competitive advantage provided by bacterial motility in the formation of nodules by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.*, **148**: 728-729.
- Ames-Gottfred, N. P., Christie, B. R. (1989). Competition among strains of *Rhizobium leguminosarum* v. *trifolii* and use of a diallel analysis in assessing competition. *App. Environ. Microbiol.*, **55**: 1599-1604.
- Amon, P., Haas, E. e Sumper M. (1998). The Sex-Inducing Pheromone and Wounding Trigger the Same Set of Genes in the Multicellular Green Alga *Volvox*. *Plant Cell*, **10**: 781-790.
- Andrew, C.S. (1976). Effect of calcium, pH and nitrogen on the growth and chemical composition of some tropical and temperate pasture legumes. I. Nodulation and growth. *Aust. J. Agric. Res.*, **27**: 611-623.
- Appleby, C. A. (1984). Leghemoglobin and *Rhizobium* Respiration. *Ann. Rev. of Plant Physiol.*, **35**: 443-478.
- Arsac, J. L., Cleyet-Marel, J. C.,(1986). Serological and ecological studies of *Rhizobium* spp. (*Cicer arietinum* L.) by immunofluorescence and ELISA technique: Competitive ability for nodule formation between *Rhizobium* strains. *Plant and Soil* . **94**; 411-423
- Ausmees, N., Kobayashi, H., Deakin, W.J., Marie, C. Krishnan, H. B., Broughton, W. J., e Perret, X. (2004). Characterization of NopP, a Type III Secreted Effector of *Rhizobium* sp. Strain NGR234. *Journal of Bacteriology*, **186**: 4774-4780.
- Baev, N., Endre, G., Petrovics, G., Banfalvi, Z., Kondorosi, A. (1991). Six nodulation genes of nod box locus 4 in *Rhizobium meliloti* are involved in nodulation signal production: nodM codes for D-glucosamine synthetase. *Mol. Gen. Genet.* **228**: 113–124.
- Bakhuizen, R. (1988). The Plant Cytoskeleton in the *Rhizobium*-Legume Symbiosis. Tese de Doutorado, Leiden University.
- Ballard, R. A., Charman, N. (2000). Nodulation and growth of pasture legumes with naturalised soil rhizobia. 1. Annual *Medicago* spp.. *Aust. J. of Exp. Agric.*, **40**: 939 – 948.
- Barefoot, S.F., Chen, Y.R., Hughes, T.A, Bodine, A.B., Shearer, M.Y., Hughes, M.D. (1994) Identification and purification of a protein that induces production of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3522-3528.
- Barnett, M. J., Long, S. R.( 1990) Nucleotide sequence of an alfalfa calmodulin cDNA., **18**: 3395-3399.

- Barnett, M.J., R.F. Fisher, T. Jones, C. Komp, P.A. Abola, F. Barloy-Hubler, L. Bowser, D. Capela, F. Galibert, J. Gouzy, M. Gurjal, A. Hong, L. Huizar, R. W. Hyman, D. Kahn, M.L. Kahn, S. Kalman, D.H. Keating, C. Palm, M.C. Peck, R. Surzycki, D.H. Wells, K.C. Yeh, R.W. Davis, N.A. Federspiel e Long, S.R. (2001). Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**:9883-9888.
- Bateman, A., Bycroft, M. (2000). The Structure of a LysM Domain from *E. coli* Membrane-bound Lytic Murein Transglycosylase D (MltD). *J. Mol. Biol.* **299**: 1113-1119.
- Bauer, W. D., Caetano-Anollés, Gustavo (1990). Chemotaxis, induced gene expression and competitiveness in the rhizosphere. *Plant and Soil*, **129**: 45-52.
- Beck, D. P. (1992). Yield and nitrogen fixation of chickpea cultivars in response to inoculation with selected rhizobial strains. *Agronomy J.*, **84**: 510-516.
- Beck, D.P., Munns, D.N. (1984). Phosphate nutrition of *Rhizobium* spp.. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**: 278-282.
- Beck, D.P., Munns, D.N. (1985). Effect of calcium on the phosphorus nutrition of *Rhizobium meliloti*. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **49**: 334-337.
- Becker, A., Pühler, A. (1998). Specific amino acid substitutions in the proline-rich motif of the *Rhizobium meliloti* ExoP protein result in enhanced production of low-molecular-weight succinoglycan at the expense of high-molecular-weight succinoglycan. *J. Bacteriol.* **180**: 395-399.
- Bell, F., Nutman P. S. (1971). Experiments on nitrogen fixation by nodulated lucerne. *Plant and Soil, Special. Vol.*: 231-264.
- Bellido, L. L., Garcia, M. F. (1986). Garbanzo para alimentación humana. *Agricultura*. 402-409.
- Bender, G. L. (1988). The genetic basis of *Rhizobium* host range extension to the non-legume *Parasponia*. Tese de Doutorado. Australian National University.
- Benzécri, J.-P. (1976). L'Analyse des Données. II. L'Analyse des Correspondances. 2ème éd., Dunod, Paris.
- Beynon, J. L., Josey, D. P. (1980). Demonstration of heterogeneity in a natural population of *Rhizobium phaseoli* using variation in intrinsic antibiotic resistance. *J. Gen. Microbiol.*, **118**: 437-442.
- Bhagwat A. A., Mithöfer A., Pfeffer, P.E., Kraus, C., Spickers, N., Hotchkiss A., Ebel J., e Keister D.L. (1999). Further Studies of the Role of Cyclic  $\beta$ -Glucans in Symbiosis. An ndvC Mutant of *Bradyrhizobium japonicum* Synthesizes Cyclodecakis-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -Glucosyl. *Plant Physiol.* **119**: 1057-1064.
- Bhuvaneswari, T. V., Bhagwat, A. A. e Bauer, W. D. (1981). Transient susceptibility of root cells in four common legumes to nodulation by rhizobia. *Plant Physiol.*, **68**: 1144-1149.
- Bohlool, B. B., Ladha J. K., Garrity D. P. e George T. (1992). Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: A perspective. *Plant and Soil* .**141**: 1-11.
- Bohlool, B.B., Schmidt, E.L. (1970). Immunofluorescence detection of *Rhizobium japonicum* in soils., *Soil Sci.*, **110**: 229-236.
- Bohlool, B.B., Schmidt, E.L. (1973). Persistence and competition aspects of *Rhizobium japonicum* observed in soil by immunofluorescence microscopy. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, **37**: 561-564.

- Boonkerd, N., Weaver, R.W. (1982). Survival of cowpea rhizobia in soil as affected by temperature and moisture. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**: 585-589.
- Bottomley, P. J., Maggard, S. P., Leung, K., e Busse, M. D. (1991). Importance of saprophytic competence for introduced rhizobia. In: *The Rhizosphere and Plant Growth*. D. L. Keister and P. B. Cregan (eds). Kluwer Academic Pub., Dordrecht, The Neatherlands. 135-137.
- Bottomley, P.J., Maggard, S.P. (1990). Determination of viability within serotypes of a soil population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**: 533-540.
- Bottomley, P.J., Dughri, M.H. (1989). Population size and distribution of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in relation to total soil bacteria and soil depth. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**: 959-964.
- Brewin, N. J., Beringer, J. E., Buchanan-Wollaston, A. V., Johnston, A. W. B. e Hirsch, P. R. (1980). Transfer of symbiotic genes with bacteriocinogenic plasmids in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.*, **116**:261-270.
- Brewin, N.J., Wood, E.A. e Young, J.P.W. (1983) Contribution of the symbiotic plasmid to the competitiveness of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 2973-2977.
- Brockwell, J. (1963). Accuracy of a Plant-Infection Technique for Counting Populations of *Rhizobium trifolii* *Appl Environ Microbiol.*, **11**: 377-383.
- Brockwell, J., Bottomley, P.J. (1995). Recent advances in inoculant technology and prospects for the future. *Soil Biol. Biochem.* **27**:683-697.
- Brockwell, J., Bottomley, P.J., Thies, J.E. (1995). Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. *Plant Soil*, **174**: 143-180.
- Brockwell, J., Dudman, W. F., Gibson, A. H., Hely, F. W. e Robinson, A. C. (1968). An integrated programme for the improvement of legume inoculant strains. *Trans. 9<sup>th</sup> Int. Cong. Soil Sci. Soc.*, **2**:103-114.
- Brockwell, J., Gault, R.R., Zorin, M., Roberts, M.J. (1982). Effects of environmental variables on the competition between inoculum strains and naturalized populations of *Rhizobium trifolii* for nodulation of *Trifolium subterraneum* L. and on persistence in the soil. *Aust. J. Agric. Res.*, **33**: 803-815.
- Brockwell, J., Roughley, R.J., and Herridge, D.F. (1987). Population Dynamics of *Rhizobium japonicum* strains used to inoculate three successive crops of soybean. *Aust. J. Agric Res.*, **38**:61-74.
- Brockwell, J.,Schwinghamer, E. A., Gault, R.R. (1977). Ecological studies of root-nodule bacteria introduced into field environments. V. A critical examination of the stability of antigenic and streptomycin-resistance markers for identification of strains of *Rhizobium trifolii*. *Soil Biol. Biochem.*, **9**: 19-24.
- Brom, S., Santos, A. G., Stepkowsky T., Dávila, M. F., Romero, G. D. e Palacios, R. (1992). Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* are required for optimal symbiotic performance. *J. Bacteriol.* **174**: 5183-5189.
- Bromfield, E. S. P., Sinha I.B. e Wolynetz, M. S. (1986). Influence of Location, Host Cultivar, and Inoculation on the Composition of Naturalized Populations of *Rhizobium meliloti* in *Medicago sativa* Nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 1077-1084.

- Bromfield, E. S., Lewis, D. M. e Barran L. R. (1985). Cryptic plasmid and rifampin resistance in *Rhizobium meliloti* influencing nodulation competitiveness. *J. Bacteriol.* 164: 410-413.
- Bromfield, E.S.P., Jones, D.G. (1979). The competitive ability and symbiotic effectiveness of doubly labelled resistant mutants of *Rhizobium trifolii*. *Ann. Appl. Biol.* 91: 211-219.
- Broughton, W.J., Jabbouri, S. E Perret, X. (2000). Keys to symbiotic harmony. *J. Bacteriol.* 182: 5641-5652.
- Brunel, B., Cleyet-Marel, J.C., Normand, P., Bardin, R. (1988). Stability of *Bradyrhizobium japonicum* after introduction into soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 2636-2642.
- Bushby, H.V.A. (1981). Changes in the numbers of antibiotic-resistant rhizobia in the soil and rhizosphere of field-grown *Vigna mungo* cv. *Regur*. *Soil Biol. Biochem.*, 13: 241-245.
- Bushby, H.V.A. (1982). Ecology. In: Nitrogen Fixation, Vol. 2, *Rhizobium*, Broughton, W. J., eds. Oxford, Clarendon Press, 35-75.
- Bushby, H.V.A., Marshall, K.C. (1977). Water status of rhizobia in relation to their susceptibility to desiccation and to their protection by montmorillonite, *J. Gen. Microbiol.*, 99: 19-27.
- Büttner, D., e Bonas, U. (2002). Getting across-bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *Emb. J.*, 21:5313-5322.
- Büttner, D., e Bonas, U. (2002). Port of entry—the type III secretion translocon. *Trends Microbiol.* 10: 186-192.
- Caetano-Anolles, G., Wall, L.G., DeMichell, A.T., Macchi, E.M., Bauer, W.D., Favelukes, G. (1988). Role of motility and chemotaxis in efficiency of nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.*, 86: 1228-1235.
- Caradus, J.R. (1980). Distinguishing between grass and legume species for efficiency of phosphorus use, *N. Z. J. Agric. Res.*, 23: 75-81.
- Cárdenas, L., Domínguez, J., Quinto, C., López-Lara, I.M., Lugtenberg, B.J.J., Spaink, H.P., Rademaker, G.J., Haverkamp, J., Thomas-Oates, J.E. (1995). Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*. *Plant Mol. Biol.* 29: 453-464.
- Carranca, C. Varennes, A de, Rolston, D. (1999). Biological Nitrogen fixation by fababean, pea and chickpea, under field conditions, estimated by the 15N isotope dilution technique. *Europ. J. Agronomy*, 10: 49-56.
- Carvalho de, M.M., Andrew, C.S., Edwards, D.G., Asher, C.J. (1981). Aluminum toxicity, nodulation, and growth of *Stylosanthes* species. *Agron. J.*, 73: 261-265.
- Carvalho, M. J. G. P. R. (1987). Factores limitantes e técnicas culturais da produção de trigo no Alentejo. Tese de Doutorado, Universidade de Évora.
- Carvalho, M. J. G. P. R., Alho, L. M. C. V., Azevedo, A. L., Marques, J. F. (1990). Efeito dos antecedentes culturais no restabelecimento natural de uma pastagem de trevo subterrâneo. *Pastagens e Forragens*, 11: 33-49.
- Cassman, K.G., Whitney, A.S., Fox, R.L. (1981). Phosphorus requirements of soybean and cowpea as affected by mode of N nutrition. *Agon. J.*, 73: 17-22.
- Cassman, K.J., Munns, D.N., Beck, D.P. (1981). Growth of *Rhizobium* strains at low concentrations of phosphate. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 45: 520-523.
- Castillo, C. B. (1989). Tolerancia a acidez en *Rhizobium trifolii*. *Pastagens e Forragens*, 10: 21-

25.

- Chatel, D.L., Greenwood, R.M. (1973a). The location and distribution in soil of rhizobia under senesced annual legume pastures. *Soil Biol. Biochem.*, **5**: 799-808.
- Chatel, D.L., Greenwood, R.M. (1973b). Differences between strains of *Rhizobium trifolii* in ability to colonize soil and plant in the absence of their specific host plants. *Soil Biol. Biochem.*, **5**: 809-813.
- Chatel, D.L., Greenwood, R.M., Parker, C.A. (1968) Saprophytic competence as an important character in the selection of *Rhizobium* for inoculation. Trans. 9<sup>th</sup> Int. Congr. Soil Sci., Sydney, Angus and Robertson, **2**: 65-73.
- Chatel, D.L., Parker, C.A. (1973a). Survival of field-grown rhizobia over the dry summer period in western Australia. *Soil Biol. Biochem.*, **5**: 415-423.
- Chatel, D.L., Parker, C.A. (1973b). The colonization of host-root and soil by rhizobia-1. Species and strain differences in the field. *Soil Biol. Biochem.*, **5**: 425-432.
- Cheung, J., Danna, K., O'Connor, E., Price, L. e Shand, R. (1997) Isolation, sequence, and expression of the gene encoding halocin H4, a bacteriocin from the halophilic archaeon *Haloferaz mediterranei* R4. *J. Bacteriol.* **179**, 548-551.
- Chun, J.Y., Stacey, G. (1994). A *Bradyrhizobium japonicum* gene essential for nodulation competitiveness is differentially regulated from two promoters. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **7**:248-255.
- Cooper, J.E. (1982). Acid production, acid tolerance, and growth rate of *Lotus* rhizobia in laboratory media. *Soil Biol. Biochem.*, **14**, 127-137.
- Corman, A., Crozat, Y., Cleyet-Marel, J.C. (1987). Modelling of survival kinetics of some *Bradyrhizobium japonicum* strains in soils. *Biol. Fertil. Soils*, **4**: 79-84.
- Cornelis, G.R., van Gijsegem, F. (2000). Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbio.*, **54**: 735-774.
- Coventry, D.R., Hirth, J.R., Fung, K.K.H. (1987). Nutritional restraints on subterranean clover grown on acid soils used for crop-pasture rotation. *Aust. J. Agric. Res.*, **38**: 163-176.
- Cregan, P. B., and H. H. Keyser. (1986). Host restriction of nodulation by *Bradyrhizobium japonicum* strain USDA 123 in soybean. *Crop Science*, **26**:911-916.
- Crozat, Y., Cleyet-Marel, J.C. (1984). Problèmes méthodologiques posés par l'extraction et la récupération des bactéries telluriques pour leur quantification par immunofluorescence. *Agronomie*, **4**: 603-610.
- Crozat, Y., Cleyet-Marel, J.C., Giraud, J.J., Obaton, M. (1982). Survival rates of *Rhizobium japonicum* populations introduced into different soils. *Soil Biol. Biochem.*, **14**: 401-405.
- Danzo, S. K. A., Alexander, M. (1974). Survival of two strains of *Rhizobium* in soil. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* **38**, 86-89.
- Date, R. A. (2000). Inoculated legumes in cropping systems of the tropics. *Field Crops Res.*, **65**: 123-136.
- Date, R.A., Halliday, J. (1979). Selecting *Rhizobium* for acid, infertile soils of the tropics. *Nature*, **277**: 62-74.



- Davis, E. O., Evans, I. J., e Johnston, A.W.B. (1988). Identification of nodX, a gene that allows *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* strain TOM to nodulate cv. Afghanistan peas. *Mol. Gen. Genet.* **212**:531-535.
- Davis, E. O., Evans, I. J. e Johnston, A. W. B. (1988) Identification of nodX, a gene that allows *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* strain TOM to nodulate Afghanistan peas. *Mol. Gen. Genet.*, **212**:531-535.
- Debellé, F., Maillet, F., Vasse, J., Rosenberg, C., Billy, F., Truchet, G., Dénarié, J. e Ausubel, F. M. (1988). Interference between *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium trifolii* nodulation genes: genetic basis of *R. meliloti* dominance. *J. Bacteriol.* **170**: 5718-5727.
- Demezas, D.H., Bottomley, P.J. (1986a). Autoecology in rhizospheres and nodulating behavior of indigenous *Rhizobium trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**: 1014-1019.
- Denton, M. D., Coventry, P. J., Howieson, J. G. e Bellotti, W. D. (2002). Competition between inoculant and naturalized *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* for nodulation of annual clovers in alkaline soils. *Aust. J. Agric. Res.* **53**: 1-8.
- Diatloff, A., Brockwell, J. (1976). Ecological studies of root-nodule bacteria introduced into field environments. 4. Symbiotic properties of *Rhizobium japonicum* and competitive success in nodulation of two *Glycine max* cultivars by effective and ineffective strains. *Aust. J. Exp. Agric. ans Anim. Husb.*, **16**:514-521.
- Díaz, C.L., Melchers, L.S., Hooykaas. P.J.J., Lugtenberg, B.J.J. e Kijne, J.W. (1989). Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Nature*, **338**: 579 – 581.
- Dilworth, M. J., Rynne, F. G., Castelli, Vivas-Marfisi, A. I.; Glenn, A. R. (1999). Survival and exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti* WSM419 are affected by calcium and low pH. *Microbiology*, **145**: 1585-1593.
- Doerge, T.A., Bottomley, P.J., Gardner, E.H. (1985). Molybdenum limitations to alfalfa growth and nitrogen content on a moderately acid high-phosphorus soil. *Agron. J.*, **77**: 895-901.
- Dowling, D. N, Broughton W. J. (1986). Competition for Nodulation of Legumes. *Annual Review of Microbiology.*, **40**: 131-157.
- Downie, J. A. (1998). Functions of rhizobial nodulation genes. In: *Rhizobiaceae*. Spaink, H.P., Kondorosi, A. e Hooykaas, P.J.J., eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Downie, J.A. (1994). Signalling strategies for nodulation of legumes by rhizobia. *Trends Microbiol.* **2**(9): 318-324.
- Duarte, I. M., de Sousa, M. T, Pereira, M. G. e Carita, T. P. (1992). Duas novas cultivares de grão de bico para sementeira antecipada no Outono: ELMO e ELVAR. *Pastagens e Forragens*, **13**: 125-134.
- Dudeja, S.S., Khurana, A.L. (1989). Persistence of *Bradyrhizobium* sp. (Cajanus) in a sandy loam. *Soil Biol. Biochem.*, **21**: 709-713.
- Dughri, M.H., Bottomley, P.J. (1984). Soil acidity and the composition of an indigenous population of *Rhizobium trifolii* in nodules of different cultivars of *Trifolium subterraneum* L.. *Soil Biol. Biochem.*, **16**: 405-411.
- Dunigan, E. P., Bollich, P. J., Hutchinson, R. L., Hicks, P. M., Zaunbrecher, F. C., Scott, S. G. e Mowers, R. P. (1984). Introduction and survival of an inoculant strain of *Rhizobium japonicum* in soil. *Agronomy J.*, **76**: 463-466.

- Efron, B. (1982). *The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans*. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia.
- Ellis, W. R., Ham, G. E. e Schmidt, E. L. (1984). Persistence and recovery of *Rhizobium japonicum* inoculum in a field soil. *Agronomy J.*, **76**: 573-576.
- England, L.S., Lee, H, Trevors, J.T. (1993). Bacterial survival in soil: effect of clays and Protozoa. *Soil Biol. Biochem.* **25**:525–531.
- Ferreira, E. M. (1983). Estudo da eficácia de estirpes de *Rhizobium* em ambiente controlado. Notas técnico-científicas, EFN-01. INIA, Lisboa.
- Ferreira, E. M. (1986). Inoculantes para leguminosas. Dissertação apresentada nas provas de acesso a Investigador Auxiliar. EFN, Instituto Nacional de Investigação Agrária.
- Ferreira, E. M. (1986). Produção e aplicação de inoculantes para leguminosas – Alguns aspectos práticos. 1º Encontro sobre Montados de Sobro e Azinho, Évora. p. 309-315.
- Ferreira, E. M., Castro, I. V. (1989). Eficácia das estirpes de *Rhizobium trifolii* isoladas de trevos indígenas colhidos em diferentes solos portugueses. Comunicação apresentada à X reunião de Primavera da S.P.P.F., Elvas.
- Ferreira, E. M., Marques, J. F. (1986). Eficácia das simbioses com *Rhizobium trifolii*. Competição entre estirpes e significado dos métodos de avaliação. *Pastagens e Forragens*, **7**:57-66.
- Ferreira, E. M., Marques, J. F. (1992). Selection of Portuguese *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strains for production of legume inoculants. I. Screening for effectiveness in laboratory conditions. *Plant and Soil*, **147**: 151-158.
- Finan T.M., S. Weidner, K. Wong, J. Buhrmester, P. Chain, F.J. Vorholter, I. Hernandez-Lucas, A. Becker, A. Cowie, J. Gouzy, B. Golding, A. Puhler. (2001). The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N<sub>2</sub>-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci U S A*: **98**: 9889-9894.
- Fink, C.R., Waggoner, P.E. e Ausubel, F. (1999). Nitrogen fertilizer: retrospect and prospect. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**:1175–1180.
- Firmin, J.L., Wilson, K.E., Carlson, R.W., Davies, A.E., e Downie, J.(1993). Resistance to nodulation of c.v. Afghanistan peas is overcome by nodX, which mediates an O-acetylation of the *Rhizobium leguminosarum* lipo-oligosaccharide nodulation factor. *Mol. Microbiol.* **10**, 351–360.
- Fobert, P. R., Roy, N., Nash, J. H. E. e Iyer, V. N. (1991). Procedure for Obtaining Efficient Root Nodulation of a Pea Cultivar by a Desired *Rhizobium* Strain and Preempting Nodulation by Other Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1590-1594.
- Francis, C. M. (1999). The need to collect new pasture and forage species. *In: Genetic Resources of Mediterranean Pasture and Forage Legumes*. S. J. Bennet and P. S. Cocks (eds.). Kluwer Academic Pub., 90-95.
- Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W.J. (1997). Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature*, **387**: 394 – 401.
- Fry, J., Wood, M., Poole, P.S. (2001). Investigation of *myo*-inositol catabolism in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and its effect on nodulation competitiveness. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **14**:1016–1025.

- Fuhrmann, J., Davey, C.B., Wollum, A.G. (1986). Desiccation tolerance of clover rhizobia in sterile soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **50**: 639-644.
- Gagnon, H. e Ibrahim, R. K. (1998). Aldonic Acids: A Novel Family of nod Gene Inducers of Mesorhizobium loti, Rhizobium lupini, and Sinorhizobium meliloti. *The American Phytopathological Society*, **11 (10)**: 988-998.
- Gaur, Y. D., Sen, A. N. (1979). Cross-inoculation group specificity in *Cicer-Rhizobium* symbiosis. *New Phytol.*, **83**:145-154.
- George, M. L. C., F. M. Robert. (1991). Autoregulatory response of Phaseolus vulgaris L. to symbiotic mutants of Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2687-2692.
- George, T., Bohlool, B. B. e Singleton, P. W. (1987). Bradyrhizobium japonicum-Environment Interactions: Nodulation and Interstrain Competition in Soils along an Elevational Transect *Appl Environ Microbiol.* **53**: 1113-1117.
- Gibson, A. H., Date, R. A. e Brockwell, J. (1976).A comparison of competitiveness and persistence amongst five strains of *Rhizobium trifolii*. *Soil Biol. Biochem.*, **8**: 395-401.
- Gibson, A., H. (1987). Evaluation of nitrogen fixation by legumes in the greenhouse and growth chamber. In: Symbiotic Nitrogen Fixation Technology. Gerald H. Elkan (ed). marcel Dekker, Inc., New York. 321-370.
- Gibson, A.H., Brockwell, J. (1968). Symbiotic characteristics of subspecies of Trifolium subterraneum L. *Aust. J. Agric. Res.*, **19**:891-905.
- Gibson, A.H., Curnow, B.C., Bergersen, F.J., Brockwell, J., Robinson, A.C. (1975). Studies of field populations of *Rhizobium*: Effectiveness of strains of *Rhizobium trifolii* associated with *Trifolium subterraneum* L. pastures in southeastern Australia. *Soil Biol. Biochem.*, **7**: 95-102.
- Graham, P.H., Viteri, S.E., Mackie, F., Vargas, A.T., Palacios, A. (1982). Variation in acid tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. *Field Crops Res.*, **5**: 121-128.
- Gray, T. R. G., Williams, S. T. (1971). Microbial productivity in soil. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* **21**: 255-281.
- Gueguen, A., Nakache, J.-P. (1988). Méthode de discrimination basée sur la construction d'un arbre de décision binaire. *Reveu de Statistique Apliquée*, **XXXVI** : 19-38.
- Gueguen, A., Nakache, J.-P. e Nicolau-Molina, J.(1996). SPAD•S® Version 3. Segmentation par Arbre de Décision Binaire Discrimination et Régréssion. CISIA, Saint-Mandé.
- Hagedorn, C. (1979) Relationship of antibiotic resistance to effectiveness in *Rhizobium trifolii* populations. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **43**: 921-925.
- Hahn, M., Studer, D. (1986). Competitiveness of a nif<sup>-</sup> Bradyrhizobium japonicum mutant against the wild-type strain. *FEMS Microbiology Letters*, **33**: 143-145.
- Hambdi, Y. A. (1971). Soil-water tension and the movment of rhizobia. *Soil Biol. Biochem.*, **3**: 121-126.
- Hardi A.E., Bisseling, T., (1998). The Rhizobiaceae. Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria. Ed. Spaink, H.P., Kondorosi, A., Hooykaas, P.J.J.. Dortrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers., pp. 435-464.

- Hardi, A., Spaink, H.P., Bissenling, T. E Brewin, N.J. (1989). Diversity of root nodulation and rhizobial infection processes. *In The Rhizobiaceae*. Edited by Spaink, H.P., Kondorosi, A. E Hooykaas, P.J.J. pp.347-360. Kluwere Academic Publishers, London.
- Hardson, G., Jones, D. G. (1979). Effect of temperature on competition amongst strains of *Rhizobium trifolii* for nodulation of two white clover varieties. *Ann. Appl. Biol.*, **92**: 229-36.
- Harper, J. E. e Gibson, A. H. (1984). Differential nodulation tolerance to nitrate among legume species. *Crop Sci.*, **24**: 797-801.
- Harrison, S. P., Young e Jones, D. G. (1989). *Rhizobium* population genetics: Host preference and strain competition effects on the range of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* genotypes isolated from natural populations. *Soil Biol. Biochem.*, **21**: 981-986.
- Hartel, P.G., Alexander, M. (1983). Growth and survival of cowpea rhizobia in acid, aluminium-rich soils. *Soil Sc. Soc. Am. J.*, **47**,502-506.
- Hartel, P.G., Alexander, M. (1986). Role of extracellular polysaccharide production and clays in the desiccation tolerance of cowpea rhizobia. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **50**: 1193-1198.
- Hartel, P.G., Whelan, A.M., Alexander, M. (1983). Nodulation of cowpea and survival of cowpea rhizobia in acid, aluminium-rich soils. *Soil Sc. Soc. Am. J.*, **47**: 514-517.
- Hartel, PG; Alexander, M. (1984). Temperature and desiccation tolerance of cowpea rhizobia. *Can. J. of Microbiol.* **30**: 820-823.
- Haukka, K. (1997). Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from tropical tree legumes. Tese de Doutoramento. Department of Applied Chemistry and Microbiology. University of Helsinki.
- Hebb, D. M., Richardson, A. E., Reid, R. e Brockwell, J. (1998). PCR as an ecological tool to determine the establishment and persistence of *Rhizobium* strains introduced into the field as seed inoculant. *Aust. J. Agric. Res.*, **49**: 923-934.
- Hebb, D.M., Richardson, A.E., Reid, R., Brockwell, J. (1998). PCR as an ecological tool to determine the establishment and persistence of *Rhizobium* strains introduced into the field as a seed inoculant. *Austr. J. Agric. Res.*, **49**: 923-934.
- Heinrich, K., Ryder, M.H., and Murphy, P.J. (2001). Early production of rhizopine in nodules induced by *S. meliloti* strain L5-30. *Can. J. Microbiol.*, **47**:165-171.
- Hedges, L.V.; Olkin, I. (1985). Statistical methods for meta-analysis. London: Academic Press, 1985. 369p.
- Henzell, E.F. (1988). The role of biological nitrogen fixation research in solving problems in tropical agriculture. *Plant and Soil*, **108**: 15-21.
- Herridge, D. F., Turpin, J. E., Robertson, M. J. (2001). Improving nitrogen fixation of crop legumes through breeding and agronomic management: analysis with simulation modeling. *Aust. J. Exp. Agriculture*. **41**: 391-401.
- Heynen, C.E., van Elsas, J.D., Kurkman, P.J., van Veen, J.A. (1988). Dynamics of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* into soil; the effect of bentonite clay on predation by protozoa. *Soil Biol. Biochem.*, **20**: 483-488.
- Hillman, J., Dzuback, A. e Andrews, S. (1987). Colonization of the human oral cavity by a *Streptococcus mutans* mutant producing increased bacteriocin. *J. Dent. Res.*, **66**:1092-1094.

- Hiltbold, A.E., Patterson, R.M., Reed, R.B. (1985). Soil populations of *Rhizobium japonicum* in a cotton-corn-soybean rotation. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **49**: 343-348.
- Hirsch, P. R. (1978) Studies of plasmids in *Rhizobium leguminosarum*. Tese de Doutorado, East Anglia University, Norwich, England.
- Hirsch, P. R. (1979) Plasmid-determined bacteriocin production in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.*, **113**:219-228.
- Hirsch, P. R., Van Montagu, M., Johnston, A. W. B., Brewin, N. J. e Schell, J. (1980). Physical identification of bacteriocinogenic nodulation, and other plasmids in strains of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.*, **120**: 403-412.
- Howard, J. B., Rees, D.C. (1996). Sturctural basis of biological nitrogen fixation. *Chemical Reviews*, **96**: 2965-2982.
- Howieson, J. G. (1999). The host- rhizobia relationship. In: S. J. Bennett e P. S. Cocks (eds), Genetic Resources of Mediterranean Pasture and Forrage Legumes. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Howieson, J. G., Ballard, R. A. (2004). Optimising the legume symbiosis in stressful and competitive environments within Southern Australia-some contemporary thoughts. *Soil Biol. Biochem.*, **36**: 1261-1273.
- Howieson, J. G., Ewing, M. A., D'Antuono, M. F. (1988). Selection for acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Plant and Soil*, **105**: 179-188.
- Howieson, J. G., Robson, A. D., Abbott, L. K. (1992). Calcium modifies pH effects on the growth of acid-tolerant and acid-sensitive *Rhizobium meliloti*. *Aust. J. Agric. Res.*, **43**: 765-772.
- Howieson, J.G., O'Hara, G.W., Carr, S.J. (2000). Changing roles for legumes in Mediterranean agriculture: developments from an Australian perspective. *Field Crops Res.* **65**: 107-122.
- Hynes, M. F., Brucksch, K.e Priefer, U. (1988). Melanin production by a cryptic plasmid in a *Rhizobium leguminosarum* strain. *Arch. Microbiol.*, **150**:326-332.
- Hynes, M. F., Finan, T. M. (1998). General genetic knowledge. In: The *Rhizobiaceae*. H. P. Spaink, A. Kondorisi e P. J. J. Hooykaas (ed). Kluwer Academic Pub., Netherlands.
- Hynes, M. F., O'Connel, M. P. (1990). Host plant effect on competition among strains of *Rhizobium leguminosarum*. *Can. J. Microbiol.*, **36**: 864-869.
- Hynes, M.F. e N.F. MacGregor. (1990). Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Microbiol.* **4**:567-574.
- Israel, D.W. (1987). Investigation on the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation. *Plant Physiol.*, **84**: 835-840.
- Issa, S., Wood, M. (1995). Multiplication and survival of chickpea and bean rhizobia in dry soils: the influence of strains, matric potential and soil texture. *Soil Biol. Biochem.*, **27**: 785-792.
- Jack, W. R., Tagg, J. R. e Ray, B. (1995). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Reviews*, **59**: 171-200.
- Jarvis, B.W.D., Wart, L.J.H., Slade, E.A. (1989). Expression by soil bacteria of nodulation genes from *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**: 1426-1434.

- Jiang, G., Krishnan, A.H., Kim, Y.-W., Wacek, T.J., and Krishnan, H.B. (2001). A functional *myo*-inositol dehydrogenase gene is required for efficient nitrogen fixation and competitiveness of *Sinorhizobium fredii* USDA191 to nodulate soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Appl. Environ. Microbiol.*, **183**:2595–2604.
- Johnson, H.W., Means, U.M., Weber, C.R. (1965). Competition for nodules sites between strains of *Rhizobium japonicum*. *Agron. J.*, **57**:179-185.
- Johnson, R.A. e Wichern, D.W. (1998). Applied Multivariate Statistical Analysis. 4<sup>th</sup> ed., Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River.
- Johnston, A. W. B., Beynon, J. L., Buchanan-Wollaston, A. V., Hirsch, P. R. e Beringer, J. E. (1978). High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of *Rhizobium*. *Nature*, **276**:634-636.
- Jones, D.G., Bromfield, E.S.P. (1978). A study of the competitive ability of streptomycin and spectinomycin mutants of *Rhizobium trifolii* using various marker techniques. *Annals Appl. Biology*, **88**: 448-450.
- Jordan, D. C. (1984). Family III. *Rhizobiaceae* Conn 1938, 321AL. In *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, pp. 234-256. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore:Williams e Wilkins.
- Josey, D. P., Beynon, J. L., Johnston, A. W. B. e Beringer, J. E. (1979). Strain identification in *Rhizobium* using intrinsic antibiotic resistance. *J. Appl. Bacteriol.*, **46**: 343-350.
- Kaneko T., Nakamura Y., Sato S., Asamizu E., Kato T., Sasamoto S., Watanabe A., Idesawa K., Ishikawa A., Kawashima K., Kimura T., Kishida Y., Kiyokawa C., Kohara M., Matsumoto M., Matsuno A., Mochizuki Y., Nakayama S., Nakazaki N., Shimpo S., Sugimoto M., Takeuchi C., Yamada M., Tabata S. (2000). Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* **7**: 331-338.
- Keatinge, J. D. H., Chapanian, N. e Saxena, M. C. (1988). Effect of improvement management of legumes in a legume-cereal rotation on field estimates of crop nitrogen uptake and symbiotic nitrogen fixation in northern Syria. *J. Agric. Sci.*, **110**: 651-659.
- Kennedy, A.C., Wollum, A.G. (1988). Enumeration of *Bradyrhizobium japonicum* in soil subjected to high temperature: Comparison of plate count, most probable number and fluorescent antibody techniques. *Soil Biol. Biochem.*, **20**: 933-937.
- Kessel, C., Hartley, C. (2000). Agricultural management of grain legumes: has it led to an increase in nitrogen fixation? *Field Crops Res.*, **65**:165-181.
- Keyser, H.H., Munns, D.N. (1979). Tolerance of rhizobia to acidity, aluminum, and phosphate. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **43**: 519-523.
- Keyser, H. H., Li, F. (1992). Potential for increasing biological nitrogen fixation in *leguminosmm* biovar *trifolii*. *Soil Biol. Biochem.* **21**: 437-442
- Kijne, J. W. (1992). The *Rhizobium* infection process. In: Biological Nitrogen Fixation. G. Stacey, H. Burris and H. J. Evans (eds). Chapman & Hall, London, 349-398.
- Kim, M.K., Edwards, D.G., Asher, C.J. (1985). Tolerance of *Tifolium subterraneum* cultivars to low pH. *Aust. J. Agric. Res.*, **36**: 569-578.
- Kingsley, M.T., Bohlool, B.B. (1981). Release of *Rhizobium* spp. from tropical soils and recovery for immunofluorescence enumeration. *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**: 241-248.

- Kinzig, A.P., Socolow, R.H. (1994). Human impacts on the nitrogen cycle. *Physics Today*, **94**: 24-31.
- Konisky, J. (1982). Colicins and other bacteriocins with established modes of action. *Annu. Rev. Microbiol.*, **36**: 125-144.
- Krishnan, H. B. (2002). *NoIX* of *Sinorhizobium fredii* USDA257. a type III-secreted protein involved in host range determination, is located in the infection threads of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) and soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) nodules. *J. Bacteriol.*, **184**: 831-839.
- Kucey, R.M.N., Hynes, M.F. (1989). Populations of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* and *viciae* in fields of bean or pea in rotation with nonlegumes. *Can. J. Microbiol.*, **35**: 661-667.
- Lagares, A., Cartano-Anollés, G., Neihaus, K., Lorenzen, K., Ljunggren, H. D., Pühler, A. e Favelukes, G. (1992). A *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant altered in competitiveness for nodulation in alfalfa. *J. Bacteriol.*, **174**:5941-5952.
- Lawson, K.A., Barnett, Y.M., McGilchrist, C.A. (1987). Environmental factors influencing numbers of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and the its bacteriophages in field soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**: 1125-1131.
- Lebart, L., Morineau, A. e Piron, M. (2000). *Statistique Exploratoire Multidimensionnelle*. 3<sup>ème</sup> éd., Dunod, Paris.
- Lebart, L., Morineau, A. e Warwick, K.M. (1984). *Multivariate Descriptive Statistical Analysis*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Lebart, L.M.A., Lambert, T. e Pleuvret, P. (1996). *SPAD<sup>®</sup> Version 3. Manuel de Référence*. CISIA, Saint-Mandé.
- Lee, J.S, Brown, G.G, Verma, D.P. (1983). Chromosomal arrangement of leghemoglobin genes in soybean. *Nucleic Acids Res.* **11**:5541-5553.
- Leitão, T. (1986). 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.
- Lennox, L.B., Alexander, M. (1981). Fungicide enhancement of nitrogen fixation and colonization of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium phaseoli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**: 404-411.
- Leung, K., Bottomley, P.J. (1987). Influence of phosphate on the growth and nodulation characteristics of *Rhizobium trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**: 2098-2105.
- Lewis, D. M., Bromfield, E. S. P. e Berran, L. R. (1987). Effect of rifampin resistance on nodulating competitiveness of *Rhizobium meliloti*. *Can. J. Microbiol.*, **33**: 343-345.
- Lie, T. A. (1984). Host genes in *Pisum sativum* L. conferring resistance to European *Rhizobium leguminosarum* strains. *Plant and Soil*, **82**: 415-42.
- Lie, T.A. (1969). Effect of low pH on different phases of nodule formation in pea plants. *Plant and Soil*, **31**: 391-406.
- Limpens, E., Franken, C., Smit, P., Willemsse, J., Bisseling, T. e Geurts, R. (2003). LysM Domain Receptor Kinases Regulating Rhizobial Nod Factor-Induced Infection. *Science*, **302**: 630 - 633.

- Lindstrom, K., Sarsa, M. -L., Polkunen, J., Kansanen, P. (1985). Symbiotic nitrogen fixation of *Rhizobium (Galega)* in acid soils, and its survival in soil under acid and cold stress. *Plant and Soil*, **87**: 293-302.
- Liu, R. L., Tran, V. M. e Schmidt, E. L. (1989). Nodulation competitiveness of a nonmotile Tn7-mutant of *Bradyrhizobium japonicum* in nonsterile soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**:1895-1900.
- Lochner, H.H., Strijdom, B.W., Law, I.J. (1989). Unaltered nodulation competitiveness of a strain of *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) after a decade in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**: 3000-3008.
- Loneragan, J.F., Meyer, D., Fawcett, R.G., Anderson, A.J. (1955). Lime pelleted clover seed for nodulation on acid soil. *J. Aust. Inst. Agric. Sci.*, **21**: 264-265.
- Long, S.R. e Ehrhardt, D.W. (1989). New route to a sticky subject. *Nature*, **338**: 545-546.
- Maças, I. M. V. D. (1994). Seleção morfológica e fisiológica para a resistência à secura em grão de bico (*Cicer arietinum* L.). Tese de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia.
- Madsen, E. B., Madsen, L. H., Radutoiu, M., Rakwalska, K., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N. e Stougaard, J. (2003). A receptor kinase gene of the LYSM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature*, **425**:637-640.
- Mahler, R.L., McDole, R.E. (1987). Effect of soil pH on crop yield in Northern Idaho, *Agron. J.*, **79**: 751-755.
- Mahler, R.L., Wollum, A.G. (1980). Influence of water potential on the survival of rhizobia in a goldsboro loamy sand. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **44**: 988-992.
- Mahler, R.L., Wollum, A.G. (1981a). The influence of soil water potential and soil texture on the survival of *Rhizobium japonicum* and *Rhizobium leguminosarum* isolates in the soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **45**: 761-766.
- Mahler, R.L., Wollum, A.G. (1981b). Seasonal variation of *Rhizobium trifolii* in clover pastures and cultivated fields in North Carolina. *Soil Sci.*, **132**: 240-246.
- Malek, W., Inaba, M., Ono, H., Kaneko, Y. e Murroka, Y. (1998). Competition for *Astragalus sinicus* root nodule infection between its native microsymbiont *Rhizobium huakuii* by *rengae* B3 and *Rhizobium* sp. ACMP 18 strain, specific for *Astragalus cicer*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**:261-265.
- Marie, C., Deakin, W.J., Viprey, V., Kopcinska, J., Golinowski, W., Krishnan, H.B., Perret, X. e Broughton, W.J. (2003). Characterization of Nops, nodulation outer proteins, secreted via type III secretion system of NGR234. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**: 743-751.
- Marshall, K.C. (1969). Studies by microelectrophoretic and microscopic techniques of the sorption of illite and montmorillonite to rhizobia. *J. Gen. Microbiol.*, **56**: 301-306.
- Martínez-Romero, E., Rosenblueth, M. (1990). Increased bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodulation competitiveness of genetically modified *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**:2384-2388.
- Maximino, C. F. P. (1992). Ecologia de populações nativas de *Rhizobium* em condições de Montado. Tese de Licenciatura. Universidade de Évora.
- May, S.W., Bohlool, B.B., (1983). Competition among *Rhizobium leguminosarum* strains for nodulation of lentils (*Lens esculenta*). *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**: 960-965.



- McLoughlin, T. J., Bordeleau, L. M., Dunican, L. K. (1984). Competition studies with *Rhizobium trifolii* in a field experiment. *J. Appl. Bacteriol.*, **56**:131-135.
- McWilliam, J.R., Clements, R.J., Dowling, P.M. (1969). Some factors influencing the germination and early seedling development of pasture plants. *Aust. J. Agric. Res.*, **21**: 19-32.
- Mellor, H.Y., Glenn, A.R., Arwas, R., Dilwoeth, M.J. (1987). Symbiotic and competitive properties of motility mutants of *Rhizobium trifolii* TA1. *Arch. Microbiol.*, **148**: 34-39.
- Moawad, H., Badr El-Din, S. M. S. e Abdel-Aziz, R. A. (1998). Improvement of biological nitrogen fixation in Egyptian winter legumes through better management of *Rhizobium*. *Plant and Soil*, **204**: 95-106.
- Moawad, H., Bohlool, B.B., (1984). Competition among *Rhizobium* spp. for nodulation of *Leucaena leucocephala* in two tropical soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**: 5-9.
- Moawad, H.A., Ellis, W.R., Schmidt, E.L. (1984). Rhizosphere response as a factor in competition among three serogroups of indigenous *Rhizobium japonicum* for nodulation of field-grown soybeans. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**: 607-612.
- Montgomery, D.C. (1991). Introduction to Statistical Quality Control. 2<sup>nd</sup> ed., John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Mullen, M.D., Israel, D.W., Wollum, A.G. (1988). Effects of Bradyrhizobium japonicum and soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) phosphorus nutrition on nodulation and dinitrogen fixation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**: 2387-2392.
- Munns, D.N. (1968). Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture. I. Acid-sensitive steps. *Plant and Soil*, **28**: 129-146.
- Munns, D.N., Fox, R.L., Koch, B.L. (1977). Influence of lime on nitrogen fixation by tropical and temperate legumes. *Plant and soil*, **46**: 591-601.
- Munns, D.N., Hohenberg, T.S., Righetti, T.L., Lauter, D.J. (1981). Soil acidity tolerance of symbiotic and nitrogen-fertilized soybeans. *Agron. J.*, **73**: 407-410.
- Munns, D.N., Keyser, H.H., Fogle, V.W., Hohenberg, J.S., Righetti, T.L., Lauter, D.L., Zaroug, M.G., Clarkin, K.L., Whitacre, K.W. (1979). Tolerance of soil acidity in symbioses of mung bean with rhizobia. *Agron. J.*, **71**: 256-260.
- Murphy, P.J., Wexler, M., Ggzemski, W., Rao, J.P., e Gordon, D. (1995). Rhizopines: their role in symbiosis and competition. *Soil Biol. Biochem.* **27**:525-529.
- Newcomb, W. (1981). Nodule morphogenesis and differentiation. In: Biology of the Rhizobiaceae. K. L. Giles and A. G. Atherly (eds). Academic Press, New York. 247-297.
- Newcomb, W., Sippel, D.e Peterson, R. L. (1979). The early morphogenesis of *Glycine max* and *Pisum sativum* root nodules. *Can. J. Bot.*, **57**:2603-2616.
- Nutman, P.S., Ross, G.J.S. (1970). *Rhizobium* in the soils of the Rothamsted and Woburn farms. Rothamsted Experimental Report for 1970, Part 2, pp. 148-167.
- Obaton, M. M. (1971). Utilisation de mutants spontanés résistants aux antibiotiques pour l'étude écologique des *Rhizobium*. *C. R. Acad. Sc. Paris*, **272** :2630-2635.
- Obaton, M., Bouniols, A., Piva, G. e Vadez, V. (2002). Are *Bradurhizobium japonicum* stable during long term stay in soil? *Plant and Soil*, **245**: 315-326.

- O'Hara, G. W., Goss, T. J., Dilworth, M. J., and Glenn, A. R. 1989. Maintenance of intracellular pH and acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1870-1876.
- Oliveira, A. N. P. (1989). Interações bactéria-hospedeiro-meio ambiente no estabelecimento da simbiose por *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. Tese de Doutorado. Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia.
- Oliveira, W. S., Meinhardt, L. W., Sessitsch, A. e Tsai, S. M. (1998). Analysis of *Phaseolus-Rhizobium* interactions in a subsistence farming system. *Pant and Soil*, **204**:107-115.
- Oresnik, I. J., Liu, S.L., Yost, C.K., and Hynes, M.F. (2000). Megaplasmid pRm2011a of *Sinorhizobium meliloti* is not required for viability. *J. Bacteriol.*, **182**: 3582-3586.
- Oresnik, I. J., Pacarynyuk, L. A., O'Brien, S. A. P., Yost, C. J.e Hynes, M. F. (1998). Plasmid encoded catabolic genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*: evidence for a plant-inducible rhamnose locus involved in competition for nodulation. *MPMI*, **11**:1175-1185.
- Ozanne, P. G.; Keay, J.; Biddiscombe, E. F. (1969): The comparative applied phosphate requirements of eight annual pasture species. *Aust. J. Agric. Res.*, **20**: 809-817.
- Ozawa, T., Ogara, H., Doi, R. e Komai, Y. (1992). Isolation of transposon Tn5-induced hydrophobic mutants of a *Bradyrhizobium japonicum* strain with improved competitive nodulation abilities. *Sci. Plant Nutr.*, **38**: 545-552.
- Ozawa, T., Yamaguchi, M. (1986). Fractionation and estimation of particle-attached and unattached *Bradyrhizobium japonicum* strains in soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**: 911-914.
- Pankhurst, C. E. (1977). Symbiotic effectiveness of antibiotic-resistant mutants of fast-and slow-growing strains of *Rhizobium* nodulating *Lotus* species. *Can. J. Microbiol.*, **23**: 1026-1033.
- Pankhurst, C., Macdonald, P. e Reeves, J. (1986). Enhanced nitrogen fixation and competitiveness for nodulation of *Lotus pedunculatus* by a plasmid-cured derivative of *Rhizobium loti*. *J. Gen. Microbiol.*, **132**: 2321-2328.
- Papastylianou, I. (1987). Amount of nitrogen fixed by forage, pasture and grain legumes in Cyprus, estimated by the A-value and a modified difference method. *Plant and Soil*, **104**: 23-29.
- Parker, C.A., Trinick, M.J., Chatel, D.L. (1977). Rhizobia as soil and rhizosphereinhabitants. In: A Treatise on Dinitrogen Fixation, Hardy, R. W. F. and Gibson, A. H., eds., New York, Wiley, pp.311-352.
- Parniske M., Downie J. A. (2003). Plant biology: locks, keys and symbioses. *Nature* **425**: 569-570.
- Pepper, I. L., Josephson, K. L., Nautiyal, C. S. e Bourque (1989). Strain identification of highly-competitive bean rhizobia isolated from root nodules: Use of fluorescent antibodies, plasmid profiles and gene probes. *Soil Biol. Biochem.*, **21**: 749-753.
- Pereira, M. G., de Sousa, M. T. e Duarte, I. M. (1992). Produção de grão de bico em Portugal – Potencial e estrangulamentos. *Pastagens e Forragens*, **13**: 115-124.
- Perret, X., Staehelin, C. e Broughton W.J. (2000). Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **64**: 180-201.
- Postgate, J.R. (1982). The fundamentals of nitrogen fixation. Cambridge, Cambridge University Press, 252 pp.

- Postma, J., van Elsas, J.D., Govaert, J.M., van Veen, J.A. (1988). The dynamics of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* introduced into soil as determined by immunofluorescence and selective plating techniques. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **53**: 251-260.
- Postma, J., van Veen, J. A. (1990). Habitable pore space and survival of *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*. *Soil Biol. Biochem.* **22**: 607-613.
- Postma, J., van Veen, J.A., Walter, S. (1989). Influence of different initial soil moisture contents on the distribution and population dynamics of introduced *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Soil Biol. Biochem.* **21**: 437-442.
- Poupot, R., Martinez-Romero, E., Gautier, N. e Promé, J. C. (1995). Wild type *Rhizobium etli*, a bean symbiont, produces acetyl-fucosylated, N-methylated, and carbamoylated nodulation factors. *J. Biol. Chem.*, **270**: 6050-6055.
- Poupot, R., Martinez-Romero, e Promé, J. C. (1993). Nodulation factors from *Rhizobium tropici* are sulfated or non-sulfated chitopentasaccharides containing na N-methyl-N-acetylglucoseamine terminus. *Biochemistry*, **32**:10430-10435.
- Ramirez, C., Alexander, M. (1980). Evidence suggesting protozoan predation on *Rhizobium* associated with germinating seeds and in the rhizosphere of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**: 492-499.
- Rasmussen, P.E., Rohde, C.R. (1989). Soil acidification from ammonium-nitrogen fertilization in moldboard plow and stubble-mulch wheat-fallow tillage. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **53**: 119-122.
- Relic, B., Perret, X., Estrada-García, M.T., Kopcinska, J., Golinowski, W., Krishnan, H B., Pueppke, S.G. e Broughton, S.G. (1994). Nod factors of *Rhizobium* are a key to the legume door. *Mol. Microbiol.* **13**: 171-178.
- Renwick, A., Jones, D. G. (1985). A comparison of the fluorescent ELISA and antibiotic resistance identification techniques for use in ecological experiments with *Rhizobium trifolii*. *J. Appl. Bacteriol.*, **58**: 199-206.
- Richardson, A.E., Simpson, R.J. (1988). Enumeration and distribution of *Rhizobium trifolii* under a subterranean clover-based pasture growing in an acid soil. *Soil Biol. Biochem.*, **20**: 431-438.
- Richardson, A.E., Simpson, R.J., Djordjevic, M.A., Rolfe, B.G. (1988). Expression of nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* is affected by low pH and by Ca and Al ions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**: 2541-2548.
- Riley, M. A. (1998). Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annu. Rev. Genet.*, **2**:255-278.
- Rivilla, R., Downie, J.A. (1994). Identification of a *Rhizobium leguminosarum* gene homologous to nodT but located outside the symbiotic plasmid. *Gene*. **24**; **144(1)**: 87-91.
- Robleto, E. A., Kmiecik, K., Oplinger, E. S., Nienhuis, J. e Triplett, E. W. (1999). Trifolitoxin production increases nodulation competitiveness of *Rhizobium etli* CE3 under agricultural conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**:2630-2633.
- Robleto, E. A., Scupham, A. J. e Triplett, E. W. (1997). Trifolitoxin production in *Rhizobium etli* strain CE3 increases competitiveness for rhizosphere colonisation and root nodulation of *Phaseolus vulgaris* in soil. *MPMI*, **10**:228-233.
- Robson, A.D. (1989). Soil Acidity and Plant Growth, New York, Academic Press, pp. 306.

- Roche, P., Mailliet, F., Plaz Janet, C., Debelle, F.R., Ferro, M., Truchet, G., Prome, J.C. e Narie, J.D. (1996). The common *nodABC* genes of *Rhizobium meliloti* are host-range determinants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 15305–15310.
- Roslycky, E. B. (1967). Bacteriocin production in the rhizobia bacteria. *Can. J. Microbiol.*, **13**: 421-433.
- Roth, L.E., Stacey, G. (1989). Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: the symbiosome membrane comes from three sources. *Europ. J. Cell Biol.*, **49**:13-23.
- Roughley, R. J., Blowes, W. M., Herridge, D. F. (1976). Nodulation of *Trifolium subterraneum* L. by introduced rhizobia in competition with naturalised strains. *Soil Biol. Biochem.*, **8**: 403-407.
- Roughley, R. J., Gemell, L. G., Thompson, J. A. e Brockwell, J. (1993). The number of bradyrhizobium sp (Lupinus) applied to seed and its effect on rhizosphere colonization, nodulation and yield of lupin. *Soil Biol. Biochem.*, **25**:1453-1458.
- Rovira, A.D. (1961). *Rhizobium* numbers in the rhizospheres of red clover and *Paspalum* in relation to soil treatment and the numbers of bacteria and fungi. *Aust. J. Agric. Res.*, **12**: 77-83.
- Rubio, L. M., Ludden, P. W. (2000). The gene products of the *nif* regulon. In: Nitrogen Fixation at the millennium. G. J. Leigh (ed). Elsevier, Amsterdam. 101-130.
- Saad, M. M., Kobayashi, H., Marie, C., Brown, I. R., Mansfield, J. W., Broughton, W. J., Deakin, W. J. (2005). NopB, a Type III Secreted Protein of *Rhizobium* sp. Strain NGR234, Is Associated with Pilus-Like Surface Appendages. *J. Bacteriol.* **187**: 1173-1181.
- Sadowsky, M. J., Graham, P. H. (1998). Soil biology of the Rhizobiaceae. In: The *Rhizobiaceae*. H. P. Spaink, A. Kondorosi e P. J. J. Hooykaas (ed). Kluwer Academic Pub., Netherlands.
- Sahl, H. G., Bierbaum, G. (1998). Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, **52**: 41-79.
- Sanjuan, J., Olivares, J. (1989). Implication of *nifA* in regulation of genes located on a *Rhizobium meliloti* cryptic plasmid that effect nodulation efficiency. *J. Bacteriol.*, **171**: 4154-4161.
- Sargent, L., Huang, S. Z., Rolfe, B. G. e Djordjevic, M. A. (1987). Split-root assays using *Trifolium subterraneum* show that *Rhizobium* infection induces a systemic response that can inhibit nodulation of another invasive *Rhizobium* strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**:1611-1619.
- Sawada, H., Kuykendall, L. D. e Young, J. M. (2003). Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J Gen Appl Microbiol*, **49**: 155-179.
- Schell, M. A. (1993). Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Ann. Rev. Microbiol.*, **47**:597-626.
- Schlaman, H. R. M., Okker, R. J. H. e Lugtenberg, B. J. J. (1992) Regulation of nodulation gene expression by *NodD* in rhizobia. *J. Bacteriol.*, **174**:5177-5182.
- Schlaman, H.R.M., Phillips, D.A. e Kondorosi, E. (1998). Genetic organization and transcriptional regulation of rhizobial nodulation genes. In: Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ (eds) The Rhizobiaceae. Kluwer Acad Publ, Dordrecht Boston London, pp. 361–386.

- Schwinghamer, E. A., Belkengren, R. P. (1968). Inhibition of rhizobia strains of *Rhizobium trifolii*: some properties of the antibiotic and of the strain. *Arch. Mikrobiol.*, **64**:130-145.
- Schwinghamer, E.A., Dudman, W.F. (1973) Evaluation of spectinomycin resistance as a marker for ecological studies with *Rhizobium* spp. *J. Appl. Bact.*, **36**: 262-272
- Scupham, A. J., Bosworth, A. H., Ellis, W. R., Wacek, T. J., Albrecht, K. A. e Triplett, E. W. (1996). Inoculation with *Sinorhizobium meliloti* RMBPC-2 increases alfalfa yield compared with inoculation with a nonengineered wild-type strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**:4260-4262.
- Sessitsch, A.G.S., Stralis-Pavese, N.W.A. e Pfeifer, U. (2002). RNA isolation from soil for bacterial community and functional analysis: evaluation different extraction and soil conservation protocol. *J. Microbiol Methods*, **51**: 171-179.
- Sinclair, M. J., Eaglesham, A. R. (1984). Intrinsic antibiotic resistance in relation to colony morphology in three populations of West African cowpea rhizobia. *Soil Biol. Biochem.*, **16**: 247-251.
- Singleton, P.W., Abdel-Magid, H.M., Tavares, J.W. (1985). Effect of phosphorus on the effectiveness of stains of *Rhizobium japonicum*. *Soil Sc. Soc. Am. J.*, **49**: 613-616.
- Singleton, P.W., El Swaify, S.A., Bohlool, B.B. (1982). Effect of salinity on *Rhizobium* growth and survival. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**: 884-890.
- Slattery, J. F., Coventry, D. R. (1999). Persistence of introduced strains of *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* in acid soils of north-eastern Victoria. *Aust. J. Exp. Agric.*, **39**: 829-837.
- Smit, G., Logman, T. J. J., Boerrigter, M. E. T. T., Kijne, J. W. e Lugtenberg, B. J. J. (1989). Purification and partial characterization of the *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* Ca<sup>2+</sup> dependent adhesin with mediates the first step in attachment of all the family *Rhizobiaceae* to plant root hair tips. *J. bacteriol.*, **171**:4054-4062.
- Smith, S. C., Bezdicecek, D. F., Turco, R. F. e Cheng, H. H. (1987). Seasonal N<sub>2</sub> fixation by cool-season pulses based on several N<sup>15</sup> methods. *Plant Soil*, **97**: 3-13.
- Soberon-Chavez, G., Najera, R. (1989). Isolation from soil of *Rhizobium leguminosarum* lacking symbiotic information. *Can. J. Microbiol.*, **35**: 464-468.
- Soedarjo, M., Borthakur, D. (1998). Mimosine, a toxin produced by the tree-legume *Leucaena* provides a nodulation competition advantage to mimosine-degrading *Rhizobium* strains. *Soil Biol. Biochem.*, **30**: 1605-1613.
- Sokal, R. R., Rohlf, F. J. (1995). *Biometry: The principles and practice in biological research*. 3<sup>rd</sup> ed., W. H. Freeman and Company, New York.
- Somasegaran, P., Hoben, H. J. (1994). *Handbook for Rhizobia. Methods in legume- Rhizobium technology*. Springer –Varlag, New York.
- Somasegaran, P., Hoben, H. J. e Gurgun, V. (1988). Effects of inoculation rate, rhizobial strain competition, and nitrogen fixation in chickpea. *Agronomy J.*, **80**: 68-73.
- Sousa, (1989). O melhoramento do grão de bico (*Cicer arietinum* L.): Algumas linhas programáticas. ENMP, Elvas.
- Sousa, M. M. T., Duarte, I. M, (1990). *Ascochyta rabiei* em grão de bico. Estratégia de melhoramento. *Pastagens e Forragens*, **11**: 179-189.
- Sprent, J.I. (2001). *Nodulation in legumes*. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, UK.

- Stein, M., Bromfield, E.P. e Dye, M. (1982). An assessment of a method based on intrinsic antibiotic resistance for identifying *Rhizobium* strains. *Ann. Appl. Biol.*, **101**: 261–267.
- Stephens, P. M., and Cooper, J. E. (1988). Variation in speed of infection of “no root hair zone” of white clover and nodulating competitiveness among strains of *Rhizobium trifolii*. *Soil Biol. Biochem.*, **20**:465-470.
- Streeter, J. G. (1994). Failure of inoculant rhizobia to overcome the dominance of indigenous strains for nodule formation. *Can. J. Microbiol.*, **40**:513-522.
- Sullivan, J.T., Trzebiatowski, J.R., Cruickshank, R.W., Gouzy, J., Brown, S.D., Elliot, R.M., Fleetwood, D.J., McCallum, N.G., Rossbach, U. e Stuart, G.S. (2002) Comparative Sequence Analysis of the Symbiosis Island of *Mesorhizobium loti* Strain R7A. *J. Bacteriol* **184**: 3086–3095.
- Surange, S., Wollum, A. G., Kumar, N. e Nautiyal, C. S. (1997). Characterization of *Rhizobium* from root nodules of leguminous trees growing in alkaline soils. *Can. J. Microbiol.*, **43**:891-894.
- Surin, B.P., Downie, J.A. (1988). Characterization of the *Rhizobium leguminosarum* genes nodLMN involved in efficient host-specific nodulation. *Mol Microbiol.*, **2**(2):173–183.
- Thies, J. E., Singleton, P. W. e Bohlool, B.B. (1991). Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**:19-28.
- Thornton, F.C., Davey, C.G. (1983). Acid tolerance of *Rhizobium trifolii* in culture media. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **47**: 496-501.
- Triplett, E. W. (1988). Isolation of genes involved in competitiveness from *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* T24. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**:3810-3814.
- Triplett, E. W., Barta, T. M. (1987) Trifolitoxin production and nodulation are necessary for the expression of superior nodulation competitiveness by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain T24 on clover. *Plant Physiol.*, **85**: 335-342.
- Triplett, E. W., Sadowsky, M. J. (1992). Genetics and competition for nodulation of legumes. *Annu. Rev. Microbiol.*, **46**: 399-428.
- Turco, R.F., Moorman, T.B., Bezdicek, D.F. (1986). Effectiveness and competitiveness of spontaneous antibiotic-resistant mutants of *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium japonicum*. *Soil Biol. Biochem.*, **18**: 259-262.
- Turgeon, B. G., Bauer, W.D. (1985). Ultrastructure of infection thread development during infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. *Planta*, **163**:328-349.
- Upchurch, R. G. (1987). Estimation of bacterial nitrogen fixation using acetylene reduction. In: Symbiotic Nitrogen Fixation Technology. Gerald H. Elkan (ed). Marcel Dekker, Inc., New York. 289-306.
- Van Kessel C, Hartley C (2000) Agricultural management of grain legumes: Has it led to an increase in nitrogen fixation? *Field Crops Res* **65**: 165-181.
- Van Veen, J.A., Ladd, J.N., Martin, J.K., Amato, M. (1987). Turnover of carbon, nitrogen, and phosphorus through the microbial biomass in soils incubated with <sup>14</sup>C-, <sup>15</sup>N-, and <sup>32</sup>P-labelled bacterial cells. *Soil Biol. Biochem.*, **19**: 559-565.

- Vandamme, P., Goris, J., Chen, W.M., De Vos, P. e Willems, A. (2002). *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Syst Appl Microbiol*, **25**: 507-512.
- Vargas, A.A.T., Graham, P.H. (1988). Phaseolus vulgaris cultivar and *Rhizobium* strain variation in acid-pH tolerance and nodulation under acid conditions. *Field Crops Res.*, **19**: 91-101.
- Vargas, A.A.T., Graham, P.H. (1989). Cultivar and pH effects on competition for nodule sites between isolates of *Rhizobium* in beans. *Plant and Soil*, **117**: 195-200.
- Verma, D. P. S., Hu, C. A. e Zhang, M. (1992). Root nodule development: origin, function and regulation of nodulin genes. *Physiol. Plant.*, **85**:253-265.
- Vessey, J.K. (1994). Measurement of nitrogenase activity in legume root nodules: In defence of the acetylene reduction assay. *Plant and Soil*, **158**: 151-162.
- Vincent, J. M. (1970). A manual for the practical study of root nodule bacteria. IBO handbook n° 15. Blacckwells, Oxford.
- Vincent, J.M. (1974). Root-nodule symbioses with *Rhizobium*. In: The Biology of Nitrogen Fixation, Quispel, A., eds., Amsterdam, North-Holland, pp. 265-341.
- Viprey, V., Del Greco, A., Golinowski, W., Broughton, W.J., Perret, X. (1998). Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. *Mol. Microbiol*, **28**:1381-1389.
- Wacek, T. J., Brill, W. J. (1976). Simple, rapid assay for screening nitrogen-fixing ability in soybean. *Crop Science*, **16**:519-523.
- Wang, E. T., Rogel, M. A., Garcia de los Santos, A., Martinez-Romero, J., Cevallos, M. A., e Martinez-Romero, E. (1999). *Rhizobium etli* bv. *mimosae*, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. International Journal of Systematic Bacteriology
- Weaver, R.W., Frederick, L.R. (1974). Effect of inoculum rate on competitive nodulation of Glycine max L. Merrill. II. Field studies. *Agron. J.*, **66**: 233-235.
- Weaver, R.W., Frederick, L.R., Dumenil, L.C. (1972). Effect of soybean cropping and soil properties on numbers of *Rhizobium japonicum* in Iowa soils. *Soil Sci.*, **114**: 137-141.
- Weber, D. F. and Miller, V. L. (1972). Effect of soil temperature on *Rhizobium japonicum* serogroup distribution in soybean nodules. *Agron. J.* **64**: 796-798.
- Wei, X., and W. D. Bauer.(1999). Tn5-induced and spontaneous switching of *Sinorhizobium meliloti* to faster-swarming behavior. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1228-1235.
- Wei, X., Bauer, W. D. (1999). Tn5-induced and spontaneous switching of *Sinorhizobium meliloti* to faster-swarming behaviour. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 1228-1235.
- Wexler, M., Gordon, D., and Murphy, P.J. (1995). The distribution of inositol rhizopine genes in *Rhizobium* populations. *Soil Biol. Biochem.* **27**:531-537.
- Winarno, R., Lie, T. A. (1979). Competition between *Rhizobium* strains in nodule formation: Interaction between nodulating and non-nodulating strains. *Plant and Soil*, **51**: 135-142.
- Wood, M., Cooper, J.E. (1985). Screening clover and *Lotus* rhizobia for tolerance of acidity and aluminum. *Soil Biol. Biochem.*, **17**: 493-497.
- Wood, M., Cooper, J.E. (1988). Acidity, aluminum, and multiplication of *Rhizobium trifolii*: Effects of temperature and carbon source. *Soil Biol. Biochem.*, **20**: 89-93.

- Wood, M., Cooper, J.E., Campbell, D.S. (1985). A survey of clover and *Lotus* rhizobia in Northern Ireland pasture soils. *J. Soil Sci.*, **36**: 357-365.
- Wood, M., Shepherd, G. (1987). Characterization of *Rhizobium trifolii* isolated from soils of different pH. *Soil Biol. Biochem.*, **19**: 317-321.
- Woomer, P., Bohlool, B.B. (1989). Rhizobial ecology in tropical pasture systems. In: Persistence of Forage Legumes ( Marten, G. C., et al., eds.), Madison, Amer. Soc. Agron., pp. 233-245.
- Woomer, P., Singleton, P. W. e Bohlool, B. B. (1988). Ecological indicators of native rhizobia in tropical soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**: 1112-1116.
- Woomer, P., Singleton, P.W., Bohlool, B.B. (1988). Ecological indicators of native rhizobia in tropical soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**: 1112-1116.
- Worral, V.S., Roughley, R.J. (1976). The effect of moisture stress on infection of *Trifolium subterraneum* L. by *Rhizobium trifolii* Dang. *J. Exp. Bot.*, **27**: 1233-1241.
- Yost, C. K., Rochepeau, P. e Hynes, M. F. (1998). *Rhizobium leguminosarum* contains a group of genes that appear to code for methyl-accepting chemotaxis proteins. *Microbiology*, **144**:1945-1956.
- Young, J. P. W., Demetriou, L., e Apte, R. G. (1987) Rhizobium population genetics: Enzyme polymorphism in *Rhizobium leguminosarum* from plants and soil in a pea crop. *App. Environ. Microbiol.*, **53**: 397-402.
- Young, J.P.W. (1996). Phylogeny and taxonomy of rhizobia. *Plant and Soil*, **186**: 45-52.
- Zdor, R E., Pueppke, S. G. (1990). Competition for nodulation of soybean by *Bradyrhizobium japonicum* 123 and 138 in soil containing indigenous rhizobia. *Plant Soil*,**141**: 119-135.
- Zdor, R.E., Pueppke, S. G. (1988). Early infection and competition for nodulation of soybean by *Bradyrhizobium japonicum* 123 e 138. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**:1996-2002.
- Zelazna-Kowalska, I. (1971). Correlation between streptomycin resistance and infectiveness in *Rhizobium trifolii*. *Plant and Soil*, **Special Vol.**:67-71.
- Zhang, X. X., Turner, S. L. Guo, X. W., Yang, H.J., Debelle F., Yang, G. P., Denarie, J., Young, J. P. W. e Li, F. D. (2000). The common nodulation genes *Astragalus sinicus* rhizobia are conserved despite chromosomal diversity. *App. Environ. Microbiol.*, **66**: 2988-1427.





## **7. Anexos**



**ANEXO I – Valores médios mensais de Temperatura e Precipitação****Valores Médios Mensais de Precipitação (mm) - Beja**

	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Ano
30 anos	22	55	77	80	73	72	89	48	35	20	0	1	572
94-95	9	35	42	35	31	49	30	31	15	7	1	0	285
95-96	16	5	124	232	291	52	56	22	89	0	0	0	887

**Valores Médios Mensais de Temperatura Média do Ar (° C) - Beja**

	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Ano
30 anos	21,9	17,8	19,9	9,5	9,2	10,2	10,1	14,3	17,3	21,2	23,8	23,8	16,2
94-95	21	18,6	15,1	11,9	10,5	11,5	13,6	16,6	19,9	21,7	25,3	25,7	17,6
95-96	20,6	21	16	12,1	11,3	9,3	12,7	15,9	16,8	23,5	25,2	23	17,3

**Valores Médios Mensais de Precipitação (mm) - Elvas**

	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Ano
30 anos	28	60	71	75	68	75	52	46	37	24	5	3	542
94-95	6	65	75	15	39	32	13	10	30	45	5	0	335,1
95-96	19	10	118	220	249	38	57	32	82	0	1	0	825,3

**Valores Médios Mensais de Temperatura Média do Ar (° C) - Elvas**

	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Ano
30 anos	22,2	17,3	12,4	9,1	8,4	9,8	11,7	13,7	17,2	21,0	25,0	24,5	16,0
94-95	21,8	17,5	10,9	9,5	9	10,4	14,4	17,3	20,8	22,6	27,1	26,4	17,3
95-96	21,6	21,3	15,2	11,9	10,6	8,4	26,2	16,9	19,7	23,9	26,2	23,9	18,8

**Valores Médios Mensais de Precipitação (mm) - Évora**

	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Ano
30 anos	26	66	88	93	96	84	99	57	46	24	5	3	687
87-88	0	118	57	157	132	30	3	26	82	79	15	0	699
94-95	1	56	64	37	43	50	17	26	19	28	36	0	376
95-96	37	14	192	297	263	54	56	33	117	9	5	0	1076,6

**Valores Médios Mensais de Temperatura Média do Ar (° C) - Évora**

	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Ano
30 anos	21,2	17,6	12,7	9,4	9,1	9,9	12	14,2	16,8	20,5	23,1	23,2	15,8
87-88	23,6	13,0	11,6	10,0	9,7	13,2	13,6	15,2	18,5	21,9	23,3	23,6	15,7
94-95	19,5	17,2	14,2	11,0	9,8	10,9	13,4	15,9	18,8	20,7	23,8	24,6	16,6
95-96	19,1	19,7	14,8	11,4	10,5	8,9	12,1	14,8	16,3	22,8	23,1	23,2	16,4

**ANEXO II – Meios de cultura e soluções nutritivas****Meio de Cultura Agar de Manitol Levedura (MLA)**

Manitol .....	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.675 g
NaCl .....	0.1 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0.2 g
Estrato de Levedura .....	0.5 g
Água destilada qbp .....	1000 ml

Ajustar pH a 7.2

Agar .....	15 g
------------	------

Autoclavar 121°C durante 15 minutos.

**Meio MLA com antibiótico**

Preparar solução stock de antibiótico a 1%

Esterilizar por filtração com filtro de poro 0.45 µm

Adicionar 25 µl / ml meio MLA a 45°C para concentração final de 250 µg/ml

Adicionar 12.5 µl / ml meio MLA a 45°C para concentração final de 125 µg/ml

Agitar suavemente e distribuir por placas de Petri.

### Preparação da Solução Nutritiva de Harper & Gibson (1984)

Soluções stock [100 X]:

**. Solução A**

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  ..... 40 mg/l

$KH_2PO_4$  ..... 40 mg/l

**Solução B**

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ..... 250 mg/l

$K_2SO_4$  ..... 210 mg/l

**Solução C**

$CaCl_2$  ..... 56 mg/l

Sequestrene Fe-300 ..... 22 mg/l

**Micronutrientes**

$H_3BO_3$  ..... 2.86 g

$MnSO_4 \cdot H_2O$  ..... 2.08 g

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  ..... 0.22 g

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$  ..... 0.008 g

$Na_2MoO_4$  ..... 0.11 g

$H_2O$  ..... qbp 1000 ml

Todas as solução stock são autoclavadas em separado a 121°C durante 15 minutos.

**Preparação da solução final:**

.  $CaSO_4 \cdot 2H_2O$  ..... 350 mg

. Água destilada ..... 969 ml

- Autoclavar 121°C durante 15 minutos.

- Adicionar:

. Solução A ..... 10 ml

. Solução B ..... 10 ml

. Solução C ..... 10 ml

. Solução micronutrientes ..... 1 ml

Ajustar pH final a 6.7.

**Solução nutritiva (WB) de Wacek & Brill (1976)**

Sacarose .....	10 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	0.88 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0.24 g
CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O .....	0.43 g
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O .....	0.229 g
Etilinodiamina .....	0.016 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O .....	0.12 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.43 g
Solução micronutriente.....	1 ml
Água destilada .....	qbp ... 1000 ml.

pH final 7