ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE VARIANTES DE *Rhizobium phaseoli*

Josefina Rodríguez Juárez

Dissertação apresentada como um dos requisitos ao Grau de Mestre em Agronomia, área de Concentração Solos, setor de Microbiologia do Solo, Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre

Junho, 1984

1/ Química Bacterióloga Parasitóloga (Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N., México)

"ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE VARIANTES DE *Rhizobium phaseoli*".

JOSEFINA DEL CARMEN RODRIGUEZ JUÁREZ
Química Bacterióloga Parasitóloga (ENCB/IPN/MÉXICO)

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

MESTRE EM AGRONOMIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
FACULDADE DE AGRONOMIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PORTO ALEGRE (RS) - BRASIL

Aprovada em: 08.06.1984 Homologada em: 20.06.1984

Pela Banca Examinadora: Por:

Dr. JOÃO RUY JARDIM FREIRE
Professor Orientador - UFRGS

Dr. ARNALDO CHAER BORGES
Professor UFV

Prof. Dr. JOSÉ ANTONIO COSTA
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Agronomia
UFRGS

Dr. CAIO VIDOR
Professor UFRGS

MSc. IRENE SILVEIRA SCHRANK
Centro de Biotecnologia UFRGS

MSc. PEDRO ALBERTO SELBACH
Professor UFRGS

Prof. Tit. CARLOS MIRANDA GARCIA
p/Diretor da Faculdade de Agronomia
UFRGS

AGRADECIMENTOS

Ao professor João R. Jardim Freire pela sua orientação e amizade no meu treinamento e pela dedicação no preparo desta dissertação.

À Seção de Microbiologia do Solo/IPAGRO pelo fornecimento das estirpes e orientação no preparo dos soros, além da constante ajuda no desenvolvimento da pesquisa.

Ao Centro de Biotecnologia do Rio Grande do Sul pelo uso de suas instalações, e especialmente à Irene S. Schrank pela sua orientação.

Ao CNPq,à FINEP e ao Programa Integrado de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul - Secretaria da Agricultura/EMBRAPA pelos recursos financeiros destinados à realização desta pesquisa através do Projeto Fixação do Nitrogênio em Feijão.

A Escuela Nacional de Ciencias Biológicas pelo apoio para a realização do curso.

Ao Departamento de Solos da UFRGS pela oportunidade de freqüentar o curso.

Ao Gregorio pelo estímulo e auxílio na realização do curso. Em especial a meu filho José Andrés, minha gratidão.

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE VARIANTES DE *Rhizobium phaseoli*

Autor: Josefina Rodríguez Juarez
Orientador: Prof. J. R. Jardim Freire

RESUMO

Sessenta e cinto estirpes de *Rhizobium phaseoli* foram examinadas quanto à apresentação de variantes e estas a pós isoladas foram estudadas, por meio de experimentos de laboratório e casa de vegetação, quanto a suas caracterísi cas culturais, bioquímicas, genéticas e simbióticas.

Com base em diferenças na morfologia colonial foi verificado que três culturas apresentavam-se com variantes, sendo separadas para o estudo duas variantes das estirpes SEMIA 476 e SEMIA 410 e três variantes da estirpe SEMIA 424, as quais tiveram sua capacidade nodulífera comprovada. ram observadas diferenças entre variantes da mesma estirpe quanto a capacidade de metabolizar alguns carboidratos e na sensibilidade a antibióticos.

Aparentemente não houve diferenças plasmidiais entre as variantes. Num experimento em casa de vegetação para avaliar a efetividade e capacidade competitiva das variantes, observou-se que existem entre elas diferente capacidade de competir por sítios de nodulação. No mesmo experimento a variante SEMIA 410-2 se comportou como inefetiva enquanto que as variantes SEMIA 424-1 e SEMIA 424-3 foram superiores a sua estirpe matriz. Foi observada certa relação entre o tipo de morfologia colonial e a efetividade em fixação do nitrogênio, sendo menos efetivas as variantes com colónias grandes e viscosas.

1/ **Dissertação de Mestrado em Agronomia (Área de Concentração Solos, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (90p.) - junho, 1984.**

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *Rhizobium phaseoli* VARIANTS-"

Author: Josefina Rodríguez Juarez
Adviser: Prof. J. R. Jardim Freire

SUMMARY

Sixty five strains of *Rhizobium phaseoli* were examined in relation to the existence of variants in their cultures and after isolation they were studied in their cultural, biochemical, genetic and symbiotic characteristics in a series of laboratory and greenhouse experiments.

Based in differences in colony morphology it was observed that three cultures presented variants and it were isolated for study two variants from strains SEMIA 476 and SEMIA 410 and three variants from strain SEMIA 424. These variants were checked for their nodule formation capacity. There was no differences in their cell morphology but marked differences were observed in relation to carbohidrates utilization and tolerance to antibiotics. No differences were observed in the plasmids.

Differences were observed between variants in relation to effectiveness and competitiveness for nodule sites. Variant SEMIA 410-2 was ineffective and variants SEMIA 424-1 and SEMIA 424-3 were superior in effectiveness in relation to their parent culture. Some relation was observed between colony type and effectiveness in dinitrogen fixation. Variants with large viscid colonies were less effective than those with small or punctiform colonies.

1/ M.Sc. Dissertation in Agriculture (Soils) - Agricultural School - Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre (90p.) - June, 1984.

SUMÁRIO

	Página
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. Características bioquímicas	8
2.2. Resistência a antibióticos	11
2.3. Características plasmidiais	16
2.4. Capacidade competitiva	23
3. Material e Métodos	28
3.1. Obtenção das culturas variantes	28
3.2. Descrição das culturas variantes	29
3.3. Utilização de carboidratos	29
3.4. Teste de sensibilidade a antibióticos	29
3.5. Isolamento da DNA plasmidial	30
3.6. Avaliação da eficiência e da capacidade competitiva por sítios de infecção nodular das estirpes variantes	31
4. Resultados e Discussão	33
4.1. Descrição das variantes isoladas	33
4.2. Utilização de carboidratos	44
4.3. Sensibilidade a antibióticos	45
4.4. Características plasmidiais	49
4.5. Avaliação da eficiência e capacidade competitiva por sítios de infecção nodular das variantes	52
5. Conclusões	58
6. Bibliografia Citada	59
7. Apêndices	69

RELAÇÃO DE TABELAS

Página

1. Características das colonias de *R. phaseoli* SEMIA 476 e suas variantes no meio de cultura gluconato-manitol, após 48 horas de incubação 37

2. Características das colonias de *R. phaseoli* SEMIA 424 e suas variantes no meio de cultura gluconato-manitol, após 48 horas de incubação 38

3. Características das colonias de *R. phaseoli* SEMIA 410 e suas variantes no meio de cultura gluconato-manitol, após 48 horas de incubação 39

4. Dimensão das células das estirpes de *R. phaseoli* SEMIA 476, SEMIA 424, SEMIA 410 e suas variantes, após 48 horas de crescimento no meio gluconato-manitol. Médias de 10 repetições . 41

5. Resultados do crescimento de *R. phaseoli* SEMIA 476, SEMIA 424, SEMIA 410 e respectivas variantes após 72 horas de incubação a 30°C em meio leite litmus e peptona-dextrose-agar. Resultados de 3 repetições 42

6. Avaliação do crescimento de *R. phaseoli* SEMIA 476, SEMIA 424, SEMIA 410 e suas variantes em meio de cultura agarizado com diversos carboidratos após 72 horas de incubação a 30°C. Resultados de 5 repetições 43

7. Resultados dos testes de sensibilidade a diferentes concentrações de estreptomicina das estirpes de *R. phaseoli* SEMIA 476, SEMIA 424, SEMIA 410 e suas variantes. Médias de cinco repetições 46

Página

8. Resultados dos testes de sensibilidade a diferentes concentrações de novobiocina das estirpes de *R. phaseoli* SEMIA 476, SEMIA 424, SEMIA 410 e suas variantes. Médias de cinco repetições 48

9. Resultados de avaliação de teste de sensibilidade a diferentes concentrações de neomicina das estirpes de *R. phaseoli* SEMIA 476, SEMIA 424, SEMIA 410 e duas variantes. Média de cinco repetições . 50

10. Peso seco de nódulos, rendimento de matéria seca da parte aérea, porcentagem e teor de nitrogênio total de *Phaseolus vulgaris* cv. Turrialba 4 em resposta à inoculação com as estirpes de *R. phaseoli* SEMIA 476, SEMIA 424, SEMIA 410 e suas variantes, individualmente e em combinações mistas. Médias de três repetições (duas plantas/vaso) 53

11. Ocorrência das estirpes variantes de *R. phaseoli* em nódulos de *Phaseolus vulgaris* cv. Turrialba 4 cultivada em casa de vegetação, em resposta a inoculação com combinações das estirpes. Identificações feitas pela sensibilidade à antibióticos 56

RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

1. Perfil eletroforético em gel de agarose do DNA plasmidial das estirpes de *R. phaseoli*: SEMIA 476, 476-1, 476-2, SEMIA 410, 410-1. 410-2, SEMIA 424, 424-1, 424-2, 424-3 nas canaletas 1 a 10 respectivamente 51

1. INTRODUÇÃO

A prática da inoculação das sementes de leguminosas com estirpes de *Rhizobium* é realizada para a obtenção de maiores benefícios da fixação biológica do nitrogênio. Os chamados inoculantes são constituídos por culturas dos rizóbios específicos selecionados do material genético naturalmente existente, que apresentem: uma nodulação efetiva com a leguminosa recomendada, capaz de formar uma grande proporção de nódulos em competição com os rizóbios naturais presentes no solo e persistência no solo em presença ou ausência do hospedeiro. Essa prática representa uma alternativa para a produção de alimentos de boa qualidade a menores custos que pelo uso do nitrogênio mineral.

As estirpes usadas na fabricação de inoculantes são continuadamente cultivadas em meios de cultura, em repicagens sucessivas, o que pode ocasionar alterações nas suas características culturais, bioquímicas, morfológicas e simbióticas, devido a multiplicação acelerada. Daí que a estabilidade genética das estirpes de *Rhizobium* usadas na fabricação de inoculantes seja uma característica que deve ser mantida.

Têm-se encontrado nos inoculantes comerciais para

leguminosas estirpes de *Rhizobium* que modificaram sua capacidade de fixar nitrogênio e/ou a habilidade de nodular a leguminosa hospedeira.

Essas observações mostram a importância de se testar periodicamente as características culturais bem como a efetividade das estirpes mantidas em culturas estoques, bem como a possibilidade de se obter estirpes mais efetivas a partir de uma mesma estirpe com características desejáveis.

A presente pesquisa foi conduzida com o objetivo de observar a presença de variantes espontâneas em estirpes de *Rhizobium phaseoli* da Coleção de Culturas do IPAGRO/ Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul. Avaliou-se também suas características bioquímica, plasmidial, sensibilidade a antibióticos, bem como a estabilidade de suas características simbióticas, como a fixação de nitrogênio atmosférico, nodulação e capacidade competitiva.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tem sido relatado um bom número de observações referentes à ocorrência natural de variação na capacidade de nodular (infectividade) e na habilidade de fixar nitrogênio (efetividade) em estirpes de *Rhizobium* em condições de "stress" ambiental como: prolongado cultivo em meio artificial, conservação a temperaturas baixas, dessecação no solo, passagem através do hospedeiro e exposição a fagos virulentos (SCHWINGHAMER, 1962).

Numa das primeiras revisões sobre o assunto, ALLEN e ALLEN (1950) mencionam que ISRAILSKY e STARYGIN, em 1930, foram os primeiros a chamar a atenção sobre a presença de colônias de *Rhizobium* lisas e rugosas e que ambas culturas formavam nódulos. Os primeiros autores sugeriram que alguma relação deveria existir entre o tamanho da colônia de *Rhizobium* e sua habilidade de fixar nitrogênio simbioticamente.

VINCENT (1954) faz menção que as estirpes de *Rhizobium* spp. são usualmente estáveis por muitos anos em meio de cultivo, mas que no entanto, variações na efetividade simbiótica têm sido notadas.

É comumente aceito (ROUGHLEY, 1976) que as estirpes

de *R. trifolii* são propensas a produzir mutantes inefetivos enquanto que as estirpes de *R. meliloti* são mais estáveis. Tem-se observado que apesar das culturas terem sido mantidas na forma liofilizada e cultivadas no meio basal levedura manitol ocorrem variações entre as estirpes usadas na fabricação de inoculantes. Assim três estirpes de *R. trifolii* mostraram variação, duas estirpes na efetividade ou infectividade mas não na morfologia colonial; uma estirpe de Caupí variou tanto na morfologia colonial como na efetividade. Uma estirpe de *R. lupini* modificou sua morfologia colonial e o tempo de surgimento dos nódulos. LABANDERA e VINCENT (1975a) reportam perda da efetividade em estirpes de *R. trifolii* usadas na fabricação de inoculantes.

A partir de uma estirpe efetiva de *R. trifolii*, VINCENT (1962) isolou três tipos diferentes de colônias, com alta, média e baixa produção de goma que se mostraram respectivamente efetiva, inefetiva e inefetiva na fixação de nitrogênio.

KUYKENDALL e ELKAN (1976) encontraram em algumas estirpes de *Rhizobium japonicum* a presença de populações de células coexistindo e que eram morfológica e fisiologicamente distintas denominadas "variantes".

Num estudo com 17 culturas de uma mesma estirpe de *Rhizobium* spp. HERRIDGE e ROUGHLEY (1975) encontraram que a maior parte das culturas continha dois ou mais tipos de colônias e que as características não eram estáveis. Esses

autores observaram a existência de uma relação entre a efetividade simbiótica e o tipo de colônia originalmente isolada. As três sub-estirpes mais inefetivas foram derivadas originalmente de colônias grandes e gomosas e as mais efetivas foram isoladas de colônias punctiformes e seca.

O possível papel do polissacarídio extracelular na formação do cordão de infecção foi investigado por HUBBELL (1970), que trabalhou com duas variantes de *R. trifolii*, o tipo L formando colônias grandes e gomosas de crescimento rápido não inefetivas e o tipo S representado por colônias muito pequenas, não gomosas, de crescimento lento e inefetivas. Este autor observou que o polissacarídio livre das células, obtido da variante tipo L induziu uma leve deformação dos pêlos radiculares, ao passo que o polissacarídio obtido da variante tipo S provocou uma típica deformação nos pêlos. A análise química mostrou a presença de galactose e ácido glucorônico no polissacarídio das colônias S e galactose, glucose e ácido glucorônico no polissacarídio tipo L.

As observações feitas por LJUNGGREN e FAHRAEUS (1959) indicaram que as células de *Rhizobium* excretavam uma substância solúvel na água, estável ao calor e cujo princípio ativo são polissacarídios que induziam formação de poligalocturonase que por sua vez induz a deformação do pêlo radicular.

Com o objetivo de determinar se podem ser comparados os valores de fixação livre e simbiótico de nitrogênio além da sensibilidade a sais entre variantes de quatro

estirpes de *R. japonicum*, UPCHURCH e ELKAN (1977) conduziram um experimento em câmara de crescimento e observaram marcadas diferenças na fixação livre, as colônias pequenas não gomosas apresentaram atividade da nitrogenase 5-114 vêzes maior que as colônias grandes e gomosas. A mesma correlação foi observada na fixação simbiótica onde as colônias pequenas e não gomosas foram 6-16 vezes mais efetivas que as colônias grandes e gomosas. O experimento também mostrou que as colônias pequenas não gomosas foram mais sensíveis aos sais.

Resultados opostos foram encontrados por SANDERS et alii (1976). Por repetidas passagens através de filtro millipore de 1,2 µm eles isolaram uma variante de *R. leguminosarum* deficiente na produção de polissacarídio extacelular e na habilidade de nodular. Esta variante formou colônias pequenas, como resultado da perda do polissacarídio extracelular. Células que voltaram a produzir o polissacarídio extracelular voltaram a nodular a planta hospedeira. Posteriormente NAPOLI e ALBERSHEIM (1980) reportaram o isolamento de três variantes de *R. leguminosarum* que mostraram diminuição na produção do polissacarídio extracelular e que num ensaio em câmara de crescimento apresentaram relação entre a quantidade de polissacarídio extracelular formado e a eficiência na nodulação.

Mac GREGOR e ALEXANDER (1972) trabalhando com duas variantes de uma estirpe de *R. trifolii*, encontraram que a variante que formava colônias menos gomosas não tinha a

capacidade de nodular, enquanto que a variante com colônias gomosas nodulava o trevo. Os autores não observaram diferenças significativas quali e quantitativas quanto aos polissacarídios extracelulares entre as variantes; a maior diferença entre as duas variantes foi a incapacidade da variante menos gomosa de formar nódulos na parte superior da raiz de *T. pratense*.

Resultados semelantes obteve HEPPEER (1972) com dez estirpes de *R. trifolii*. Nesse estudo, foram incluídas quatro estirpes efetivas, quatro inefetivas e duas não infectivas, sendo observado que não apresentavam diferenças significativas na composição do polissacarídio extracelular e concluiram que não existiu correlação entre a composição do polissacarídio e a habilidade da nodular ou de fixar nitrogênio.

PRAKASH et alii (1980) observaram que a mudança de colônias lisas para rugosas não necessariamente significava perda da infectividade. Os autores trabalharam com variantes rugosas de *R. leguminosarum* selecionadas por resistência a fagos e que se mostraram inteiramente inefetivas ou efectivas além de conservar as marcas de estirpe original, exceto a sensibilidade a fagos.

Existe um contínuo interesse no estudo da fisiologia e biologia molecular de variantes bacterianas. Um grande número de provas bioquímicas tem sido usadas para determinar se existe um padrão característico de utilização, sensibilidade a antibióticos, características genéticas e

estabilidade das suas características simbióticas (infectividade e efetividade) entre estirpes de *Rhizobium*.

2.1. Características bioquímicas

O manual de Bergey na sua 8ª edição (BUCHANAN e GIBBONS, 1974) descreve a família *Rhizobiaceae* formada por bactérias de células normalmente na forma de bastão, sem endosporos, aeróbias, gram negativos e móveis, com um flagelo polar ou subpolar ou de 2-6 flagelos peritriquios, com dois gêneros: *Agrobacterium* e *Rhizobium*.

Segundo VINCENT (1977) as células do gênero *Rhizobium* medem de 0,5 - 0,9 µm x 1,2 - 3,0 µm, freqüentemente com proeminentes grânulos de poli-β-hidroxibutirato, temperatura ótima de crescimento 25 - 30°C, crescimento pobre em peptona, lento crescimento no leite litmus eventualmente dando reação ácida ou alcalina, algumas vezes com clara zona de soro indicativo de uma ligeira atividade proteolítica. Podem usar nitrato, amônio ou aminoácidos como única fonte de nitrogênio.

Os rizóbios de crescimento rápido (*R. meliloti*, *R. phaseoli*, *R. trifolii*, *R. leguminosarum*) acidificam o meio de cultura; têm um tempo de geração de 2 - 4 horas e geralmente formam colônias grandes (2 - 4 mm de diâmetro) gomosos, sem cor ou brancas depois de 3 - 5 dias.

Os rizóbios de crescimento lento (*R. japonicum*, *R. lupini*, *R.* spp.) alcalinizam o meio de cultura, tem um

tempo de geração de 6 - 8 horas e geralmente formam colônias pequenas (< 1 mm de diâmetro) após 7 - 10 dias, densas e viscosas, geralmente sem cor, raramente cor rosada, e a goma é menos abundante que as de crescimento rápido.

TAN e BROUGHTON (1981) sugerem que as mudanças de pH produzidas por *Rhizobium* crescendo no meio levedura Manital é causada pela utilização preferencial de açúcares pelas estirpes de crescimento rápido e de compostos nitrogenados pelas estirpes de crescimento lento.

DRETS e ARIAS (1972) estabeleceram diferenças enzimáticas entre os rizóbios de crescimento lento e os de crescimento rápido. Eles detectaram nicotinamida adenina dinucleotide fosfato - 6 - fosfogluconato desidrogenase nas estirpes de crescimento lento.

Embora a utilização de carboidratos por *Rhizobium* tenha sido extensivamente estudada, as diferenças entre as estirpes freqüentemente são mascaradas pela presença de extrato de levedura no meio de cultura (BALDWIN e FRED, 1927; GEORGI e ETTINGER, 1941) citados por GRAHAM (1964).

Diversos trabalhos têm mostrado diferenças na utilização de carboidratos entre culturas variantes de *Rhizobium*. Assim, KUYKENDALL e ELKAN (1977) num estudo com variantes de uma estirpe de R. *japonicum*, encontraram que as variantes que possuíam a enzima induzida D-Manitol desidrogenase eram consideravelmente menos efetivas na fixação simbiótica de nitrogênio medido pela redução de acetileno, que as variantes que não possuiam a enzima. Os autores sugeriram que a

presença de D-manitol desidrogenase intracelular tem como conseqüência a redução da eficiência da utilização de D-glucose.

KUYKENDALL e ELKAN (1976) estudaram a utilização de carboidratos por duas variantes de uma estirpe de *R. japonicum* e não encontraram diferenças na taxa de crescimento em L-arabinose, glicerol, D-Manose e gluconato. Entretanto, uma clara diferença na habilidade de utilizar D-manitol ou D-arabitol foi observada; uma das variantes se mostrou mais eficiente na utilização de D-glucose,enquanto que a outra foi superior na utilização de D-frutose. O exame da morfologia colonial em meio com diferentes açúcares não mostrou diferenças.

MULONGOY e ELKAN (1977) investigaram se o catabolismo de carboidratos como fonte de energia e metabólitos diferia em duas variantes de *R. japonicum* em relação a eficiência na fixação de nitrogênio. Eles observaram que uma das variantes se caracterizou por uma eficiência 5 a 10 vezes maior na fixação de nitrogênio, menor tempo de geração em glucose e utilização preferencial da via EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) conhecida como um meio mais eficiente de produção de energia que a via ED (Entner-Doudoroff), aparentemente predominante na outra variante.

A assimilação de amônio por variante de *R. japonicum* efetivos e inefetivos na fixação de nitrogênio foi estudada por UPCHURCH e ELKAN (1978). Eles encontraram que as duas variantes inefetivas formavam colônias grandes e gomosas e

apresentaram duas vezes maior atividade das enzimas glutamina sintetase e glutamato sintase e 3 - 9 vezes maior atividade da enzima glutamato deshidrogenasa. Essas observações indicam que *Rhizobium* pode simultaneamente não reprimir a biossíntese da nitrogenase e reprimir a biossíntese de enzimas que assimilam o amônio. Também podem unir a eficiência na assimilação de amônio com a eficiência na atividade da nitrogenase.

2.2. Resistência a antibióticos

A aplicação prática envolvendo resistência a antibióticos em *Rhizobium* tem sido investigada sob dois aspectos: 1) a determinação dos níveis de resistência de estirpes efetivas afim de identificar culturas possuindo o mesmo padrão de resistência, com o propósito de estudos ecológicos (DAVIS, 1962); 2) a seleção no laboratório de mutantes resistentes para a impressão de uma marca de identificação. Esta metodologia foi utilizada para determinar a influência da resistência a antibióticos de culturas de *Rhizobium* na nodulação e inefetividade (SCHWINGHAMER, 1964, 1967).

Nos estudos ecológicos, técnicas sorológicas e de resistência a antibióticos têm sido empregadas com bons resultados. A resistência a antibióticos é preferível às técnicas sorológicas, porque é simples e rápida e pode ser ampliada pelo uso de uma marca adicional como sensibilidade a fagos (BROCKWELL et alii, 1977).

ATOUN et alii (1982) identificaram claramente a tolerância de estirpes de *R. meliloti* pelo uso de discos impregnados com antibióticos, teste este empregado na bacteriologia médica.

HAGEDORN (1979a) diz que deve ser considerada se a efetividade ou outras características das estirpes de *Rhizobium* pode ser alterada pela seleção de resistência a antibióticos, conforme trabalhos (SCHWINGHAMER, 1964; 1967) que indicam a resistência a alguns antibióticos, enquanto que resistência a outros antibióticos não tem influência.

No que se refere a estabilidade da marca de resistência a antibióticos, usada como uma técnica para o reconhecimento das estirpes de *Rhizobium*, JOSEY et alii (1979) trabalharam com *R. phaseoli* e *R. leguminosarum* e encontraram que o padrão de resistência permaneceu estável para as duas estirpes subcultivadas ou reisoladas dos nódulos. As similaridades encontradas entre estirpes originais e variantes depois de alguns anos de cultivo sugerem que a resistência à baixas concentrações de antibióticos é uma propriedade estável da bactéria.

Resistência à estreptomicina é uma marca freqüentemente usada para investigações ecológicas de competitividade e sobrevivência no solo (SCHWINGHAMER e DUDMAN, 1973; SCHWINGHAMER, 1977). A resistência a esse antibiótico é considerada uma característica estável em cultivo, por não se conhecer a que grau os fatores edáficos podem levar à perda ou modificação dos seus caracteres (SCHWINGHAMER,

1967).

PANKHURST (1977) distingue três tipos de associação entre o modo de ação dos antibióticos e a efetividade simbiótica de mutantes de *Rhizobium*, de crescimento lento e rápido resistentes a antibióticos, que se associam a *Lotus*: Assim a resistência a inibidores da síntese de proteínas foi associado com pouca ou nenhuma perda da efetividade simbiótica; a resistência a inibidores de síntese de DNA e RNA foi associada com perda freqüente da efetividade, e a resistência a inibidores da síntese da parede celular foi associada com perda variável da efetividade. A resistência a alguns antibióticos como D-ciclosserina, novobiocina e penicilina foi associada à perda da efetividade de *Rhizobium* de crescimento rápido e lento, porém, a resistência a outros antibióticos, como neomicina, viomicina, canamicina e vibromicina foi associada à perda da efetividade somente em *Rhizobium* de crescimento rápido. Esses resultados confirmam os obtidos por SCHWINGHAMER (1967) e LEVIN e MONTGOMERY (1974).

Estudos de HAGEDORN (1979a) com *R. trifolii* ressaltam que uma perda completa ou parcial da efetividade não esteve associada a uma classe particular de antibióticos.A redução da efetividade ocorreu em 12,5% dos mutantes resistentes estudados e aumento dos níveis de efetividade ocorreram unicamente em 2,5% dos casos.

MEYER e PUEPPKE (1980) em estudo para diferenciar variantes de *R. japonicum* com diferente morfologia colonial

observaram que as variantes que formavam colônias grandes foram mais sensíveis aos antibióticos testados que as variantes que formavam colônias pequenas.

ZELAZNA-KOWALSKA (1978, 1979) citados por KUYKENDALL (1981) encontraram que mutantes de *R. meliloti* deficientes nas propriedades simbióticas e possuindo baixos níveis de resistência à estreptomicina, poderia ter restituída a habilidade simbiótica pela seleção de mutantes resistentes a altos níveis desse antibiótico ou pela inserção do gene str A. Eles levantaram a hipótese de que mudanças na permeabilidade da membrana era a causa da perda da capacidade simbiótica e que a deficiência foi corrigida pelos efeitos pleiotrópicos do gene que controla a alta resistência a estreptomicina.

Em estirpes de crescimento rápido de *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. meliloti* e *R. leguminosarum* SCHWINGHAMER (1967) encontrou que a resistência a antibióticos capaz de inibir a síntese das proteínas em outras bactérias (estreptomicina, espectinomicina, cloranfenicol) foi associada com pouca ou nenhuma perda da efetividade simbiótica. Por outro lado, a resistência a antibióticos que inibe a síntese da parede celular (D-ciclosserina, novobiocina) e antibióticos que afetama permeabilidade da parede e síntese de proteínas (viomicina e neomicina) foi associada com perda da efetividade simbiótica.

Entretanto, LEVIN e MONTGOMERY (1974) não encontraram relação entre a perda da efetividade simbiótica e a

resistência a antibióticos em mutantes de *R. japonicum* de crescimento lento.

Segundo HAGEDORN (1979a) com tal diversidade das informações disponíveis sobre a resistência a antibióticos em *Rhizobium* faz parecer inútil sugerir alguma generalização ou tendência. Pode ser que o rizóbio é assim diverso ou sua exposição a antibióticos no solo é variável ou que cada estirpe tem propriedades próprias e distintas e poderia por conseguinte ser considerada na forma individual para esta característica em particular. A probabilidade de que a resistência a antibióticos no rizóbio seja mantida por elementos extracromossomicos pode ser um fator que dificulta chegar a uma compreensível asseveração.

O uso de marca de resistência a antibióticos como método para a identificação de estirpes de *Rhizobium* apresenta três inconvenientes: (1) a presença de características de resistência pode perturbar o experimento e realizar por exemplo, alteração da velocidade de crescimento ou da permeabilidade da célula (SCHWINGHAMER, 1977); (ii) existe uma alta resistência natural a antibióticos em muitas estirpes de *Rhizobium* (PARIISKAYA e GORELOVA, 1976), conforme citação de ROBERTS et alii (1980); e (iii) a resistência a antibióticos pode ser transferida entre estirpes no solo assim como no nódulo (JOHNSTON e BERINGER, 1976; PARIISKAYA e GORELOVA, 1976) citados por ROBERTS et alii (1980).

2.3. Características plasmidiais

Nos últimos anos tem ocorrido um significativo avanço no campo da genética de *Rhizobium*. Sistemas de transferência de genes cromossômaicos e mapeamento têm sido estabelecidos e o crucial papel dos plasmídios na simbiose foi esclarecido. No entanto, ainda é cedo para o uso destas informações como uma ferramenta na compreensão da simbiose. Segundo KONDOROSI e JOHNSTON (1981) o sucesso ou fracasso da aplicação dos conhecimentos em genética de *Rhizobium* pode ser julgado pelo grau em que poderá ajudar a elucidar os detalhes do desenvolvimento do nódulo e a fixação de nitrogênio e na maneira em que estas informações poderão ser usadas para melhorar a interação simbiótica.

É muito conhecido que as propriedades simbióticas tais como a habilidade de induzir a formação de nódulos nas raízes de leguminosas (NOD^+) e a habilidade de fixar nitrogênio dentro do nódulo (FIX^+) são relativamente estáveis em certas culturas de *Rhizobium* conservadas em laboratório (DÉNARIÉ et alii, 1981).

A primeira evidência genética de que os genes contidos nos plasmídios (DNA estracromossômico) em *Rhizobium* podem estar envolvidos no estabelecimento das características simbióticas assim como da especificidade hospedeira, foi reportada por HIGASHI (1967) e JOHNSTON et alii (1978). Nesse estudo, HIGASHI (1967) encontrou que as estirpes de *R. trifolii* e *R. phaseoli* perderam a habilidade de formar

nódulos após o tratamento com laranja de acridina, corante comumente usado para eliminar plasmídios de bactérias gram--negativas. Esses resultados sugeriram que os plasmídios poderiam estar envolvidos no controle da formação dos nódulos. Pesquisas posteriores confirmaram essa idéia, como a demonstração da fixação de nitrogênio por *Rhizobium* na ausência da planta hospedeira, indicando que os genes para a síntese e função da nitrogenase estão na bactéria (PAGAN et alii, 1975; Mc COMB et alii, 1975).

A presença física de plasmídios em *Rhizobium* foi sugerida pelos estudos de densidade de DNA (SUTTON, 1974)e demonstrada em algumas estirpes por gradiente de densidade (KLEIN et alii, 1975; DUNICAN et alii, 1976; ZURKOWSKI e LORKIEWICZ, 1976; OLIVARES et alii, 1977, citados por DÉNARIÉ et alii, 1981). Simultaneamente foi mostrado que outro membro da família Rhizobiaceae, *Agrobacterium tumefaciens*, que induz tumor nas dicotiledôneas, também possuia um plasmídio.

NUTI et alii (1979) procuraram evidências de que os genes da fixação de nitrogênio (nif) estão localizados num plasmídio e concluíram que o DNA de R. *leguminosarum* examinado continha seqüências que eram homólogas a uma parte dos genes estruturais para a nitrogenase de *K. pneumonia*. Isto é uma forte evidência de que os genes nif H e nif D estão localizados em plasmídio. Tem sido demonstrado que o nif D está envolvido na síntese de um dos polipeptídios do componente I e nif H no componente II da enzima nitrogenase

(ROBERTS et alii, 1978).

PRAKASH et alii (1981), pela técnica de eletroforese em gel de agarose, encontraram que estirpes de *R. trifolii*, *R. leguminosarum*, *R. meliloti* e *R. phaseoli* continham pelo menos dois plasmídios com peso molecular de 180 - 300 x 10^6, 150 - 250 x 10^6, 91 - 180 x 10^6 e 100-250 x 10^6 respectivamente e que alguns genes nif estavam ligados aos plasmídios nestas espécies. Os mesmos autores encontraram que os genes para a nodulação e fixação de nitrogênio estavam localizados no mesmo plasmídio.

HOMBRECHER et alii (1981) comprovaram a presença de genes nif KHD nos plasmídios de *R. phaseoli* *R. leguminosarum* numa prova de hibridização usando um plasmídio contendo os genes estruturais de *K. pneumonia* marcado radioativamente.

BEYNON et alii (1980) observaram que a supressão espontânea do plasmídio de uma estirpe de *R. phaseoli* gerou estirpes que não produziam melanina, além de perder a capacidade de nodular. Pela técnica de eletroforese em gel de agarose, plasmídios de elevado peso molecular (superior a 300 x 10^6) denominados megaplasmídios, têm sido encontrados em algumas estirpes das famílias *Rhizobiaceae* e *Pseudomonadaceae* segundo CASSE et alii (1979); HIRSH et alii (1980); HANSEN e OLSEN (1978).

ROSENBERG et alii (1981) observaram que dez variantes espontâneas de três estirpes de *R. meliloti* mostraram ter sofrido supressão dos genes nif DH na região do megaplasmídio. Estes resultados indicam que os genes que controlam

o primeiro estágio da formação dos nódulos estão localizados na região dos genes nif DN do megaplasmídio. Resultados similares são citados por BANFALVI et alii (1981).

O entendimento da organização e regulação dos genes que regulam a simbiose em *R. meliloti* tem um particular interêsse já que *R. meliloti* forma simbiose com uma importante cultura forrageira (*M. sativa*) e a manipulação genética desta simbiose pode trazer um benefício agrícola no futuro (BANFALVI et alii, 1981).

R. trifolii se une especificamente com as raízes do trevo pela interação entre as lectinas da planta e a bactéria (DAZZO e BRILL, 1979). Estirpes de *R. trifolii*, que perderam um plasmídio grande pela incubação a elevadas temperaturas, foram incapazes de formar nódulos devido à inexistência da união com a lectina da planta (ZURKOWSKI e LOKIEWICZ, 1979). A capacidade de união com o pêlo radicular e formação de nódulo foi recuperada quando a cultura que perdeu o plasmídio o adquiriu novamente pela conjugação com a estirpe original como doadora.

ROBERTS e BRILL (1981) também observaram que os genes envolvidos na união do *Rhizobium* com a planta estavam localizados num plasmídio grande. De maneira geral não tem sido firmemente estabelecida a presença de megaplasmídios em *Rhizobium* de crescimento lento (grupo do Caupí e *R. japonicum*), com a exceção de estirpes de *R. japonicum* isoladas de solos alcalinos pelo fato de que, neste caso, uma desnaturação alcalina foi eficiente em determinar a presença

de plasmídios (GROSS et alii, 1979). No entanto, alguns resultados positivos mas não para todas as estirpes estudadas sugerem a presença de megaplasmídio nas bactérias de crescimento lento (NUTI et alii, 1977).

Fato interessante foi observado por MASTERSON et alii (1982) com uma estirpe de *R. japonicum* de crescimento rápido originária da República Popular da China, que apresentava características fisiológicas semelhantes às estirpes de crescimento rápido e que, geralmente era inefetiva com as cultivares norte-americanas. Além disso, foi encontrado que os genes nif estavam localizados num megaplasmídio. Os autores explicam tais observações sugerindo que é possível que as estirpes de *R. japonicum* citadas, tenham formado parte recentemente da família dos organismos que fixam nitrogênio.

APPELBAUM et alii (1984) examinaram estirpes de *R. japonicum* de crescimento rápido e encontraram que algumas das estirpes possuiam um megaplasmídio de pêso molecular mínimo de 450×10^6, além de 1 a 3 plasmídios menores e observaram que em algumas das estirpes estudadas os genes nif e da nodulação estavam juntos num só plasmídio e nas outras estirpes possivelmente a localização destes genes era cromossômica.

Segundo PRAKASH et alii (1981) em *R. phaseoli* os genes estruturais nif estão localizados num megaplasmídio (pêso molecular superior a 250×10^6). A presença de megaplasmídio em estirpes de *R. leguminosarum* e *R. trifolii* tem sido

demonstrada, além de plasmídios menores.

Os bacteróides formados por algumas estirpes de *Rhizobium* são capazes de sintetizar o complexo hidrogenase que cataliza a oxidação de H_2 a H_2O (DIXON, 1968). As estirpes de *Rhizobium* que possuem esta característica têm a habilidade de recuperar parte da energia gasta pela liberação de N_2 catalisado pela nitrogenase (DIXON, 1972; EMERICH et alii, 1979). ALBRECHT et alii (1979) mencionaram que num experimento em casa de vegetação, plantas de soja inoculadas com estirpes hidrogenase positiva demonstraram maior porcentagem de nitrogênio no tecido e nas sementes que as plantas inoculadas com estirpes hidrogenase negativa. CANTRELL et alii (1982) analisaram uma série de estirpes nativas de *R. japonicum* para determinar se existe alguma aparente correlação entre o perfil do plasmídio e a presença do sistema assimilador de H_2. Os resultados indicaram que a alta atividade da hidrogenase nas estirpes estava associada com a ausência de plasmídios distinguíveis. Destas observações seria possível postular que a presença de algum plasmídio em *R. japonicum* seria incompatível com um sistema ativo da hidrogenase.

BREWIN et alii (1980) trabalharam com duas estirpes nativas de *R. leguminosarum* com diferentes habilidades de assimilar o H_2 e encontraram que os genes que especificam a capacidade de nodular e assimilar H_2 estavam unidos. Um plasmídio com pêso molecular de 190×10^6 parecia conter os dois genes.

Segundo COLE e ELKAN (1973) existem evidências que sugerem que a resistência de *R. japonicum* a certos antibióticos é controlada por genes contidos num plasmídio. Esta proposição é baseada na similaridade das propriedades do fator R que intervem na resistência em bactérias entéricas (ANDERSON e LEWIS, 1965; WATANABLE, 1963) e nas propriedades e resistência a antibióticos em *R. japonicum*. Estas similaridades foram: (i) a resistência simultânea de um grande número de estirpes de *R. japonicum* a tetraciclina, penicilina G, neomicina e cloranfenicol; (ii) a notável resistência a penicilina G, neomicina e cloranfenicol dependente do inóculo; (iii) a eliminação da resistência a estes antibióticos por tratamento com acridina laranja; e (iv)os comparativamente elevados níveis de resistência aos mesmos antibióticos, similares aos encontrados na bactéria entérica que possui o fator R, porém geralmente menor que a resistência conferida por genes cromossômaicos.

Embora as informações disponíveis sejam ainda limitadas, é possível ter-se uma idéia da função dos genes contidos nos plasmídios de *Rhizobium* (BERINGER et alii, 1980): a) produção de bacteriolisinas no meio de cultura; b)pequena repressão de bacteriolisinas; c) habilidade de nodular; d) especificidade hospedeira; e) síntese da nitrogenase; f) composição do polisacarídio extracelular; g)produção de pigmento; h) possibilidade de transferência entre estirpes; i) incompatibilidade fisiológica entre plasmídios.

2.4. Capacidade competitiva

A habilidade das estirpes de *Rhizobium* em competir entre si pelos sítios de nodulação é uma importante característica, sendo que notáveis diferenças quali e quantitativas tem sido demonstradas (DATE, 1976). Essa habilidade é determinada ou fortemente influenciada por fatores diversos conforme PETERSON e LOYNACHAN (1981): temperatura (BROCKWELL et alii, 1968; HARDARSON e JONES, 1979); acidez do solo (BROMFIELD e AYANABA, 1980); e deficiência ou excesso de nutrientes (FRANCO, 1978; KEYSER e MUNS, 1979). A habilidade das estirpes de produzirem bacteriolisinas, liberar bacteriófagos (SCHWINGHAMER e BROCKWELL, 1978) ou tolerar bacteriófagos (EVANS et alii, 1979) podem afetar a competitividade no solo e no meio de cultura. Predação (DANSO et alii, 1975 e RAMIREZ e ALEXANDER, 1980) e antagonismo por actinomicetos e outros microorganismos do solo (DAMIRGI e JOHNSON, 1966; SMITH e MILLER, 1974; FOO e UARMA, 1976; CHOWDHURY, 1977) podem afetar a capacidade competitiva do *Rhizobium* no solo, se bem que estes fatores não têm sido avaliados em condições de campo.

As estirpes de *Rhizobium* diferem uma da outra na habilidade de serem selecionadas pela planta hospedeira. O número de nódulos formados por cada estirpe presente depende não só da capacidade competitiva das estirpes como também do seu número. Para predizer o comportamento de uma estirpe com relação ao comportamento de outras, deve-se conhecer

a relação quantitativa entre a proporção das estirpes no inóculo e a proporção dos nódulos formados (AMARGER e LOBREAU, 1982).

IRELAND e VINCENT (1968), citados por AMARGER e LOBREAU (1982), encontraram que num solo, o logarítmo da porcentagem de plantas noduladas por estirpes efectivas de *R. trifolii* está em função direta do logarítmo do número de células de rizóbios efetivas aplicadas na semente e o logarítmo do número de rizóbios no solo.

Num estudo em câmara de crescimento, LABANDERA e VINCENT (1975b) observaram que estirpes efetivas de *R. trifolii* mostraram ter maior capacidade competitiva que as estirpes inefetivas. As mesmas observações foram feitas por MARQUES-PINTO (1974) e ROBINSON (1969). Vinte e quatro estirpes de *R. meliloti* consideradas com potencial para serem usadas na fabricação de inoculantes foram estudadas por VAN-RESBURG e STRIJDOM (1982). As estirpes foram agrupadas em pares para observar a sua habilidade de competir por sítios de nodulação em três cultivares de *Medicago*. Com base nestes estudos, eles sustentam que a capacidade competitiva das estirpes de *Rhizobium* não tem relação com os outros aspectos da simbiose, por exemplo, as estirpes mais competitivas não estavam necessariamente entre as mais efetivas e a capacidade competitiva também não estava relacionada com a capacidade da estirpe de sobreviver no solo.

MARQUES-PINTO et alii (1974), em estudo em casa de vegetação, compararam o "índice de competitividade" que

expressa o êxito relativo na nodulação de duas estirpes com variantes gomosas e não gomosas de *R. meliloti* e *R.trifolii* quando estão representadas em igual proporção na superfície da raiz e encontraram que as variantes gomosas tinham um "índice de competitividade" maior que as não gomosas.

VINCENT (1970) mencionado por ROLFE et alii (1980), em experiências de campo e provas no laboratório, encontrou que um inoculante para trevo continha na sua maior parte estirpes não invasoras, assim como invasoras porêm inefetivas, que formavam colônias pequenas. Mais recentemente foi observado que todas as subestirpes que formavam colônias grandes, contidas na coleção da Universidade de Sidney, demonstraram ser não invasoras. Entretanto, as culturas que formavam colônias pequenas mantiveram a capacidade de infectar, mas eram inefetivas na fixação do nitrogênio. As bases genéticas destes diferentes tipos de mutantes são desconhecidas (ROLFE et alii, 1980).

Estudos feitos por GHAI et alii (1982) indicaram que o comportamento das estirpes de *Rhizobium* num tipo de solo particular e a capacidade competitiva das estirpes nesse solo coincidem amplamente. Assim, a capacidade competitiva das estirpes pode ser julgada com base a seu comportamento. É de se esperar, provavelmente, que as estirpes que possuam maior capacidade de nodulação num solo particular possam ser as mais competitivas também no campo.

Em trabalho de campo HAGEDORN (1979b) utilizou duas marcas de resistência cada uma para 100 µg/ml de

estreptomicina e espectinomicina respectivamente e observaram que as estirpes foram muito competitivas em relação aos rizóbios do solo na nodulação de *T. subterraneum* L.

PETERSON e LOYNACHAN (1981) ressaltam que o mecanismo que afeta a competitividade é pouco entendido. Embora os estudos tenham mostrado especificidade na planta na interação simbiótica com *Rhizobium*, a razão da seletividade não está ainda bem definida. Lectinas, exsudados radiculares , substâncias do tegumento das sementes e que difundem (HALE e MATHERS, 1977) podem estar envolvidos.

Estudos ecológicos a longo prazo no campo com espécies de *Rhizobium* dependem da sua validez na estabilidade das marcas usadas para distinguir as estirpes. Métodos imunológicos têm sido amplamente usados (DUDMAN, 1964;HOLLAND, 1966; TRINICK, 1969; SKRDLETA, 1970) com aparente bons resultados.

Devido ao desaparecimento progressivo de estirpes de *R. trifolii* imunologicamente identificáveis em microcomunidades do solo, tem sido considerada como pobre a persistência de rizóbios envolvidos. No entanto, é possível que tenha havido uma perda gradual das características antigênicas que não permite a identificação sorológica (DUDMAN e BROCKWELL, 1968; BROCKWELL et alii, 1972).

DUDMAN e BROCKWELL (1968) encontraram que a técnica de imunodifusão no gel é ideal quando o propósito é a identificação de estirpes de *Rhizobium* isoladas do campo, e proporciona resultados inequívocos com esforço mínimo.

Posteriormente, BROCKWELL et alii (1977) usaram paralelamente marcas imunológicas e de resistência a estreptomicina para a identificação de *R. trifolii* e concluíram que alguma perda das características imunológicas ou de resistência ao antibiótico ocorre no campo, porém, a proporção não é representativa e não afeta a confiabilidade das técnicas de imunodifusão em gel e/ou uso de mutantes resistentes à estreptomicina na identificação de estirpes dos nódulos em estudos ecológicos de *Rhizobium*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção das culturas variantes

Examinaram-se 65 culturas de *Rhizobium phaseoli* pertencentes a coleção de culturas do IPAGRO/Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul, em relação a presença de variantes.

Das culturas matrizes conservadas sob óleo mineral e em refrigeração, a repicagem foi feita em meio YEM - HM (Yeast, Extract, Mannitol - Hepes, Mes) descrito no Apêndice 1, pela técnica usada por KUYKENDALL e ELKAN (1976). As culturas foram incubadas a 30°C até aparecimento das colônias no agar (geralmente 48 horas). As culturas que apresentaram mais de um tipo de morfologia colonial foram escolhidas para o estudo, e repicando-se para tubos com meio levedura-manitol, armazenados a 4°C após o crescimento.

As culturas foram purificadas até a comprovação da persistência das características da morfologia das colônias e inoculadas em plantas de feijão em casa de vegetação.

Teste de pureza das culturas variantes foram feitas por provas de crescimento em leite litmus (SMIBERT e KRIEG, 1981) e glucose - peptona - agar descritas por VINCENT et alii

(1979).

3.2. Morfologia celular

A dimensão das células foi realizada pela medição com ocular micrométrica, de coloração de Gram, de culturas jovens em fase exponencial.

3.3. Descrição das culturas variantes

Para a observação da morfologia das colônias de cada uma das variantes e estirpes originais, as culturas foram repicadas para placa com o meio gluconato-manitol (MEYER e PUEPPKE, 1980), descrito no Apêndice 2,e incubadas a 30°C. No mesmo meio observou-se a produção de ácido ou alcali pelas culturas.

3.4. Utilização de carboidratos

Foi verificada a habilidade das estirpes variantes na utilização de alguns carboidratos como fonte de carbono, utilizando-se o meio base citado por SCHWINGHAMER (1970), descrito no Apêndice 3. Os caboidratos testados foram: D(+) xilose, D(-) arabinose, D(+) glucose, D(+) galactose, D(-) frutose, L(-) ramnose, melibiose, lactose, sacarose, levulose, D(-) manitol, L(-) arabitol e inositol. Cada

carboidrato foi esterilizado por filtração através de membrana Millipore com poros de 0,45 µm de diâmetro, adicionado ao meio base para uma concentração final de 1% e colocado nas placas.

Cada uma das culturas das variantes e das estirpes originais foram repicadas para placas em cada meio (5 repetições) e incubadas a 30°C.

3.5. Teste de sensibilidade a antibióticos

Determinou-se a sensibilidade das estirpes a quatro antibióticos, de distintos tipos de ação sobre as células, conforme descrito por BUSHBY (1982):

1. Estreptomicina, sulfato (LAFERGS) 780 mcg/ml.
   Concentrações (µg/ml): 500, 1000, 5000, 10000, 15000 e 25000.
   Ação: inibe síntese de proteínas.
2. Novobiocina, sal sódico (Sigma Chemical)
   Concentrações (µg/ml): 100, 200, 250, 300, 350, 440, 500 e 1000.
   Ação: inibe síntese de parede ou membrana celular.
3. Neomicina, sulfato (LAFERGS) 667 U/mg
   Concentrações (µg/ml): 1500, 2000, 3500, 3000, 3500, 4500, 5000, 6000 e 7000.
   Ação: inibe síntese de proteínas e possivelmente afeta a permeabilidade da parede.
4. Ácido nalidíxico (Cristalia Produtos Químicos Farmacêuticos, Ltda.) 104%
   Concentrações (µg/ml): 100, 200, 500, 1000, 2000, 4000 e 10000.

Ação: inibe síntese de ácidos nucleicos.

Todos os antibióticos foram dissolvidos em água exceto o ácido nalidíxico, que foi dissolvido em NaOH 0,1 N e esterilizados por filtração. Uma tira de papel de filtro Whatman 42, com dimensão de 7 x 85 mm esterilizado foi impregnada com 0,1 ml de cada uma das diferentes concentrações de antibióticos e colocada no centro da placa com meio levedura manitol. Cada estirpe foi inoculada macissamente, lateralmente a tira de papel com o antibiótico. Foram feitas cinco repetições por tratamento. As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas. Estimou-se a sensibilidade das culturas a cada antibiótico medindo a faixa de inibição.

3.6. Isolamento da DNA plasmidial

Com o objetivo de determinar se as estirpes variantes tinham modificado seu perfil de plasmídios foi seguida a técnica abaixo descrita, utilizada no Centro de Biotecnologia do Rio Grande do Sul e citada por SANTOS e AFFONSO (1982) que se detalha a seguir:

a) Montagem do gel de agarose, metodologia descrita no Apêndice 4.

b) Isolamento dos plasmídios.

1) As culturas foram inoculadas em tubos com 3 ml de meio levedura manitol e incubadas a 30°C em banho-maria com agitação por 18-20 horas.

2) Centrifugadas a 10000 rpm durante 5 minutos.

3) As células foram ressuspenças em 1 ml de TEB (Apêndice 5).
4) Centrifugadas novamente e ressuspendidas em 100 µl de TEB em um vortex até total homogeneização.
5) Foram colocadas num tubo de Eppendorff de 1,5 ml de capacidade: 30 µl da suspensão de células e 30 µl de uma mistura lítica (ver Apêndice 6), homogeneizadas manualmente.
6) Depois de 5 minutos à temperatura ambiente foram aplicados 50 µl de cada mistura na canaleta do gel (agarose 0,8% em TEB).
7) Em seguida adicionou-se 25 µl de solução de SDS - ficoll 10% (ver Apêndice 7).
8) Homogeneizou-se lentamente, em movimentos circulares com o auxílio de um palito de madeira até que a mistura apresentou aspecto viscoso.
9) Adicionou-se 100 µl de solução de SDS-ficoll 5%, lentamente, evitando que esta camada se misturasse com a camada inferior.
10) As canaletas foram seladas com agarose fundido, aproximadamente a 50°C.
11) A câmara da cuba foi preenchida com TEB e o material foi submetido a uma corrida inicial de 2 mA durante 45 minutos e em seguida a 40 mA até que o corante atingisse a parte inferior do gel.

12) O gel foi colorido com uma solução de brometo de etídio a 1 µg/ml por 30 minutos.

13) O material foi examinado sob luz ultravioleta e fotografado.

3.7. Avaliação da eficiência è da capacidade competitiva por sítios de infecção nodular das estirpes variantes

O experimento foi conduzido em casa de vegetação utilizando-se vasos "Leonard" contendo areia e carvão vegetal na proporção de 4 : 1 para eliminar possível toxidez de manganês relacionada com a areia e esterilizados. Para irrigar foi usada a solução nutritiva esterilizada de SPECHT et alii (1956) descrita no Apêndice 8; em intervalos periódicos foi adicionada água destilada esterilizada durante o ciclo da planta.

Semearam-se 6 sementes por vaso de cultivar de feijão Turrialba-4, previamente desinfectadas em álcool 96° GL por 5 minutos, $HgCl_2$ 0,1% durante 3 minutos e lavagens consecutivas com água destilada para eliminar o excesso de $HgCl_2$. Sete dias após a semeadura foi feito o desbaste deixando-se duas plantas por vaso. As estirpes, desenvolvidas individualmente em meio levedura manitol, foram suspensas em solução salina 0,85% esterilizada e equalizadas por turbidimetria num colorímetro fotoelétrico (Klett-Summerson). Determinou-se o número real de células viáveis de cada suspensão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Descrição das variantes isoladas

As colônias selecionadas foram obtidas das estirpes SEMIA 424, nativa do Rio Grande do Sul; SEMIA 410, isolada de um inoculante comercial dos Estados Unidos e SEMIA 476 (CC 511) originária da Austrália.

A morfologia colonial das estirpes de *R. phaseoli* estudadas está detalhada nas Tabelas 1, 2, 3 e Apêndices 9 a 18.

Foi observada a presença de variantes na estirpe 476, que apresentou dois tipos diferentes de colônias: puntiformes e opacas, que correspondem à variante 476-1, e a variante 476-2 que formou colônias viscosas com 1 mm de diâmetro. A estirpe 424 apresentou três tipos de morfologia colonial distinta; variantes 424-1 e 424-3 formaram colônias de 1 mm de diâmetro e viscosas. A 424-2 formou colônias grandes e muito viscosas, mostrando morfologia típica dos rizóbios de crescimento rápido. A estirpe 410 apresentou dois tipos de colônias, a 410-1 formou colônias pequenas e opacas e a 410-2 desenvolveu colônias maiores e viscosas. Essas variantes conservaram suas características coloniais quando foram transferidas para placas com meio

pelo método de diluição em placa, obtendo-se uma concentração em torno de $2,5 \times 10^{10}$ a $4,0 \times 10^{10}$ células/ml.

Foram preparados inóculos mistos de 3 estirpes adicionando 2 ml de cada suspensão de células. Sendo usadas todas as combinações possíveis entre as estirpes, além do que foram inoculadas cada uma delas em forma individual. A inoculação foi efetuada com 1 ml da suspensão de células. Testemunhas sem inocular e com nitrogênio total e outra sem inocular foram adicionadas ao experimento. O tratamento nitrogenado recebeu a cada 3 dias 10 ml de NH_4HO_3 contendo 7 mg de N/ml durante o ciclo da planta totalizando 700 mg de N/vaso. Para propiciar um melhor desenvolvimento inicial das plantas, adicionou-se 35 mg de nitrogênio na forma de NH_4NO_3 a todos os tratamentos. Utilizaram-se 3 repetições por tratamento.

A colheita foi efetuada 48 dias após, em floração plena, e avaliou-se: o peso seco dos nódulos e o rendimento de matéria seca da parte aérea após secagem em estufa a $60^{o}C$ até peso constante; nitrogênio total da parte aérea (TEDESCO, 1982).

Para a identificação dos grupos sorológicos das estirpes inoculadas foram preparados os antissoros específicos de cada uma delas em coelhos, conforme a metodologia citada por SCHMIDT et alii (1968). De cada uma das estirpes foi feita uma suspensão com solução salina 0,85% e colocada em banho-maria a $100^{o}C$ durante 30 minutos para inativar os antígenos flagelares, uma gota da suspensão de células

de cada estirpe foi colocada num tubo em contato com cada um dos antissoros preparados, posteriormente incubados por 2-3 horas em banho-maria a 60°C e lida a aglutinação.

A avaliação da capacidade competitiva das variantes foi efetuada pelo reisolamento e identificação das estirpes formadoras dos nódulos tomando-se ao acaso 60 nódulos (20 por repetição) dos tratamentos inoculados com as misturas das culturas. Cada variante assim recuperada foi identificada pela sua sensibilidade a um ou mais dos antibióticos testados conforme determinado no item 3.5 e seguindo a mesma metodologia.

Para determinar as características das colonias das estirpes variantes após passagem por planta, as culturas recuperadas dos nódulos foram repicados ao meio gluconato-manitol em placa, o mesmo que foi usado para a descrição da morfologia das colonias ao início da pesquisa.

TABELA 1. Características das colonias de *R. phaseoli* SEMIA 476 e suas variantes no meio de cultura glu conato-manitol[1/], após 48 horas de incubação.

Características	Estirpes e Variantes		
	476	476-1	476-2
Diâmetro (mm)	1	<1	1
Forma	irregular	puntiforme	circular
Elevação	plana	convexa baixa	convexa baixa
Superfície	lisa	lisa	lisa
Bordos	inteiros	inteiros	inteiros
Densidade ótica	translúcida	opaca	translúcida
Consistência	viscosa	butirosa	viscosa
pH do meio	sem mudança	sem mudança	sem mudança

[1/] MEYER e PUEPPKE (1980).

TABELA 2. Características das colonias de *R. phaseoli* SEMIA 424 e suas variantes, no meio de cultura gluconato-manitol[1/], após 48 horas de incubação.

Características	Estirpes e Variantes			
	424	424-1	424-2	424-3
Diâmetro (mm)	4	1	3	1
Forma	circular	circular	circular	circular
Elevação	convexa alta	convexa baixa	convexa baixa	convexa baixa
Superfície	lisa	lisa	lisa	lisa
Bordos	inteiros	inteiros	inteiros	inteiros
Densidade ótica	translúcida	translúcida	translúcida	opaca
Consistência	muito viscosa	viscosa	butirosa	viscosa
pH do meio	sem reação	sem reação	sem reação	ácida

[1/] MEYER e PUEPPKE (1980).

TABELA 3. Características das colonias de *R. phaseoli* SEMIA 410 e suas variantes no meio de cultura glu conato-manitol[1/], após 48 horas de incubação.

Características	Estirpes e Variantes		
	410	410-1	410-2
Diâmetro (mm)	3	1	5
Forma	circular	circular	circular
Elevação	convexa alta	convexa alta	convexa alta
Superfície	lisa	lisa	lisa
Bordos	inteiros	inteiros	inteiros
Densidade ótica	translúcida	opaca	translúcida
Consistência	muito viscosa	butirosa	muito viscosa
pH do meio	sem reação	sem reação	sem reação

[1/] MEYER e PUEPPKE (1980).

levedura manitol em passes sucessivos.

A variante 424-3 acidificou o meio de cultura glucon<u>a</u>to-manitol enquanto que as outras variantes não mostraram mudanças.

No estudo das características de morfologia celular, não foram observadas diferenças de tamanho das células das variantes observadas (Tabela 4). Em preparações rápidas em campo escuro todas as culturas apresentaram igual motilidade.

A resposta das variantes em meio leite litmus (Tabela 5) está dentro do reportado por VINCENT (1979) para *Rhizobium*. O meio foi alcalinizado pela maioria das variantes, à exceção da estirpe matriz 410 e sua variante 410-2, que não modificaram o pH. A estirpe 424 e suas variantes 424-1, 424-2 e 424-3 formaram uma pequena zona de soro. Em meio peptona-dextrose-agar as estirpes 424 e 410, assim como suas variantes, desenvolveram-se abundantemente. O meio foi acidificado unicamente pela estirpe 424 e suas variantes, enquanto que a estirpe 476 e suas variantes cresceram pouco e não mostraram alteração no pH. VINCENT et alii (1979) menciona que o *Rhizobium* cresce pobremente neste meio com pouca alteração de pH. Pelo observado neste trabalho nem todas as estirpes de *R. phaseoli* se comportam desta forma.

TABELA 4. Dimensão das células das estirpes de *R. phaseoli* SEMIA 476, SEMIA 424, SEMIA 410 e suas variantes, após 48 horas de crescimento no meio gluconato-manitol. Médias de 10 repetições.

Estirpe	Tamanho das células (µm)
476	1,50 x 2,45
476-1	1,16 x 2,23
476-2	1,23 x 2,16
424	1,35 x 2,46
424-1	1,20 x 2,44
424-2	1,15 x 2,21
424-3	1,10 x 2,39
410	1,13 x 2,19
410-1	0,86 x 2,83
410-2	1,00 x 2,23

TABELA 5. Resultados do crescimento de *R. phaseoli* SEMIA 476, SEMIA 424, SEMIA 410 e respectivas variantes após 72 horas de incubação a 30°C em meio leite litmus[1/] e peptona-dextrose-agar[2/]. Resultados de 3 repetições.

Estirpes	Variantes	Reação em leite litmus			Desenvolvimento em peptona-dextrose-agar	
		pH	Coagulação	Formação de soro	Crescimento	pH
476		A	S	S	+	S
	476-1	A	S	S	+	S
	476-2	A	S	S	+	S
424		A	S	+	+++	Ac
	424-1	A	S	+	+++	Ac
	424-2	A	S	+	+++	Ac
	424-3	A	S	+	+++	Ac
410		S	S	S	+++	S
	410-1	A	S	S	+++	S
	410-2	S	S	S	+++	S

Símbolos: A - alcalino; Ac - ácido; S - sem modificação.
+ pouco; +++ abundante.

[1/] SMIBERT e KRIEG (1981).
[2/] VINCENT et alii (1979).

TABELA 6. Avaliação do crescimento de *R. phaseoli* SEMIA 476, SEMIA 424, SEMIA 410 e suas variantes em meio de cultivo agarizado com diversos carboidratos após 72 horas de incubação a 30°C. Resultados de 5 repetições.

Carboidratos	Estirpes									
	476	476-1	476-2	424	424-1	424-2	424-3	410	410-1	410-2
D(+) xilose	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
D(-) arabinose	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
D(+) glucose	++	+	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
D(+) galactose	++	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
D(-) frutose	+	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
L(-) ramnose	-	-	-	++	++	++	++	+	-	-
lactose	++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
sacarose	++	-	-	+++	+++	+++	+++	++	++	+
melibiose	+	-	-	++	++	++	++	+	-	-
levulose	+	-	-	++	++	++	++	+	-	-
D(-) manitol	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
L(-) arabitol	-	-	-	+	++	++	++	-	-	-
inositol	-	-	-	++	++	++	++	-	-	-

Símbolos: - sem crescimento; + pouco crescimento; ++ médio crescimento; +++ abundante crescimento.

4.2. Utilização de carboidratos

Na Tabela 6 são mostrados os resultados da utilização de carboidratos pelas estirpes em estudo. A estirpe 476 e suas variantes 476-1 e 476-2) foram incapazes de utilizar ramnose, arabitol e inositol; frutose, melibiose e levulose foram metabolizados pobremente pela estirpe 476 enquanto que suas variantes não a utilizaram. Essa mesma estirpe, assim como suas variantes, cresceram abundantemente em xilose, arabinose e manitol; a lactose foi pobremente metabolizada e a sacarose não foi utilizada pelas variantes. Não foram observadas diferenças marcantes entre as variantes 476-1 e 476-2 na utilização dos carboidratos testados, com exceção para a glucose; que foi metabolizada pobremente pela variante 476-1, ao passo que a 476-2 não se desenvolveu, o que sugere que esta variante carece de uma hexaquinase. KUYKENDALL e ELKAN (1976) testaram a utilização de uma série de carboidratos por variantes de *R. japonicum* e encontraram que uma delas crescia bem no manitol, enquanto que a outra variante não desenvolveu. Verificou-se assim que a estirpe 476 e suas variantes foram menos eficientes na utilização dos carboidratos.

A estirpe 424 e suas variantes mostraram de forma geral, maior eficiência na metabolização dos carboidratos; sendo que as variantes mostram ter o mesmo comportamento. MEYER e PUEPPKE (1980) não encontraram diferenças significativas na utilização de carboidratos entre variantes de *P.*

japonicum.

As variantes 410-1 e 410-2 mostraram diferenças na capacidade de utilizar a galactose, já que a variante 410-1 cresceu abundantemente, enquanto que a 410-2 não se desenvolveu; esta mesma variante utilizou muito pouco a sacarose, contrariamente à 410-1 que se desenvolveu bem. Nos outros carboidratos não houve diferenças entre as variantes desta estirpe.

As variantes 476-1, 376-2 e 410-2, que mostraram menos exigência no metabolismo dos carboidratos usados, coincidentemente apresentaram baixa efetividade (Tabela 10). Resultados semelhantes são reportados por MULONGOY e ELKAN (1977) em *R. japonicum*.

A maior ou menor eficiência no metabolismo de carboidratos e outros nutrientes poderia explicar as variações nas características culturais, como por exemplo, o aspecto colonial. Poderia também ressaltar que o crescimento de culturas com predominância de variantes de maior exigência nutricional pode trazer problemas a sua preservação em coleções bem como à multiplicação para a produção de inoculantes.

4.3. Sensibilidade a antibióticos

A Tabela 7 mostra os resultados dos testes de sensibilidade das estirpes a estreptomicina. Observa-se que a diferença entre as variantes 476-1 e 476-2 é mais acentuada

TABELA 7. Resultados dos testes de sensibilidade a diferentes concentrações de estreptomicina das estirpes de *R. phaseoli* SEMIA 476, SEMIA 424, SEMIA 410 e suas variantes. Médias de cinco repetições.

Estirpe	Variante	Estreptomicina[a] µg/ml*					
		500	1000	5000	10000	15000	25000
476		5[b]	9	11	15	18	18
	476-1	5	10	15	20	20	20
	476-2	5	5	10	16	18	18
424		0	3	3	5	5	10
	424-1	7	15	18	20	20	20
	424-2	0	0	3	5	7	10
	424-3	8	10	12	15	17	19
410		0	0	3	5	6	14
	410-1	8	10	12	15	15	20
	410-2	0	0	5	6	8	13

a - potência 780 mcg/mg.

b - faixa de inibição do crescimento em mm.

*As tiras de papel filtro Whatman 42, foram impregnadas com 0,1 ml de estreptomicina as concentrações indicadas.

nas concentrações de 1000, 5000 e 10000 µg/ml.

Das variantes da estirpe 424, a 424-2 se mostrou mais resistente, sendo a 424-1 a mais sensível.As variantes 410-1 e 410-2 mostraram ser muito diferentes na sensibilidade a estreptomicina, sendo a 410-2 mais resistente; no experimento para avaliação da efetividade (Tabela 10) esta variante mostrou ter perdido a capacidade de fixar nitrogênio. PANKHURST (1977) afirma ser pouco freqüente a perda da efetividade em estirpes de *Rhizobium* de crescimento rápido resistentes aos antibióticos que inibem a síntese de proteínas, como a estreptomicina. HAGEDORN (1979) encontrou que resistência à estreptomicina em *R. meliloti* esteve associada à redução da efetividade em algumas estirpes. No entanto, outras não mostraram modificação. A explicação dada por aquele autor é que a alteração é mais dependente da estirpe que do antibiótico.

MEYER e PUEPPKE (1980) observaram que as variantes de *R. japonicum* que formavam colônias grandes foram mais sensíveis aos antibióticos que as que formavam colônias pequenas. Esses resultados não coincidem com os observados nesta pesquisa. Observou-se claras diferenças na sensibilidade a novobiocina (Tabela 8) entre as variantes 476-2, 424-1 e 410-1, que mostraram ter perdido resistência ao antibiótico. A variante 476-2 mostrou-se mais sensível que a 476-1. O comportamento das variantes 424-2 e 410-2 em diferentes concentrações de novobiocina foi semelhante ao de suas respectivas matrizes.

TABELA 8. Resultados dos testes de sensibilidade a diferentes concentrações de novobiocina das estirpes de *R. phaseoli* SEMIA 476, SEMIA 424, SEMIA 410 e suas variantes. Médias de cinco repetições.

Estirpe	Variante	Novobiocina µg/ml*							
		100	200	250	300	350	400	500	1000
476		0[b]	3	3	5	5	5	11	20
	476-1	0	1	5	5	5	8	10	20
	476-2	0	5	10	10	10	12	15	20
424		0	0	0	0	0	0	0	10
	424-1	0	3	5	10	10	15	15	20
	424-2	0	0	0	0	0	0	0	10
	424-3	0	0	0	3	10	10	12	15
410		0	0	0	0	0	3	3	9
	410-1	4	8	10	10	10	10	14	16
	410-2	0	0	0	0	0	3	5	8

b - faixa de inibição do crescimento em mm.

* As tiras de papel filtro Whatman 42, foram impregnadas com 0,1 ml de novobiocina as concentrações indicadas.

BUSHBY (1982) cita perda da efetividade em estirpes de *Rhizobium* de crescimento rápido, resistentes a novobiocina (inibidor de síntese da parede celular); em concordância, as estirpes e variantes 424, 424-2, 410 e 410-2 foram as mais resistentes e apresentaram baixa efetividade.

As variantes 424-3 e 410-1 mostraram-se mais sensíveis à neomicina (Tabela 9) que as outras variantes, sendo que no experimento de avaliação da efetividade foram mais efetivas. BUSHBY (1982) menciona que as estirpes de *Rhizobium* de crescimento rápido são menos efetivas com o aumento de resistência a neomicina; HAGEDORN (1979) encontrou que as mutantes de *R. meliloti* resistentes a neomicina foram altamente inefetivas.

Todas as estirpes mostraram-se resistentes ao ácido nalidíxico em concentrações até 10000 µg/ml.

4.4. Características plasmidiais

A Figura 1 mostra o perfil de plasmídios de cada uma das estirpes matrizes e suas variantes. Na estirpe 410 não foi observada a presença de plasmídios pela técnica usada que, porém, tem um baixo grau de resolução. Essa figura mostra que, todas as outras estirpes têm pelo menos dois plasmídios e não apresentam diferenças entre elas, mesmo quando houve perda da efetividade como a variante 410-2.

DJORDJEVIC et alii (1982) não encontraram alterações demonstráveis nos plasmídios de duas mutantes efetivas

TABELA 9. Resultados de avaliação de teste de sensibilidade a diferentes concentrações de neomicina das estirpes de *R. phaseoli* SEMIA 476, SEMIA 424, SEMIA 410 e suas variantes. Médias de cinco repetições.

Estirpe	Variante	Neomicina[a] µg/ml*								
		2000	2500	3000	3500	4000	4500	5000	6000	7000
476		0	0	0	2	3	3	3	3	3
	476-1	0	2	2	3	3	4	5	5	5
	476-2	0	3	3	4	5	5	5	5	5
424		0	2	2	3	4	4	5	5	5
	424-1	1	2	3	3	3	3	5	5	5
	424-2	0	2	2	4	4	4	4	4	5
	424-3	3	5	5	5	5	5	6	6	6
410		0	0	0	2	4	4	5	5	5
	410-1	2	2	2	5	5	5	5	5	5
	410-2	0	2	2	4	4	4	4	4	5

a - potência 667 U/mg.
b - faixa de inibição do crescimento em mm.

*As tiras de papel filtro Whatman 42, foram impregnadas com 0,1 ml de neomicina as concentrações indicadas.

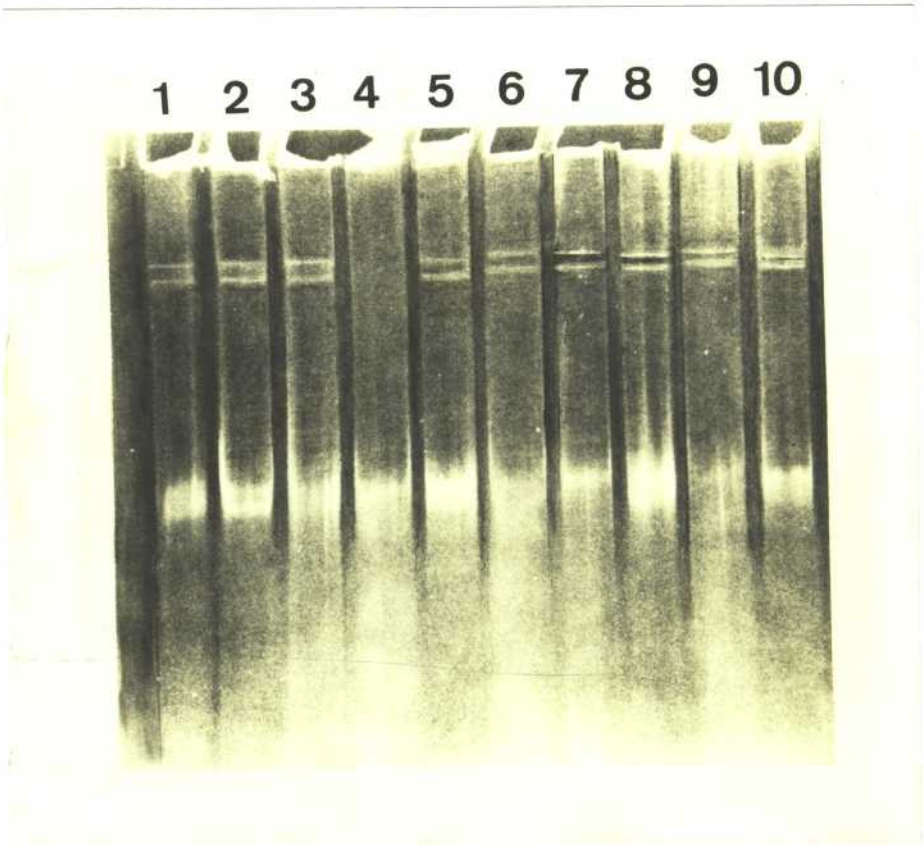


FIGURA 1. Perfil eletroforético em gel de agarose do DNA plasmidial das estirpes de *R. phaseoli*: SEMIA 476, 476-1, 476-2, SEMIA 410, 410-1, 410-2, SEMIA 424, 424-1, 424-2, 424-3 nas canaletas 1 a 10 respectivamente.

e inefetivas de *R. trifolii*. O mesmo autor cita comunicação pessoal de AUSUBEL, F.M., que um pequeno elemento móvel residente pode inserir-se especificamente em sítios do genoma de *R. meliloti* e indiretamente inativar a expressão dos genes para a fixação do nitrogênio, sem modificação dos plasmídios. Essa poderia ser uma explicação ao fato de que a variante 410-2 se comportou como inefetiva e seus plasmídios aparentemente não se modificaram.

4.5. Avaliação da eficiência e capacidade competitiva por sítios de infecção nodular das variantes

Os dados obtidos de peso de nódulos secos em experimento em casa de vegetação não revelam uma relação com o nitrogênio fixado (Tabela 10), já que variantes que se mostraram inefetivas como a 410-2, formaram maior massa nodular que outras mais efetivas como a 476-2 ou a mistura de variantes do primeiro tratamento. Isso é confirmado pelo teste estatístico.

No rendimento de matéria seca foram encontrados unicamente três grupos diferentes estatisticamente: a testemunha nitrogenada no grupo superior, um intermediário que incluiu todos os tratamentos inoculados com as estirpes e um grupo inferior, a testemunha sem inoculação. Ainda que a diferença no rendimento entre os tratamentos não seja significativa, observou-se que onde o rendimento de matéria seca

TABELA 10. Peso seco de nódulos, rendimento de matéria seca da parte aérea, porcentagem e teor de nitrogênio total de *Phaseolus vulgaris* cv. Turrialba 4 em resposta à inoculação com as estirpes de *R. phaseoli* SEMIA 476, SEMIA 424, SEMIA 410 e suas variantes, individualmente e em combinações mistas. Médias de três repetições (duas plantas/vaso).

Tratamentos			Peso de nódulos	Matéria seca	% de N	N total
			mg/vaso	g/vaso		mg/vaso
424-1	476-1	476-2	511ab	4,37 b	1,70 b	78 bc
424-1	410-1	410-2	436 b	2,37 b	1,22 b	29 bc
424-1	424-2	424-3	467ab	2,92 b	1,40 b	40 bc
424-2	476-1	476-2	910ab	5,13 b	1,55 b	87 bc
424-2	410-1	410-2	799ab	4,11 b	1,46 b	63 bc
424-3	476-1	476-2	506ab	3,10 b	1,60 b	50 bc
424-3	410-1	410-2	934ab	4,48 b	1,74 b	64 bc
410-1	476-1	476-2	813ab	4,15 b	1,41 b	62 bc
410-1	424-1	424-2	664ab	4,01 b	1,58 b	65 bc
410-2	424-1	424-2	769ab	4,04 b	1,50 b	63 bc
476-1	424-2	424-3	587ab	3,00 b	1,26 b	38 bc
476-1	410-1	410-2	770ab	3,56 b	1,51 b	52 bc
476-2	410-2	476-1	808ab	4,73 b	1,67 b	75 bc
476-2	424-3	410-1	525ab	3,10 b	1,44 b	47 bc
476-2	424-1	424-2	1194a	4,00 b	1,78 b	73 bc
410-1	424-1	424-3	1209a	6,11 b	1,96 b	119 b
	424-1		569ab	4,31 b	1,80 b	75 bc
	424-2		595ab	2,86 b	1,68 b	51 bc
	424-3		798ab	4,34 b	1,84 b	80 bc
	410-1		573ab	3,35 b	1,82 b	62 bc
	410-2		558ab	2,19 b	1,23 b	29 bc
	476-1		600ab	4,11 b	1,51 b	62 bc
	476-2		479ab	3,21 b	1,74 b	69 bc
	424		525ab	4,23 b	1,63 b	67 bc
	476		687ab	4,72 b	1,61 b	76 bc
	410		687ab	4,12 b	1,52 b	63 bc
Testemunha			-	1,51 c	1,51 b	23 c
Testemunha + N			-	12,67a	3,47a	422a

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%. As análises de variança são apresentadas nos Apêndices, 19 a 21.
Coeficiente de variação %: peso de nódulos, 39; matéria seca, 37; % de N, 44; N total, 40.

foi alto, o conteúdo de nitrogênio total seguiu a mesma tendência.

A porcentagem de nitrogênio no tecido não foi diferente entre os tratamentos inoculados com as estirpes.

Os resultados de nitrogênio total no tecido dos tratamentos inoculados com as culturas na forma individual não foram diferentes estatisticamente entre eles; embora estas diferenças não sejam significativas, podemos observar diversidade na capacidade de fixar nitrogênio atmosférico entre algumas variantes. No caso da variante 410-2, que produziu 29 mg de N/vaso, menos da metade de sua estirpe matriz (63 mg N/vaso), torna-se evidente que ela perdeu a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, sendo de salientar que os nódulos formados pela variante foram inefetivos (de cor branca) e abundantes. No entanto, a outra variante 410-1 se comportou como sua estirpe matriz.

As variantes 476-1 e 476-2 não apresentaram diferenças marcantes no nitrogênio total no tecido.

Entre as variantes da estirpe 424, 424-1 e 424-3 mostraram ser superiores em efetividade que a 424-2.

Pelos dados obtidos a variante 410-2, que sintetizou uma grande quantidade de polissacarídios extracelulares, se comportou como inefetiva; a variante 424-3, que formou colônias pequenas, mostrou ter uma boa capacidade de fixar nitrogênio. Essa mesma tendência se observou com as outras estirpes. Esses dados contradizem os observados por VINCENT (1962), que encontrou que as variantes de *R. trifolii* que

formavam colônias muito viscosas, eram mais efetivas.Por outro lado, HERRIDGE e ROUGHLEY (1975) observaram que as variantes de *Rhizobium* spp. que formavam colônias grandes e viscosas foram menos efetivas que as pequenas e secas. Resultados semelhantes são reportados por UPCHURCH e ELKAN (1977) em *R. japonicum*.

Nas combinações das variantes, o tratamento inoculado com a combinação 410-1, 424-1 e 424-3 foi superior. Segundo a Tabela 11, 63% dos nódulos foram induzidos pela variante 424-3, seguido pela 424-1 (25%) e mais pobremente pela 410-1 (12%). Individualmente as duas primeiras variantes mostraram ter boa capacidade de fixar nitrogênio,em mistura, elas dominaram e seriam as responsáveis pela alta fixação.

As variantes 424-2, 476-1 e 476-2, que individualmente se mostraram menos efetivas, que quando foram inoculadas em combinação; de alguma maneira, a combinação das três culturas influiu para a apresentação de uma melhor capacidade fixadora.

Pelo contrário a variante 424-3, que individualmente se comportou como boa fixadora,quando se inoculou em mistura com outras culturas, sua efetividade diminuiu apesar de que ela dominou os sítios de nodulação. BROMFIELD e JONES (1980) observaram que pode existir uma competição ou antagonismo entre as estirpes quando são inoculadas juntas o que faz com que a sua capacidade fixada não seja manifestada.

TABELA 11. Ocorrência das estirpes variantes de *R. phaseoli* em nódulos de *Phaseolus vulgaris* cv. Turrialba 4 cultivada em casa de vegetação, em resposta à inoculação com combinações das estirpes. Identificações feitas pela sensibilidade a antibióticos.

Tratamentos			%							
			424-1	424-2	424-3	410-1	410-2	476-1	476-2	Total
424-1	476-1	476-2	66	-	-	-	-	17	17	100
424-1	410-1	410-2	43	-	-	14	43	-	-	100
424-1	424-2	424-3	5	80	15	-	-	-	-	100
424-2	476-1	476-2	-	65	-	-	-	15	15	95
424-2	410-1	410-2	-	60	-	20	20	-	-	100
424-3	476-1	476-2	-	-	76	-	-	12	12	100
424-3	410-1	410-2	-	-	64	18	18	-	-	100
410-1	476-1	476-2	-	-	-	22	-	22	55	99
410-1	424-1	424-2	50	30	-	10	-	-	-	90
410-2	424-1	424-2	33	54	-	-	11	-	-	98
476-1	424-2	424-3	-	33	47	-	-	20	-	100
476-1	410-1	410-2	-	-	-	6	47	47	-	100
476-2	410-2	476-1	-	-	-	-	36	10	53	99
476-2	424-3	410-1	-	-	56	33	-	-	10	99
476-2	424-1	424-2	24	38	-	-	-	-	36	98
410-1	424-1	424-3	25	-	63	12	-	-	-	100

A capacidade competitiva mostrada pela variante 410-2, embora não sendo muito alta, poderia apresentar problemas se ela dominasse a cultura mista original, ou se fosse usada em mistura com outras, já que ela se comportou como inefetiva. Essa variabilidade apresentada por estirpes de *R. phaseoli* pode gerar problemas na fabricação de inoculantes, já que provavelmente decresceria sua utilidade para propósitos agrícolas se forem usadas culturas com predomínio de variantes com características indesejáveis.

FRANCO e VINCENT (1976) afirmam que a habilidade das estirpes de *Rhizobium* de competir por sítios de nodulação não é relacionada com outros aspectos da simbiose; por exemplo, a melhor capacidade competitiva não significa necessariamente que a estirpe seja mais efetiva.

É de ressaltar que após a inoculação e reisolamento dos nódulos formados, as variantes recuperadas não apresentaram a mesma morfologia colonial que tinham antes de ser inoculadas. Houve portanto, uma aparente reversão às características da cultura matriz, que era na realidade uma mistura de tipos variantes ou a imposição de características novas.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que:

a) Algumas das estirpes de *R. phaseoli* estudadas, pertencentes a coleção de culturas do IPAGRO/ Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul, apresentaram variantes espontâneas, com modificações nas características culturais, bioquímicas, de sensibilidade a antibióticos e simbióticas.

b) A variação nas características culturais apresentadas pelas culturas, mostrou não ser estável após passagem por fase de infecção em planta e formação de nódulos.

c) Apesar de não haver significância estatística observou-se ocorrencia de variantes com redução ou aumento da efetividade na fixação de nitrogênio, com relação a cultura matriz.

6. BIBLIOGRAFIA CITADA

ALBRECHT, S.L.; MAIER, R.J.; HANUS, F.J.; RUSELL, S.A.; EMERICH, D.W.; EVANS, H.J. 1979. Hydrogenase in *Rhizobium japonicum* increases nitrogen fixation by nodulation soybeans. *Science*, London, *203*:1255-1257.

ALLEN, E.K. & ALLEN, O.N. 1950. Biochemical and symbiotic properties of the rhizobia. *Bacteriol. Rev.*, London, *14*: 273-330.

AMARGER, N. & LOBREAU, J.P. 1982. Quantitative study of nodulation competitiveness in *Rhizobium* strains. *Appl. Env. Microbiol.*, Washington, *44*:583-588.

ANDERSON, E.S. & LEWIS, M.J. 1965. Characterization of the transfer factor associated with drug resistance in *Salmonella typhimirium*. *Nature*, London, *208*:843-849.

APPELBAUM, E.R.; JOHANSEN, E.; CHARTRAIN, N. 1984. Identification of plasmids carriying symbiotic genes in fast-growing *Rhizobium japonicum* using DNA hybridization and Tn 5 mutagenesis. In: UEEGER, C. & NEWTON, W.E. eds. *Advances in nitrogen fixation research*. Amsterdam, J. Wiley, p.670.

ATOUN, H.; BORDELEAU, I.M.; PREVOST, D. 1982. Strain identification in *Rhizobium meliloti* using the antibiotic disk susceptibility test. *Plant and Soil*, The Hague, *66*: 45-50.

BANFALVI, Z.; SKANYAN, V.; KONCZ, C.; KISS, A.; DUSHA, I.; KONDORSI, A. 1981. Location of nodulation fixation genes on a high molecular weight plasmid of *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.*, Berlin, *184*:318-325.

BERINGER, J.E.; BREWIN, N.J.; JOHNSTON, A.W.B. 1980. The genetic analysis of *Rhizobium* in relation to symbiotic nitrogen fixation. *Heredity*, London, *45*(2):161-186.

BEYNON, J.L.; BERINGER, J.E.; JOHNSTON, A.W.B. 1980. Plasmids and host-range in *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium phaseoli*. *J. Gen. Microbiol.*, New York, *120*: 421-429.

BREWIN, N.J.; DE-JONG, T.M.; PHILLIPS, D.A.; JOHNSTON, A.W.B. 1980. Co-transfer of determinants for hidrogenase activity and nodulation ability in *Rhizobium leguminosarum*. *Nature*, London, *288*:277-279.

BROCKWELL, J.; BRYANT, W.G.; GAULT, R.R. 1972. Ecological studies of root-nodule bacteria introduced into field environment. III. Persistence of *Rhizobium trifolii* in association with White clover at high elevations. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.*, Melbourne, *12*:407-413.

BROCKWELL,J.; SCHWINGHAMER, E.A.; GAULT, R.R. 1977. Ecological studies of root-nodule bacteria introduced into field environment. V. A critical examination of the stability of antigenic and Streptomycin-resistance markers for identification of strains of *Rhizobium trifolii*. *Soil Biol. Biochem.*, Oxford, 9:19-24.

BROMFIELD, E.S.P. & JONES, G.D. 1980. Studies on double strain occupancy of nodules and the competitive ability of *Rhizobium trifolii* and red and White clover grown in soil and agar. *Ann. Appl. Biol.*, London, *94*:51.

BUCHANAN, R.E. & GIBBONS, N.E. 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8 th. edn. Williams & Wilkins, Baltimore, p.286-287.

BUSHBY, H.V.A. 1982. Direct quantitative recovery of *Rhizobium* from soil and rhizosphere. In: VINCENT, J.M. ed. *Nitrogen fixation in legumes*. Sydney, Academic Press. Cap.7, p.59-67.

CANTRELL, M.A.; HICKOK, R.E.; EVANS, H.J. 1982. Identification and characterization of plasmids in hydrogen uptake positive and hydrogen uptake negative strains of *Rhizobium japonicum*. *Arch. Microbiol.*, Berlin, *131*:102-106.

CASSE, F.; BOUCHER, C.; JULLIOT, J.S.; MICHEL, M.; DÉNARIÉ, J. 1979. Identification e characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *J. Gen. Microbiol.*, New York, *113*:229-242.

COLE, M.A. & ELKAN, G.H. 1973. Transmissible resistance to Penicillin G, Neomycin and Chloranpheniral in *Rhizobium japonicum*. *Antimicrobial Agents and Chem.*, 4:248-253.

CONN, H.J.; JENNISON, M.W.; WEEKS, O.B. 1957. Routine tests for the identification of bacteria. In: PELCZAR, M.J.,ed. *Manual of the Microbiological Methods*. New York, cap.7, p.140-168.

DATE, R.A. 1976. Principles of *Rhizobium* strains selection. In: NUTHAM, P.S. ed. *Symbiotic nitrogen in plants*. Cambridge, Cambridge University Press. Cap.12, p.137-150.

DAVIS, R.J. 1962. Resistance of rhizobio to antimicrobial agents. *J. Bacteriol.*, New York, *84*:187-188.

DAZZO, F.B. & BRILL, W.J. 1979. Bacterial polysacharide which binds *Rhizobium trifolii* to clover root hairs. *J. Bacteriol.*, New York, *137*:1362-1373.

DÉNARIÉ, J.; BOISTARD, P.; CASSE-DELBART, F. 1981. Indigenous plasmids of *Rhizobium*. In: GILES, K.L. & ATHERLY, A.G., ed. *Biology of the Rhizobioceae*. Academic Press, New York. p.225-246.

DIXON, W.D. 1968. Hydrogenase in pea root nodule bacteroids. *Arch. Microbiol.*, Berlin, *62*:272-283.

_____. 1972. Hydrogenase in legume root nodule bacteroids: ocurrance and properties. *Arch. Microbiol.*, Berlin, *85*:193-201.

DJORDJEVIC, M.A.; ZURKOWSKI, W.; ROLFE, B.G. 1982. Plasmids and stability of symbiotic properties of *Rhizobium trifolii*. *J. Bacteriol.*, New York, *151*:560-568.

DRETZ-MARTINEZ, G. & ARIAS, A. 1972. Enzymatic bases for differentiation of *Rhizobium* into fast and slow-growing groups. *J. Bacteriol.*, New York, *109*:467-470.

DUDMAN, W.F. 1964. Inmune diffusion analysis of the extracellular soluble antigens of two strains of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.*, New York, *88*:782-792.

DUDMAN, W.F. & BROCKWELL, J. 1968. Ecological studies of root-nodule bacteria-introduced into field environments. I. A survey of field performance of clover inoculants by gel inmune diffusion serology. *Aust. J. Agr. Res.*, East Melbourne, *19*:739-747.

EMERICH, D.W.; RUIZ-ARGUESO, T.; CHING, T.M.; EVANS, H. J. 1979. Hydrogendependent nitrogenase activity and ATP formation in *Rhizobium japonicum* bacteroids. *J. Bacteriol.*, New York, *137*:153-160.

FRANCO, A.A. & VINCENT, J.M. 1976. Competition among rhizobial strains for the colonization and nodulation of two tropical legumes. *Plant and Soil*, The Hague, *45*:27-48.

GHAI, B.S.; KARIR, I.S.; AGNIHORTRI, S.K. 1982. Competition of strains of *Rhizobium* of the cowpea group in two soil types. *Plant and Soil*, The Hague, *64*:251-253.

GRAHAM, P.H. 1964. Studies on the utilization of carbohydrates and Krebs cycle intermediates by rhizobia using an agar plate method. *Antonie van Leenwenhock*, Delft, *30*:68-72.

GROSS, D.C.; VIDAVER, A.K.; KLUCAS, R.U. 1979. Plasmids biological properties and efficacy of nitrogen fixation in *Rhizobium japonicum* strains indigenous to alkaline soils. *J. Gen. Microbiol.*, New York, *114*:257-266.

HAGEDORN, C. 1979a. Relationship of antibiotic resistance to effectiveness in *Rhizobium trifolii* populations. *Soil Soc. Am. J.*, Madison, *43*:921-925.

_____. 1979b. Nodulation of *Trifoluim subterraneum* by introduced rhizobia in Southwest Oregon soils. *Soil. Sci. Soc. Am. J.*, Madison, *43*:515-519.

HANSEN, J.B. & OLSEN, R.H. 1978. Inc P2 group of *Pseudomonas*, a class of uniquely large plasmids. *Nature*, London, *274*:717-717.

HALE, C.N. & MATHERS, D.J. 1977. Toxicity of White clover seed diffusate and its effect on the survival of *Rhizobium trifolii*. *N. Z. J. of Agricultural Res.*, Wellington, *20*:69-73.

HEPPEER, C.M. 1972. Composition of extracellular polysacharides of *Rhizobium trifolii*. *Antonie van Leeuwenhock*, Delft, *38*:437-445.

HERRIDGE, D.F. & ROUGHLEY, R.S. 1975. Variation in colony characteristics simbiotic effectiveness of *Rhizobium*. *J. Appl. Bact.*, London, *38*:19-27.

HIGASHI, S. 1967. Transfer of clover infectivity of *Rhizobium trifolii* to *Rhizobium phaseoli* as mediated by an episomic factor. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, New York, *13*:391-403.

HIRHS, P.R.; VAN-MONTAGU, M.U.; JOHNSTON, A.W.B.; BREWIN, N.J.; SCHELL, J. 1980. Physical identification of bacteriogenetic, nodulation and other plasmids in strains of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.*, New York, *120*:403-412.

HOLLAND, A.A. 1966. Serological characteristics of certain root-nodule bacteria of legumes. *Antonie van Leenwenhock*, Delft, *32*:410-418.

HOMBRECHER, G.; BREWIN, N.J.; JOHNSTON, A.W.B. 1981. Linkage of genes for nitrogenase and nodulation ability on plasmids in *Rhizobium leguminosarum* *Rhizobium phaseoli*. *Mol. Gen. Genet.*, Berlin, *182*:133-136.

HUBBELL, D.H. 1970. Studies on the root hair "curling factor of *Rhizobium*. *Bot. Gaz.*, Madison, *131*(4):337-342.

JOHNSTON, A.W.B.; BEYNON, J.L.; BUCHANAN, W.A.U.; SETCHELL, S.M.; HIRSCH, P.R.; BERINGER, J.E. 1978. High frequency transfer of nodulation ability between strains and species of *Rhizobium*. *Nature*, London, *276*: 634-636.

JOSEY, D.P.; BEYNON, J.L. JOHNSTON, A.W.B.; BERINGER, J. E. 1979. Strain identification in *Rhizobium* using intrinsic antibiotic resistance. *J. appl. Bact.*, London, *46*:343-350.

KONDOROSI, A. & JOHNSTON, A.W.B. 1981. The genetics of *Rhizobium*. In: GILES, R.L. & ATHERLY, A.G. eds. *Biology of the Rhizobiaceae*. New York, Academic Press. p.191-224.

KUYKENDALL, L.D. 1981. Mutants of *Rhizobium* tha are altered in legume interaction and nitrogen fixation. In: GILES, K.L. & ATHERLY, A.G. eds. *Biology of the Rhizobiaceae*. New York, Academic Press. p.299-309.

KUYKENDALL, L.D. & ELKAN, G.H. 1976. *Rhizobium japonicum* derivatives differing in nitrogen fixing efficiency and carbohydrate utilization. *Appl. Env. Microbiol.*, Washington, *32*:511-519.

_____. 1977. Some features of mannitol metabolism in *Rhizobium japonicum*. *J. Gen. Microbiol.*, New York, *98*:291-295.

LABANDERA, C.A. & VINCENT, J.M. 1975a. Loss of symbiotic capacity in commercially useful strains of *Rhizobium trifolii*. *J. appl. Bacterial.*, London, *39*:209-211.

LABANDERA, C.A. & VINCENT, J.M. 1975b. Competition between an introduced strains and native Uruguayan strains of *Rhizobium trifolii*. *Plant and Soil*, The Hague, *42*:327-347.

LEVIN, R.A. & MONGOMERY, M.P. 1974. Symbiotic effectiveness of antibiotic - resistant mutants of *Rhizobium japonicum*. *Plant and Soil*, The Hague, *41*:669-676.

LJUNGGREN, H. & FAHRAEUS, G. 1959. Effects of *Rhizobium* polysaccharide on the formation of poligalacturonase in lucerne and clover. *Nature*, London, *184*:1578-1579.

Mac GREGOR, A.N. & ALEXANDER, M. 1972. Formation of tumor-like structures on legume roots by*Rhizobium*. *J. Bacteriol.*, New York, *105*:728-732.

MacCOMB, J.A.; ELLIOTT, J.; DILWORTH, M.J. 1975. Acetilene reduction by *Rhizobium* in pure culture. *Nature*, London, *256*:409-410.

MARQUES-PINTO, C.; YAO, P.Y.; VINCENT, J.M. 1974. Nodulating competitiveness amongst strains of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium trifolii*. *Aust. J. Agric. Res.*, East Melbourne, *25*:317-329.

MASTERSON, R.U.; RUSELL, P.R.; ATHERLY, A.G. 1982. Nitrogen fixation (nif) genes and large plasmids of *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.*, New York, *152*:928-931.

MEYER, M.C. & PUEPPKE, S.G. 1980. Differentiation of *Rhizobium japonicum* strain derivatives by antibiotic sensitivity patterns, lectin binding and utilization of biochemicals. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, *26*:606-612.

MULONGOY, K. & ELKAN, G.H. 1977. Glucose catabolism in two derivatives of a *Rhizobium japonicum* strain differing in nitrogen fixing efficiency. *J. Bacteriol.*, New York, *131*:179-187.

NAPOLI, C. & ALBERSHEIM, P. 1980. *Rhizobium leguminosarum* mutants incapable of normal extracellular polysaccharide production. *J. Bacteriol.*, New York, *141*:1454-1456.

NUTI, M.P.; LEDEBOER, A.M.; LEPIDI, A.A.; SCHILPEROOT, R.A. 1977. Large plasmid in different *Rhizobium* species. *J. Gen. Microbiol.*, New York, *100*:241-248.

PAGAN, J.D.; CHILD, J.J.; SCOWCROFT, W.R. GIBSON, A.H. 1975. Nitrogen fixation by *Rhizobium* cultured on a defined medium. *Nature*, London, *256*:406-407.

PANKHURST, C. 1977. Symbiotic effectiveness of antibiotic -resistant mutants of fast and slow-growing strains of *Rhizobium* nodulating *Lotus* species. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, *23*:1026-1033.

PETERSON, H.L. & LOYNACHAN, T.E. 1981. The significance and aplication of *Rhizobium* in agriculture. In: GILES, K.L. & ATHERLY, A.G. eds. *Biology of the Rhizobioceae*. New York, Academic Press, p.311-331.

PRAKASH, R.K.; HOOYKAAS, P.J.J.; LEDEBOER, A.M.; KIJNE, J.W.; SCHILPEROORT, R.A.; NUTI, M.P.; LEPIDI, A.A.; CASSE, F.; BOUCHER, C.; JULLIOTT, J.S.; DENARIÉ, J. 1980. Detection an characterization of large plasmids in *Rhizobium*. In: NEWTON, W.E. & ORME-JOHNSON, W.H. eds. *Nitrogen fixation*. Baltimore, University Park Press, v.2, p.139-163.

PRAKASH, R.K.; SCHILPEROORT, R.A.; NUTI, M.P. 1981. Large plasmids of fast-growing rhizobia: Homology studies and location of structural nitrogen fixation (nif) genes. *J. Bacteriol.*, New York, *145*:1129-1136.

ROBERTS, G.P.; Mac NEIL, D.; BRILL, W.J. 1978. Regulation and characterization of protein products coded by the nif (nitrogen fixation) genes in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, New York, *136*:267-294.

ROBERTS, G.P.; LEPS, W.T.; SILVER, L.E.; BRILL, W.J. 1980. Use of two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis to identify and classify *Rhizobium* strains. *Appl. Env. Microbiol.*, Washington, *39*(2):414-422.

ROBERTS, G.P. & BRILL, W.J. 1981. Genetics and regulation of nitrogen fixation. *Ann. Rev. Microbiol.*, Palo Alto, *35*:207-235.

ROBINSON, C.A. 1969. Competition between effective and ineffective strains of *Rhizobium trifolii* in the nodulation of *Trifolium subterraneum*. *Aust. J. Agr. Res.*, East Melbourne, *20*:827-841.

ROLFE, B.G.; GRESSHOFF, P.M.; SHINE, J.; VINCENT, J.M. 1980. Interaction between a non-nodulating and an ineffective mutant of *Rhizobium trifolii* resulting in Effective (nitrogen-fixing) nodulation. *Appl. Env. Microbiol.*, Washington, *39*:449-452.

ROSENBERG, CH.; BOISTARD, P.; DÉNARIÉ, J.; CASSE-DELBART, F. 1981. Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.*, Berlin, *184*:326-333.

ROSENBERG, CH.; CASSE-DELBART, F.; DUSHA, I.; DAVID, M.; BOUCHER, C. 1982. Megaplasmids in the plant-associated bacteria *Rhizobium melilati* and *Pseudomonas solanacearum*. *J. Bacteriol.*, New York, *150*:402-406.

ROUGHLEY, R.J. 1976. The production of high quality inoculants and their contribution to legume yield. In: NUTMAN, P.S. ed. *Symbiotic nitrogen fixation in plants*. Cambridge, Cambridge University Press, cap.11, p.125-136.

SANDERS, R.E.; CARLSON, R.W.; ALBERSHEIM, P. 1976. A *Rhizobium* mutant incapable of nodulation and normal polysaccharide secretion. *Nature*, London, *271*:240-242.

SANTOS, D.S. & AFFONSO, M.H.T. 1982. *1º Curso avançado sobre biologia molecular de plasmídios bacterianos*. Guia de trabalhos práticos. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 57p.

SCHMIDT, E.L.; BANKOLE, R.O.; BOHLOOL,B.B. 1968. Fluorescent-antibody approach to study of rhizobia in soil. *J. Bacteriol.*, New York, *95*:1987-1992.

SCHWINGHAMER, E.A. 1962. Studies on induced variation in the rhizobia. III. Host range modification of *Rhizobium trifolii* by spontaneous and radiation induced mutation. *Amer. J. Bot.*, Baltimore, *49*:269-277.

_____. 1964. Association between antibiotic resistance and ineffectiveness in mutant strains of *Rhizobium* spp. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, *10*:221-233.

_____. 1967. Effectiveness of *Rhizobium* as modified by mutation for resistance to antibiotics. *Antonie van Leenwenhock*, Delfat, *33*:121-136.

_____. 1970. Current studies at Camberra on auxotrophic mutants and on antibiosis in *Rhizobium*. *Rhizobium Newsletter*, Sidney, *15*:37-39.

_____. 1977. Genetic aspects of nodulation and N_2 fixation by legumes: the microsymbiont. In: HARDY, W.F. & SILVER, W.S. ed . *A tratise on dinitrogen fixation*. New York, J. Wiley, v.3, p.577-622.

SCHWINGHAMER, E.A. & DUDMAN, W.F. 1973. Evaluation of spectinomycin resistance as a marker for ecological studies with *Rhizobium* spp. *J. Appl. Bacteriol.*, London, 36:263-272.

SKRDLETA, V. 1970. Competition for nodules sites between two inoculum strains of *Rhizobium japonicum* as affected by delayed inoculation. *Soil Biol. Biochem.*, Oxford, 2: 167-171.

SMIBERT, R.M. & KRIEG, N.R. 1981. General characterization. In: GERNARDT, P. ed. *Manual of methods for general bacteriology*. Washington American Society of Microbiology. Cap.20, p.409-443.

SPECHT, A.W.; ERDMAN, L.W.; MEANS, V.M.; RESNICKY, J.W. 1956. Effect of nutrition on *Trifolium hirtum* inoculated with *Rhizobium trifolii*. *Soil. Sci. Soc. Am. Proc.*, Madison, 29:489-495.

SUTTON, W.D. 1974. Some features of the DNA of *Rhizobium* bacteroids and bacteria. *Biochem. Biophys. Acta*, Amsterdan, 366:1-10.

TAN, I.K.P. & BROUGHTON, W.J. 1981. Rhizobio in tropical legumes - XIII. Biochemical basis of acid and alkali reactions. *Soil Biol. Biochem.*, Oxford, 13:389-393.

TEDESCO, M.J. 1982. *Extração simultânea de N, P, K, Ca e Mg em tecido de plantas por digestão com* $H_2O_2 - H_2SO_4$. Porto Alegre, Faculdade de Agronomia, UFRGS. 23p. (Informativo interno, 01/82).

TRINICK, M.J. 1969. Identification of legume nodule bacteroids by the fluorescent antibody reaction. *J. appl. Bacteriol.*, London, 32:181-186.

UPCHURCH, R.G. & ELKAN, G.H. 1977. Comparison of colony morphology salt tolerance and effectiveness in *Rhizobium japonicum*. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, 23:1118-1122.

_____. 1978. Ammonio assimilation in *Rhizobium japonicum* colonial derivatives differing in nitrogen - fixing efficiency. *J. Gen. Microbiol.*, New York, 104:219-225.

VAN RENSBURG, H.J. & STRIJDOM, B.W. 1982. Competitive abilities of *Rhizobium meliloti* strains considered to have potential as inoculants. *Appl. Env. Microbiol.*, Washington, 44:98-106.

VINCENT, J.M. 1954. The root-nodule bacteria of pasture Legumes. *Proc. Linn. Soc.*, New South Wales, *79*:4-6.

_____. 1962. Australian studies of the root-nodule bacteria. *Proc. Linn. Soc.*, New South Wales, *87*:8-10.

_____. 1977. *Rhizobium* general microbiology. In: HARDY, W.F. & SILVER, W.S. eds. *A treatise on the dinitrogen fixation*. New York, J. Willey, v.3, cap.7, p.277-365.

VINCENT, J.M.; NUTMAN, P.S.; SKINNER, F.A. 1979. The identification and classification of *Rhizobium*. In: SKINNER, F.A. & LOVELOCK, D.W. ed. *Identification methods for microviologists*. London, Academic Press, p.49-69.

WATANABLE, T. 1963. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol. Rev.*, Washington, *27*: 87-115.

ZURKOWSKI, W. & LORKIEWICZ, Z. 1979. Plasmid mediated control of nodulation in *Rhizobium trifolii*. *Arch. Microbiol.*, Berlin, *123*:195-201.

7. APÊNDICES

APÊNDICE 1. Meio de cultura YEM-HM (COLE e ELKAN, 1973).

Na_2HPO_4	0,125 g
Na_2SO_4	0,25 g
NH_4Cl	0,32 g
$MgSO_4.7\,H_2O$	0,18 g
$FeCl_3$	0,004 g
$CaCl_2.2\,H_2O$	0,013 g
N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid. (HEPES)	1,3g
(2-|N-morpholina| ethane sulfonis acid). (MES)	1,1g
Manitol	0,5%
Extrato de levedura	0,025%
L-Arabinose	0,05%
Água	q.s.p. 1000 ml
pH	6,6 com NaOH 5N

APÊNDICE 2. Meio de cultura gluconato-manitol (MEYER e PUEPPKE, 1980).

Manitol	5,0 g
Gluconato de sódio	5,0 g
Glutamato de sódio	1,0 g
$(NH_4)_2SO_4$	0,5 g
HEPES	1,3 g
MES	1,1 g
Biotina	0,01 mg
Suplemento B	2 ml
Azul de bromotimol	0,1 g
Agar	15 g
Água	q.s.p. 1000 ml
pH	6,9

APÊNDICE 3. Meio de cultura base para a prova de utilização de carboidratos pelas culturas (SCHWINGHAMER, 1970).

$MgSO_4 . 7\ H_2O$	0,25 g
$CaSO_4 . 2\ H_2O$	0,03 g
$Na_2HPO_4 . 12\ H_2O$	1,20 g
KH_2PO_4	0,55 g
NaCl	0,25 g
$FeSO_4 . 7\ H_2O$	0,0035 g
$ZnSO_4 . 7\ H_2O$	0,00016 g
$CuSO_4 . 5\ H_2O$	0,00008 g
H_3BO_3	0,0005 g
$MnSO_4 . 4\ H_2O$	0,0004 g
Ext. levedura (Difco)	0,25 g
Azul de bromotimol	0,1 g
Agar	15 g
Carboidrato	1%
Água	q.s.p. 1000 ml

APÊNDICE 4. Montagem do gel de agarose (SANTOS e AFFONSO, 1982).

1. Preparar em um erlenmeyer de 250 ml de capacidade, 70 ml de agarose em tampão TEB e concentração de 0,8%.
2. Fundir a agarose e resfriar a aproximadamente 50°C.
3. Colocar aproximadamente 8-10 ml de agarose na canaleta inferior da cuba de eletroforese.
4. Imediatamente após, verter a agarose cuidadosamente (para evitar a formação de bolhas) entre duas placas de vidro (110 x 140 mm), separadas por espaçadores de lucite de 2,5 mm de espessura, e mantidas em posição vertical por prendedores de metal.
5. Colocar, na parte superior entre as placas, um pente de acrílico medindo 6,5 x 15 x 2,5 mm (o número de dentes do pente varia de acordo com o número de amostras).
6. Após a solidificação do gel, retirar os prendedores de metal, o pente e o espaçador inferior. Remover o excesso de agarose das canaletas com um palito de madeira.
7. Montar o conjunto placas-gel com o auxílio dos prendedores de metal, na cuba de eletroforese vertical, apoiado sobre a canaleta existente na parte inferior da cuba, contendo a agarose solidificada.

APÊNDICE 5. Fórmula da solução tampão TEB (SANTOS e AFFONSO, 1982).

Tampão TEB	pH 8,2
Tris-OH	89 mM
Na_2-EDTA	2,5 mM
H_3BO_3	89 mM

Preparar 10 vezes concentrado:

- Dissolver o Na_2-EDTA a quente em aproximadamente 600 ml de água bidestilada.
- Adicionar em seguida o Trizma-base e o H_3BO_3.
- Ajustar o pH para 8,2.
- Completar o volume para 1000 ml com água bidestilada.
- Diluir 10 vezes no momento do uso.

APÊNDICE 6. Mistura lítica (SANTOS e AFFONSO, 1982).

Lisozima	7500 U/ml
Ribonuclease I	0,3 U/ml
Ficoll 400.000	20 %
Azul de bromofenol	0,005 %
Na_2-EDTA 0,25 M	2 ml

a) Preparo da solução de RNAse:

- Dissolver 10 mg de RNAse em 1 ml de tampão acetato de sódio 0,4 M pH 4,0.
- Ferver a solução em banho-maria por 2 minutos.
- Manter em congelador.

APÊNDICE 7. Solução de SDS (Dodecil sulfato de sódio) - Ficoll (SANTOS e AFFONSO, 1982).

- SDS - Ficoll 10%

SDS	0,2 g
Ficoll 400.000	10 g
TEB q.s.p.	100 ml

- SDS - Ficoll 5%

SDS	0,2 g
Ficoll 400.000	5 g
TEB q.s.p.	100 ml

APÊNDICE 8. Solução nutritiva para vasos Leonard, elaborada por SPECHT et alii (1956).

Solução Estoque A: usar 1 ml por litro da solução final

$MgCl_2.6\ H_2O$	178,2 g
$MgSO_4.7\ H_2O$	256,5 g
Água destilada esterilizada	1000,0 ml

Solução Estoque B: usar 1 ml por litro da solução final

K_2HPO_4	164,7 g
K_2SO_4	82,4 g
Água destilada esterilizada	1000,0 ml

Solução Estoque C: usar 10 ml por litro da solução final

Na EDTA (Titriplex III - $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8.2H_2O$)	3,72 g
$FeSO_4.7\ H_2O$	3,78 g
Água destilada esterilizada	1000,00ml

Dissolver o NaEDTA + $FeSO_4.7\ H_2O$ em 900 ml de água destilada esterilizada, aquecendo a 80°C até dissolução total. Completar volume com água.

Solução Estoque D: usar 3 ml por litro da solução final

$CaSO_4.2\ H_2O$	63,33 g
Água destilada esterilizada	1000,00ml

Solução Estoque E: usar 0,5 ml por litro da solução final

$MnCl_2.2\ H_2O$	7,24 g
H_3BO_3	5,72 g
$CuSO_4.7\ H_2O$	9,32 g
$ZnSO_4.7\ H_2O$	0,44 g
$Na_2MoO_4.2\ H_2O$	0,25 g
Água destilada esterilizada	1000,00ml



APÊNDICE 9. Estirpe de *R. phaseoli* SEMIA 476 cultivada em meio gluconato manitol. Após 48 horas de crescimento a 30°C.



APÊNDICE 10. Variante de *R. phaseoli* 476-1 cultivada em meio gluconato manitol. Após 48 horas de crescimento a 30°C.



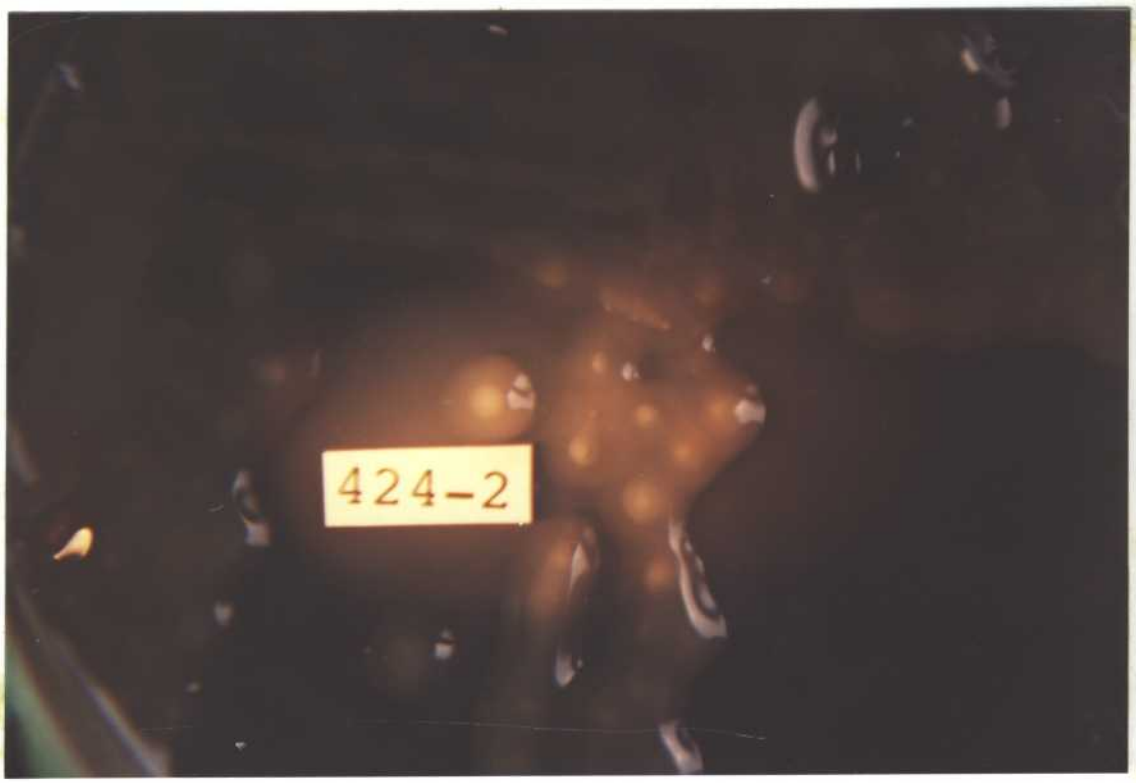
APÊNDICE 11. Variante de *R. phaseoli* 476-2 cultivada em meio gluconato manitol. Após 48 horas de crescimento a 30°C.



APÊNDICE 12. Estirpe de *R. phaseoli* SEMIA 424 cultivada em meio gluconato manitol. Após 48 horas de crescimento a 30°C.



APÊNDICE 13. Variante de *R. phaseoli* 424-1 cultivada em meio gluconato manitol. Após 48 horas de crescimento a 30°C.



APÊNDICE 14. Variante de *R. phaseoli* 424-2 cultivada em meio gluconato manitol. Após 48 horas de crescimento a 30°C.



APÊNDICE 15. Variante de *R. phaseoli* 424-3 cultivada em meio gluconato manitol. Após 48 horas de crescimento a 30°C.



APÊNDICE 16. Estirpe de *R. phaseoli* SEMIA 410 cultivada em meio gluconato manitol. Após 48 horas de crescimento a 30°C.



APÊNDICE 17. Variante de *R. phaseoli* 410-1 cultivada em meio gluconato manitol. Após 48 horas de crescimento a 30°C.



APÊNDICE 18. Variante de *R. phaseoli* 410-2 cultivada em meio gluconato manitol. Após 48 horas de crescimento a 30°C.

APÊNDICE 19. Análise de variância do pêso de nódulos secos de *Phaseolus vulgaris* cv. Turrialba 4 inoculada com as estirpes de *R. phaseoli* SEMIA 476, SEMIA 424, SEMIA 410 e suas variantes, individualmente e em combinações mistas.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	25	5855014,43	234200,60	3,35*
Erro experimental	53	3696131,48	69738,33	

* Significância a 5% de probabilidade.

APÊNDICE 20. Análise de variância de pêso de matéria seca da parte aérea de *Phaseolus vulgaris* cv. Turrialba 4 inoculada com as estirpes de *R. phaseoli* SEMIA 476, SEMIA 424, SEMIA 410 e suas variantes, individualmente e em combinações mistas.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	27	308,90	11,44	4,95*
Erro experimental	56	129,22	2,31	

* Significância a 5% de probabilidade.

APÊNDICE 21. Análise de variância do percentagem de nitrogênio de *Phaseolus vulgaris* cv. Turrialba 4 inoculada com as estirpes de *R. phaseoli* SEMIA 476, SEMIA 424, SEMIA 410 e suas variantes, individualmente e em combinações mistas.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	27	13,83	0,51	3,64*
Erro experimental	56	7,58	0,14	

* Significância a 5% de probabilidade.

APÊNDICE 22. Análise de variância do nitrogênio total da parte aérea de *Phaseolus vulgaris* cv. Turrialba 4 inoculada com as estirpes de *R. phaseoli* SEMIA 424, SEMIA 410 e suas variantes, individualmente e em combinações mistas.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	27	410217	15193,2	17,2*
Erro experimento	56	49416	882,4	

* Significância a 5% de probabilidade.