CARACTERIZAÇÃO E ASPECTOS GENÉTICOS DE ESTIRPES DE *Rhizobium phaseoli*

MARIA DE FÂTIMA ALVES

Orientador: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
1981

.i.

A minha família

OFEREÇO

Ao GILBERTO DINIZ DE OLIVEIRA

(In Memoriam)

Minha homenagem

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho. Em especial:

- Aos Professores *Dr. João Lúcio de Azevedo* e *Dr. Felizardo Pernalva da Silva*, pela orientação, dedicação e amizade.
- Prof.^a *Dra. Alaídes Puppim Ruschel* e *Dra. Siu Mui Tsai Saito* pelo fornecimento das estirpes de *Rhizobium*.
- *Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos*, pelo fornecimento das estirpes de *E. coli*.
- Aos Engenheiros Agrônomos *José Roberto Rodrigues Perez* e *Milton Alexandre Teixeira Vargas*, pela colaboração nos experimentos em casa de vegetação.
- Aos Professores *Dr. José Maria Gonçalves de Almeida Júnior* e *Dr. Renato dos Santos Mello*, pelas facilidades concedidas durante o desenvolvimento do trabalho no Laboratório de Genética da UnB.
- Aos Professores do Instituto de Genética da ESALQ.
- Aos Funcionários do Instituto de Genética, ESALQ, em especial a *Srta. Erica Spruck* (secretária), *Terezinha* e *Eisa* (bibliotecárias), *Srs. Antônio José Rocha Campos*, *Luiz Prôspero*, *Rodolfo Fulini*, *Humberto Gorga Filho* e *José Broglio*.

.iii.

- Aos *Funcionários da Seção de Microbiologia do Solo do CPAC-EMBRAPA, técnico Ademildo Santos da Silva e laboratorista Vilderete Castro Alves.*
- Ao estagiário do Laboratório de Genética, da UnB, *Nuno Chacel*, pelas fotografias.
- A estagiária do Laboratório de Genética, da UnB, *Elaine Santos* pelo trabalho de Microscopia Eletrônica.
- De uma forma muito especial e carinhosa agradeço aos *Funcionários do Laboratório de Genética, da UnB, Gláucia Maria de Paula Correa, Petrônio Timo, Walter César Fernandes Silveira, Pedro Olavo Costa, Pedro Ernesto da Silva e Ornil Claro Costa*, pela cordialidade com que me receberam, bom humor constante e ajuda valiosa.
- À *Faculdade de Ciências Agrárias do Pará*, na pessoa de seu *Diretor Virgílio Ferreira Libonati*, por ter permitido meu afastamento para a realização do curso.
- À *Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"* por me ter aceito como aluna.
- À *Universidade de Brasília*, por ter permitido a realização deste trabalho em seu laboratório de Genética.
- Ao *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)* pela bolsa concedida.

I N D I C E

	<u>Página</u>
RESUMO	xi
SUMMARY	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.	4
2.1. Classificação taxonômica de <i>Rhizobium</i>	4
2.1.1. Crescimento e produção de ácido.	5
2.1.2. Resistência a antibióticos	6
2.1.3. Metabolismo do carbono.	6
2.1.4. Composição de bases do DNA	7
2.1.5. Hibridação de DNA.	7
2.1.6. Padrões eletroforéticos de proteínas	9
2.2. Plasmídios endógenos de <i>Rhizobium</i>	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.	17
3.1. Material.	17
3.1.1. Bactérias.	17
3.1.2. Meios de cultura.	20
3.1.3. Soluções	23
3.1.4. Tampões.	29
3.1.5. Gel.	33
3.1.6. Planta hospedeira.	33
3.2. Métodos.	34
3.2.1. Purificação, isolamento e caracterização das es- tirpes de <i>Rhizobium phaseoli</i>	34
3.2.2. Curvas de crescimento.	34

	<u>Página</u>
3.2.3. Taxa de crescimento.	35
3.2.4. Crescimento em meio definido	36
3.2.5. Crescimento em PGA	36
3.2.6. Ensaio da capacidade de nodulação.	37
3.2.7. Análise eletroforética da ocorrência de plasmí- dios.	38
3.2.8. Estimativa dos pesos moleculares dos plasmídios de estirpes de <i>Rhizobium phaseoli</i>	43
3.2.9. Visualização de plasmídios de <i>R. phaseoli</i> ao mi- croscópio eletrônico.	43
3.2.10. Determinação dos padrões de esterases em estir- pes de <i>Rhizobium phaseoli</i> por eletroforese em gel de acrilamida.	44
4. RESULTADOS.	47
4.1. Purificação, isolamento e caracterização das estirpes..	47
4.2. Curvas de crescimento	49
4.3. Taxas de crescimento.	53
4.4. Crescimento de estirpes de <i>Rhizobium phaseoli</i> em meio definido.	53
4.5. Crescimento de estirpes de <i>Rhizobium phaseoli</i> em meio peptona-glucose-ágar (PGA).	55
4.6. Capacidade de nodulação das estirpes.	56
4.7. Ocorrência de plasmídios em estirpes de <i>Rhizobium pha- seoli</i>	57
4.8. Estimativa dos pesos moleculares dos plasmídios das es- tirpes nativas de <i>Rhizobium phaseoli</i>	62

4.9. Plasmídios ao microscópio eletrônico.	62
4.10. Padrões de esterases em estirpes de <i>Rhizobium phaseoli</i> ..	66
5. DISCUSSÃO	70
5.1. Caracterização e crescimento	70
5.2. Crescimento em meio definido e em meio PGA	71
5.3. Nodulação.	72
5.4. Eletroforese em gel de agarose de DNA plasmidial	73
5.5. Número de plasmídios e seus pesos moleculares.	73
5.6. Microscopia eletrônica.	76
5.7. Esterase.	77
6. CONCLUSÕES.	78
7. LITERATURA CITADA	80

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
1 - Agrupamento de espécies de <i>Rhizobium</i> com base na planta hospedeira.	4
2 - Estirpes de <i>Rhizobium phaseoli</i> usadas no trabalho . . .	18
3 - Linhagens de <i>Escherichia coli</i> usadas no trabalho como plasmídios referências.	19
4 - Tempo de incubação para as colônias atingirem 3 mm de diâmetro.	48
5 - Número médio de células viáveis por ml da estirpe C05, em diferentes tempos de cultivo	50
6 - Número médio de células viáveis por ml da estirpe C88, em diferentes tempos de cultivo.	51
7 - Taxas de crescimento das estirpes C05 e C88 de <i>Rhizobium phaseoli</i>	53
8 - Crescimento de <i>Rhizobium phaseoli</i> em meio definido "CA"	54
9 - Crescimento de <i>Rhizobium phaseoli</i> em meio PGA	55
10 - Capacidade de nodulação das estirpes de <i>Rhizobium phaseoli</i>	56

Tabela

Página

11 - Estimativa dos pesos moleculares dos plasmídios de estirpes de <i>Rhizobium phaseoli</i>	62
12 - Comparação do número de plasmídios esperados, com base na produção de bacteriocina, capacidade de nodulação e fixação de nitrogênio.	75

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
1 - Curvas de crescimento de <i>Rhizobium phaseoli</i> , estirpes C05 e C88.	52
2 - Eletroforese em gel de agarose de DNA plasmidial de <i>R. phaseoli</i> e de <i>E. coli</i> carregando plasmídios padrões . .	58
3 - Eletroforese em gel de agarose de DNA plasmidial de <i>R. phaseoli</i> e de <i>E. coli</i> carregando plasmídios padrões . .	59
4 - Eletroforese em gel de agarose de DNA plasmidial de <i>R. phaseoli</i> e de <i>E. coli</i> carregando plasmídios padrões . .	60
5 - Eletroforese em gel de agarose de DNA plasmidial de <i>R. phaseoli</i> e de <i>E. coli</i> carregando plasmídios padrões . .	61
6 - Estimativa dos Pesos Moleculares dos plasmídios de <i>R. phaseoli</i> em comparação com plasmídios de <i>E. coli</i> . . .	63
7 - Plasmídio de <i>R. phaseoli</i> C14.	64
8 - Plasmídio de <i>R. phaseoli</i> C33.	65
9 - Eletroforese em gel de acrilamida. Padrões de esterases de <i>Rhizobium phaseoli</i>	67
10 - Padrão de esterase em <i>Rhizobium phaseoli</i> . Eletroforese em gel de acrilamida.	68
11 - Sumário preliminar dos principais padrões de esterases de <i>R. phaseoli</i>	69

BIOGRAFIA

MARIA DE FÁTIMA ALVES, NATURAL DE BELÉM, ESTADO DO PARÁ, FILHA DE CARLOS ALVES E PHILOMENA ALVES, OBTVEU O TÍTULO DE ENGENHEIRA AGRONOMA PELA ESCOLA DE AGRONOMIA DA AMAZÔNIA (ATUAL FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DO PARÁ), E O DE MESTRE EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS PELA ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIRÓZ", USP.

É PROFESSORA ASSISTENTE DA FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DO PARÁ, ONDE LECIONA A DISCIPLINA DE GENÉTICA.

CARACTERIZAÇÃO E ASPECTOS GENÉTICOS DE ESTIRPES DE *Rhizobium phaseoli*

Maria de Fátima Alves

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

- Orientador -

RESUMO

Foram estudadas 19 estirpes de *Rhizobium phaseoli* quanto às suas características culturais, crescimento em meio definido e em meio definido e em meio com peptona e glicose.. Todas as estirpes cresceram nesses meios, variando, entretanto, a intensidade do crescimento.

Análises eletroforéticas em gel de agarose evidenciaram a presença de, pelo menos 1 plasmídio, na maioria das estirpes. Tais plasmídios foram tentativamente correlacionados com a produção de bacteriocina, com a nodulação e com a capacidade de fixar nitrogênio.

Por eletroforese em gel de acrilamida foram determinados os padrões de esterases das estirpes, os quais parecem estar correlacionados com o seu local de origem.

O crescimento em meio definido e a presença de plasmídios na maioria das estirpes ensaiadas abre possibilidades para estudos genéticos nas mesmas.

.xii.

Por outro lado, a verificação de que é possível separar es tirpes segundo seu padrão de bandas no que se refere a esterases vai permitir a utilização dessas marcas em estudos de inoculação de estirpes em campo.

CARACTERIZATION AND GENETICAL ASPECTS OF STRAINS OF *Rhizobium phaseoli*

Maria de Fátima Alves

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

- Adviser -

SUMMARY

Nineteen strains of *Rhizobium phaseoli* were studied in relation to their growth characteristics including growth on defined and peptone-glucose medium. All tested strains were able to grow on these media. However the rates of growth varied according to the strains. Agarose gel electrophoresis have shown that most of the strains presented one or more plasmids. Such plasmids were tentatively correlated with bacteriocin production, nodulation and nitrogen fixation ability. Acrilamide gel electrophoresis have shown that several esterase patterns occurred in different strains and that these patterns can be related to the region from which such strains were isolated. Growth ability on defined medium and the presence of plasmids in the majority of the strains are features which can be used for future genetic studies in *R. phaseoli*. Also the fact that it was possible to group strains according to their esterases pattern opens the possibility for the use of such markers in inoculation studies on field experiments.

1. INTRODUÇÃO

A fixação biológica do N_2 , ou seja, a conversão do N_2 atmosférico em NH_3 é um processo de grande importância agrícola. Ela é realizada por procariotos, entre os quais destacam-se as bactérias do gênero *Rhizobium* que desenvolvem uma simbiose com plantas leguminosas. Por meio dessa simbiose, cerca de 20×10^6 toneladas de N_2 são fixados, anualmente (BURRIS, 1977) representando uma economia de, aproximadamente, 140×10^6 barris de petróleo, os quais seriam gastos para produzir a mesma quantidade de N sob forma de fertilizante.

O fenômeno da fixação biológica do N_2 tornou-se, pois, uma importante alternativa agrícola dentro da crise mundial do petróleo, uma vez que leguminosas de grão fazem parte da alimentação humana, ressaltando o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) como a principal base protéica do povo brasileiro.

A simbiose *Rhizobium-leguminosa* é estabelecida através de várias fases desde a pré-infecção, infecção inicial, indução do nódulo, do tecido nodular, formação de bacteróides e fixação de N_2 .

A genética da fixação de N_2 vem sendo desenvolvida, com grande ênfase do gênero *Klebsiella* (BRILL, 1980) em cujo cromossomo já foram mapeados 17 genes *nif* (nomenclatura dada a todos os genes envolvidos na fixação) e também se encontra bastante estudada em *Rhizobium* (BERINGER, 1980 e BERINGER et alii, 1980).

Rhizobium guarda uma certa especificidade com relação a planta que ela nodula. Esta característica, atualmente, serve de base para classificação de espécies dessas bactérias, formando os grupos de inoculação. Entretanto, este critério deixa muito a desejar e outros métodos deverão ser desenvolvidos, pois existem variações dentro das espécies atuais que não são detectadas mesmo por serologia, enquanto que estirpes consideradas diferentes podem, na verdade, ser uma única estirpe, além do que estirpes que tenham perdido a capacidade de nodular deixariam de ser classificadas como *Rhizobium* pelo critério da especificidade.

Tanto a capacidade de nodulação em *Rhizobium* como os genes *nif* parecem estar localizados em plasmídios (NUTI et alii, 1979).

Desse modo verifica-se que uma procura de novos processos de identificação dessas bactérias bem como um estudo da presença de plasmídios associados ou não aos processos de nodulação e fixação de nitrogênio se revestem de importância, especialmente em estirpes nativas que são muito pouco estudadas sob esse aspecto. Assim o presente trabalho além de caracterizar estirpes de *Rhizobium phaseoli* quanto ao seu crescimento em diferentes meios, teve como objetivos principais: 1) determinar padrões

.3.

de esterases em estirpes de *Rhizobium* buscando um método para identificação dessas bactérias; 2) verificar ocorrência de plasmídios em estirpes nativas de *Rhizobium phaseoli*; 3) tentar associar tais plasmídios, se presentes com a capacidade de nodulação e fixação de N_2 .

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Classificação taxonômica de *Rhizobium*

A identificação de espécies de *Rhizobium* tem sido feita pelo método de *FRED et alii* (1932) com base na classe de planta hospedeira. Por esse sistema, existem seis (6) espécies além de um grupo que é chamado grupo do "cow-pea" (Tabela 1).

Tabela 1 - Agrupamento de espécies de *Rhizobium* com base na planta hospedeira.

Espécie	Leguminosa hospedeira
<i>R. Leguminosarum</i>	<i>Pisum</i> spp, <i>Lathyrus</i> , <i>Lens</i> e <i>Vicia</i> .
<i>R. trifolii</i>	<i>Trifolium</i> spp.
<i>R. phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>R. lupini</i>	<i>Lupinus</i>
<i>R. meliloti</i>	<i>Medicago</i> spp.
<i>R. japonicum</i>	<i>Glycine</i> spp.
<i>R. "Cow-pea"</i>	miscelânia do "cow-pea".

No entanto, essa classificação é deficiente pois: a) muitas leguminosas não estão incluídas naqueles grupos de inoculação cruzada; b) grupos de inoculação cruzada não são mutuamente exclusivos, de modo que é comum isolar bactérias que nodulam plantas em mais de um grupo; c) *Rhizobium* perde a sua capacidade de nodular, com relativa frequência, e então a sua identificação como *Rhizobium* torna-se difícil e dependente do conhecimento de sua capacidade anterior (NUTI, 1979).

Dadas essas dificuldades, várias outras metodologias têm sido tentadas com o intuito de identificar estirpes de *Rhizobium*. Entre as metodologias encontram-se aspectos morfológicos, aspectos fisiológicos, serologia, resistência a antibióticos, composição de bases do DNA, hibridização de DNA, e mais, recentemente, padrões eletroforéticos de proteínas.

2.1.1. Crescimento e produção de ácido

NORRIS (1965) examinou 278 espécies de organismos e concluiu que *Rhizobium* pertence a dois grupos distintos: 1) de crescimento rápido e formando ácido em meio de cultura: *R. leguminosarum*, *R. trifolii* e *R. phaseoli*; 2) de crescimento lento e dando reação neutra ou alcalina em meio de cultura: *R. japonicum* e *R. lupini*.

Entretanto existe inoculação cruzada dentro do grupo. Por exemplo, uma estirpe isolada de *Trifolium* seria classificada como *R. tri*

folii mas a mesma estirpe poderia ser classificada como *R. leguminosarum* se fosse isolada, primeiro, da ervilha.

2.1.2. Resistência a antibióticos

SCHWINGHAMER e DALMAS (1961) procuraram distribuir as espécies de *Rhizobium* por suas respostas a 31 antibióticos. Somente *R. meliloti* comportou-se como um grupo à parte.

BEYNON e JOSEY (1979) desenvolveram uma técnica para identificar estirpes de *Rhizobium* usando a variação entre elas quanto à resistência intrínseca a baixos níveis de vários antibióticos; por essa técnica, eles têm conseguido distinguir *R. leguminosarum* de *R. phaseoli*. Segundo os autores, estirpes que deram mesma reação serológica, observada na estirpe 1231, mostraram-se diferentes desta pela técnica de resistência.

2.1.3. Metabolismo do carbono

WHITE (1972) estudou *Rhizobium* e *Agrobacterium* quanto à sua capacidade de utilizar 61 compostos de Carbono. Encontrou que existe mais semelhança entre *Rhizobium* de crescimento rápido e *Agrobacterium* do que entre *Rhizobium* de crescimento rápido e *Rhizobium* de crescimento lento.

2.1.4. Composição de bases do DNA

DE LEY e RASSEL (1965) observaram que as espécies *peritri*quias têm crescimento rápido e apresentam entre 58,6 e 63,1% de G + C em seu DNA. Sugeriram que esse grupo fosse constituído de 2 subgrupos: *R. leguminosarum* e *R. meliloti*. As espécies de flagelação sub-polar apresentam crescimento lento e o conteúdo de G + C em seu DNA é de 62,8-65,5%, fazendo parte desse grupo *R. lupini*, *R. japonicum* e *R. "Cow-pea"*, as quais, os autores propõem, sejam agrupadas em uma única espécie *R. japonicum*.

2.1.5. Hibridação de DNA

HEBERLEIN *et alii* (1967) encontraram, pela hibridização de DNA de *R. leguminosarum* e da *Agrobacterium tumefaciens* com *Agrobacterium*, *Rhizobium* e *Chromobacterium*, como padrão, que *R. japonicum*, *R. meliloti* e *R. leguminosarum* são suficientemente distintas justificando a classificação de espécies.

ELKAN (1971) estudou a homologia de DNA dentro da espécie de *R. japonicum* e concluiu que existe heterogeneidade, de modo que, a espécie pode ser arranjada em dois grupos moderadamente divergentes. Essas diferenças não foram detectadas por serologia.

GIBBINS e GREGORY (1972) desenvolveram estudos de hibridização de DNA de *Rhizobium* e entre DNA de *Rhizobium* e *Agrobacterium* por

3 métodos diferentes. Concluíram que a habilidade de nodular uma determinada planta hospedeira, embora possa não envolver uma grande parte do genoma da bactéria, permite que a planta de origem sirva como indicadora útil ao relacionamento das estirpes. Apenas as espécies *R. leguminosarum* e *R. trifolii* não puderam ser separadas. *R. phaseoli* agrupou-se mais próximo de *R. meliloti* e o *R. lupini* mais próximo do *R. japonicum*, mas são espécies claramente distintas.

BOWERS et alii (1979) hibridizaram DNA não marcado, de isolados de *R. japonicum*, com DNA marcado com P^{32} . Encontraram 3 grupos distintos de homologia de DNA.

JARVIS et alii (1980) usaram técnicas de reassociação de DNA em 27 estirpes de *R. trifolii*, 4 de *R. leguminosarum* e 4 de *R. phaseoli*. Observaram que homologia de DNA está correlacionada com a serologia e que a capacidade de formar nódulos pode ser perdida sem uma mudança detectável na homologia com uma estirpe referência. Propõem que *R. trifolii* e *R. leguminosarum* sejam reunidos em uma só espécie com o nome de *R. leguminosarum* Frank. Dentro dessa espécie várias estirpes seriam designadas de acordo com a planta hospedeira. *R. phaseoli* seria mantida separada.

HOOLLIS et alii (1981) estudaram hibridização de DNA de *Rhizobium japonicum* concluindo que estirpes dessa espécie caem em 3 grupos distintos de homologia de DNA e os *R. "cowpea"* estudados podem representar 2 espécies diferentes.

Os métodos que tomam por base as propriedades superficiais da célula, tais como serologia e tipagem como fago, não são específicos, visto que mais de uma estirpe diferente pode dar a mesma tipagem. Mais recentemente vem sendo desenvolvido o método de:

2.1.6. Padrões eletroforéticos de proteínas

KÖVES-PÉCHY e SZENDE (1978) apresentaram um resumo de seus estudos em 86 estirpes de 7 espécies de *Rhizobium* de diferentes origens geográficas. Observaram a variação eletroforética em gel de poliacrilamida, de Malato desidrogenase (Mdh), Esterase e Tetrazólio oxidase. Os dados, especialmente, a variação de Mdh, foram importantes para diferenciação das estirpes.

ROBERTS *et alii* (1980) analisaram a proteína total de 57 estirpes de várias espécies de *Rhizobium*, por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. Concluíram que esta técnica é mais útil para diferenciar estirpes de *Rhizobium* que são, presumivelmente, idênticas por serologia, susceptibilidade a antibiótico ou tipagem de fago.

A diferença mais clara, no método, foi entre estirpes de crescimento lento e de crescimento rápido. Mesmo no caso do grupo de inoculação de Lotus que contém representantes de cada classe, a distinção foi válida. *R. leguminosarum* e *R. trifolii* podem ser agrupadas em uma única classe, de acordo com os padrões do gel, e os autores citam que esta é a

razão porque ocorre conjugação cromossomal entre elas e inoçulação cruzada. Encontraram, por exemplo, que as estirpes 127 K 26 e 127 K 44 de *Rhi*zobium são similares enquanto que são distintas das 127K 49 e 127K 55 que, por sua vez, são semelhantes entre si. *R. lupini* são, estreitamente, relacionadas com a *R. japonicum* e "cow-pea", embora existam poucos pontos eletroforéticos distintos para o último grupo. Não houve correlação entre origem das estirpes nem planta hospedeira, pois estirpes que tiveram mesmo padrão eram provenientes de diferentes regiões e de diferentes plantas.

2.2. Plasmídios endógenos de *Rhizobium*

Nenhum gene controlando propriedades simbióticas, tais como especificação hospedeira, habilidade de formar nódulos e fixação de Nitrogênio, foi ainda mapeado no cromossomo de *Rhizobium*.

Existem evidências de que essas características estão em plasmídios. Plasmídios grandes têm sido encontrados na maioria das estirpes de *Rhizobium* examinadas.

HIGASHI (1967) demonstrou transferência, da capacidade de infectar trevo, de uma estirpe de *R. trifolii* para *R. phaseoli*. Esta capacidade, portanto, estaria associada a um plasmídio. Também, por transferência, DUNICAN e CANNON (1971) evidenciaram que o controle das proprieda

des simbióticas, em *Rhizobium*, seriam plasmidiais.

NUTI et alii (1977) isolaram plasmídios de tamanhos grandes (PM de $1,3 \times 10^8$ d - $4,0 \times 10^8$ d), de várias espécies de *Rhizobium*, usando padrão uma linhagem de *Agrobacterium tumefaciens* que contém plasmídios T e RP4, com pesos moleculares de $1,1 \times 10^8$ d e 36×10^6 d, respectivamente.

JOHNSTON et alii (1978) observaram que uma estirpe mutante Nod⁻ (não nodulante), de *R. leguminosarum* apresentava uma depleção em um plasmídio de 205×10^6 d. Quando o plasmídio pRLI JI era introduzido nesse mutante, o mesmo readquiria a capacidade de nodular. Ainda mais, transferiram derivados desse plasmídio de *R. leguminosarum* para estirpes de *R. trifolii* e *R. phaseoli*. Os transconjugantes tiveram capacidade de nodular ervilha além de nodular seus hospedeiros normais.

ZURKOWSKI e LORKIEWICZ (1978) trataram estirpes de *R. trifolii* com aquecimento (alta temperatura) e essas estirpes perderam a capacidade de nodular.

HIRSCH (1979) identificou três plasmídios bacteriocinogênicos transmissíveis em *Rhizobium leguminosarum* cada um de um isolado diferente. Estes plasmídios foram chamados de pRLIJI, pRL3JI e pRL4JI. A presença de qualquer um desses plasmídios em uma única estirpe conferia resistência a bacteriocina produzida por cada um dos outros dois plasmídios. A bacteriocina produzida é de tamanho "médio". Evidenciou também

que cada plasmídio contém um gene codificando um repressor para a produção de bacteriocina "pequena".

JOHNSTON et alii (1979) mostraram que a capacidade de nodular ervilha pode ser transmitida, com alta frequência, de uma estirpe de *R. leguminosarum* para outras espécies de *Rhizobium*, tais como *R. trifolii* e *R. phaseoli*. A alta frequência de transferência implica em que, pelo menos, alguns genes de nodulação estão sobre plasmídios transmissíveis em *R. leguminosarum*.

NUTI et alii (1979) observaram a presença de plasmídios grandes em *Rhizobium*. O número e o tamanho dos plasmídios presentes em estirpes de uma dada espécie parece ser pouco variável, embora nenhuma correlação tenha sido estabelecida, ainda, entre a topologia dos plasmídios e espécies. O tamanho médio dos plasmídios varia de 90 a mais de 300×10^6 d, isso implica em que 10 a 30% da informação genética total em *Rhizobium* é codificada por plasmídios. Os plasmídios menores de 110×10^6 d podem ser "curados", por choque térmico, resultando que a estirpe não é mais capaz de reconhecer a planta hospedeira nem induzir a formação de nódulos. As camadas superficiais dessas estirpes são profundamente afetadas e componentes lipopolissacarídicos específicos não são mais encontrados.

Os autores, verificaram ainda que genes estruturais para Nitrogenase estão sobre outro plasmídio de *R. leguminosarum* e sobre plasmídios de *R. japonicum* e *R. meliloti*. Isto foi evidenciado pela hibridiza

ção com um plasmídio pequeno de $6,9 \times 10^6$ d (pSA30) que conduzia os genes estruturais para Nitrogenase de *Klebsiella pneumoniae*.

CASSE *et alii* (1979) identificaram e caracterizaram plasmídios grandes em *R. meliloti* usando a técnica de eletroforese em gel de agarose. Usaram 25 estirpes simbioticamente eficientes, das quais 22 mostraram a presença de pelo menos 1 plasmídio grande, os pesos moleculares foram estimados de 90×10^6 d a 200×10^6 d, concluindo que se o tamanho do cromossomo de *Rhizobium* for similar ao de *E. coli*, 3 a 10% da informação genética, em *Rhizobium*, é plasmidial.

GROSS *et alii* (1979) isolaram plasmídios de estirpes de *R. japonicum* do serogrupo 135. Os plasmídios tinham peso molecular variando de 48×10^6 d a 130×10^6 d, entretanto não conseguiram associar nenhuma das características estudadas com os plasmídios.

SPITZBARTH *et alii* (1979) isolaram plasmídios de estirpes de *R. meliloti*, usando gradiente de densidade em Cloreto de Césio e Brometo de Etídio. Os plasmídios, em sua maioria, foram agrupados em duas classes de tamanho.

RUVKUN e AUSUBEL (1980) separaram, por eletroforese, DNA de *Rhizobium* digerido por enzima de restrição e hibridizaram esse DNA com DNA *ni⁺* radioativo clonado de *Klebsiella*.

BEYNON *et alii* (1980) transferiram plasmídio RJB 5 JI (pRL 1 J1: Tn 5) para uma estirpe de *R. phaseoli*. Esse plasmídio foi com

patível com os dois plasmídios endógenos da estirpe receptora, mas nos transconjugantes, o plasmídio menor, de *R. phaseoli* foi eliminado. Esse plasmídio determina formação de pigmento e produção de nódulos funcionais em feijão.

PRAKASH et alii (1980) observaram que uma estirpe de *R. leguminosarum* que tinha sido "curada" de seu plasmídio pequeno, era Nod⁻ (não nodulante) e apresentava colônia enrugada, o que reflete uma alteração na composição do polissacarídeo extracelular.

BUCHANAN-WOLLASTON et alii (1980) conseguiram 160 derivados do plasmídio de nodulação pRL1 JI. Destes, 14 quando transferidos para o mutante que tem depleção no plasmídio, resultou na produção de nódulos Fix⁻ em ervilha. Isto indica que o plasmídio pRLIJI apresenta tanto função de nodulação como de fixação. Quando transferiram o plasmídio pRLIJI ocorreu a produção de nódulos Fix⁺ donde concluíram que esse plasmídio conduz todos os genes para nodulação e fixação que estão ausentes na estirpe mutante.

BREWIN et alii (1980a) transferiram genes simbióticos com plasmídios bacteriocinogênicos em *R. leguminosarum*. A capacidade de co-transferência ocorreu com uma frequência superior a 95% quando o plasmídio era o pRLI JI. Os plasmídios pRLI JI, pRL 3 JI e pRL4 JI parecem pertencer ao mesmo grupo de incompatibilidade, isto é, não podem co-existir em uma mesma célula.

BREWIN et alii (1980) transferiram plasmídio de *R. legumi-*

nosarum estirpe TOM para a estirpe 16015, não nodulante. A frequência de transferência foi de 10^{-5} a 10^{-6} . 39 transconjugantes foram Nod^+ , isto é, nodularam ervilha. A transferência da capacidade de nodulação esteve associada à nova banda eletroforética de plasmídeo de peso molecular 160×10^6 d correspondente ao tamanho de um dos 3 plasmídios da estirpe TOM. Esse plasmídeo foi chamado pRL 5JI e não apresentou incompatibilidade com os plasmídios da receptora.

HOOPYKAAS et alii (1981) marcaram um plasmídeo, de *R. trifolii*, com transposon Tn 5 que confere resistência a canamicina. Fizeram vários cruzamentos com estirpes resistentes a estreptomicina ou a rifampicina. Uma vez estabelecido que o plasmídeo era autotransmissível, foi feita a "cura" por dois dias a 37°C . Os sobreviventes eram Km^{S} e Nod^- enquanto guardavam todas as demais características da parental. Bioquimicamente foi provado que estas estirpes tinham perdido um plasmídeo de PM 180×10^6 d. O plasmídeo foi reintroduzido nas estirpes $\text{Km}^{\text{S}}\text{Nod}^-$ e estas tornaram-se Nod^+ Fix^+ indicando que este plasmídeo controla a nodulação; o mesmo foi chamado plasmídeo *Sym* (pRtr 5 a). Transferindo-o para estirpes de *R. leguminosarum* os autores puderam concluir que o plasmídeo em questão tem, também, pelo menos alguns genes estruturais *nif*.

PRAKASH et alii (1981) isolaram um plasmídeo grande de *R. leguminosarum* e outro de *R. trifolii*. Esses plasmídios, bem como um plasmídeo maior que foi detectado em *R. phaseoli* 3622, hibridizaram com partes dos genes *nif* estruturais de *Klebsiella pneumoniae*. Já os plasmídios

de *R. meliloti* estirpes V7 e L 5 -30 não mostraram hibridização com aqueles genes, indicando que os mesmos podem estar localizados ou no cromossomo ou em plasmídios maiores ainda não isolados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Bactérias

Estirpes de *Rhizobium phaseoli* fornecidas pela Seção de Microbiologia do Solo, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA, Piracicaba, SP, foram selecionadas segundo a eficiência relativa de fixação de Nitrogênio, produção de bacteriocinas e local de origem. Essas estirpes estão relacionadas na Tabela 2.

As linhagens de *Escherichia coli* utilizadas como referências foram fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia da Escola Paulista de Medicina - São Paulo, SP e estão relacionadas na Tabela 3.

Tabela 2 - Estirpes de *Rhizobium phaseoli* usadas no trabalho. (Produção de Bacteriocina e Eficiência relativa determinadas por CASSINI, 1980).

P r o c e d ê n c i a	Estirpe	Nº original	Produção Bacteriocina	Eficiência relativa (%)
Piracicaba, SP.	C01	C01	+	38,79
	C03	C03	+	30,42
	C05	C05	+	40,57
	C09	C09	-	39,44
	C10	C10	-	33,55
	C12	C12	-	19,17
Tietê - SP.	C13	C13	-	6,33
	C14	C14	-	44,59
Capão Bonito, SP.	C18	C18	-	50,11
Sengês, PR.	C19	C19	+	43,91
Vila Velha, PR.	C20	C20	NT	18,84
Itapetininga, SP.	C23	C23	+	56,22
Nitragin Co, USA	C29	127 K-17	+	35,84
Alegre, ES.	C33	F310	-	45,53
	C34	F413	-	42,48
CIAT, Colômbia	C40	CIAT255 (Z272)	+	29,90
Porto Alegre, RS.	C86	SEMIA 400	-	36,77
	C88	SEMIA 487	-	52,87
CSIRO, Austrália	C89	CIAT 57 (CC511)	-	15,36

+ = Produção; - = Ausência de produção; NT = Não ensaiada.

Tabela 3 - Linhagens de *Escherichia coli* usadas no trabalho como plasmídeos referências.

Linhagem	Característica
K-12 (pSA)	portadora do plasmídio pSA PM = 23×10^6 d
K-12 (RP4)	portadora do plasmídio RP4 PM = 36×10^6 d
K-12 (pBR 322)	portadora do plasmídio pBR 322 PM = $2,2 \times 10^6$ d

3.1.2. Meios de cultura

Todos os meios foram autoclavados a 120°C por 15 minutos.

3.1.2.1. YMB (Yeast-Mannitol-Broth) *VICENT, 1970*, modificado

K ₂ HPO ₄	0,1 g
KH ₂ PO ₄	0,4 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Manitol.	10 g
Extrato de levedura.	0,5 g
Água destilada	1000 ml

pH 6,5 - 7,0

3.1.2.2. YMA (Yeast-Manitol-ágar). Ao meio YMB acrescentou-se 15 g de Ágar Difco.

3.1.2.3. Definido (= Meio "C" de *van Brussel et alii*, 1977).

Manitol	14 g
K ₂ HPO ₄	0,6 g
KH ₂ PO ₄	0,4 g
CaCO ₃	0,01 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.	0,55 g
NH ₄ Cl	3 g
Biotina	10 g
Solução de elementos traços	2,5 ml
Água destilada.	1000 ml

pH = 7,0

3.1.2.4. Meio "CA" ("C" - Ágar)

Ao Meio "C" acrescentou-se 15 g de Ágar Difco.

3.1.2.5. Meio nutriente líquido (NL)

Extrato de carne	3 g
Peptona.	5 g
Água destilada.	1000 ml

pH = 7,2

Usado para cultivo de *Escherichia coli*.

3.1.2.6. Meio nutriente ágar (NA)

Extrato de carne	3 g
Peptona.	5 g
Ágar	15 g
Água destilada	1000 ml

pH = 7,2

Usado para manutenção de *Escherichia coli*.

3.1.2.7. Meio PGA

Peptona.	5 g
Glucose.	5 g
K ₂ HPO ₄	5 g
Ágar.	15 g
Água destilada	1000 ml

3.1.2.8. Meio de JENSEN (1942) modificado

CaHPO ₄	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g

NaCl	0,2 g
FeCl ₃	0,1 g
NH ₄ NO ₃	1 ml (= 0,576 mg)
Ágar	8,0 g
Água destilada	10000 ml

3.1.3. Soluções

3.1.3.1. SSR (Solução de sais para *Rhizobium*)

Solução A	10 ml
Solução B	20 ml
Água destilada	1000 ml

Distribuída em vidros retangulares (9 ml/vidro) e autoclavadas a 120°C por 15 minutos.

SOLUÇÃO A

KH ₂ PO ₄	50 g
K ₂ HPO ₄	50 g
H ₂ O destilada.	1000 ml

SOLUÇÃO B

MgSO ₄ .7H ₂ O.	20 g
NaCl.	10 g
H ₂ O destilada.	1000 ml

3.1.3.2. Solução de elementos traços

(% p/v)

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0035
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,0462
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0097
H_3BO_3	0,1270
$\text{Na}_2\text{MgO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0346
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0
EDTA - Na_2	1,04
KOH.	0,68
Água destilada	100 ml

3.1.3.3. Solução estoque de RNAase

10 mg - 10 ml de TEB

3.1.3.4. Solução fenol-clorofórmio (1:1)

10 ml Fenol destilado

10 ml Clorofórmio

3.1.3.5. Solução ABF - Ficoll 10%

Azul de Bromofenol	0,05 g
Ficoll 400.000	10 g
TEB.	100 ml

3.1.3.6. Brometo de etídio

- Solução estoque.

20 mg - 50 ml TEB

- Solução para revelação: (0,4 µg/ml) 0,3 ml da solução es
toque em 300 ml de Tampão Tris-Acetato pH 8,0 ou em 300
ml de TEB conforme o método.

3.1.3.7. Solução SDS 0,2%/Ficoll 5%

SDS	0,2 g
Ficoll.	5,0 g
TEB	100 ml

3.1.3.8. Solução SDS 0,2%/ficoll 10%

SDS	0,2 g
Ficoll.	10 g
TEB	100 ml

3.1.3.9. Solução estoque de EDTA- Na_2 0,25 M 0,845 g em
100 ml de TEB

3.1.3.10. Mistura Lítica

Lisozima	50 mg
Ribonuclease.	0,1 ml da sol. estoque
Na_2 -EDTA.	4 ml da sol. estoque
Azul de Bromofenol.	50 mg
Ficoll 400.000	20 g
TEB.	100 ml

3.1.3.11. Persulfato de Amônia (AP)

Solução aquosa a 10% de AP.

3.1.3.12. α naftilacetato

α naftilacetato 0,2 g
Acetona. 10 ml
Água destilada. 10 ml

3.1.3.13. β naftilacetato

β naftilacetato : 0,2 g
Acetona 20 ml

3.1.3.14. Solução para revelação de esterase

100 mg Fast Blue R
3 ml α naftilacetato
3 ml β naftilacetato
100 ml tampão fosfato pH 6,8

3.1.3.15. Sublimado Corrosivo para esterilização superficial
das sementes

HgCl₂ solução aquosa 0,2% (p/V)

3.1.3.16. Azul de Bromotimol (ABT)

Solução alcoólica de ABT a 0,5% (p/v)

3.1.3.17. Solução de Monofosfato de Sódio

NaH_2PO_4	27,6 g
H_2O destilada.	1000 ml

3.1.3.18. Solução de Difosfato de Sódio

Na_2HPO_4	28,4 g
H_2O destilada.	1000 ml

3.1.3.19. Solução de Citocromo

Citocromo C	120 μl da solução estoque (1 mg/ml)
EDTA - Na_2	10 μl da solução estoque (0,2 M)
Acetato de Amônia.	600 μl da solução estoque (1 M) pH 7,2.
Água destilada	270 μl

3.1.3.20. Acetato de Uranila

Acetato de Uranila.2H ₂ O	211	mg
HCl 12 N.	40	μl
H ₂ O destilada.	9,96	ml

Para preparar esta solução colocou-se num agitador magnético por 24 horas a 37°C, no escuro. Depois filtrou-se em Milipore(0,22 μm) e finalmente, diluiu-se 60 μl em 30 ml de etanol 90%.

3.1.3.21. Vermelho do Congo (VC)

Solução aquosa a 0,25% (p/V).

3.1.4. Tampões

3.1.4.1. Trizma-HCl 50 mM pH 8,0

Trizma-HCl. 7,9 g

Água destilada. 1000 ml

pH ajustado com Trizma-Base 1 M

3.1.4.2. TE-RNase pH 8,0

Trizma-HCl. 0,790 g
Na₂EDTA. 0,338 g
RNAase 0,5 mg (0,5 ml da sol. estoque)
Água destilada para . . . 100 ml
pH ajustado com Trizma - Base 1M

3.1.4.3. TEB pH 8,2

Trizma Base. 10,8 g
Na₂-EDTA. 0,85 g
H₃BO₃. 5,5 g
Água destilada 1000 ml

3.1.4.4. SDS 3%

Trizma-Base. 50 mM
Na₂-EDTA. 10 mM
pH 12,6

Trizma-Base. . . . 1,8165 g
Na₂-EDTA. 1,0140 g
SDS. 9,0 g
Água destilada . . 300 ml

3.1.4.5. TRIS-HCl 2M

Trizma-HCl. 3,16 g

Água destilada. 10 ml

3.1.4.6. TRIS-Acetato pH 8,0

Trizma-Base. 4,8440 g

Acetato de Sódio 1,6408 g

Na₂-EDTA. 0,6760 g

Água destilada. 1000 ml

pH ajustado com Ácido Acético

3.1.4.7. Lítio-Borato pH 8,3

Hidróxido de Lítio (anidro).. 1,2 g

Ácido Bórico. 11,89 g

Água destilada 1000 ml

3.1.4.8. Tris-Citrato pH 8,3

Trizma Base. 6,3 g

Ajustar o pH com Ácido Cí-
trico. (± 1,6 g)

Água destilada 1000 ml

3.1.4.9. Fosfato pH 6,8

Solução de Monofosfato de
Sódio 385 ml

Solução de Difosfato de
Sódio 150 ml

pH ajustado para 6,8

3.1.4.10. Tris-EDTA pH 7,2

Tris 10 mM

EDTA 2 mM

3.1.5. Gel

3.1.5.1. Agarose

Agarose (INC Pharmaceuticals. Inc. Cleveland) a 0,8% em tampão Tris-Acetato pH 8,0 ou em TEB pH 8,2.

3.1.5.2. Acrilamida

Cyanogum a 5% em uma mistura de Tampões Tris-Citrato pH 8,3 e Litio-Borato pH 8,3 (na proporção 9:1).

3.1.6. Planta hospedeira

Em dois experimentos a planta hospedeira foi siratro (*Macroptilium atropurpureum* cv. *siratro*) que apresenta capacidade de ser inoculada pela maioria das estirpes de *Rhizobium* e em terceiro experimento foi usado *Phaseolus vulgaris*.

3.2. Métodos

3.2.1. Purificação, isolamento e caracterização das estirpes de *Rhizobium phaseoli*

As estirpes de *Rhizobium phaseoli* foram inoculadas em meio YMB e inoculadas a 28°C até turvação. Dessas culturas líquidas foram feitas diluições apropriadas das quais 0,1 ml foram semeados em meio YMA contendo 10 ml da solução de Vermelho do Congo.

Foi verificada a pureza, e colônias foram isoladas em tubos com meio YMA com 2,5 ml solução de Azul de Bromotimol, inclinado.

Nas próprias placas de purificação foram feitas caracterizações quanto aos aspectos das colônias.

Para caracterizar quanto à produção de ácido ou álcali usou-se o método de *NORRIS (1965)*. As estirpes foram inoculadas em tubos contendo 10 ml de meio "79" A inclinado, contendo 2,5 ml de Azul de Bromotimol como indicador do pH.

3.2.2. Curvas de crescimento

As curvas de crescimento foram feitas pela técnica de di-lução em placas (*AZEVEDO e COSTA, 1973*).

.35.

Culturas líquidas de 48 horas foram diluídas a 10^{-4} em SSR e esta diluição constituiu-se o inóculo inicial para uma série de tubos contendo 9 ml de meio YMB. Cada tubo recebeu 1 ml de inóculo.

Amostras foram retiradas em diferentes tempos de cultivo. As amostras foram diluídas, apropriadamente, e 0,1 ml de cada diluição foi semeado em placas com meio YMA + ABT (preparadas 24 horas antes e deixadas incubando a 28°C para secar e eliminar possíveis contaminações).

Os tempos de cultivo em que foram colhidas as amostras foram 0, 6, 12, 24, 30, 36, 48, 54 e 72 horas para estirpe C88 e 0, 6, 12, 24 e 48 para estirpe C05.

Após 48 horas de incubação das placas, foi feita a contagem do número de colônias por placa.

A estirpe C05 serviu para representar o crescimento das estirpes que apresentavam colônias com 3 mm de diâmetro aos 5 dias de incubação, e a C88 representou as que desenvolviam com apenas 3 dias.

3.2.3. Taxa de crescimento

As taxas de crescimento foram calculadas pela fórmula:

$$\frac{t_2 - t_1}{(\log_{10} N_2 - \log_{10} N_1) / \log_{10} 2}$$

onde:

t_1 = 6 horas de cultivo;

t_2 = 24 horas de cultivo;

N_1 = número médio de bactérias viáveis no tempo t_1 .

N_2 = número médio de bactérias viáveis no tempo t_2 .

portanto, expressas em tempo de geração (*LARPENT e LARPENT-GOURGAND, 1975*).

3.2.4. Crescimento em meio definido

As estirpes foram inoculadas, em estrias, em placas contendo meio definido "CA" e incubadas a 28°C por 2 a 8 dias.

A partir da primeira placa, foram feitas 4 subculturas sucessivas, em placas com o mesmo meio definido, para garantir que o crescimento, nesse meio não fosse por efeitos endógenos.

3.2.5. Crescimento em PGA

As estirpes foram cultivadas em meio YMB por 24 a 48 horas. 1 ml de cada cultura foi semeado em placas com meio PGA e incubadas por 3 a 8 dias a 28°C.

3.2.6. Ensaio da capacidade de nodulação

3.2.6.1. Preparo do inóculo

Cada uma das estirpes foi inoculada em 10 ml de meio YMA + ABT, inoculadas a 28°C por 4 a 5 dias.

De cada cultura foi tirada uma alíquota de 3 ml para medir a absorbância. As amostras foram padronizadas para absorbância de 50%, diluindo-se, quando necessário, com meio YMA.

3.2.6.2. Preparo das sementes

As sementes foram escarificadas, rolando-as em uma lixa. Posteriormente, foram tratadas com H₂SO₄ concentrado, por 5 minutos, lavadas em água corrente e finalmente esterilizadas superficialmente. Essa esterilização consistiu em deixar as sementes no álcool por 2 minutos, em sublimado corrosivo por 3 minutos e depois bem lavadas com água esterilizada.

Uma bandeja com algodão umedecido e coberto com papel toalha foi previamente autoclavada. As sementes foram colocadas nessa bandeja e incubadas a 30°C por 24 horas, para germinarem.

3.2.6.3. Implantação das sementes pré-germinadas, inoculação e manutenção do ensaio

Em cada tubo de ensaio, de 25 mm X 150 mm contendo 10 ml de meio de JENSEN, foi implantada uma semente pré-germinada.

No mesmo dia da implantação foi feita a inoculação com 1 ml do inóculo preparado conforme 3.2.6.1.

Foram realizados três experimentos de inoculação sendo os dois primeiros com siratro e o último com *Phaseolus*.

Nos três experimentos cada estirpe foi inoculada, em duplicata. Foram deixados dois tubos sem inoculação, para controle.

3.2.7. Análise eletroforética da ocorrência de plasmídios

Foram usados dois métodos para verificar a ocorrência de plasmídios nas estirpes.

3.2.7.1. Método de KADO e LIU (1981) modificado

3.2.7.1.1. Preparação das amostras

As estirpes foram cultivadas em 3 ml de meio YMB ou NL por

24 horas (fase exponencial do crescimento), quando foram colhidas, por centrifugação a 6000 rpm por 10 minutos em uma centrífuga Janetzki colocada em uma câmara fria a 2°C.

As células sedimentadas foram lavadas com tampão TRIS-HCl 50 mM pH 8,0 e depois ressuspensas em 0,1 ml de tampão TE-RNase pH 8,0.

A seguir, foi adicionado 0,2 ml de SDS 3% pH 12,6. Os tubos foram invertidos, vagorosamente, por quatro vezes, para misturar e depois, incubados a 60°C por 20 minutos. Findo esse tempo, os tubos foram colocados em gelo, onde foram mantidos até a última centrifugação.

Foi acrescentado 20 µl de Tris-HCl 2 M e 0,5 ml da solução Fenol/clorofórmio (1:1) e agitou-se, invertendo os tubos quatro vezes. Foi feita centrifugação por 15 minutos a 6000 rpm a 4°C, resultando três fases: 1) inferior - solução fenol/clorofórmio; 2) meio - massa protéica e restos celulares; 3) sobrenadante - parte aquosa clara, onde estavam os plasmídios.

35 µl da parte aquosa superior foi misturada com 10 µl da solução ABF-Ficoll 10%. Essa mistura foi colocada na canaleta da placa de eletroforese.

3.2.7.1.2. Placa de gel de agarose

0,8 g de agarose em 100 ml de Tampão Tris-Acetato pH 8,0

.40.

foi fundida em um forno de microondas (Phillips), deixada resfriar a 48°C e vertida entre duas placas de vidro em posição vertical, com espaçadores de acrílico de 22 cm X 1 cm X 0,3 cm, unidas por garras especiais. Logo após o gel ter sido vertido, foi colocado no gel, um pente de acrílico com 11 dentes, espaçados de 0,4 cm.

Depois que o gel solidificava, o pente era retirado, cuidadosamente, e as placas de vidro contendo o gel, eram colocadas em uma cuba de eletroforese vertical.

3.2.7.1.3. Eletroforese

Em cada uma canaleta, formada pelo pente, era colocada a amostra, e depois seladas com agarose fundida e resfriada a 48°C.

Na cuba de eletroforese era colocado o Tampão Tris-Acetato pH 8,0 e a corrida era feita no sentido catodo-anodo a 40 - 45 mA por 3 a 4 horas, a uma temperatura de 4°C.

3.2.7.1.4. Revelação

Terminada a corrida, a placa era retirada da cuba de eletroforese e o gel de agarose, passado para uma cuba de esmalte contendo

Brometo de Etídio a 0,4 µg/ml em Tampão Tris-Acetato pH 8,0. O tempo para corar era de 30 minutos. A retirada do excesso de corante era feita em água corrente por 15 minutos. A observação do gel era feita com um transluminador equipado com 6 lâmpadas ultra violeta de ondas curtas, e as fotografias foram tomadas com uma câmara Minolta XD-7 equipada com uma lente 50 mm fl. 4 com filtro ultra violeta e laranja 0,2.

3.2.7.2. Método de *ECKHARDT* (1978) modificado por *AFFONSO* (1981)

3.2.7.2.1. Preparação das amostras

As estirpes foram cultivadas em 3 ml de meio YMB a 28°C por 24 a 48 horas. Essas culturas foram centrifugadas a 4000 rpm por 20 minutos, a $\pm 4^{\circ}\text{C}$.

O sedimento foi lavado com 1 ml de TEB. As condições de centrifugação foram as mesmas anteriores.

As células foram ressuspensas em 0,1 ml de TEB. Homogeneizadas por rotação, em um vortex, por 15 segundos.

30 µl da amostra foi misturada com 30 µl da mistura lítica (item 3.1.3.10).

3.2.7.2.2. Placa de gel de agarose

As mesmas condições que para o método de KADO e LIU, sendo que o tampão foi o TEB.

3.2.7.2.3. Eletroforese

50 µl do lisado bacteriano era colocado na canaleta do gel. A seguir, colocava-se 25 µl de solução SDS/Ficoll 10% (item 3.1.3.8.), na canaleta e homogeneizava-se, lentamente, com um palito de madeira. Depois era colocado, devagar, 10 µl da solução SDS/Ficoll 5% (item 3.1.3.7.). Finalmente, a canaleta era selada com agarose.

Na cuba de eletroforese era colocado o tampão TEB pH 8,2. Fazia-se uma pré-corrida, a 2 mA por 45 minutos e depois a corrida era feita a 40 - 45 mA por 2 horas, à temperatura ambiente.

3.2.7.2.4. Revelação

O mesmo procedimento do método de KADO e LIU, sendo que a solução de Brometo de Etídio era feita em tampão TEB.

3.2.8. Estimativa dos pesos moleculares dos plasmídios de estirpes de *Rhizobium phaseoli*

Os pesos moleculares dos plasmídios de *Rhizobium phaseoli* foram estimados, com base na mobilidade eletroforética, em comparação com a migração de plasmídios com pesos moleculares conhecidos.

O método é o de *MEYERS et alii* (1976) que tem por base a relação inversa entre migração e peso molecular dos plasmídios. Determinou-se o log da migração e o log do peso molecular dos plasmídios conhecidos.

3.2.9. Visualização de plasmídios de *R. phaseoli* ao microscópio eletrônico

O método usado para a visualização ao microscópio eletrônico foi o de *KLEINSCHMIDT et alii* (1963) modificado.

De duas amostras (estirpes C.14 e C.33) preparadas para eletroforese, conforme item 3.2.7.1.1. foram calculadas as concentrações de DNA plasmidial, utilizando-se para tanto um DU espectrofotômetro a 260 nm. Foram feitas diluições em Tampão Tris-EDTA pH 7,2 para uma concentração final de 1 µg/ml, diluição essa apropriada para a visualização dos plasmídios ao microscópio eletrônico.

10 µl de DNA (1 µg/ml) foram misturados com 10 µl da solução

ção de Citocromo sobre um pedaço de Parafilm. Tocou-se a superfície com uma ou mais telinhas ("grids"). Secou-se o excesso em papel de filtro e depois corou-se durante 30 segundos na solução alcoólica de Acetato de Uranila, com movimentos lentos. Lavou-se o excesso em solução de etanol 90% por 5 segundos. Colocou-se as telinhas com amostras (presas por uma extremidade) em uma fita adesiva sobre uma placa de Petri pequena. Levou-se a placa a um Metalizador Denton Vacuum para sombrear com platina. No metalizador, a placa girava em ângulo raso (0^0) para haver uma deposição de átomos de platina de maneira gradual e fina por toda a superfície das telinhas.

3.2.10. Determinação dos padrões de esterases em estirpes de *Rhizobium phaseoli* por eletroforese em gel de acrilamida

O método usado foi o de *SCANDINAVIANS* (1969) modificado.

3.2.10.1. Preparação das amostras

As estirpes foram crescidas, em pequenos recipientes de vidro retangulares contendo meio "CA" inclinado por 3 a 5 dias. Dessas bactérias eram feitas suspensões bastante concentradas em 0,2 ml do tampão do gel (9 partes de Tris-Citrato pH 8,3 para 1 parte de Lítio-Borato pH 8,3).

Essas suspensões eram trituradas com um bastão de vidro e depois deixadas por uma noite a -40°C . No dia seguinte, eram descongeladas e congeladas-descongeladas mais 3 vezes, sendo 15 minutos o tempo de cada congelamento.

Após o quarto descongelamento as amostras estavam prontas para serem aplicadas no gel.

3.2.10.2. Placa de gel de acrilamida

5 g de Cyanogum eram dissolvidas em 90 ml de tampão Tris-Citrato pH 8,3 e 10 ml de tampão Lítio-Borato pH 8,3. Após a completa dissolução do Cyanogum, eram adicionados 0,1 ml de TEMED (Tetramethyl-ethylenodiamine) e 0,8 ml da solução AP (Persulfato de Amônio). Imediatamente, a mistura era vertida em uma placa de vidro de 15 cm X 16 cm X 0,3 cm. Uma outra placa de vidro era colocada por cima do gel, tendo-se o cuidado de não deixar bolhas de ar no gel.

Deixava-se polimerizar em temperatura ambiente, por 20 minutos e depois colocava-se em geladeira (4°C) por, no mínimo, 20 minutos.

Uma vez polimerizado o gel, a placa de vidro, de cima, era retirada e eram feitos canais no gel, com auxílio de um pente de metal com 12-14 dentes.

3.2.10.3. Aplicação das amostras e corrida da eletroforese

Cada amostra era embebida num pequeno retângulo de papel de filtro Whatman nº 03, o qual era colocado em um dos canais feitos no gel.

Após a aplicação das amostras, a placa era colocada em uma cuba de eletroforese horizontal. O tampão do eletrodo era o Lítio-Borato pH 8,3 e a corrida era feita do polo negativo para o positivo com uma amperagem de 25 mA - 30 mA/170V - 200V, em geladeira, por um tempo de 3 a 5 horas.

3.2.10.4. Revelação da esterase e plastificação do gel

Em uma cuba, de plástico, era colocado o gel (após a corrida em eletroforese) em 100 ml da solução para revelação, descrita no item 3.1.3.14. Imediatamente, era colocada em um incubador a 37°C por, no mínimo, 45 minutos.

Após a revelação, retirava-se a solução corante e colocava-se álcool etílico a 50% por, no mínimo, 10 minutos, a 4°C para fixar.

Para plastificar o gel, retirava-se o álcool, lavava-se em água corrente e a plastificação era feita com papel celofane com auxílio de um bastidor de bordado.

4. RESULTADOS

4.1. Purificação, isolamento e caracterização das estirpes

Nas placas de YMA + VC foi verificada a pureza das culturas, apresentando colônias de forma circular, bordos lisos, ligeiramente côncavas, uniformes, inodoras e sem absorver ou absorvendo muito pouco o Vermelho do Congo, exceção da C88 que absorveu um pouco mais. O tempo para a colônia atingir 3 mm de diâmetro variou de 3 a 5 dias. Esses dados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Tempo de incubação para as colônias atingirem
3 mm de diâmetro.

Estirpes	Tempo de crescimento (dias)
C01	3
C03	3
C05	5
C09	5
C10	3
C12	5
C13	4
C14	4
C18	5
C19	3
C20	3
C23	3
C29	4
C33	3
C34	4
C40	4
C86	5
C88	3
C89	5

Quanto ao teste de Norris, quase todas as estirpes deram reação ácida, exceto as estirpes C14, C18 e C29 que deram reação básica e a C33 que teve reação neutra.

4.2. Curvas de crescimento

Os resultados dos experimentos descritos em 3.2.2. estão nas Tabelas 5 e 6, respectivamente, para a estirpe C05 e C88. As representações gráficas dos dados para as duas estirpes, são apresentadas na Figura 1.

Tabela 5 - Número médio de células viáveis por ml da estirpe C05, em diferentes tempos de cultivo.

Horas de cultivo	Diluições (a)	Nº médio de colônias/placa (b)	Nº bactérias viáveis/ml	Nº bactérias viáveis/ml (média)	Redução a 1 bactéria	Log nº bactéria/ml (reduzida a 1)
0	Sd	246,5	$2,46 \times 10^3$			
	10^{-1}	60,7	$6,07 \times 10^3$			
	10^{-2}	10	$10,00 \times 10^3$	$9,63 \times 10^3$	1	0
	10^{-3}	2	$20,00 \times 10^3$			
3	10^{-1}	15,5	$1,55 \times 10^3$	$2,02 \times 10^3$	1	0
	10^{-2}	2,5	$2,50 \times 10^3$			
6	10^{-2}	143	$1,43 \times 10^6$			
	10^{-3}	14	$1,40 \times 10^6$	$1,41 \times 10^6$	$1,47 \times 10^2$	2,17
24	10^{-5}	175,2	$1,75 \times 10^8$	$1,75 \times 10^8$	$1,82 \times 10^4$	4,25
48	10^{-5}	108,5	$1,08 \times 10^8$			
	10^{-6}	27,5	$2,75 \times 10^8$	$2,11 \times 10^8$	$2,19 \times 10^4$	4,34
	10^{-7}	2,5	$2,50 \times 10^8$			

(a) 0,1 ml semeado.

(b) Mínimo de 2 placas.

Tabela 6 - Número médio de células viáveis por ml da estirpe C88, em diferentes tempos de cultivo.

Horas de cultivo	Diluições (a)	Nº médio de colônias/placa (b)	Nº bactérias viáveis/ml	Nº bactérias viáveis/ml (média)	Redução a 1 bactéria	Log nº bactéria/ml
0	Sd	342	3,42 x 10 ³	5,29 x 10 ³	1	0
	10 ⁻¹	53	5,30 x 10 ³			
	10 ⁻²	7,2	7,16 x 10 ³			
6	10 ⁻¹	240,3	2,40 x 10 ⁴	3,30 x 10 ⁴	6,24	0,79
	10 ⁻²	42	4,20 x 10 ⁴			
12	10 ⁻²	108,5	1,08 x 10 ⁵	1,44 x 10 ⁵	2,73 x 10	1,44
	10 ⁻³	18	1,80 x 10 ⁵			
24	10 ⁻⁴	168,7	1,69 x 10 ⁷	2,29 x 10 ⁷	4,33 x 10 ³	3,64
	10 ⁻⁵	29	2,90 x 10 ⁷			
30	10 ⁻⁴	518,3	5,18 x 10 ⁷	7,44 x 10 ⁷	1,41 x 10 ⁴	4,15
	10 ⁻⁵	91,3	9,13 x 10 ⁷			
	10 ⁻⁶	8	8,00 x 10 ⁷			
36	10 ⁻⁶	68	6,80 x 10 ⁸	6,80 x 10 ⁸	1,28 x 10 ⁵	5,11
48	10 ⁻⁶	122,7	1,23 x 10 ⁹	1,33 x 10 ⁹	2,51 x 10 ⁵	5,40
	10 ⁻⁷	14,2	1,42 x 10 ⁹			
54	10 ⁻⁶	164	1,64 x 10 ⁹	1,62 x 10 ⁹	3,06 x 10 ⁵	5,49
	10 ⁻⁷	16	1,60 x 10 ⁹			
72	10 ⁻⁷	5	0,50 x 10 ⁹	1,90 x 10 ⁹	3,59 x 10 ⁵	5,55
	10 ⁻⁸	3,3	3,30 x 10 ⁹			

(a) 0,1 ml semeado.

(b) Mínimo de 2 placas.

Fig.1 - Curvas de Crescimento de Rhizobium phaseoli, estirpes C 05 e C 88.

4.3. Taxas de crescimento

As taxas de crescimento calculadas conforme item 3.2.3., são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Taxas de crescimento das estirpes C05 e C88 de *Rhizobium phaseoli*.

Estirpes	Tempo de geração
C05	2 h 30 min
C88	1 h 54 min

4.4. Crescimento de estirpes de *Rhizobium phaseoli* em meio definido.

Os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Crescimento de *Rhizobium phaseoli* em meio definido "CA".

Estirpes	Passagens sucessivas			
	1	2	3	4
C01	++	++	++	++
C03	++	++	++	++
C05	+	+	+	+
C09	+	+	+	+
C10	+	+	+	+
C12	+	+	+	+
C13	+	+	+	++
C14	+	+	+	++
C18	+	+	+	+
C19	+	+	+	+
C20	+	+	+	++
C23	+	+	+	++
C29	+	+	+	+
C33	+	+	+	++
C34	+	+	+	++
C40	+	+	+	++
C86	+	+	+	+
C88	+	+	+	++
C89	+	+	+	-

++ = muito crescimento.

+ = pouco crescimento.

- = não cresceram.

4.5. Crescimento de estirpes de *Rhizobium phaseoli* em meio peptona-glucose-ágar (PGA)

Todas as estirpes, usadas no trabalho, cresceram em meio PGA, variando, no entanto, a intensidade de crescimento. Os resultados são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Crescimento de *Rhizobium phaseoli* em meio PGA.

Estirpes	Crescimento em PGA com 3 dias de cultivo
C01	+++
C03	+++
C05	+++
C09	++
C10	+++
C12	+++
C13	++
C14	+
C18	++++
C19	++++
C20	+
C23 ^(a)	++
C29	+
C33	++
C34	+
C40	++++
C86 ^(a)	++
C88	++++
C89 ^(a)	++

(a) crescimento em 10 dias; ++++ = muito crescimento;
++ = crescimento razoável; + = pouco crescimento

4.6. Capacidade de nodulação das estirpes

Os resultados dos ensaios, em casa de vegetação, são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Capacidade de nodulação das estirpes de *Rhizobium phaseoli*.

Estirpes	E x p e r i m e n t o s		
	Siratro		Phaseolus
	1 (a)	2 (a)	3 (a)
C01	-	-	-
C03	-	-	-
C05	+	+	+
C09	+	+	+
C10	-	-	-
C12	+	+	+
C13	+	+	+
C14	+	+	+
C18	-	-	-
C19	-	-	-
C20	+	+	-
C23	-	-	-
C29	-	-	-
C33	-	-	-
C34	+	+	-
C40	-	-	-
C86	-	+	-
C88	-	-	+
C89	+	-	-
Testemunha	-	-	-

(a) Resultados de duas repetições.

+ = Nodulou.

- = Não nodulou.

4.7. Ocorrência de plasmídios em estirpes de *Rhizobium phaseoli*

As Figuras 2, 3, 4 e 5 mostram os resultados dos testes eletroforéticos, em gel de agarose, para detecção da presença de plasmídios em 19 estirpes de *Rhizobium phaseoli* conforme descrito no item 3.2.7.

Foram detectados 11 plasmídios, os quais foram designados de pRph 1 APA a pRph 11 APA.

Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose de DNA plasmidial de *R. phaseo*
li e de *E. coli* carregando plasmídios padrões. (Método de
 ECKHARDT, 1978, modificado por AFFONSO, 1981).

pRph 2 APA com 104 Md	C33.
pRph 4 APA com 91 Md	C18, C19, C29 e C33.
pRph 7 APA com 69 Md	C01, C03.
pRph 8 APA com 63 Md	C19, C29 e C33.
RP4 com 36 Md	<i>E. coli</i> .
pSA com 23 Md	<i>E. coli</i> .

Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose de DNA plasmidial de *R. phaseoli* e *E. coli* carregando plasmídios padrões (Método de ECKHARDT, 1978, modificado por AFFONSO, 1981).

pRph5APA com 89 Md	C34, C89
pRph6APA com 79 Md	C05, C12, C14, C34, C89
pRph8APA com 63 Md	C09
pRph9APA com 57 Md	C05, C09, C12, C13, C14, C89.
pRph10APA com 47 Md.	C05, C12.
pRph11APA com 30 Md.	C09.
RP4 com 36 Md	<i>E. coli</i> .
pSA com 23 Md	<i>E. coli</i> .

Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose de DNA plasmidial de *R. phaseoli* e de *E. coli* carregando plasmídios padrões. (Método de ECKHARDT, 1978, modificado por AFFONSO, 1981).

pRph	5	APA	com	89	Md	.	.	.	.	.	C34
pRph	6	APA	com	79	Md	.	.	.	.	.	C05, C12, C14, C34, C89.
pRph	8	APA	com	63	Md	.	.	.	.	.	C09.
pRph	9	APA	com	57	Md	.	.	.	.	.	C05, C09, C12, C13, C14, C89.
pRph	10	APA	com	47	Md	.	.	.	.	.	C05, C12.
pRph	11	APA	com	30	Md	.	.	.	.	.	C09.
pSA		com		23	Md.	.	.	.	.	.	<i>E. coli</i> .
pBR		com		2,6	Md	.	.	.	.	.	<i>E. coli</i> .

Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose de DNA plasmidial de *R. phaeo* e *E. coli* carregando plasmídios padrões. (Método de ECKHARDT, 1978, modificado por AFFONSO, 1981).

pRph 1 APA com 120 Md.		C86.
pRph 3 APA com 95 Md.		C10.
pRph 5 APA com 89 Md.		C86.
pRph 6 APA com 79 Md.		C89, C86.
pRph 8 APA com 63 Md.		C20, C23.
pRph 9 APA com 57 Md.		C89.
pSA com 23 Md.		<i>E. coli</i> .
pBR com 2,6 Md		<i>E. coli</i> .

4.8. Estimativa dos pesos moleculares dos plasmídios das estirpes nativas de *Rhizobium phaseoli*.

O número de plasmídios e suas respectivas migrações são apresentadas na Tabela 11.

A estimativa dos pesos moleculares foi feita como descrito em 3.2.8. e é apresentada na Figura 6.

Tabela 11 - Estimativa dos pesos moleculares dos plasmídios de estirpes de *Rhizobium phaseoli*.

Plasmídios	PM x 10 ⁶ d	Estirpes portadoras
pRph 1 APA	120	C86
pRph 2 APA	104	C33
pRph 3 APA	95	C10
pRph 4 APA	91	C18,C19,C29,C33
pRph 5 APA	89	C34,C86
pRph 6 APA	79	C05,C12,C14,C34,C86,C89
pRph 7 APA	69	C01,C03
pRph 8 APA	63	C09,C19,C20,C23,C29,C33
pRph 9 APA	57	C05,C09,C12,C13,C14,C89
pRph 10 APA	47	C05,C12
pRph 11 APA	30	C09

4.9. Plasmídios ao microscópio eletrônico

Foram visualizados plasmídios das estirpes C14 e C33. Dois dos quais são vistos nas Figuras 7 e 8.

Fig. 6 Estimativa dos Pesos Moleculares dos Plasmídios de Rhizobium phaseoli em comparação com plasmídios de E. coli (Vide Tabela 11)

1 a 11 - pRph 1 APA o pRph 11 APA

Figura 7 - Plasmídio de *R. phaseoli* C14.

Figura 8 - Plasmídio de *R. phaseoli* C33.

4.10. Padrões de esterases em estirpes de *Rhizobium phaseoli*.

Conforme metodologia descrita no ítem 3.2.10. foram determinados os padrões de esterases em 19 estirpes de *Rhizobium phaseoli*, os quais são vistos nas Figuras 9, 10 e 11.

Figura 9 - Eletroforese em gel de acrilamida. Padrões de esterases de *Rhizobium phaseoli*.

Figura 10 - Padrão de esterase em *Rhizobium phaseoli*. Eletrofo
rese em gel de acrilamida.

Fig.11 - Sumário preliminar dos principais padrões de Esterases de R. phaseoli

Padrões	Estirpes
1	C01, C03, C89
2	C05, C09, C12, C13, C14, C29
3	C18, C88
4	C19, C23
5	C34
6	C40

5. DISCUSSÃO

5.1. Caracterização e crescimento

A caracterização das estirpes, quanto aos tipos das colônias, concorda com VINCENT (1970). Entretanto em relação ao crescimento, houve variação dentro da espécie e entre as estirpes. (Tabela 4).

Houve variação também, quanto ao Teste de NORRIS, onde nem todas as estirpes tiveram reação ácida. Embora o número de estirpes com reação alcalina ou neutra tenha sido pequena pode-se dizer que não há correlação entre o tempo de crescimento e tipo de reação. NORRIS (1965) diz que reação ácida está relacionada com o modo de crescimento lento. Isto entretanto, não parece estar acontecendo, visto que, há diferença mesmo dentro da espécie, o que é uma confirmação dos dados de CASSINI (1980).

Para efeito de estudo da curva do crescimento foram usadas duas estirpes, uma que leva 3 dias para atingir colônia de 3 mm e outra que leva 5 dias. A C88 cresce mais rápido porque tem uma fase log, praticamente, nula, uma fase estacionária que leva mais tempo para ser atingi-

da, permitindo que tenha um número 10 vezes maior de células, no mesmo volume, com 48 horas de cultivo, em relação a estirpe C05, que atinge o patamar muito rápido.

O tempo de geração era o esperado (Tabela 7) visto que a C88 tem crescimento mais rápido. Comparando com o tempo de geração de *R. japonicum* (ALVES e AZEVEDO, 1975) comprova-se que *R. phaseoli* é de crescimento rápido e *R. japonicum* é de crescimento lento.

5.2. Crescimento em meio definido e em meio PGA

Das 19 estirpes estudadas, apenas uma não cresceu após 4 cultivos sucessivos, em meio definido. A maioria apresentou a mesma taxa de crescimento e 8 delas até melhoraram no quarto cultivo, isto pode ser devido à seleção de mutantes, menos exigentes, ou então, indução de enzimas.

Para comprovar qual das duas hipóteses está correta, teria que ser feito repiques novos, depois da estirpe estar em estoque em meio completo por período longo. No caso de crescer lento, implicaria em genes reguladores envolvidos, e no caso de crescer rápido, comprovaria a mutação. Resultados preliminares, indicam que a primeira hipótese é verdadeira.

Os dados mostram que, praticamente, todas as estirpes são

capazes de crescer em meio definido e, conseqüentemente, são muito apropriadas para futuros estudos genéticos.

Mutantes auxotróficos poderiam ser obtidos à semelhança do que tem sido feito com outras estirpes e com outras espécies (SCHWINGHAMER, 1969) para estudos genéticos de recombinação (HEUMANN, 1968).

Pela Tabela 9, observa-se que todas as estirpes cresceram em PGA, embora com diferentes intensidades de crescimento, isso contraria o preceito de que Peptona distingue *Rhizobium* de outras bactérias. As que cresceram mal em PGA apresentam pouco crescimento também em outros meios como o meio definido (Tabela 8) e o YMA ou YMB (Tabela 4 e ALVES, não publicado).

5.3. Nodulação

5 estirpes, das 19 de *R. phaseoli*, ensaiadas nodularam em três experimentos, 3 nodularam em dois experimentos e 2 nodularam em 1 dos experimentos.

Parece existir uma certa associação entre o melhor crescimento em meio PGA e ausência de nodulação, também parece haver associação com o crescimento em meio YMA (tamanho da colônia - Tabela 4). As que não nodulam crescem mais rápido.

Outras associações com nodulação, plasmídios e esterases

serão feitas nos itens 5.4. e 5.5.

5.4. Eletroforese em gel de agarose de DNA plasmidial

O processo de detecção de plasmídios em *Rhizobium* é muito complexo, daí ter-se buscado um método mais simples e amplamente usado para outras bactérias principalmente, para enterobactérias (MARTINEZ, 1979; AFFONSO, 1981) e para *Azospirillum* (LE MOS, 1980). O método de KADO E LIU (1981) também foi usado por ter semelhança com o de CASSE *et alii* (1979) que foi o processo desenvolvido para *Rhizobium*.

O método de ECKHARDT (1978) modificado por AFFONSO (1981) usando o Tampão TEB, funcionou muito bem, permitindo distinguir melhor o número de plasmídios, quando comparado com o outro método usado (Figuras 2, 3, 4 e 5) mesmo tendo sido introduzidas modificações que melhoraram a visualização dos plasmídios.

5.5. Número de plasmídios e seus pesos moleculares

Todas as estirpes apresentaram pelo menos 1 plasmídio com exceção da C40 e C88. O fato de 17 delas possuírem plasmídios, reforça a teoria de NUTI *et alii* (1979) de que uma parte significativa da informação genética em *Rhizobium* é plasmidial.

Não se chegou a detectar a função de cada um desses plasmídios. Entretanto, sabendo-se que algumas dessas estirpes produzem bacteriocina, nodulam e fixam N_2 e que estas características estariam correlacionadas com plasmídios (HIRSCH, 1979; CASSE *et alii*, 1979; JOHNSTON *et alii*, 1979; RUVKUN e AUSUBEL, 1980; NUTI *et alii*, 1979; BEYNON *et alii*, 1980; HIRSCH *et alii*, 1980), pode-se comparar o número de plasmídios esperados com o número de plasmídios observados (Tabela 12). Houve uma concordância para 10 estirpes, do total estudado. No caso em que não houve concordância, por apresentarem menos plasmídios do que se esperava ou não apresentarem plasmídios, é possível que tenha havido perda de alguns ou de todos. Perda de plasmídio é um fato relativamente comum (NUTI *et alii*, 1979). Os que deram a mais podem ter ou plasmídios crípticos ou apresentam mais de um plasmídio para a mesma função ou trata-se de um mesmo plasmídio em estados conformacionais diferentes. Isto pode ser comprovado, "curando" o plasmídio por choque de temperatura (ZURKOWSKI e LORKIEWICZ, 1978; BANFALVI e KONDOROSI, 1980).

No caso da C88, parece ter havido perda espontânea. VALARINI (comunicação pessoal) encontrou 1 plasmídio nessa estirpe. Na C40 não encontrou qualquer plasmídio o que concorda com nossos resultados; é provável que tenha havido perda de plasmídio no estoque original, uma vez que, ambas as culturas provieram da mesma fonte.

Os plasmídios visualizados foram designados de pRph1APA até pRph11APA. O peso molecular dos mesmos variou de 30 Md. a 120 Md., limite

Tabela 12 - Comparação do número de plasmídios esperados, com base na produção de bacteriocina, capacidade de nodulação e fixação de nitrogênio.

Estir- pes	Bacterio- cina (a)	Nodulação (b)	Fixação de N ₂ Efr (a)	Nº de plasmídios (b)	
				Esperados	Observados
C01	+	-	M	1 ou 2	1
C03	+	-	M	1 ou 2	1
C05	+	+	MA	3	3
C09	-	+	M	2	3*
C10	-	-	M	1	1
C12	-	+	MB	2	3*
C13	-	+	B	2	2
C14	-	+	MA	2	2
C18	-	-	A	1	1
C19	+	-	MA	2	2
C20	NT	+	B	2 ou +	1*
C23	+	-	A	2	1*
C29	+	-	M	2	2
C33	-	-	MA	1	2*
C34	-	+	MA	2	3*
C40	+	-	MB	2	0*
C86	-	+	MA	2	3*
C88	-	+	A	2	0*
C89	-	+	B	2	2

+ = Produção.
- = Ausência.
M = Média.

MA = Média alta.
MB = Média baixa.
B = Baixa.

A = Alta.

(a) CASSINI, 1980.

(b) Neste trabalho.

* Diferindo do esperado

muito aproximado do encontrado por GROSS *et alii*, 1979 em *R. japonicum*. Alguns são comuns a várias estirpes é o exemplo do pRph6APA e pRph9APA que se encontram em seis diferentes estirpes. Plasmídios grandes, superiores a 10^8 d, como é o caso, do pRph1APA e do pRph2APA, já foram encontrados em várias espécies de *Rhizobium* (NUTI *et alii*, 1979; BEYNON *et alii*, 1980).

Os pesos moleculares dos plasmídios foram determinados por meio da migração relativa (média de 3 eletroforeses), portanto, diferenças muito pequenas podem ser o mesmo plasmídio, como por exemplo, pRph3APA e pRph4APA, pRph7APA e pRph8APA.

As que não têm plasmídios seriam boas receptoras para plasmídios exógenos, como por exemplo o RP4 (promíscuo, à semelhança do que foi feito por outros autores (BERINGER e HOPWOOD, 1976) ou então como receptora para trabalhos em recombinação para estudos genéticos.

5.6. Microscopia eletrônica

Os plasmídios das estirpes C14 e C33 foram visualizados ao microscópio eletrônico. Foram estimados 45,9 μ m de comprimento dos plasmídios da C14 e 32,3 μ m do outro. Da C33 foram estimados 58,9 μ m, 51,6 μ m e 35,7 μ m. Esses valores estão dentro dos limites encontrados por SPITZBARTH *et alii* (1979) para *R. meliloti* (14 a 17 μ m e 125 - 135 μ m).

ZURKOWSKI e LORKIEWICZ (1976) demonstraram DNA plasmidial de 31 μ m de comprimento de *R. trifolii*.

5.7. Esterase

As estirpes tem diferentes padrões, caracterizados pela migração. Apenas tem-se conhecimento de dois trabalhos na área de eletroforese, visando métodos de identificação de estirpes de *Rhizobium* (KOVES-PÉCHY e SZENDE, 1978, ROBERTS *et alii*, 1980).

O método é muito útil para ser usado como marcador. Existem vários marcadores, tais como, resistência a antibióticos (SCHWINGHAMER e DALMAS, 1961; OBATON, 1971) que entretanto, podem afetar a nodulação e a eficiência (ALVES e AZEVEDO, 1975).

Os padrões parecem estar correlacionados com o local de origem das estirpes, e isto seria de grande valia para identificação em experimentos de campo, com inoculação. Além disso, estudos quantitativos por densitometria, poderiam informar sobre possíveis correlações entre a intensidade dos padrões de bandas e a capacidade de nodulação e fixação. Estudos não só qualitativos mas também quantitativos devem ser feitos com outras estirpes e outras espécies e outros sistemas, visando os mesmos objetivos.

6. CONCLUSÕES

Dos resultados podemos concluir que:

- 1) Produção de Álcali ou Ácido não é um método geral para distinguir estirpes de *Rhizobium* de crescimento rápido das de crescimento lento.
- 2) Meio com Peptona não é um meio eficiente para distinguir *Rhizobium* de outros gêneros de bactérias.
- 3) As estirpes estudadas crescem em meio definido e, portanto, são ótimo material para futuros estudos genéticos.
- 4) Existe uma frequência de 90% de estirpes de *Rhizobium phaseoli*, portanto os plasmídios, quais têm um peso molecular variando de 30 a 120 Md. Possivelmente, esses plas

mídios estão relacionados com a capacidade de nodulação de nitrogênio, bem como de produção de bacteriocina.

- 5) Padrões de esterases podem se constituir num bom instrumento na identificação à nível de estirpe.

7. LITERATURA CITADA

- AFFONSO, M.H.T. 1981. Isolamento de um plasmídeo responsável pela síntese simultânea da enterotoxina st. e do fator de colonização CFA/1 em *Escherichia coli*. Tese de Doutorado da Escola Paulista de Medicina, SP.
- ALVES, M.F. e J.L. AZEVEDO. 1975. Isolamento e características de mutantes de *Rhizobium japonicum* resistentes à estreptomicina. *Summa Phytopatologica*, 1:203-213.
- AZEVEDO, J.L. e S.O.P. da COSTA (ed). 1973. Exercícios práticos de Genética. Ed. Nacional. Ed. USP, SP.
- BÁNFALVI, Z. e A. KONDOROSI. 1980. Plasmid elimination from *Rhizobium meliloti* at elevated temperature. *Acta Microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 27:214.

- BERINGER, J.E. 1980. The development of *Rhizobium* genetics. The Fourth Fleming Lecture. *Journal of General Microbiology*, 116:1-7.
- BERINGER, J.E.; N.J. BREWIN e A.W.B. JOHNSTON. 1980. The genetic analysis of *Rhizobium* in relation to symbiotic nitrogen fixation. *Heredity*, 45:161-186.
- BERINGER, J.E. e D.A. HOOPWOOD. 1976. Chromosomal recombination and mapping in *Rhizobium leguminosarum*. *Nature*, 264:291-293.
- BEYNON, J.L.; J.E. BERINGER e A.W.B. JOHNSTON. 1980. Plasmids and host-range in *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium phaseoli*. *Journal of General Microbiology*, 120:421-429.
- BEYNON, J.L. e O.P. JOSEY. 1979. A novel technique to identify *Rhizobium* strains. In: Proceeding 7th American *Rhizobium* Conference. June 17-21, pg.46, Texas, USA.
- BOWERS, A.P.; G.H. ELKAN e W.E. KLOOS. 1979. Taxonomic study of *Rhizobium japonicum* using DNA-DNA hybridization. In: Proceeding 7th American *Rhizobium* Conference. June 17-21, pg.22, Texas, USA.
- BREWIN, N.J.; J.E. BERINGER; A.V. BUCHANAN-WOLLASTON; P.W.B. JOHNSTON e P.R. HIRSCH. 1980a. Transfer of symbiotic-genes with bacteriocinogenic plasmids in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology*, 116:261-270.

- BREWIN, N.J.; J.E. BERINGER e A.W.B. JOHNSTON. 1980b. Plasmid-mediated transfer of Host-range specificity between two strains of *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology*, 120:413-420.
- BRILL, W.J. 1980. Biochemical Genetics of Nitrogen Fixation. *Microbiological Reviews*, 4:449-467.
- BRUSSEL, A.A.N. van; K.PLANQUÉ e A. QUISPÉL. 1977. The wall of *Rhizobium leguminosarum* in bacteroid and free-living forms. *Journal of General Microbiology*, 101:51-56.
- BUCHANAN-WOLLASTON, A.V.; J.E. BERINGER; N.J. BREWIN; P.R. HIRSCH e A.W.B. JOHNSTON. 1980. Isolation of symbiotically defective mutants of *Rhizobium leguminosarum* by insertion of the transposon Tn5 into a transmissible plasmid. *Molecular and General Genetics*, 178:185-190.
- BURRIS, R. 1977. Overview of nitrogen fixation. In: HOLLAENDER, A., ed. Genetic Engineering for Nitrogen Fixation. Plenum Press, pg.9-18.
- CASSE, F.; C. BOUCHER; J.S. JULLIOT; M. MICHEL e J. DÉNARIÉ. 1979. Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *Journal of General Microbiology*, 113:229-242.

CASSINI, S.T.A. 1980. Atividade bacteriocinogênica e capacidade competitiva entre estirpes de *Rhizobium phaseoli*. Dissertação de Mestrado. ESALQ-USP, SP.

DE LEY, J. e A. RASSEL. 1965. DNA base composition flagellation and taxonomy of the genus *Rhizobium*. *Journal of General Microbiology*, 41:85-91.

DUNICAN, L.K. e F.C. CANNON. 1971. The genetic control of symbiotic properties in *Rhizobium*: evidence for plasmid control. *Plant and Soil*, Vol. especial: 73-79.

ECKHARDT, T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid*, 1:584-588.

ELKAN, G.H. 1971. Biochemical and genetical aspects of the taxonomy of *Rhizobium japonicum*. *Plant and Soil*, Vol. Especial: 85-104.

FRED, E.B.; I.L. BALDWIN e E. MCCOY. 1932. Root nodule bacteria and leguminous plants. University of Wisconsin, Studies of Sciences n° 5, Univ. Wisconsin, Madison.

GIBBINS, A.M. e K.F. GREGORY. 1972. Relatedness among *Rhizobium Agrobacterium* species determined by three methods of nucleic acid hybridization. *Journal of Bacteriology*, 111:129-141.

- GROSS, D.C., ANNE K. VIDAVER e R.V. KLUCAS. 1979. Plasmids, biological properties and efficacy of nitrogen fixation in *Rhizobium japonicum* strains indigenous to alkaline soils. *Journal General Microbiology*, 114:257-266.
- HEBERLEIN, G.T., J. DE LEY e J. TIJTGAT. 1967. Deoxyribonucleic acid homology and taxonomy of *Agrobacterium*, *Rhizobium* and *Chromobacterium*. *Journal of Bacteriology*, 94:116-124.
- HEUMANN, W. 1968. Conjugation in starforming *Rhizobium lupini*. *Molecular General Genetics*, 102:132-144.
- HIGASHI, S. 1967. Transfer of clover infectivity of *Rhizobium trifolii* to *Rhizobium phaseoli* as mediated by an episomic factor. *Journal General Applied Microbiology*, 13:391-403.
- HIRSCH, PENELOPE, R. 1979. Plasmid-determined bacterium production by *Rhizobium leguminosarum*. *Journal General Microbiology*, 113:219-228.
- HIRSCH, P.R.; M. van MONTAGU; A.W.B. JOHNSTON; N.J. BREWIN e J. SCHELL. 1980. Physical identification of bacteriocinogenic, nodulation and other plasmids in strains of *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology*, 120:403-412.

- HOLLIS, A.B.; W.E. KLOOS e G.H. ELKAN. 1981. DNA:DNA hybridization studies of *Rhizobium japonicum* and related *Rhizobiaceae*. *Journal of General Microbiology*, 123:215-222.
- HOYKAAS, P.J.J.; A.A.N. van BRUSSEL; H. den DULKRAAS; G.M.S. van SLOOTEREN e R.A. SCHILPEROORT. 1981. Sym plasmid of *Rhizobium trifolii* expressed in different rhizobial species and *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, 291:351-353.
- JARVIS, B.D.W.; A.G. DICK e R.M. GREENWOOD. 1980. Deoxyribonucleic acid homology among strain of *Rhizobium trifolii* and related species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30:42-52.
- JENSEN, H.L. 1942. Nitrogen fixation in leguminous plants. II- Is symbiotic nitrogen fixation influences by *Azotobacter*? *Proc. Linnean Soc. New South Wales*, 67:205-212.
- JOHNSTON, A.W.B.; J.E. BERINGER; J.L. BEYNON; N.J. BREWIN; A.V. BUCHANAN-WOLLASTON e P.R. HIRSCH. 1979. The involvement of plasmids in nodulation by *Rhizobium leguminosarum*. In: Proceeding 7th American Rhizobium Conference. June 17-21, pg.20, Texas, USA.
- JOHNSTON, A.W.B.; J.L. BEYNON; A.V. BUCHANAN-WOLLASTON; S.M. SETCHELL; P.R. HIRSCH e J.E. BERINGER. 1978. High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of *Rhizobium*. *Nature*, 276:634-636.

- KADO, C.I. e S.T. LIU. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *Journal of Bacteriology*, 145:1365-1373.
- KOVES-PECHY, K. e K. SZENDE. 1978. Electrophoretic variability of proteins in rhizobia. *Acta Microbiologica Academie Scientiarum Hungaricae*, 25:129.
- LARPENT, J.P. e M. LARPENT-GOURGAUD. 1975. Microbiologia prática. Trad. M.C. de M. AMOROSO, Ed. Edgar Blucher. Ed. USO, SP.
- LEMONS, M.V.F. 1980. Estudos genéticos no microrganismo fixador do nitrogênio *Azospirillum brasilense* (Krieg & Tarrand). 1977. Tese de Doutorado, Ribeirão Preto, SP.
- MARTINEZ, T.C.N. 1979. Estudo genético e físico em plasmídios de amostras humanas enterotoxigênicas de *Escherichia coli*. Tese de Mestrado, Escola Paulista de Medicina, SP.
- MEYERS, J.A.; D. SANCHEZ; L. PELWELL e S. FALKOW. 1976. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *Journal of Bacteriology*, 127:1529-1537.
- NORRIS, D.O. 1965. Acid production by *Rhizobium*, a unifying concept. *Plant and Soil*, 22:143-166.

NUTI, M.P.; F.C. CANNON; R.K. PRAKASH; A.A. LEPIDI e R.A. SCHILPEROORT.

1979. Extrachromosomal location of symbiotic genes in *Rhizobium*. In: Proceeding 7th American *Rhizobium* Conference. June, 17-21, pg.21, Texas, USA.

NUTI, M.P.; A.M. LEDEBOER; A.A. LEPIDI e R.A. SCHILPEROORT. 1977. Large plasmids in different *Rhizobium* species. *Journal of General Microbiology*, 100:241-248.

OBATON, M.M. 1971. Utilization de mutants spontanés résistants aux antibiotiques pour l'étude écologique des *Rhizobium*. *Compte Rendue Académie Science Paris, Série D*, 272:2630-2633.

PRAKASH, R.H.; P.J.J. HOOYKAAS; A.M. LEDEBOER; J. KIJNE; R.A. SCHILPEROORT; NUTI; A.A. LEPIDI; F. CASSE; C. BOUCHER; J.J. JULLIOT e J. DÉNARIÉ. 1980. Detection, isolation and characterization of large plasmids in *Rhizobium*. Proceedings of 3rd International Symposium on Nitrogen Fixation, eds. W.E. Newton e W.H. Orme-Johnson. University Park Press, Madison.

PRAKASH, R.K.; R.A. SCHILPEROORT e M.P. NUTI. 1981. Large plasmids of fast-growing *Rhizobia*: Homology studies and location of structural nitrogen fixation (*nif*) genes. *Journal of Bacteriology*, 145:1129-1136.

- ROBERTS, G.P.; W.T. LEPS; L.E. SILVER e W.J. BRILL. 1980. Use of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis to identify and classify *Rhizobium* strains. *Applied Environmental Microbiology*, 39:414-422.
- RUVKUN, G.B. e F.M. AUSUBEL. 1980. Interspecies homology of nitrogenase genes. *Proceedings National Academy Science of the USA*, 77:191-195.
- SCANDALIOS, J.G. 1969. Genetic control of multiple molecular form of enzymes in plants. A review. *Biochemical Genetics*, 3:37-79.
- SCHWINGHAMER, E.A. 1969. Mutation to auxotrophy and prototrophy as related to symbiotic effectiveness in *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Canadian Journal of Microbiology*, 15:611-622.
- SCHWINGHAMER, E.A. e R.L. DALMAS. 1961. Studies on induced variation in the rhizobia. II. Radiation sensitivity and induction of antibiotic-resistance markers. *Applied Microbiology*, 9:410-414.
- SPITZBARTH, M.; A. PUHLER e W. HEUMANN. 1979. Characterization of Plasmids isolated from *Rhizobium meliloti*. *Archives of Microbiology*, 121:1-7.
- VINCENT, J.M. 1970. Manual práctico de Rhizobiologia. Trad. C. Bathyani, Ed. Hemisfério Sur, Argentina. 200p.

WHITE, L.O. 1972. The taxonomy of the crown-gall organism *Agrobacterium tumefaciens* and its relationship to rhizobia and other agrobacteria. *Journal of General Microbiology*, 72:565-574.

ZURKOWSKI, W. e Z. LORKIEWICZ. 1978. Effective method for the isolation of non-nodulating mutants of *Rhizobium trifolii*. *Genetical Research*, 32:311-314.