INOCULAÇÃO DO FEIJOEIRO COMUM COM *Rhizobium leguminosarum*
bv.phaseoli E OBTENÇÃO DE MUTANTES RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS

SILVANA DE TELLA CAVALHEIRO PELLICANO
Engenheira Agrônoma

Orientador: Prof. Dr. ÁLVARO AUGUSTO T. VARGAS

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia, Área de
Concentração: Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Dezembro - 1992

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - FCLQ/USP

P391i Pellicano, Silvana de Tella Cavalheiro
Inoculação do feijoeiro comum com *Rhizobium*
leguminosarum bv. *phaseoli* e obtenção de mutantes
resistentes a antibióticos. Piracicaba, 1993.
71p.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Feijão - Inoculação 2. Nitrogênio - Fixação
3. Rizóbio - Inoculação 4. Rizóbio - Resistência
à antibiótico I. Escola Superior de Agricultura
Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 635.652

INOCULAÇÃO DO FEIJOEIRO COM *Rhizobium leguminosarum*
bv.phaseoli E OBTENÇÃO DE MUTANTES RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS

SILVANA DE TELLA CAVALHEIRO PELLICANO

Aprovada em: 03/02/1993

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Prado Filho	ESALQ/USP
Prof. Dr. Antonio Luiz Fanceli	ESALQ/USP
Prof. Dr. Álvaro Augusto T. Vargas	CENA/USP

Prof. Dr. Álvaro A.T. Vargas
Orientador

Ao Ido e à Natália pela
paciência e carinho com que
acompanharam este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Álvaro Augusto Teixeira Vargas pela orientação, apoio e amizade.

A Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP) e ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) pelas facilidades proporcionadas.

A CAPES e FAPESP pelo suporte financeiro.

Aos funcionários da Seção de Microbiologia do Solo do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), Siu Mui Tsai, Marli de Fátima Fiori, Roberto Bonetti, Francisco C. Montrazzi, Mário Bizetto, Márcio A. Gava e estagiárias Edna e Valéria.

A Dra. Elke J.B.N. Cardoso e funcionários do laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Solos da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP) pela primeira orientação.

A todos os professores e funcionários da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP) e do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	xi
SUMMARY	xii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1. Efeito da inoculação com <i>Rhizobium</i> em <i>P. vulgaris</i>	03
2.2. Limitações quanto ao sucesso da inoculação	04
2.2.1. Limitação inerente ao cultivar ...	04
2.2.2. Desordem nutricional da planta ..	06
2.2.3. Competição por sítios de infecção nodular	08
2.2.3.1. Fatores da Estirpe	10
2.2.3.2. Fatores do Hospedeiro ...	11
2.2.3.3. Fatores Ambientais	12
2.2.4. Sobrevivência e Persistência no solo	13
2.2.5. Nível de Inóculo na semente	16
2.3. Métodos de Identificação de estirpes de <i>Rhizobium</i> em nódulos	18
2.3.1. Mutantes resistentes a antibióticos	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. Experimento 01: Avaliação em campo da Inoculação de dois cultivares de feijão com as estirpes de <i>Rhizobium</i> <i>leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> CIAT-899 e UM-1135	20

3.2. Experimento 02: Resposta do feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) a diferentes concentrações de inoculante em condições de campo	24
3.3. Experimento 03: Comportamento da estirpe CIAT-899sc em vasos contendo solo com baixa população nativa de <i>Rhizobium</i>	25
3.4. Experimento 04: Obtenção de mutantes resistentes a antibióticos para estudos ecológicos no solo	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5. CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
APÊNDICE	69

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1	Tolerância à acidez e alumínio de estirpes de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	28
Tabela 2	Formação de nódulos por regiões	31
Tabela 3	Comparação entre os cultivares Carioca e ESAL 506 para os parâmetros número e matéria seca de nódulos e atividade da nitrogenase.....	33
Tabela 4	Comparação entre os cultivares Carioca e ESAL 506 para os parâmetros produção, matéria seca da parte aérea e do sistema radicular e nitrogênio na planta.....	33
Tabela 5	Comparação entre as fontes de nitrogênio para os parâmetros número e matéria seca de nódulos e atividade da nitrogenase...	34
Tabela 6	Comparação entre fontes de nitrogênio para os parâmetros produção, matéria seca da parte aérea e do sistema radicular e nitrogênio na planta.....	34
Tabela 7	Comparação entre os cultivares Carioca e ESAL 506 para os parâmetros número e matéria seca de nódulos e atividade da nitrogenase.....	38

Tabela 8	Comparação entre os cultivares Carioca e ESAL 506 para os parâmetros produção, matéria seca da parte aérea e do sistema radicular e nitrogênio na planta.....	38
Tabela 9	Comparação entre as diferentes concentrações de inóculo para os parâmetros número e matéria seca de nódulos e atividade da nitrogenase.....	39
Tabela 10	Comparação entre as diferentes concentrações de inóculo para os parâmetros produção, matéria seca da parte aérea e do sistema radicular e nitrogênio na planta.....	39
Tabela 11	Comparação entre os cultivares Carioca e Capixaba Precoce para os parâmetros número e matéria seca de nódulos e atividade da nitrogenase.....	43
Tabela 12	Comparação entre os cultivares Carioca e Capixaba Precoce para os parâmetros matéria seca da parte aérea e do sistema radicular da planta.....	43
Tabela 13	Comparação entre as fontes de nitrogênio para os parâmetros número e matéria seca de nódulos e atividade da nitrogenase.....	44

Tabela 14	Comparação entre as fontes de nitrogênio para os parâmetros matéria seca da parte aérea e do sistema radicular da planta.....	44
Tabela 15	Teste de χ^2 para cálculo da % de infecção de nódulos para estirpe inoculada	45
Tabela 16	Resistência das estirpes de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> a antibióticos	47
Tabela 17	Número de nódulos e distribuição no sistema radicular do cultivar de feijão Carioca em resposta à inoculação com estirpes de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>Phaseoli</i> resistentes a antibióticos	48

LISTA DE FIGURA

Figura 1	Esquema das sacolas de germinação utilizadas no teste de infecção e indução da nodulação pelos mutantes de <i>Rhizobium</i> obtidos	71
----------	---	----

INOCULAÇÃO COM *Rhizobium leguminosarum* BV. *phaseoli* NO
FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.), E OBTENÇÃO DE MUTANTES
RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS

Autora: Silvana de T. C. Pellicano
Orientador: Álvaro Augusto T. Vargas

RESUMO

Foi estudado, em condições de campo, o efeito da inoculação e níveis de inoculante de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* na cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Observou-se que em solos com baixa população nativa de *Rhizobium* a inoculação apresentou boa resposta, não diferindo em produtividade do tratamento com N-mineral. Com relação aos níveis de inoculante verificou-se que um aumento de 2 vezes a dosagem recomendada aos agricultores aumentou significativamente a taxa de fixação de N_2 . Em casa de vegetação e laboratório foram desenvolvidos experimentos utilizando-se estirpes com marcas seletivas de resistência a antibióticos. Em um experimento utilizando-se a estirpe CIAT-899sc obteve-se aproximadamente 50% dos nódulos ocupados por essa estirpe, confirmando sua resistência e a possibilidade da utilização da marcação com antibióticos como um método eficaz para estudos ecológicos no solo. Além disso, foram obtidas 76 estirpes mutantes resistentes a diversos antibióticos. Essas estirpes foram testadas quanto à habilidade de indução e formação de nódulos através de um método rápido e eficaz.

BEAN INOCULATION WITH *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*
AND USE OF MUTANTS TOLERANT TO ANTIBIOTICS

Author: Silvana de T. C. Pellicano

Adviser: Álvaro A. T. Vargas

SUMMARY

It was studied under field conditions the effect of several concentrations of *Rhizobium* in beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) inoculation.

Soils with low cell concentration of indigenous *Rhizobium* showed good response to rhizobia inoculation, with no difference in plant yield when compared with N-mineral application. Increasing the concentration of inoculant up two times the dose recommended to farmers improved the efficiency in N_2 -fixation. In the greenhouse and laboratory it was developed studies using *Rhizobium* strains marked with antibiotics. For the trial inoculating beans with *Rhizobium* strain CIAT-899_{mc}, it was found 50% of nodule occupancy with this strain. Another 76 strains were also marked with several antibiotics and tested to ability in nodule formation.

1. INTRODUÇÃO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma cultura de grande interesse econômico para o Brasil, uma vez que se constitui na principal e mais acessível fonte de proteína para sua população.

Pesquisas mostram que aproximadamente 80% da área cultivada com essa cultura pertence a pequenos proprietários que dispõem, na maioria das vezes, de pouca ou nenhuma tecnologia, com o agravante de limitação de recursos econômicos para implantá-las.

A tecnologia da **Fixação Biológica do Nitrogênio** consiste no aproveitamento do nitrogênio atmosférico (N_2) por microrganismos específicos que, através de uma simbiose, transferem esse nitrogênio, antes na forma de N_2 não assimilável pela planta, em uma forma assimilável pela planta.

Essa tecnologia vem sendo amplamente estudada pois pode substituir totalmente a adubação nitrogenada química, o que causaria redução no custo de produção e na poluição ambiental com a eliminação da fixação industrial e ainda a melhoria das condições químicas e físicas do solo quando inoculado com esses microrganismos.

Em algumas culturas como a soja no Brasil por exemplo, já se consegue a eliminação total da adubação química nitrogenada, utilizando-se estirpes selecionadas, que fixam e suprem a planta de todo nitrogênio necessário para que o ciclo da cultura se complete.

Já no caso da cultura do feijão, apesar de muitos progressos, os resultados ainda são contraditórios em termos da eliminação da adubação nitrogenada e substituição pela inoculação com as estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*.

Sendo a América Latina o centro de origem do feijoeiro é abundante o número de *Rhizobium* nativo no solo, frequentemente inefetivos e que tornam a resposta da planta à inoculação muito difícil. Além disso, já se verificou que o feijoeiro é relativamente promiscuo nodulando com muitas estirpes isoladas de outras leguminosas, resultando em pouca ou nenhuma fixação do nitrogênio atmosférico.

A identificação e o uso em inoculantes de estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* que combinem habilidade na fixação do N_2 e alta competitividade por sítios de infecção nodulares pode ser um importante fator para o estabelecimento definitivo da fixação biológica como fonte de nitrogênio nessa cultura.

Este trabalho visou o estudo da Fixação Biológica do Nitrogênio no feijoeiro e obtenção de mutantes resistentes a antibióticos para estudos ecológicos no solo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Efeito da inoculação com *Rhizobium* em *Phaseolus vulgaris*

O feijoeiro comum tem sido considerado inferior a outras leguminosas de grão em sua habilidade na fixação do N_2 por planta. Esta inferioridade foi atribuída em parte ao fato das avaliações iniciais terem sido feitas com material varietal, estirpes de *Rhizobium* e outras condições inadequadas. Resultados de GRAHAM & ROSAS (1977), demonstraram que os níveis de fixação de N_2 no feijoeiro eram tão altos como em outras leguminosas a exemplo da soja.

Quando se trata de condições controladas (casa-de-vegetação) as respostas do feijoeiro são bastante satisfatórias. BURTON et al (1954), encontraram um aumento de 220% de N e 40% na matéria seca em plantas inoculadas com uma estirpe eficiente de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* em comparação com plantas não inoculadas.

Em condições de campo, a resposta do feijoeiro à inoculação é bastante inconstante apresentando desde efeitos depressivos até respostas positivas no aumento de produção (GRAHAM, 1981). HABISH & ISHAG (1974), obtiveram um aumento significativo na produção, que variou de 20 a 145% dependendo do ano e local do Sudão. O efeito da inoculação foi equivalente a 43 Kg de fertilizante nitrogenado por hectare, chegando até a 86 Kg de N/ha.

VIDOR et al¹ citam que o ciclo vegetativo relativamente curto, associado ao cultivo em solos com relativa alta fertilidade natural, têm contribuído para disseminar o conceito de que a simbiose no feijoeiro não é eficiente.

A variação da resposta à inoculação no feijoeiro, principalmente em condições ambientais, dá-se devido a fatores intrínsecos dos cultivares e estirpes envolvidas, e também aos fatores ambientais tais como fertilidade (com especial atenção para o nitrogênio do solo), ph e temperatura do solo, e intensidade luminosa.

2.2. Limitações quanto ao sucesso da inoculação

2.2.1. Limitação inerente ao cultivar

Em estudos tentando-se determinar a variabilidade existente em germoplasma de feijão, encontrou-se uma variação de 20 a 115 Kg/ha de N_2 fixado por diferentes variedades (GRAHAM & TEMPLE, 1984).

Nos últimos anos têm-se demonstrado que algumas variedades de feijão podem obter mais de 60% do N requerido pelas plantas através da fixação do N_2 , e mais de 100 Kg/ha de nitrogênio pode ser fixado por cultivo (RENNIE & KEMP, 1983; RUSCHEL et al, 1982; WESTERMANN et al, 1981).

¹ VIDOR, C.; OLIVEIRA, L.A.; LOVATO, P.E. Sobrevivência e competição de estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. Trabalho apresentado na XIII Reunião Latinoamericana sobre *Rhizobium*, Panamá, 1986.

A obtenção destes níveis em cultivares que não foram selecionados para alta fixação e sem o uso das melhores combinações estirpe/hospedeiro, sugere a possibilidade do aumento da fixação do N_2 de forma substancial mediante o melhoramento de plantas que podem suprir uma melhor fixação de N_2 em associação a *Rhizobium* nativo ou a inoculantes melhorados, sob condições ótimas ou não de cultivo.

Nos estudos de melhoramento, GRAHAM & HALLIDAY (1977); GRAHAM & ROSAS (1977) e GRAHAM (1981), analisaram mais de 600 cultivares de feijão e verificaram que os com maiores potenciais de fixação de nitrogênio apresentavam porte indeterminado e hábito trepador. Esta hipótese foi contestada por BLISS (1985), que obteve linhagens com hábito de crescimento determinado e altas taxas de fixação de nitrogênio, podendo-se concluir então que altas taxas de fixação de nitrogênio não são totalmente dependentes de maturidade tardia e elevado crescimento vegetativo (características de cultivares de porte indeterminado e trepadeiras).

A duração das folhas fotossinteticamente ativas, em particular nas zonas baixas da planta, e o suprimento de carboidratos aos nódulos, estão frequentemente associados com o tempo da floração/maturação e hábito de crescimento, e também afetam a fixação do N_2 (GRAHAM & HALLIDAY, 1977; MC FERSON, 1983; ROSAS, 1983).

A capacidade de fixar N_2 atmosférico é um caráter quantitativo e de herança complexa. Diferenças na habilidade fixadora, tanto da estirpe quanto do hospedeiro são normalmente "distribuídas" e a frequência de genótipos altamente efetivos deve ser baixa segundo MYTTON (1984), o que dificulta o trabalho de obtenção de cultivares e estirpes eficientes.

Valores de redução do acetileno e de outros caracteres indicativos da fixação do N_2 como número e massa de nódulos, parecem estar geneticamente controlados e a relação destes caracteres com a quantidade de N_2 fixado parece depender principalmente de características da planta hospedeira, da interação hospedeiro/bactéria e do efeito do ambiente na simbiose (ROSAS & BLISS, 1986).

FELIX et al (1981), observaram que cultivares de feijão tropicais têm maior atividade de nitrogenase e menor atividade de nitrato redutase que cultivares de clima temperado independentemente do hábito de crescimento da planta. Isso foi explicado segundo a diferente partição de fotossintatos entre esses cultivares. Baseados nessas explicações os autores acreditam que mais que os países temperados, os países tropicais devem investir no melhoramento de cultivares visando o aumento da fixação biológica do N_2 , uma vez que seus cultivares, como foi mostrado, têm grande potencial para esta variável.

2.2.2. Desordem Nutricional da Planta

Inúmeros são os fatores nutricionais da planta que influenciam a fixação biológica do Nitrogênio. Entre esses fatores podemos citar os problemas associados a acidez nas plantas em geral, como: toxidez de alumínio e manganês, deficiência de fósforo, cálcio, magnésio e molibdênio.

Solos ácidos prejudicam tanto a bactéria, quanto o hospedeiro. O feijoeiro, que é bastante sensível à acidez, apresenta maior sensibilidade no início da nodulação, podendo esta ser atrasada, diminuindo-se o número de nódulos porém sem alteração do seu crescimento final. A nodulação máxima foi obtida em pH acima de 6,0 (MUNNS & FOX, 1977).

Como opções para a obtenção de boas respostas à inoculação do feijoeiro nos nossos solos (conhecidamente ácidos) pode-se utilizar medidas corretivas que auxiliem a fixação como por exemplo calagem, fosfatagem e aplicação de micronutrientes.

Aliás, a questão calagem em solos tropicais é bastante controversa e acredita-se que o grau de saturação de cálcio e magnésio do solo é mais importante do que o pH do meio no que diz respeito a fixação simbiótica do nitrogênio pela soja.

Já ALMENDRAS & BOTTOMLEY (1987), conseguiram aumentos na ocorrência de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* pelo aumento do pH do solo de 5,0 para 6,5 através da calagem.

Especial atenção em termos de adubação deve ser delegada ao micronutriente molibdênio (Mo) que apesar de ser requerido em pequena quantidade pela planta, tem a sua grande importância fundamentada no fato de que é o principal componente da nitrogenase.

Como outra opção na minimização de fatores nutricionais adversos à fixação biológica do N_2 , cita-se a utilização de cultivares e estirpes de *Rhizobium* que sejam tolerantes a estas condições.

VARGAS & GRAHAM (1988), estudaram a variação de estirpes e cultivares de feijão quanto à tolerância a pH ácido em casa-de-vegetação e concluíram que ambos (cultivar e estirpe) quando tolerantes a baixo pH, reduzem o efeito adverso dessa variável na nodulação e fixação do N_2 .

Efeitos da temperatura sobre a simbiose também podem ser minimizados através da obtenção de estirpes que sejam mais tolerantes aos extremos de temperatura.

2.2.3. Competição por sítios de infecção nodular

O termo "competição" quando aplicado a *Rhizobium*, usualmente designa competição pela formação de nódulos entre estirpes de *Rhizobium*, desde o momento que elas estão juntas no mesmo ambiente até que elas estejam dentro do nódulo (AMARGER, 1983).

A competição entre estirpes de *Rhizobium* pode ocorrer em turfa (DE ANTONI et al, 1981); no solo (GERMIDA, 1988); na raiz da planta hospedeira (MOAWAD et al, 1984; ANOLLES & FAVELUKES, 1986); ou durante os estágios infectivos da nodulação de leguminosas (JOHNSON et al, 1965; WINARMO & LIE, 1979). Essa competição pode ocorrer através da inoculação de um inoculante com mistura de estirpes (OLIVEIRA & VIDOR, 1984) e afetar a produção (RENNIE & DUBITZ, 1984), porém o principal problema de competição ocorre entre inoculantes com estirpes efetivas e *Rhizobium* nativo menos efetivo (OLIVEIRA, 1988).

Em solos não cultivados previamente com leguminosas e portanto com uma baixa população inicial de *Rhizobium*, estirpes inoculadas normalmente ocupam uma alta porcentagem dos nódulos e o aumento da produção pode ser considerado uma regra (DUNIGAN et al, 1983; GRAHAM, 1985). Por outro lado, em solos onde existam leguminosas nativas ou onde uma leguminosa introduzida tenha sido plantada por vários anos sem inoculação, o número de *Rhizobium* nativo pode ser aumentado, como mostra o trabalho de SAITO et al (1983), onde foi encontrado 6×10^4 *Rhizobium*/g de solo em 16 solos cultivados com feijão em São Paulo.

Essa grande população nativa passa então a competir por sítios nodulares. A eficiência desses *Rhizobium* varia grandemente. Segundo HAM (1978), a variação na

efetividade, bem como a predominância numérica destes *Rhizobium* é evidente em áreas do Centro-oeste americano, onde estirpes inoculadas raramente produzem mais do que 10% dos nódulos em soja e o N da planta derivado da fixação, preenche apenas 40% da necessidade das plantas durante todo o ciclo.

OLIVEIRA (1988), argumenta que a dominância dos *Rhizobium* nativos nos nódulos pode ser devido à sua melhor adaptação às condições ambientais do solo, à sua superioridade numérica, ou ainda à inabilidade das estirpes inoculadas de migrarem para sítios de nodulação das raízes secundárias e terciárias da planta hospedeira.

Essa situação se complica ainda mais pelo curto espaço de tempo que as raízes estão susceptíveis à infecção e pelo rápido crescimento das raízes através do solo. Enquanto a elongação das raízes pode exceder 5,0 cm/dia (BHUVANESWARI et al, 1981), MADSEN & ALEXANDER (1982), observaram que células de *Bradyrhizobium japonicum* USDA 138 sobrevivem a uma profundidade de no máximo 10 cm e lá alcançam uma população máxima de 10 células/g de solo. Essa baixa mobilidade e população de células são insuficientes para induzir uma boa nodulação no sistema radicular. O trabalho de AMES & BERGMAN (1981), confirma essa hipótese uma vez que os autores obtiveram uma maior formação de nódulos por uma estirpe "móvel" quando inoculada separadamente de estirpes não móveis de *R. meliloti*.

Enquanto o número de estirpes e sua relativa distribuição no solo são indubitavelmente um dos principais fatores na competição por sítios de nodulação, a estirpe, o hospedeiro e variáveis ambientais podem, igualmente, afetar a resposta competitiva.

2.2.3.1. Fatores da Estirpe

Os estudos de verificação de diferenças de competitividade entre estirpes, embora já feitos desde 1941 (NICOL & THORNTON, 1941), se reduzem a identificar estirpes mais competitivas ao invés de se investigar a base da competição.

Diversos autores observaram que, em meio de cultura, estirpes efetivas de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* eram mais competitivas que as inefectivas. Essa melhor competitividade das estirpes efetivas foi observada mesmo quando a proporção de estirpe efetiva para inefectiva era de 1% (ROBINSON, 1969).

Já JOSEPHSON & PEPPER (1984), citam em seu trabalho que eficiência na fixação é um fator independente e não correlacionado com competição. Segundo os autores, uma estirpe em particular pode ser altamente competitiva devido a inúmeros fatores como por exemplo um reconhecimento preferencial do hospedeiro pela estirpe, tolerância a fatores ambientais ou números relativos de estirpe inoculada e população nativa.

Muitos estudos de competição têm envolvido diferenças entre estirpes de crescimento rápido e de crescimento lento com capacidade para infectarem o mesmo hospedeiro. BROMFIELD & KUMAR RAO (1983), mostraram que *Rhizobium* de crescimento rápido foi mais competitivo que *Rhizobium* de crescimento lento em *Cicer arietinum* (Grão-de-bico). Já MC LOUGHLIN et al (1985), encontraram que *Rhizobium* de crescimento lento foi mais competitivo em soja que o *Rhizobium* de crescimento rápido, mesmo quando este último apresentava-se numericamente superior.

Segundo OLIVEIRA (1988), os fatores da estirpe que influenciam a competição têm sido inadequadamente estudados. Por exemplo, o estudo da motilidade (que influencia na competição) é limitado a estabelecerem-se comparações entre mutantes "não móveis" com as estirpes "móveis" que lhes deram origem, ao invés de se estudar a variabilidade natural de motilidade das estirpes.

2.2.3.2. Fatores do Hospedeiro

CALDWELL & VEST (1968), observaram que algumas estirpes nativas de *Bradyrhizobium japonicum* eram mais comuns nos nódulos de alguns genótipos de soja que em outros e que a distribuição desses nódulos era similar para cultivares com características relacionadas.

Em condições de campo, DIATLOFF & BROCKWELL (1976), concluíram que existia grande interação estirpe-hospedeiro em soja quando, estudando três estirpes de *B. japonicum* (CB 1809, CC 709 e CB 1795) observaram que para o cultivar Hampton a habilidade competitiva era mostrada na seguinte ordem: CB 1809 - CC 709 - CB 1795 e para o cultivar Hardy a ordem foi: CC 709 - CB 1795 - CB 1809.

Os aspectos que realmente estão envolvidos na resposta diferencial da inoculação a diversos genótipos hospedeiros, ainda não são perfeitamente conhecidos. DOMMERGUES et al (1978), baseados na hipótese de que lectinas das leguminosas estão relacionadas à especificidade na simbiose *Rhizobium*-leguminosa, sugerem que o sucesso na competição por uma determinada estirpe se deva à quantidade de açúcares específicos presentes na superfície das células, os quais estariam envolvidos no reconhecimento de sítios nodulares.

2.2.3.3. Fatores Ambientais

Diversos fatores ambientais afetam a competição por sítios nodulares entre estirpes. Dentre estes fatores destacam-se o pH, temperatura e fertilidade do solo.

JONES & MORLEY (1981), avaliaram 2 estirpes de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (CP 3B e R4) misturadas em um inoculante em igual proporção. Em 4 cultivares de trevo a pH = 5, 6 e 7, encontraram que em pH = 5, a estirpe CP 3B ocupou 86% dos nódulos, mas a pH = 7, 66% dos nódulos foram ocupados pela estirpe R4. Similarmente, com estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, VOSS et al (1984), mostraram que o efeito do pH do solo na capacidade de competição por sítio de nodulação variou entre as estirpes. A presença das estirpes CAR 37 e CAR 43 em nódulos foi reduzida de 22 e 65%, respectivamente, em um solo pH 5,1 para 3 e 5% em solo pH 6,7. Entretanto, a estirpe CAR 04 teve sua porcentagem em nódulos aumentada de 12 para 60% quando o pH do solo foi de 5,1 para 6,2.

A temperatura do solo também afeta a competitividade do *Rhizobium*. KVIEN & HAM (1985), encontraram que as estirpes USDA 110 e 138 quando inoculadas, dominavam as estirpes nativas a 15 e 30° C, mas foram dominadas pelas estirpes do solo a 20° C.

HARDARSON & JONES (1979), trabalhando com estirpes de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, obtiveram uma inversão na ocupação dos nódulos pelas estirpes 75str e 33spc a 12°C e 25°C. A estirpe 75str que dominava a ocupação dos nódulos a 12°C, sofreu uma redução na ocupação dos nódulos a 25°C onde a estirpe 33spc passou a ocupar 74% dos nódulos.

Além dos fatores pH e temperatura, outras características físico-químicas do solo têm sido estudadas para se avaliar seu efeito sobre a competição de estirpes e a fixação biológica do N_2 .

Em recente trabalho, ABAIDOO et al (1989), estudaram a influência da aplicação de nitrogênio na competição por sítios nodulares e também na colonização rizosférica. Concluíram que na ausência de populações nativas de *Rhizobium*, a competição e a colonização rizosférica das estirpes inoculadas não foram alteradas com as diferentes aplicações de N. Foi observada uma redução no número e massa de nódulos mais pronunciada no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) que em soja (*Glycine max* (L.) Merrill), redução esta que não modificou a via de ocupação dos nódulos.

Outro exemplo de manejo do solo, afetando a competição entre estirpes de *Rhizobium* pode ser observado no trabalho de HICKS & LOYNACHAN (1987), que observaram que uma fertilização fosfatada modificou a ocorrência nos nódulos de *B. japonicum* serogrupo 123 de 72% para 37% em vasos não fertilizados para fertilizados, respectivamente.

2.2.4. Sobrevivência e Persistência no solo

A persistência de uma estirpe de *Rhizobium* introduzida, que se refere a sua habilidade de sobreviver em condições adversas e de manter sua população no solo em número suficiente para a adequada nodulação de seu hospedeiro, é, fortemente influenciada por fatores bióticos e também fatores abióticos.

Fatores bióticos podem ser entendidos como interações entre *Rhizobium* e o seu hospedeiro através da rizosfera e entre *Rhizobium* e outros microrganismos do solo.

Já é conhecido e aceito que estirpes de *Rhizobium* são "seletivamente" estimuladas na rizosfera de seus hospedeiros. Diversos autores (ROBERT & SCHMIDT, 1983; MOAWAD et al, 1984) mostraram que o *Rhizobium* é um habitante natural da rizosfera independentemente se esta rizosfera for de leguminosas compatíveis ou não a ele, ou ainda se forem plantas não leguminosas. Esses autores sugerem que devido a essa grande adaptação na sobrevivência do *Rhizobium* em rizosferas de plantas hospedeiras ou não é que levaram essa espécie a manter uma população natural no solo.

O trabalho de DIATLOFF (1969), mostrou muito bem o efeito da rizosfera de planta não hospedeira quando obteve a nodulação de soja (*Glycine max* (L) Merrill), tendo utilizado um solo autoclavado (portanto sem estirpes nativas) onde foram plantadas e inoculadas com estirpe de *B. japonicum* culturas de trigo, aveia, tremço e ervilha. A melhoria da nodulação foi atribuída ao aumento da população de *B. japonicum* promovido pela rizosfera dessas plantas.

Recentemente, ROBERT & SCHMIDT (1983), utilizando a técnica de anticorpos específicos fluorescentes tentaram determinar o impacto do cultivo de leguminosa no estabelecimento e persistência de uma estirpe inoculada de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* e sua habilidade em competir com estirpes nativas. Foram utilizados 2 cultivares de feijão e 1 de soja (planta não hospedeira). O inoculante se sobressaiu nas 3 rizosferas estudadas, foi altamente competitivo e persistiu pelo menos durante 1 ano em solo sem cultura produzindo abundante nodulação das plantas hospedeiras no próximo cultivo.

Já LOVATO et al (1985), estudando a flutuação populacional de estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* na rizosfera de feijão, concluíram que a nodulação e

fixação do N_2 em feijão dependem mais das condições do solo, especialmente da acidez do que da sobrevivência do *Rhizobium* na rizosfera da planta.

Rhizobium e *Bradyrhizobium* interagem com os demais microrganismos do solo nos períodos em que vivem como saprófitas, sendo dessa maneira um outro fator que pode alterar a persistência e conseqüentemente a fixação por essas estirpes. Dentre as interações mais importantes temos a competição por nutrientes, a predação, o parasitismo e o amensalismo.

A eliminação dos demais microrganismos, através da esterilização do solo, proporciona a manutenção de maiores populações de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* em casos onde os fatores não biológicos não sejam limitantes (CHOWDHURY, 1977; VIDOR & MILLER, 1980; LOWENDORF et al, 1981). Dessa maneira o trabalho de CHOWDHURY (1977), constatou que *Bradyrhizobium* sp. e *R. leguminosarum* bv. *trifolii* apresentaram comportamento semelhante em solo esterilizado, enquanto que em solo não esterilizado houve diferença de comportamento entre os dois microrganismos, o que sugere diferentes capacidades de competição com a população microbiana do solo.

Dentre os fatores abióticos que afetam a persistência e sobrevivência do *Rhizobium* no solo destacam-se a temperatura e umidade do solo.

Altas temperaturas de solo associadas com baixa umidade podem reduzir sensivelmente a população de estirpes eficientes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* introduzidas ao solo pela inoculação. Essa hipótese pode ser comprovada pelo trabalho de CHATEL & PARKER (1973), que obtiveram fracassos no estabelecimento de pastagens de trevo no oeste australiano, o que vem sendo relacionado a um declínio

acentuado da população do *Rhizobium* existente no solo durante o verão quente e seco.

Assim, melhores condições de sobrevivência durante o período de cultivo da leguminosa hospedeira pode se constituir em requisito básico para assegurar um número adequado de células do *Rhizobium* específico em anos subsequentes (CHATEL & PARKER, 1973; MARSHALL, 1964).

2.2.5. Nível de Inóculo na Semente

Aumentando-se a concentração do inoculante aplicado às sementes das leguminosas, pode-se em alguns casos melhorar a nodulação e a fixação do N_2 , tanto pela sobrevivência da estirpe inoculada na rizosfera da planta, quanto pelo fato de uma população mais alta favorecer a competição entre os *Rhizobium* pelos sítios de infecção nodular (BOHLOOL & SCHMIDT, 1973; WEAVER & FREDERICK, 1974; VARGAS & GRAHAM, 1988).

VARGAS & SUHET (1980), estudando tipos e níveis de inoculantes em soja cultivada em um solo de cerrado, observaram um efeito significativo na nodulação e atividade da nitrogenase e um pequeno efeito no N total e produção de grãos quando do aumento da concentração do inoculante concluindo que para as condições do experimento era necessário a utilização de níveis mais elevados de inoculante.

MARTENSSON (1990), aumentou a concentração de *Rhizobium* inoculado em trevo em um experimento de campo onde uma população nativa e inefectiva estava presente. Observou-se um aumento na matéria seca e nitrogênio das plantas com o aumento da concentração do inóculo. A inoculação foi realizada em várias etapas e observou-se também que o número

de primeiros nódulos ocupados por bactérias inoculadas aumentou com o aumento da concentração do inóculo para determinada estirpe. A ocupação dos nódulos pelas estirpes inoculadas não se alterou com o aumento da concentração na nodulação tardia.

SOMASEGARAN et al (1988), concluíram que as concentrações de inoculação de estirpes em grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) não afetaram a competição dessas estirpes quando misturadas no inoculante.

WEAVER & FREDERICK (1974), observaram que o número de nódulos em raízes de soja em solos contendo menos que 12 *rhizobium*/g aumentou com o aumento da concentração de células inoculadas para $3,3 \times 10^4$ células/semente. Concluíram com este estudo que para formar 50% ou mais de nódulos, o *Rhizobium* inoculado deve estar presente no solo a uma razão de 1000:1 em relação a população nativa. Concluíram ainda que nos Estados Unidos os inoculantes comerciais não continham o número de *Rhizobium* adequado para uma competição entre estirpes em solos onde já havia sido cultivada a soja anteriormente.

JOHNSON et al (1965), encontraram uma taxa de infecção menor que 5% na soja, quando as estirpes foram inoculadas nas dosagens normalmente utilizadas pelos agricultores. Entretanto, aumentando em 25 vezes a dosagem normal, houve um aumento médio de 5 vezes na percentagem de nódulos formados por algumas das estirpes estudadas.

GAUR & LOWTHER (1982), obtiveram diferença significativa na nodulação com o aumento da concentração de inóculo, evidenciando a importância da população de *Rhizobium* na competição por sítios nodulares.

VARGAS & GRAHAM (1989), ao aumentarem a concentração de células de UMR 1116 de 1:1 para 100:1 com a estirpe CIAT 899sc em inoculante, obtiveram aumento significativo na ocupação dos nódulos por aquela estirpe principalmente em pH ácido. Os autores sugerem, em concordância com outros estudos realizados, que a limitação imposta pela acidez pode ser em parte suprida com altas doses de inoculante.

2.3. Métodos de identificação de estirpes de *Rhizobium* em nódulos

Com relação aos métodos de identificação de estirpes de *Rhizobium* em nódulos, vários deles têm sido utilizados em estudos de competição. Entre eles estão: aglutinação serológica (MARSHALL, 1956; SCHMIDT et al, 1968); anticorpos fluorescentes (SCHMIDT et al, 1968; BOHLOOL, 1987); SDS-PAGE (KAMICKER & BRILL, 1986; MAAGD et al, 1988); ELISA (JONES & MORLEY, 1981; KISHINEVSKY & JONES, 1987); Mutantes resistentes a antibióticos (OBATON, 1971; BROMFIELD & JONES, 1979; EAGLESHAM, 1987); *Rhizobium* produtor de nódulos pretos (AYANABA et al, 1986); *Rhizobium* infectivo mas não fixador de N₂ (AMARGER, 1981; HAHN & STUDER, 1986).

2.3.1. Mutantes resistentes a antibióticos

Segundo BERINGER (1981), a resistência do *Rhizobium* a antibióticos pode ser testada com baixas dosagens de antibiótico para se estudar a resistência intrínseca, ou com altos níveis de antibiótico para se obter mutantes. A concentração do antibiótico usado depende muito da espécie e pode variar muitas vezes. Os mutantes resistentes a antibióticos têm sido largamente utilizados em estudos ecológicos de *Rhizobium*, entretanto possuem a desvantagem de poderem ser alterados em suas propriedades simbióticas. A

resistência a baixos níveis de antibióticos é uma propriedade de microrganismos indígenas e pode ser testada sem nenhum isolamento prévio do microrganismo.

PEREIRA et al (1986), encontraram estirpes mutantes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, resistentes a diversos antibióticos, mutagenicamente estáveis e com maior capacidade de fixação de N_2 quando comparadas com estirpes recomendadas aos fabricantes de inoculantes. Esses resultados confirmavam, segundo os autores a viabilidade de utilização de mutantes em estudos ecológicos de *Rhizobium*, desde que estes mantenham suas características mutagênicas e não apresentem resistência cruzada aos antibióticos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 EXPERIMENTO 01: Avaliação em Campo da Inoculação de dois cultivares de feijão com as estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* CIAT-899 e UM-1135

O experimento foi conduzido em condições de campo na Fazenda Areão da ESALQ/USP, Piracicaba - SP, em fevereiro de 1989. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com 3 repetições. A análise estatística foi realizada pelo Teste de Duncan de comparação de médias. Foram utilizados os cultivares CARIOCA e ESAL-506 e os seguintes tratamentos:

- Carioca + inoculação da estirpe CIAT-899
- Carioca + inoculação da estirpe UM-1135
- Carioca sem inoculação (testemunha)
- Carioca + N mineral
- ESAL-506 + inoculação da estirpe CIAT-899
- ESAL-506 + inoculação da estirpe UM-1135
- ESAL-506 sem inoculação (testemunha)
- ESAL-506 + N mineral.

A adubação nitrogenada foi dividida em 2 etapas, sendo a aplicação de 65 kg de N/ha no plantio e 35 kg de N/ha em cobertura 20 dias após plantio na forma de uréia. Além disso, foi realizada uma adubação de 200 kg de P_2O_5 na forma de superfosfato simples, 60 kg de K_2O na forma de KCl e 20 kg de FTE-BR12 como fonte de micronutrientes por hectare no plantio.

O experimento conteve 24 parcelas de 20 m². Cada parcela continha 5 linhas de 4 m² e só foram utilizadas as 3 linhas centrais para amostragem de plantas. Foram coletadas 10 plantas por parcela para cada colheita.

Foram feitas 5 colheitas durante todo o ciclo da cultura (20, 30, 35, 45 e 85 dias após plantio). Os parâmetros avaliados foram: matéria seca da parte aérea e do sistema radicular da planta; número e matéria seca de nódulos; atividade da nitrogenase; teor de nitrogênio na parte aérea da planta e rendimento de grãos. A atividade da nitrogenase foi medida apenas nas 3ª e 4ª colheitas, ou seja, 35 e 45 dias após plantio. Na última colheita (85 dias após plantio) só se avaliou o rendimento de grãos.

O inoculante para as sementes foi obtido misturando-se as estirpes CIAT-899 e UM-1135 em turfa estéril. As estirpes foram inoculadas separadamente com o auxílio de alça de platina estéril e em câmara de ar, em meio de cultura extrato de levedura e manitol (YM) líquido, descrito no Apêndice. As estirpes foram originalmente repicadas da coleção de estirpes do laboratório de Microbiologia do Solo do CENA-USP, que ficam armazenadas em tubos inclinados com meio de cultura YM. Após 3 dias de incubação, sob agitação constante e temperatura ambiente, foi feita a contagem de células em Câmara de Petroff-hauser e obtida a concentração de 10⁷ células de *Rhizobium* /ml de meio. Foram colocados 40 ml desse meio em 200 g de turfa, homogeneizado e incubado a 28°C por 3 dias.

Após o período de incubação fez-se a contagem de *Rhizobium* no inoculante pelo método de diluição, colocando-se 10 g de inoculante em 90 ml de solução salina de cloreto de sódio a 0,4%, obtendo-se a diluição 10⁻¹. Transferiu-se 10 ml dessa solução para 90 ml de solução salina esterilizada de

cloreto de sódio, e assim sucessivamente até obter-se a diluição 10^{-8} . De cada diluição foi inoculado, com o auxílio de alça de Drigalski, 0,1 ml de solução em placa de Petri contendo meio YM. Após o crescimento das colônias fez-se a contagem de acordo com sua diluição. O inoculante foi aplicado às sementes quando apresentou uma concentração de 10^8 células de *Rhizobium*/g de turfa.

A inoculação das sementes foi feita com 5 g de inoculante/Kg de semente, conforme a recomendação técnica fornecida pela pesquisa.

As sementes de feijão foram esterilizadas superficialmente com álcool 98° GL, durante 5 minutos e a seguir imersas em uma solução de cloreto mercúrico 0,02% em ácido clorídrico (VINCENT, 1970), durante 3 minutos, sendo lavadas por 6 vezes sucessivas com água destilada, deionizada e esterilizada.

Parâmetros avaliados:

Rendimento de Matéria Seca da Parte Aérea: Após a colheita, a parte aérea foi separada do sistema radicular da planta, acondicionada em sacos de papel e colocadas em estufa ventilada a 60°C para secagem. Após secagem o material foi pesado.

Rendimento de Matéria seca do Sistema Radicular: Após a avaliação do parâmetro atividade da nitrogenase, os nódulos foram separados das raízes que foram lavadas em água de torneira, acondicionadas em sacos de papel, secas em estufa ventilada a 60°C e pesadas.

Número e matéria seca de nódulos de raiz: Após avaliação do parâmetro atividade da nitrogenase, os nódulos

foram contados, colocados em frascos de vidro e secos por 24h em estufa ventilada a 60°C para posterior pesagem.

Atividade da Nitrogenase: A atividade da enzima nitrogenase foi medida pelo método da redução do acetileno - ARA (HARDY et al, 1968). Após a colheita das plantas, o sistema radicular com nódulos foi acondicionado em frascos de vidro recobertos com saco de papel escuro para evitar a entrada de luz e vedados com tampa própria. Em seguida, injetou-se 10% do volume do frasco de gás acetileno e 0,01% de gás propano (para se verificar a existência de vazamento de gás dos frascos). Após a incubação por 30 minutos, amostras de 0,5 ml de gás foram retiradas dos frascos usando-se seringas de 10 ml, e injetadas em cromatógrafo a gás. Obteve-se picos das amostras que foram convertidos em nmol C_2H_4 /h.pl através da seguinte fórmula:

$$ARA = \text{Alt. pico amostra (mm)} \times K \times \text{Vol. frasco (ml)} \times \\ \times \frac{1}{\text{Volume injetado (ml)}} \times \frac{1}{T(h)}$$

onde:

$$K = \frac{11,16}{\text{altura padrão (mm)}}$$

Volume frasco = 500 ml

Volume injetado = 0,5 ml

Tempo = 0,5 h

ARA = nmol C_2H_4 /h.planta

Atividade Específica da Nitrogenase: Esses valores foram obtidos dividindo-se a atividade da nitrogenase pela matéria seca de nódulos obtendo-se então a atividade da nitrogenase em nmol/h/grama/nódulo.

ARA ÷ Matéria seca de nódulos = nmol/h/grama nódulo

Teor de Nitrogênio na Parte Aérea da

Planta: A análise do N-total da parte aérea da planta foi feita de acordo com o método semi-micro-Kjeldahl descrito por BREMMER (1965), obtendo-se o N-total em porcentagem que foi transformado em mg de nitrogênio por planta, da seguinte maneira:

$$\text{N-total da planta} = \frac{\text{TNTP} \times \text{Matéria seca parte aérea}}{100}$$

onde: TNTP = teor de nitrogênio total na parte aérea
Matéria seca planta = mg/planta.

Rendimento de Grãos: A produção de cada parcela do experimento foi pesada e o resultado transformado de g/20 m² (tamanho da parcela) para kg/ha.

3.2 EXPERIMENTO 02: Resposta do Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) a diferentes concentrações de inoculante em condições de campo.

O experimento foi conduzido na Fazenda Areão da ESALQ/USP, Piracicaba - SP, em fevereiro de 1989. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com 3 repetições. Foram utilizados os cultivares de feijão Carioca e ESAL-506 e as concentrações de inoculante foram de 5, 10, 20 e 40g de inoculante por quilo de semente. A estirpe de *Rhizobium* utilizada foi a CIAT-899, recomendada pela pesquisa. As variáveis analisadas foram: matéria seca da planta e da raiz, número e massa de nódulos, atividade da

nitrogenase, teor de nitrogênio na planta e o rendimento de grãos. Foram realizadas cinco colheitas durante todo o ciclo da cultura. O experimento foi adubado da mesma maneira descrita no item 3.1 do experimento 01 pois se tratava do mesmo solo e experimentos vizinhos.

A obtenção da estirpe, a inoculação das sementes e a análise dos parâmetros avaliados foram realizadas da mesma forma citada no item 3.1 do experimento 01.

3.3. EXPERIMENTO 03: Comportamento da Estirpe CIAT-899sc em vasos contendo solo com baixa população nativa de *Rhizobium*.

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação no CENA-USP com delineamento experimental inteiramente casualizado. Foram utilizados os cultivares Carioca e Capixaba Precoce com os seguintes tratamentos:

- Carioca + inoculação CIAT 899sc
- Carioca sem inoculação
- Carioca + N mineral
- Capixaba Precoce + inoculação CIAT 899sc
- Capixaba Precoce sem inoculação
- Capixaba Precoce + N mineral

Foram feitas seis repetições e uma só coleta no início do florescimento das plantas. Os parâmetros avaliados foram: matéria seca da parte aérea e do sistema radicular; número e matéria seca de nódulos; atividade da nitrogenase e % de infecção de nódulos pela estirpe CIAT-899sc.

Os recipientes utilizados foram vasos plásticos com capacidade para 5 Kg de solo. O solo foi coletado na Fazenda Areão da ESALQ-USP e realizado o teste do número mais provável - NMP, para quantificação de *Rhizobium*, utilizando-se a tabela de Mc Crady (POSTGATE, 1969).

Os vasos plásticos foram previamente desinfestados com uma solução de hipoclorito de sódio a 10% durante 30 minutos. Em cada vaso foram semeadas 4 sementes de feijão previamente esterilizadas como citado no item 3.1 do experimento 01.

Os vasos foram irrigados com água comum e adubados com 150 ppm de K, 200 ppm de P e 200 mg de micronutriente na forma de BR-12/vaso. O nitrogênio foi aplicado ao solo na forma de uréia no plantio (100 ppm de uréia/vaso).

Quatro dias após a emergência das plântulas fez-se a inoculação com a estirpe CIAT-899sc.

Foram colocados 10 ml de inoculante líquido (sem turfa) por vaso. O inoculante foi obtido como descrito no item 3.1 do experimento 01 e aplicado no colo das plântulas com o auxílio de pipeta estéril a uma concentração de 10^8 células/ml.

Aos 45 dias após a semeadura (início do florescimento das plantas) fez-se a coleta. Os parâmetros matéria seca da parte aérea e do sistema radicular, número e matéria seca de nódulos e atividade da nitrogenase foram avaliados da mesma forma citada no item 3.1 do experimento 01.

% de Infecção de Nódulos:

Para avaliação desse parâmetro foram coletados, ao acaso, 10 nódulos de cada vaso dos tratamentos com e sem inoculação. Os nódulos foram desinfestados superficialmente com álcool 98° GL durante 5 minutos e a seguir imersos na solução de cloreto mercúrico durante 3 minutos e lavados por

seis vezes sucessivas com água destilada, deionizada e esterilizada.

A seguir os nódulos foram colocados em placas de Petri esterilizadas, macerados separadamente, com o auxílio de um bastão de vidro, o qual, após cada maceração foi lavado com álcool 98° GL, flambado e resfriado. Cada nódulo macerado foi transferido para duas placas de Petri contendo meio de cultura extrato de levedura e manitol sendo uma placa sem antibiótico e outra com 125 ppm de estreptomicina e 125 ppm de cloranfenicol.

A adição do antibiótico ao meio YM foi feita, sob condições assépticas no meio autoclavado e resfriado a uma temperatura de aproximadamente 32°C onde o meio ainda estava líquido para ser vertido nas placas e não sendo portanto o antibiótico degradado pelo calor.

A solução de antibiótico foi obtida utilizando-se antibióticos de uso humano, conforme descrito no Apêndice, e esterilizada por filtração em filtro *Millipore* (0,45 micras).

Com o auxílio de pipetas graduadas estéreis a solução de antibiótico foi adicionada ao meio na concentração desejada e o meio foi vertido nas placas.

Em cada placa foram esmagados 10 nódulos tomando-se o cuidado para que o mesmo nódulo ocupasse o mesmo lugar nas duas placas (com e sem antibiótico).

As placas foram incubadas em estufa à 28°C para verificação do crescimento durante aproximadamente 5 dias.

Foi realizado o teste de Qui-quadrado (GOMES, 1987) para avaliação do resultado.

3.4. EXPERIMENTO 04: Obtenção de Mutantes resistentes a antibióticos para estudos ecológicos no solo.

Para a obtenção de mutantes resistentes a antibióticos foram escolhidas do banco de estirpes da Seção de Microbiologia do Solo do CENA-USP, 8 estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* sendo algumas delas já previamente testadas quanto à tolerância à acidez e alumínio como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Tolerância à acidez e alumínio de estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*.

CENA	ORIGINAL	OUTROS	TOLERÂNCIA À ACIDEZ	
			pH 4,5	100µMol Al
CM 03	CIAT 2562 Colombia	UM 1024	+	-
CM 04	C-183 CENA, SP	UM 1026	+	+
CM 05	C-184 CENA, SP	UM 1149	+	-
CM 06	C-179 CENA, SP	UM 1049	+	-
CM 10	IAPAR 32	UM 1073	-	-
CM 12	UFRGS-196	UM 1135	+	-
CM 14	007-84-EF	UM 1384	?	?
CM 38	CPAC H-23	UM 1102	-	-

As estirpes foram inicialmente repicadas dos tubos com meio YM inclinado onde são mantidas, para placas de Petri contendo o mesmo meio para multiplicação e purificação. As placas foram incubadas a 28°C durante 3 dias.

Com o auxílio de alça de platina e em condições assépticas, as colônias de *Rhizobium* foram retiradas das placas e inoculadas em meio YM líquido. Obteve-se o crescimento das estirpes no meio líquido sob agitação constante e temperatura ambiente por 3 dias.

Concomitantemente foram preparadas placas de Petri contendo meio YM e antibióticos para o crescimento de colônias mutantes. Foram preparadas soluções estoque de antibiótico de 20.000 ppm conforme descrito no apêndice. Todas as soluções de antibiótico utilizadas no experimento foram esterilizadas por filtração em filtro *Millipore* (0,45 micras) e mantidas em freezer a -10°C. Essas soluções foram diluídas de acordo com a concentração de antibiótico desejada.

Com o auxílio de pipeta de Pasteur e alça de Drigalski a estirpe original de *Rhizobium* foi transferida para a placa de Petri contendo o meio YM e antibiótico. Para cada estirpe inoculou-se 6 placas com o intuito de se obter uma quantidade elevada de mutantes. Incubou-se as placas em estufa a 28°C por 5 dias (esse crescimento pode ser retardado pela presença do antibiótico).

Uma vez obtidas as colônias mutantes repicou-se cada colônia para uma placa com YM que depois de crescida foi colocada novamente em placa contendo meio YM com dosagem maior de antibiótico.

As estirpes foram marcadas gradativamente com 20, 40, 80, 140, 200 e 300 ppm de antibiótico como mostra a Tabela 16 do experimento 04 em Resultados e Discussões.

As colônias resistentes aos antibióticos na dosagem final, foram repicadas para tubo contendo meio de cultura YM inclinado e também foram liofilizadas para serem mantidas com maior segurança, uma vez que essa estirpe liofilizada não ficará sendo repicada e com isso sujeita mais facilmente à reversão da mutação.

Como citado anteriormente, a capacidade de fixação de nitrogênio é um caráter quantitativo e de herança complexa e a obtenção de mutantes resistentes a antibióticos pode interferir na capacidade da estirpe de induzir nodulação ou fixar nitrogênio eficientemente.

Também foi conduzido um experimento com o intuito de se testar a habilidade de infecção e indução da nodulação dos mutantes obtidos.

Esse experimento foi conduzido em casa-de-vegetação no CENA-USP em sacolas plásticas segundo método descrito por OLIVEIRA, (1988). As sacolas foram feitas com papel de germinação colocado dentro de sacos plásticos. Essas sacolas foram esterilizadas através de 2,5 mrad de irradiação.

As sacolas ficaram suspensas através de um palito colocado de uma extremidade a outra da borda aberta do saco plástico. Foi feita uma dobra na parte superior do papel de germinação para que fosse colocada a semente de feijão e as raízes crescessem em direção ao fundo da sacola (Figura 1). O papel de germinação foi mantido sempre úmido com solução nutritiva de Mc Knight descrita no apêndice.

Foram colocadas 2 sementes de feijão do cultivar CARIOCA previamente esterilizadas conforme descrito no item 3.1 do experimento 01, em cada sacola.

Após 4 dias da germinação, as raízes das plântulas que mediam por volta de 5,0 cm de comprimento, foram marcadas conforme descrito por BHUVANESWARI et al (1980, 1981).

Por volta de 10 dias após a germinação das sementes já se pôde observar a formação de nódulos nas raízes. Esses nódulos foram contados por regiões conforme a Tabela 2, para que a estirpe fosse avaliada quanto à competitividade segundo método descrito por OLIVEIRA (1988).

Tabela 2. Formação de nódulos por regiões.

Regiões	Distância da raiz marcada (cm)
A	> 10 - acima
B	5-10 - acima
C	0- 5 - acima
D	0- 5 - abaixo
E	5-10 - abaixo
F	> 10 - abaixo

O resultado do número e distribuição de nódulos no sistema radicular é apresentado na Tabela 17.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

EXPERIMENTO 01: Avaliação em campo da Inoculação de dois cultivares de feijão com as estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* CIAT-899 e UM-1135.

De acordo com as Tabelas 3 e 4, apresentadas a seguir, pode-se observar que o cultivar ESAL-506 foi mais produtivo que o cultivar CARIOCA, apresentando porém menor número de nódulos e não variando estatisticamente para os parâmetros matéria seca de nódulos, atividade da nitrogenase, matéria seca da planta e do sistema radicular e teor de nitrogênio na parte aérea da planta.

O cultivar ESAL-506 foi escolhido por ter sido um cultivar melhorado para resistência a pragas e doenças e apresentar boas características comerciais; o cultivar CARIOCA por ser o mais comercializado e rústico feijoeiro plantado no Brasil.

Com relação ao comportamento das estirpes, notou-se (Tabelas 5 e 6) que, nas variáveis diretamente relacionadas à fixação biológica do nitrogênio, como número e massa de nódulos e atividade da nitrogenase, houve um incremento estatístico na média obtida em relação à testemunha (sem inoculação) e ao tratamento com nitrogênio.

Tabela 3. Comparação entre os cultivares Carioca e ESALQ 506 para os parâmetros número e matéria seca de nódulos e atividade da nitrogenase.

Cultivar	Nódulos		Atividade da nitrogenase	
	nº/ planta	mg/ planta	nmol/ planta.h	nmol/g nódulo
ESALQ 506	1,74 b	1,3 a	133,25 a	31,31 a
CARIOCA	2,81 a	2,6 a	108,50 a	19,31 a

- Teste de Duncan a 5%.

- Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

Tabela 4. Comparação entre os cultivares Carioca e ESALQ 506 para os parâmetros produção, matéria seca da parte aérea e do sistema radicular e nitrogênio na planta.

Cultivar	Produção (kg/ha)	Mat.seca planta (g/planta)	Mat.seca raiz (g/planta)	N na planta (mg/planta)
ESALQ 506	1824 a	4,72 a	0,35 a	140 a
CARIOCA	1028 b	4,51 a	0,37 a	130 a

- Teste de Duncan a 5%.

- Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

Tabela 5. Comparação entre as fontes de nitrogênio para os parâmetros número e matéria seca de nódulos e atividade da nitrogenase.

Fontes de N	Nódulos		Atividade da nitrogenase	
	no/ planta	mg/ planta	nmol/ planta.h	nmol/g nódulo
Testemunha	1,28 c	0,8 c	103,01 b	39,52 a
Nitrogênio	0,00	0,0 c	0000,0 c	00,00 b
CIAT-899	6,18 a	6,4 a	633,22 a	72,29 a
UM-1135	2,2 b	3,1 b	246,15 ab	47,30 a

- Teste de Duncan a 5%.

- Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

Tabela 6. Comparação entre fontes de nitrogênio para os parâmetros produção, matéria seca da parte aérea e do sistema radicular e nitrogênio na planta.

Fontes de N	Produção (kg/ha)	Mat.seca planta (g/planta)	Mat.seca raiz (g/planta)	N na planta (mg/planta)
Testemunha	1392 a	4,22 b	0,34 b	120 b
Nitrogênio	1604 a	6,30 a	0,45 a	200 a
CIAT-899	1300 a	3,90 b	0,33 b	110,b
UM-1135	1424 a	4,05 b	0,32 b	110 b

- Teste de Duncan a 5%.

- Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

A estirpe CIAT-899 apresentou maior número e massa de nódulos que a estirpe UM-1135 porém com mesma atividade específica da nitrogenase.

Os tratamentos com inoculação e adubação nitrogenada diferiram estatisticamente para os parâmetros matéria seca da parte aérea e do sistema radicular da planta e também quanto ao teor de nitrogênio na parte aérea da planta. Na produção de grãos não houve diferença significativa entre os tratamentos testados. O uso de fertilizantes minerais na adubação pode ter estimulado a fixação de N_2 pela população nativa de *Rhizobium*, conforme cita VARGAS et al (1989).

Obteve-se através deste experimento uma boa resposta à inoculação, o que confirma resultados alcançados por HABISH & ISHAG (1974), RUSCHELL et al (1979) e diversos autores que demonstram os benefícios de proceder-se à inoculação do feijoeiro como uma prática usual em vista do baixo custo que ela apresenta e dos aumentos de rendimento que pode ocasionar.

Entretanto, variáveis genéticas, edáficas e agronômicas limitam o potencial de fixação de N_2 no feijoeiro necessitando-se ainda de maiores estudos para respostas mais satisfatórias à inoculação com *Rhizobium* nessa cultura principalmente em condições de campo onde, quando se obtém resposta à inoculação, as taxas de fixação de N_2 observadas podem variar de 25 a 71 Kg de N_2 fixados por hectare em um ciclo de cultura de 100-130 dias (SOUZA, 1969; HABISH & ISHAG, 1974; CIAT, 1977; GRAHAM & ROSAS, 1977).

EXPERIMENTO 02: Resposta do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) a diferentes concentrações de inoculante em condições de campo.

O cultivar CARIOCA apresentou melhor desempenho que o ESAL-506, obtendo-se diferença estatística significativa pelo teste de Duncan a 5%, no número e massa de nódulos e matéria seca da parte aérea da planta. Em relação à produtividade, o cultivar ESAL-506 produziu 25% a mais que o CARIOCA sendo esta diferença não significativa estatisticamente. Na atividade da nitrogenase e nitrogênio total da parte aérea da planta, os dois cultivares não diferiram entre si. Esses dados podem ser analisados nas Tabelas 7 e 8 apresentadas a seguir.

Com relação às concentrações do inoculante, para os parâmetros número de nódulos e matéria seca da parte aérea da planta e do sistema radicular, o aumento da concentração de inoculante em 2 vezes o recomendado para os agricultores (5g inoculante/Kg semente) representou um incremento estatisticamente significativo nas médias obtidas, como podemos observar nas Tabelas 9 e 10. A concentração de 10g de inoculante/Kg de semente teve médias maiores que a concentração de 40g de inoculante/Kg de semente para os parâmetros atividade específica da nitrogenase (nmol/grama de nódulo), produção, matéria seca da parte aérea e da raiz e teor de nitrogênio na parte aérea da planta.

Conforme é citado por BOHLOOL & SCHMIDT (1973); WEAVER & FREDERICK (1974) e VARGAS & GRAHAM (1988), o aumento da concentração do inoculante aplicado às sementes das leguminosas em geral pode contribuir para a melhoria da nodulação, tanto pela sobrevivência da estirpe inoculada na rizosfera da planta, quanto ao fato de uma população mais alta favorecer a competição entre os *Rhizobium* pelos sítios de infecção nodular.

Para o experimento em questão obteve-se, pelo teste do número mais provável - NMP (POSTGATE, 1969), uma quantidade de 32 células de *Rhizobium*/g de solo. Essa baixa população nativa de *Rhizobium* no solo induz, de maneira geral, a uma melhor resposta da inoculação com estirpes melhoradas uma vez que elimina-se o fator competição da estirpe nativa ineficiente (capaz de nodular, mas apresentando baixa fixação simbiótica do N_2). Dessa maneira, pode-se concluir que o aumento no número de nódulos, na matéria seca da planta (parte aérea e raiz) e no teor de nitrogênio da parte aérea da planta quando se dobra a concentração do inoculante de 5 para 10g de inoculante/Kg de semente, deve estar associado o fator representado pela melhor sobrevivência da estirpe na rizosfera da planta.

WEAVER & FREDERICK (1974), trabalhando também com solos contendo baixa população nativa (12 células/g de solo), obtiveram um aumento no número de nódulos em soja com o aumento da concentração de células inoculadas. Esses autores concluíram que para formar 50% ou mais de nódulos o *Rhizobium* inoculado deve estar presente no solo a uma razão de 1000:1 em relação à população nativa.

JOHNSON et al (1965), obtiveram um aumento médio de 5 vezes na percentagem de nódulos formados por algumas das estirpes de soja estudadas quando aumentaram em 25 vezes a dosagem normal.

Tabela 7. Comparação entre os cultivares Carioca e ESALQ 506 para os parâmetros número e matéria seca de nódulos e atividade da nitrogenase.

Cultivar	Nódulos		Atividade da nitrogenase	
	nº/ planta	mg/ planta	nmol/ planta.h	nmol/g nódulo
ESALQ 506	8,22 b	8,0 b	1320,0 a	4,68 a
CARIOCA	12,84 a	12,0 a	1454,4 a	4,64 a

- Teste de Duncan a 5%.

- Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

Tabela 8. Comparação entre os cultivares Carioca e ESALQ 506 para os parâmetros produção, matéria seca da parte aérea e do sistema radicular e nitrogênio na planta.

Cultivar	Produção (kg/ha)	Mat.seca planta (g/planta)	Mat.seca raiz (g/planta)	N na planta (mg/planta)
ESALQ 506	1412 a	3,14 b	0,29 b	100 a
CARIOCA	1060 b	3,62 a	0,34 a	110 a

- Teste de Duncan a 5%.

- Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

Tabela 9. Comparação entre as diferentes concentrações de inóculo para os parâmetros número e matéria seca de nódulos e atividade da nitrogenase.

Dosagem de inóculo (g/kg semente)	Nódulos		Atividade da nitrogenase	
	nº/planta	mg/planta	nmol/planta.h	nmol/g nódulo
5	7,26 b	8,0 b	1176,98 a	95,33 a
10	11,06 a	9,0 b	1402,28 a	126,04 a
20	10,40 a	10,0 ab	1259,11 a	104,76 a
40	13,33 a	14,0 a	1773,58 a	96,53 a

- Teste de Duncan a 5%.

- Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

Tabela 10. Comparação entre as diferentes concentrações de inóculo para os parâmetros produção, matéria seca da parte aérea e do sistema radicular e nitrogênio na planta.

Dosagem de inóculo (g/kg semente)	Produção (kg/ha)	Mat.seca planta (g/planta)	Mat.seca raiz (g/planta)	N na planta (mg/planta)
5	1048 a	2,12 b	0,27 b	60 b
10	1348 a	3,76 a	0,35 a	120 a
20	1436 a	3,72 a	0,32 a	110 a
40	1104 a	3,31 ab	0,33 a	110 a

- Teste de Duncan a 5%.

- Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

Nesse experimento pôde-se observar que o aumento em 8 vezes da dosagem recomendada aos agricultores não representou diferença estatística significativa do aumento em 2 vezes a dosagem recomendada, para as condições do experimento. Isto significa que a dosagem de 40g de inoculante/Kg de semente além de ser mais onerosa e de difícil aplicação nas sementes, foi, desnecessária uma vez que com 10g de inoculante/Kg de semente, obteve-se as mesmas melhorias na nodulação e fixação do N_2 .

Cabe ainda ressaltar que o acompanhamento através do tempo do número de células no solo é um dado bastante importante pois pode-se observar que uma maior dosagem de inoculante em um primeiro cultivo venha influenciar outros cultivos posteriores através de uma maior persistência dessa estirpe no solo.

ROBERT & SCHMIDT (1983), confirmam a afirmação acima mencionada quando observaram em seu experimento que o inoculante introduzido em um cultivo de feijoeiro foi altamente competitivo e persistiu pelo menos durante 1 ano em solo sem cultura produzindo abundante nodulação das plantas hospedeiras no próximo cultivo.

Já LOVATO et al (1985), ao estudarem a flutuação populacional de estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, atribuíram uma maior e melhor nodulação e fixação de N_2 às condições do solo, especialmente da acidez do que à sobrevivência do *Rhizobium* na rizosfera da planta.

SOMASEGARAN et al (1988) citam que diferentes concentrações de inoculante não influenciaram a competição entre estirpes. Uma máxima fixação de nitrogênio nos dois tipos de solo analisados foi função das dosagens de inoculante, porém a competição entre estirpes de *Rhizobium*

em grão-de-bico foi influenciada pelo meio de cultura, genótipos do cultivar e diferenças de estirpes mas não por diferentes concentrações de inoculantes.

Esse resultado concorda com o resultado obtido no experimento em questão, uma vez que com o aumento na concentração do inoculante, obteve-se um aumento de nodulação e desenvolvimento da planta mesmo sem haver uma população nativa que pudesse competir com a estirpe introduzida.

KAPUSTA & ROUWENHORST (1973), não obtiveram incrementos na nodulação, na produção de grãos, no conteúdo de proteína e óleo das sementes com o aumento da concentração do inoculante. Apenas o crescimento vegetativo das plantas foi aumentado com uma maior dosagem de inoculante.

EXPERIMENTO 03: Comportamento da estirpe CIAT-899sc em vasos contendo solo com baixa população nativa de *Rhizobium*.

No teste do NMP para quantificação de *Rhizobium* no solo, obtivemos o valor de 32 células de *Rhizobium*/g de solo, o que é considerado uma baixa população nativa.

Pôde-se observar, de acordo com as Tabelas 11 e 12, que não houve diferença significativa entre os cultivares analisados para os parâmetros número e matéria seca de nódulos e atividade da nitrogenase. Observou-se ainda, que o cultivar Capixaba Precoce apresentou maior peso de matéria seca da parte aérea da planta enquanto o Carioca apresentou maior sistema radicular. Os cultivares utilizados neste experimento já haviam sido previamente selecionados como cultivares de boa resposta à inoculação.

VARGAS & GRAHAM (1989), encontraram diferença significativa entre cultivares na porcentagem de ocupação de nódulos pelas estirpes estudadas. A estirpe CIAT-899 considerada tolerante à acidez teve uma maior ocupação de nódulos no cultivar "Negro Argel" que a estirpe CIAT-632 (sensível à acidez) e a mesma porcentagem de nodulação para o cultivar "Preto 143".

OLALDE & PENA (1989), também obtiveram diferenças na capacidade de fixação de N_2 por isolados de alfafa resistentes a antibióticos em relação aos cultivares testados. Os autores obtiveram a maior eficiência na fixação com um ecotipo local e nenhuma resposta com cultivares exóticos de alfafa.

Não se obteve variação entre as fontes de nitrogênio para os parâmetros matéria seca da parte aérea e do sistema radicular. Nos parâmetros diretamente relacionados com a fixação biológica do N_2 como número e matéria seca de nódulos e atividade da nitrogenase, pôde-se observar que o nitrogênio adicionado através da uréia, agiu inibindo a formação dos nódulos e consequentemente a atividade da nitrogenase. Esses dados são apresentados nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 11. Comparação entre os cultivares Carioca e Capixaba Precoce para os parâmetros número e matéria seca de nódulos e atividade da nitrogenase.

Cultivar	Nódulos		Atividade da nitrogenase	
	no/ planta	g/ planta	nmol/ planta.h	nmol/g nódulo
CARIOCA	35,73 a	0,1597 a	7,15 a	11,47 a
CAPIXABA PRECOCE	25,23 a	0,2002 a	6,69 a	10,54 a

- Teste de Duncan a 5%.

- Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

Tabela 12. Comparação entre os cultivares Carioca e Capixaba Precoce para os parâmetros matéria seca da parte aérea e do sistema radicular da planta.

Cultivar	Matéria seca planta (g/planta)	Matéria seca raiz (g/planta)
CARIOCA	2,08 b	0,57 a
CAPIXABA PRECOCE	2,44 a	0,47 b

- Teste de Duncan a 5%.

- Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

Tabela 13. Comparação entre as fontes de nitrogênio para os parâmetros número e matéria seca de nódulos e atividade da nitrogenase.

Fontes de N	Nódulos		Atividade da nitrogenase	
	no/ planta	g/ planta	nmol/ planta.h	nmol/g nódulo
Inoculação CIAT-899	30,28 a	0,16 a	6,77 ab	10,61 a
Nitrogênio	-	-	-	-
Sem inoculação	30,68 a	0,20 a	7,61 a	11,39 a

- Teste de Duncan a 5%.

- Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

Tabela 14. Comparação entre as fontes de nitrogênio para os parâmetros matéria seca da parte aérea e do sistema radicular da planta.

Fontes de N	Matéria seca planta (g/planta)	Matéria seca raiz (g/planta)
Inoculação CIAT-899sc	2,21 a	0,53 a
Nitrogênio	2,17 a	0,46 a
Sem inoculação	2,41 a	0,56 a

- Teste de Duncan a 5%.

- Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

A inibição na formação dos nódulos pela aplicação de nitrogênio contrasta com resultados obtidos por ABAIDOO et al (1990) que não obtiveram efeito significativo na colonização rizosférica e na ocupação dos nódulos pelas estirpes testadas quando utilizaram N-mineral. Foi obtida, segundo os autores, uma redução no número e massa de nódulos, redução esta mais pronunciada no feijoeiro que na cultura da soja.

O parâmetro % de infecção foi analisado através do Teste de χ^2 (GOMES, 1987) com a observação dos resultados constantes da Tabela 15.

Tabela 15. Teste de χ^2 para cálculo da % de infecção de nódulos para estirpe inoculada.

Cultivar	Crescimento				
	CIAT/889sc		Nativa		
	Fo	Fe	Fo	Fe	
CARIOCA	71	(70,14)	63	(63,86)	134
CAPIXABA PRECOCE	74	(74,86)	69	(68,14)	143
	145		132		277

onde:

Fo = frequência observada

Fe = frequência esperada

χ^2 calculado = 0,04

χ^2 tabelado = 3,84

Como χ^2 calculado é menor que χ^2 tabelado, dizemos que a 5% de probabilidade, não há diferença significativa nos nódulos produzidos pela estirpe inoculada e

pela estirpe nativa, ou seja, pelo menos 50% dos nódulos foram infectados pela estirpe inoculada. Esse resultado confirmou a existência da resistência aos antibióticos dessa estirpe e a possibilidade da utilização desses mutantes para estudos ecológicos da fixação biológica do N_2 .

Como exemplo desses estudos citamos o trabalho de VOJINOVIC et al (1989) que trabalhando com inoculante misto de 3 estirpes de *Rhizobium meliloti* resistentes à estreptomicina e estirpes parentais eficientes na fixação de N_2 obtiveram diferenças na habilidade competitiva de acordo com a porcentagem de nódulos que eles formaram. Nesse estudo os cultivares de alfafa utilizados não influenciaram a capacidade competitiva dos mutantes de *Rhizobium meliloti*.

EXPERIMENTO 04: Obtenção de Mutantes resistentes a antibióticos para estudos ecológicos no solo.

Foram obtidos mutantes resistentes a antibióticos conforme mostra a Tabela 16.

Foram obtidos 76 mutantes posteriormente testados quanto à habilidade de indução e formação de nódulos. Na Tabela 17 estão apresentadas as estirpes e os mutantes que formaram nódulos. Os dados referentes às regiões A e F não foram incluídos pois poucas raízes possuíam nódulos nestas regiões.

Tabela 16. Resistência das Estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* a antibióticos:

Antibióticos						
Estirpes	Estreptomomicina	Espectinomomicina	Cloranfenicol	Rifampicina	Tetraciclina	Eritromicina
CM 03	+	+		+		
CM 04	+		+	+		
CM 05	+		+			
CM 06	+				+	
CM 10	+					+
CM 12	+	+				
CM 14	+	+				
CM 38	+			+		

- +: resistência ao antibiótico
- *: os mutantes obtidos dessa estirpe não formaram nódulos.
- A concentração de Estreptomomicina, espectinomomicina e rifampicina utilizada foi de 300 ppm.
- A concentração de Cloranfenicol, tetraciclina e eritromicina utilizada foi de 40 ppm.

A utilização de estirpes de *Rhizobium* geneticamente melhorados para resistência a antibióticos, além de possibilitar estudos ecológicos como a influência de fatores ambientais na competitividade e colonização do solo pelos *Rhizobium* por exemplo, tem um importante papel no sucesso do estabelecimento destes *Rhizobium* como inóculo no solo, uma vez que é comum encontrar-se uma flora microbiana no solo, principalmente actinomicetos, que ao excretar substâncias antibióticas podem afetar os rizóbios.

Tabela 17. Número de nódulos e distribuição no sistema radicular do cultivar de feijão Carioca em resposta à inoculação com estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* resistentes a antibióticos.

Estirpe	Regiões			
	B	C	D	E
	----- número de nódulos por raiz -----			
CM 03*	1,5	1,3	0,9	0,4
SP 64**	0,0	0,0	0,5	1,5
SP 65	0,3	2,1	5,7	0,2
SP 69	0,0	2,7	1,9	1,1
SP 70	2,0	1,6	1,5	1,3
SP 74	0,0	0,7	2,9	0,1
SP 75	0,0	2,1	1,0	1,7
CM 04	2,1	2,1	2,2	1,0
SP 37	1,6	2,7	0,9	0,3
SP 38	0,7	3,1	1,7	0,4
SP 39	0,8	1,9	5,0	1,3
SP 40	0,3	1,4	2,3	1,9
CM 05	1,4	1,0	3,2	0,1
SP 19	0,0	1,4	2,3	1,7
SP 21	1,5	0,3	0,5	0,5
SP 23	0,2	2,5	2,7	2,0
SP 24	0,1	3,7	0,4	0,0
SP 25	0,0	1,3	0,9	0,0
SP 26	1,1	1,3	1,0	0,0
SP 27	0,5	2,6	3,7	0,9
SP 28	0,0	0,0	0,0	0,8
CM 10	0,7	2,3	2,0	1,5
SP 29	0,9	0,4	1,9	2,8
SP 30	0,0	1,1	0,1	0,0
SP 31	1,6	1,9	0,9	0,3
SP 32	0,9	0,9	1,5	1,0

Continua...

Tabela 17. Continuação.

Estirpe	Regiões			
	B	C	D	E
	----- número de nódulos por raiz -----			
SP 33	0,0	0,6	2,6	0,3
SP 34	0,0	0,3	2,5	1,7
SP 35	0,0	0,3	2,3	0,4
SP 51	0,0	2,9	1,3	0,6
SP 53	1,0	1,5	2,3	0,9
SP 54	0,0	0,3	1,6	3,0
CM 14	1,1	1,5	1,1	0,0
SP 22	0,0	3,5	2,4	0,1
SP 41	1,3	1,0	1,3	0,9
SP 42	0,7	5,6	1,1	0,0
SP 43	0,7	2,0	2,4	1,4
SP 44	0,5	0,5	1,1	1,6
SP 45	0,7	0,7	1,5	2,8
CM 38	0,9	1,2	1,7	0,9
SP 55	1,2	1,9	2,4	1,5
SP 61	0,0	2,3	1,2	0,1

* As estirpes são as estirpes que deram origem aos mutantes.

** As estirpes SP são as estirpes mutantes obtidas.

Embora alguns autores cite a ausência de efeito de microrganismos produtores de antibióticos em *Rhizobium* (DAMIRGI & JOHNSON, 1966; KOSSLAK & BOHLOOL, 1985; HABTE & BARRION, 1984), SCOTTI et al (1982), determinaram que o fracasso da inoculação com algumas estirpes de *B. japonicum* e *Bradyrhizobium sp.*, em soja e estilosantes, respectivamente, estava relacionado com a tolerância destas estirpes a

antibióticos. Os autores observaram que as estirpes capazes de se estabelecerem e produzirem nódulos chegaram a ser tolerantes a níveis de 160 ppm para alguns antibióticos testados.

PEREIRA et al (1986), desenvolveram uma pesquisa com feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) visando a verificação da estabilidade mutagênica, a infectividade e a capacidade de fixar N_2 por parte dos mutantes espontâneos de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* resistentes a antibióticos. Perdas na capacidade infectiva ou fixadora de N_2 dos mutantes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* não estiveram relacionadas com o tipo de antibióticos e nem com as concentrações utilizadas. Os resultados confirmaram as proposições quanto à viabilidade de utilização de mutantes em estudos ecológicos de *Rhizobium* desde que estes mantenham suas características mutagênicas e não apresentem resistência cruzada aos antibióticos.

Um fator a ser considerado quando da obtenção de mutantes espontâneos resistentes a antibióticos é o tipo de antibiótico a ser utilizado.

SCHWINGHAMER (1964), encontrou 29 de 33 mutantes selecionados para tolerância a viomicina, ineficientes na fixação do N_2 .

FONSECA et al (1985), observaram a superioridade dos mutantes resistentes à estreptomicina em comparação aos resistentes à espectinomicina e novobiocina quando em turfa não esterilizada, mesmo sendo inoculados juntos e em concentrações dez vezes menores.

Durante a obtenção dos mutantes pôde-se observar uma maior dificuldade para se conferir resistência à tetraciclina e cloranfenicol em comparação com estreptomicina, espectinomicina, rifampicina e eritromicina. Este dado pode estar ligado ao fato de que a tetraciclina e o cloranfenicol atuam na síntese de proteína, enquanto a estreptomicina por exemplo interfere nos processos oxidativos (Ciclo de Krebs) da célula, o que parece ser vantajoso e menos ofensivo à célula como um todo.

COSTA (1985), cita que a resistência bacteriana a drogas pode ser cromossômica ou extra-cromossômica. A resistência cromossômica ainda se divide em resistência de "um só passo" ou da estreptomicina, onde a resistência a altas concentrações do agente inibidor é obtida através de mutação em um só gene, e portanto, uma vez esse gene alterado, confere resistência a altas concentrações da droga. Um segundo modelo de resistência cromossômica é chamado de "múltiplos passos" ou da penicilina. Nesse caso, a aquisição de resistência é gradual, pois vários genes estão envolvidos no processo, cada um conferindo baixa resistência, mas que em conjunto, propiciam como resultado alta resistência ao antibiótico. Na maioria dos casos, o modelo é característico para o antibiótico e não para a bactéria.

Ao se fazer estudos com estirpes usando a marcação com antibióticos como método para identificá-las, deve-se levar muitos fatores em consideração, entre eles o fato de que a maioria dos genes cromossômicos que conferem resistência a drogas, embora tenham vantagem seletiva em meio com a droga, são desvantajosos para as bactérias em meio desprovido da mesma. Bactérias resistentes têm um maior tempo de geração, quando comparadas com bactérias não resistentes. Assim, como cita COSTA (1985), uma mutação reversa, isto é, a volta de resistência a sensibilidade a um antibiótico, é

vantajosa para a bactéria em meio desprovido das drogas de modo que uma população resistente tende a voltar a ser sensível novamente.

Por isso, os mutantes obtidos foram guardados em tubos inclinados contendo meio YM + antibiótico.

Um outro problema que ocorre em estudos que utilizam marcação com antibióticos, é que muitos pesquisadores utilizam apenas uma marca, como por exemplo resistência a estreptomicina. Acontece que é comum encontrar estirpes de *Rhizobium* nativas no solo, possuindo pelo menos resistência a um antibiótico; dentro do nódulo, onde uma população de 10^{10} a 10^{11} células / g de nódulos pode ocorrer, não é difícil que as células possam sofrer a mutação para um único antibiótico. RUPELA et al (1982) dividiram 473 isolados de *Rhizobium* que nodula a ervilha, em vários grupos, baseado na tolerância a três níveis de 10 antibióticos diferentes. Eles foram capazes de separar os isolados em 119 grupos, demonstrando a heterogeneidade da população nativa de *Rhizobium* no solo. Recentemente tem sido sugerido que estes rizóbios marcados com antibióticos devem ser utilizados apenas em estudos ecológicos em condições controladas, já que esta tolerância pode ser transmitida para outras bactérias. Se ocorrer que os genes que conferem esta tolerância se incorporarem ao DNA de bactérias patogênicas, isto poderá trazer danos difíceis de serem estimados. A alternativa mais atualizada no momento pelos laboratórios de genética, é a obtenção de estirpes marcadas pela característica de utilizar determinados compostos (utilização de substratos).

NOVICK (1980), cita que a grande limitação normalmente encontrada quando se busca a mutação espontânea para resistência a antibióticos, na maioria dos

microrganismos é que pode ocorrer modificações indesejáveis na célula, como no caso do *Rhizobium*, a perda da infectividade, da eficiência simbiótica ou da capacidade competitiva, devendo-se dessa maneira testar os mutantes obtidos quanto a essas características.

Para se testar a habilidade de indução e formação de nódulos dos mutantes obtidos, fez-se um teste descrito por OLIVEIRA (1988) que conseguiu obter, além da habilidade de formação de nódulos, uma alta correlação entre competitividade de estirpes em vasos e distribuição de nódulos acima da marca feita nas raízes do feijoeiro com a vantagem de realização em curto espaço de tempo, necessidade de pouco espaço físico e de baixo custo.

As médias de nódulos obtidos pelas estirpes testadas no nosso experimento foram de 0,6; 1,59; 1,83 e 0,92 para as regiões de B a E, respectivamente. Esses valores, segundo o método, foram considerados baixos para a obtenção de correlações com a capacidade competitiva das estirpes. Esse baixo número de nódulos pode ser devido a uma baixa concentração de inoculação, baixa qualidade do inoculante ou inoculação tardia das sacolas, segundo cita OLIVEIRA (1988).

Através desses experimentos formou-se um banco de estirpes mutantes tendo como marca seletiva a resistência a antibióticos que poderão ser utilizados em estudos ecológicos para melhor otimização da fixação biológica do N_2 no feijoeiro.

5. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos podemos concluir que:

- As estirpes recomendadas para a inoculação do feijoeiro apresentaram boa resposta na fixação do nitrogênio atmosférico nas condições em que os experimentos foram conduzidos.

- A concentração de inoculante esteve diretamente relacionada à maximização da fixação biológica do N_2 e para o experimento realizado a dosagem recomendada ao agricultor (5g de inoculante/Kg de semente) foi subótima, sendo a dosagem de 10g/Kg de semente a que apresentou o melhor resultado.

- A obtenção de mutantes selecionados para resistência a antibióticos se constitui em uma boa ferramenta para o estudo ecológico das estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*.

- O teste utilizado para se fazer seleção para a habilidade de indução e formação de nódulos representa um método fácil, rápido e eficiente para um primeiro estudo de competitividade entre estirpes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAIDOO, R. C.; GEORGE, T.; BOHLOOL, B. B.; SINGLETON, P. W. Influence of elevation and applied nitrogen on rhizosphere colonization and competition for nodule occupancy by different rhizobial strains on field-grown soybean and common bean. *Canadian Journal Microbiology*, Ottawa, 36: 92-6, nov. 1989.
- ALMENDRAS, A. S. & BOTTOMLEY, P. J. Influence of lime and phosphate on nodulation of soil-grown *Trifolium subterraneum* L. by indigenous *Rhizobium trifolii*. *Applied Environmental Microbiology*, Baltimore, 53:2090- 7, 1987.
- AMARGER, N. Competition for nodule formation between effective and ineffective strains of *Rhizobium meliloti*. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, 13:475-80, 1981.
- AMARGER, N. Evaluation of competition in *Rhizobium spp.* In: KLUG, M. J. & REDDY, C. A., ed. Washington, American Society Microbiology, 1983. p. 300-5.
- AMES, P. & BERGMAN, K. Competitive advantage by bacterial motility in the formation of nodules by *Rhizobium meliloti*. *Journal Bacteriology*, Baltimore, 148: 728-9, 1981.

- ANOLLES, G. C. & FAVELUKES, G. Host-symbiont specificity expressed during early adsorption of *Rhizobium meliloti* to the root surface of alfalfa. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, 52: 377-82, 1986.
- AYANABA, A.; HAUGLAND, R. A.; SADOWSKY, M. J.; UPCHURCH, R. G.; WEILAND, K. D.; ZABLOTOWICZ, R. M. Rapid colored-nodule assay for assessing root-exudate-enhanced competitiveness of *Bradyrhizobium japonicum*. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, 52: 847-51, 1986.
- BERINGER, J.E. Genetic finger printing as a tool in research on biological nitrogen fixation. In: GRAHAM, P.H. & SUSAN, C.H. **Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture**. Cali, CIAT, 1981. 726p.
- BHUVANESWARI, T. V.; BHAGWAT, A. A.; BAUER, W. D. Transient susceptibility of root cells in four common legumes to nodulation by rhizobia. **Plant Physiology**, Rockville, 68: 1144-9, 1981.
- BHUVANESWARI, T.V.; TURGEON, B.G.; BAUER, W.D. Early events in the infection of soybean (*Glycine max* (L) Merr.) by *Rhizobium japonicum*. **Plant Physiology**, Washington, 66: 1027-31. 1980.
- BOHLOOL, B. B. Fluorescence methods for study of *Rhizobium* in culture and in situ. In: ELKAN, G. H. **Symbiotic Nitrogen Fixation Technology**, New York, Marcel Dekker, 1987. p. 127-55.
- BOHLOOL, B.B. & SCHMIDT, E.L. Persistence and competition aspects of *Rhizobium japonicum* observed in soil by immunofluorescence microscopy. **Soil Science Society of American Journal**, Madison, 73: 561-4, 1973.

- BREMMER, J. M. Total nitrogen. In: BLACK, C. A. et al, ed. **Methods of soil analysis; chemical and properties.** Wisconsin, American Society of Agronomy, 1965. p. 1149-78 (Agronomy, 9).
- BURTON, J.C.; ALLEN, O.N.; BERGER, K.C. Response of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to inoculation with mixtures of effective and ineffective rhizobia. **Proceedings of Soil Science Society of America**, Madison, 18:156-9, 1954.
- BROMFIELD, E. S. P. & JONES, D. G. The competitive ability and symbiotic effectiveness of doubly labelled antibiotic resistant mutants of *Rhizobium trifolii*. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, 91: 211-9, 1979.
- BROMFIELD, E. S. P. & KUMAR RAO, J. V. D. K. Studies on fast and slow-growing *Rhizobium* sp. nodulating *Cajanus cajan* and *Cicer arietinum*. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, 102: 485-93, 1983.
- CALDWELL, B.E. & VEST, G. Nodulation interactions between soybean genotypes and serogroups of *Rhizobium japonicum*. **Crop Science**, Madison, 8: 680-2, 1968.
- CHATEL, D.L. & PARKER, C.A. Survival of field-grown rhizobia over the dry summer period in western Australia. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, 5: 415- 23, 1973.
- CHOWDHURY, M.S. Effects of soil antagonistics on symbiosis; exploiting the legume-*Rhizobium* symbiosis in tropical agriculture. University of Hawaii, 1977. p.385-411. (Misc. Publ., 145).
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), 1977. Annual Report of the Bean Production Program, 85pp.

- COSTA, S.O.P. da. Aspectos genéticos e clínicos da resistência bacteriana a drogas. In: AZEVEDO, J.L. *Genética de Microrganismos em Biotecnologia e Engenharia Genética*. Piracicaba, FEALQ. 1985. 173p.
- DAMIRGI, S.M. & JOHNSON, H.W. Effect of soil actinomycetes on strains of *Rhizobium japonicum*. *Agronomy Journal*, Madison, 58: 223-4, 1966.
- DE ANTONI, G.; LOPARDO, H.; GRAU, O. Interference in culture among *Rhizobium* strains. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, 13: 409-15, 1981.
- DENARDIN, N. D'AVILA. Seleção de Estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* tolerantes a fatores de acidez e resistentes a antibióticos. Piracicaba, 1991. 89 p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz").
- DIATLOFF, A. The introduction of *Rhizobium japonicum* to soil by seed inoculation of non-host legumes and cereals. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, Melbourne, 9: 357-60, 1969.
- DIATLOFF, A. & BROCKWELL, J. Symbiotic properties of *Rhizobium japonicum* and competitive success in nodulation of two *Glycine max* cultivars by effective and ineffective strains. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, Melbourne, 6: 514-21, 1976.
- DUNIGAN, E. P.; BOLLOCK, P. K.; ZAUNBRECHER, F. C.; HICKS, P. M.; MORRISON, W. C. Soybean inoculation in Louisiana. *Louisiana Agricultural Experimental Station Bulletin*, 749, 1983.

- EAGLESHAM, A. R. J. The use of intrinsic antibiotic resistance for *Rhizobium* study. In: ELKAN, G. H. *Symbiotic Nitrogen Fixation Technology*. New York, Marcel Dekker, 1987. p. 185-204.
- FONSECA, S.M.; SAITO, S.M.T.; VIDOR, C. A vantagem dos mutantes resistentes à estreptomicina na competição e sobrevivência de *Rhizobium phaseoli* em turfa comercial. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 20(5): 609-14, maio, 1985.
- GAUR, Y. D. & LOWTHER, W. L. Competitiveness and persistence of introduced rhizobia on oversown clover: Influence of strain, inoculation rate and lime pelleting. *Soil Biology Biochemistry*, Oxford, 14: 99-102, 1982.
- GERMIDA, J. J. Growth of indigenous *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium meliloti* in soils amended with organic nutrients. *Applied Environmental Microbiology*, Baltimore, 54: 257-63, 1988.
- GOMES, F.P. Curso de Estatística Experimental. 12 ed. Piracicaba, Livraria Nobel S.A., 1987. 467p.
- GRAHAM, P. H. Problems of soybean inoculation in the tropics. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 3., Ames, 1985. *Proceedings*, edited by R. Shibles. Bouldel, Westview Press, 1985. p. 951-9.
- GRAHAM, P.H. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L. A review. *Field Crops Research*, Amsterdam, 4: 93-112, 1981.

- GRAHAM, P.H. & ROSAS, J.C. Growth and development of indeterminate and climbing cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. inoculated with *Rhizobium*. *Journal Agricultural Science, Cambridge*, **88**: 503-8, 1977.
- GRAHAM, P. H. & TEMPLE, S. R. Selection for improved nitrogen fixation in *Glycine max* (L.) Merr. and *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Soil*, The Hague, **82**: 315-27, 1984.
- HABISH, H.A. & ISHAG, H.N. Nodulation of legumes in the Sudan III. Response of Haricot bean to inoculation. *Experimental Agriculture, London*, **10**: 45-50, 1974.
- HABTE, M. & BARRION, M. Interaction of *Rhizobium* sp. with toxicin-producing fungus in culture medium and in a Tropical soil. *Applied Environmental Microbiology*, Baltimore, **47**: 1080-3, 1984.
- HAHN, M. & STUDER, D. Competitiveness of a nif-*Bradyrhizobium japonicum* mutant against the wild-type strain. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, **33**: 143-8, 1986.
- HAM, G.E. Interactions of *Glycine max* and *Rhizobium japonicum*. In: SUMMERFIELD, R.J.; BUNTING, A.H. *Advances in Legume Science*. England. University of Reading, Royal Botanic Gardens, 1978. p. 289-96.
- HARDARSON, G. & JONES, D. G. Effect of temperature on competition amongst strains of *Rhizobium trifolii* for nodulation of two white clover varieties. *Annals of Applied Biology, Cambridge*, **92**: 229-36, 1979.

- HARDY, R. W. F.; HOLSTEN, R. D.; JACKSON, E. K.; BURNS, R.C.
The acetylene-ethylene assay for N_2 -fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology*, Washington, **43**: 1185-207, 1968.
- HICKS, P. M. & LOYNACHAN, T. E. Phosphorus fertilization reduces Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and changes nodule occupancy of field-grown soybean. *Agronomy Journal*, Madison, **79**: 841-4, 1987.
- JOHNSON, H. W.; MEANS, U. M.; WEBER, C. R. Competition for nodule sites between strains of *Rhizobium japonicum* applied as inoculum and strains in the soil. *Agronomy Journal*, Madison, **57**: 179-85, 1965.
- JONES, D. G. & MORLEY, S. J. The effect of pH on host plant "preference" for strains of *Rhizobium trifolii* using fluorescent ELISA for strain identification. *Annals of Applied Biology*, Cambridge, **97**: 183-90, 1981.
- JOSEPHSON, K. L. & PEPPER, I. L. Competitiveness and Effectiveness of strains of *Rhizobium phaseoli* isolated from the sonoran desert. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, **16**(6): 651-5, 1984.
- KAMICKER, B. J. & BRILL, W. J. Identification of *Bradyrhizobium japonicum* nodule isolates from Wisconsin soybean farms. *Applied Environmental Microbiology*, Baltimore, **51**: 487-92, 1986.
- KAPUSTA, G. & ROUWENHORST, D.L. Influence of inoculum size on *Rhizobium japonicum* serogroups distribution frequency in soybean nodules. *Agronomy Journal*, Madison, **65**: 916-9, 1973.

- KISHINEVSKY, B. D. & JONES, D. G. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the detection and identification of *Rhizobium* strains. In: ELKAN, G. H. *Symbiotic Nitrogen Fixation Technology*. New York, Marcel Dekker, 1987. p. 158-84.
- KOSSLAK, R.M. & BOHLOOL, B.B. Influence of environmental factors on interstrain competition in *Rhizobium japonicum*. *Applied Environmental Microbiology*, Baltimore, 49(5): 1128-33, 1985.
- KVIEN, C. S. & HAM, G. E. Effect of soil temperature and inoculum rate on the recovery of three introduced strains of *Rhizobium japonicum*. *Agronomy Journal*, Madison, 77: 484-9, 1985.
- LOVATO, P. E.; PEREIRA, J. C.; VIDOR, C. Flutuação populacional de estirpes de *Rhizobium phaseoli* na rizosfera de feijão. *Revista Brasileira da Ciência do Solo*, Campinas, 9: 211-8, 1985.
- LOWENDORF, H.S.; BAYA, A.M.; ALEXANDER, M. Survival of *Rhizobium* in acid soil. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 42(6): 951-7, 1981.
- MAAGD, R. A.; van ROSSUM C.; LUGTENBERG, B. J. J. Recognition of individual strains of fast-growing rhizobia by using profiles of membrane proteins and lipopolysaccharides. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, 170: 3782-5, 1988.
- MADSEN, E.L. & ALEXANDER, M. Transport of *Rhizobium* and *Pseudomonas* through soil. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, 46: 557-60, 1982.

- MARSHALL, K.C. Competition between strains of *Rhizobium trifolii* in peat and broth culture. *Journal Australian Inst. Agriculture Science*, 22: 137-40, 1956.
- MARSHALL, K.C. Survival of root-nodule bacteria in dry soil exposed to high temperature. *Australian Journal of Agricultural Research*, Washington, 15: 273-81, 1964.
- MARTENSSON, A.M. Competitiveness of inoculant strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in red clover using repeated inoculation and increased inoculum levels. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 36: 136-9, 1990.
- MC FERSON, J. R. Genetic and Breeding Studies of Dinitrogen Fixation in Common Bean, *Phaseolus vulgaris*. Madison, 1983. 147 p. (PhD - University of Wisconsin).
- MC LOUGHLIN, T. J.; OWENS, P. A.; ALT, S. G. Competition studies with fast-growing *Rhizobium japonicum* strains. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 31: 220-3, 1985.
- MOAWAD, H. A.; ELLIS, W. R.; SCHMIDT, E. L. Rhizosphere response as a factor in competition among three serogroups of indigenous *Rhizobium japonicum* for nodulation of field-grown soybeans. *Applied Environmental Microbiology*, Baltimore, 47: 607-12, 1984.
- MUNNS, D.N.; FOX, R.L.; KOCH, B.L. Influence of lime on nitrogen fixation by tropical and temperate legumes. *Plant and Soil*, The Hague, 46: 591-601, 1977.

- NICOL, H. & THORNTON, H. G. Competition between related strains of nodule bacteria and its influence on infection of the legume host. *Proceedings of the Royal Society of London. Série B*, London, 130: 32-59, 1941.
- NOVICK, R.P. Plasmids. *Scientific American*, New York, 243(6): 103-27, 1980.
- OBATON, M. Utilization de mutants spontanés résistants aux antibiotiques pour l'étude écologique des *Rhizobium*. *Comptes Rendus Hebdomadaire des Séances de l'Académie des Sciences, Série D.*, Paris, 272: 2630-3, 1971.
- OLALDE-PORTUGAL, V. & PENA-CABRIALES, J.J. Native population of *Rhizobium meliloti* in Bajío, Mexico: I. Diversity, dominance and effectivity. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, Espanha, 31(4): 279-84, 1989.
- OLIVEIRA, L. A. Competitive ability of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains. Minnesota, 1988. 125 p. (PhD - University of Minnesota).
- OLIVEIRA, L. A. & VIDOR, C. Colonization, survival and competitiveness for nodule sites among *Rhizobium japonicum* strains. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, 8: 57-62, 1984.
- PEREIRA, J.C.; LOVATO, P.E.; VIDOR, C. Resistência a antibióticos e fungicidas associada com a capacidade simbiótica de estirpes de *Rhizobium phaseoli*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 21(4): 383-92, abril 1986.

- POSTGATE, J. R. Viable counts and viability. In: NORRIS & ROBINS, ed. *Methods in Microbiology*. New York, Academic Press. 1969. p. 611-28.
- RENNIE, R. J. & DUBETZ, S. Multistrain vs. single strain *Rhizobium japonicum* inoculants for early maturing (00 and 000) soybean cultivars: N_2 fixation quantified by ^{15}N isotope dilution. *Agronomy Journal*, Madison, 76: 498-502, 1984.
- RENNIE, R. J. & KEMP, G. A. N_2 -Fixation in field beans quantified by ^{15}N isotope dilution. I. Effect of strains of *Rhizobium phaseoli*. *Agronomy Journal*, Madison, 75: 640-9, 1983.
- ROBERT, F. M. & SCHMIDT, E. L. Population changes and persistence of *Rhizobium phaseoli* in soil and rhizospheres. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 45(2): 550-6, feb. 1983.
- ROBINSON, A. C. Competition between effective and ineffective strains of *Rhizobium trifolii* in the nodulation of *Trifolium subterraneum*. *Australian Journal of Agricultural Research*, Washington, 20: 827-41, 1969.
- ROSAS, J. C. Partitioning of dry matter, nitrogen fixation and seed yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) influenced by plant genotype and nitrogen fertilization. Madison, 1983. 127 p. (PhD - University of Wisconsin).
- ROSAS, J. C. & BLISS, F. A. Mejoramiento de la capacidad de Fijación de Nitrógeno del Frijol Común. *CEIBA*, Tegucigalpa, 27: 95-104, 1986.

- RUSCHEL, A.P.; SAITO, S.M.T.; TULMANN NETO, A. Eficiência da Inoculação de *Rhizobium* em *Phaseolus vulgaris* L. I. Efeito de Fontes de Nitrogênio e cultivares. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, 3: 13-7, 1979.
- RUSCHEL, A. P.; VOSE, P. B.; MATSUI E.; VICTORIA, R. L.; SAITO, S. M. T. Field evaluation of N_2 -fixation and N-utilization by *Phaseolus* bean varieties determined by ^{15}N isotope dilution. *Plant and Soil*, The Hague, 65: 397-407, 1982.
- SAITO, S. M. T.; MARTINS, E. C. S.; FREITAS, J. R.; ROSTON, A. J. Natural occurrence of mycorrhiza and *Rhizobium phaseoli* in areas under beans cultivation. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 18: 855-61, 1983.
- SCHMIDT, E. L.; BANKOLE, R. O.; BOHLOOL, B. B.; Fluorescent antibody approach to study of rhizobia in soil. *Journal Bacteriology*, Baltimore, 95: 1987-92, 1968.
- SCHWINGHAMER, E.A. Association between antibiotic resistance and ineffectiveness in mutant strains of *Rhizobium spp.* *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 10: 221-33, 1964.
- SCOTTI, M.R.M.L.; SÁ, N.M.H.; VARGAS, M.A.T.; DOBEREINER, J. Susceptibility of *Rhizobium* strains to antibiotics; a possible reason for legume failure in Cerrado soil. In: GRAHAM, P.H. & HARIP, S.C., eds. *Biological Nitrogen Fixation*. s.l., 1982. 768p.
- SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J.; GURGUN, V. Effects of inoculation rate, rhizobial strain competition and nitrogen fixation in chickpea. *Agronomy Journal*, Madison, 80: 68-73, 1988.

- VARGAS, A. A. T. & GRAHAM, P. H. Cultivar and pH effects on competition for nodule sites between isolates of *Rhizobium* in beans. *Plant and Soil*, The Hague, 117: 195-200, 1989.
- VARGAS, A. A. T. & GRAHAM, P. H. *Phaseolus vulgaris* cultivar and *Rhizobium* strain variation in acid-pH tolerance and nodulation under acid conditions. *Field Crops Research*, Amsterdam, 19: 91-101, 1988.
- VARGAS, M. A. T. & SUHET, A. R. Efeito de tipos e níveis de inoculantes na soja cultivada em um solo de cerrado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 15(3): 343- 7, jul. 1980.
- VIDOR, C. & MILLER, R.H. Relative saprophytic competence of *Rhizobium japonicum* strains in soils as determined by the quantitative fluorescent antibody technique (F.A.). *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, 12: 483-7, 1980.
- VINCENT, J.M. A manual for the practical study of root-nodules bacteria. *Internacional Biological Program Handbook*, 15, Oxford, Blackwell, 1970. 164p.
- VOJINOVIC, Z.; MILICIC, B.; RADIN, D.; KUZMANOVIC, D. Competitive ability of streptomycin resistant mutants of *Rhizobium meliloti* in triple inoculums with two active parental strains of five alfalfa cultivars. *Mikrobiologiya*, Belgrado, 26(2): 107-16, 1989.
- VOSS, M.; FREIRE, J. R. J.; SELBACH, P. A. Efeito de níveis de calcário no solo e na capacidade de competição de estirpes de *Rhizobium phaseoli* por sítios de nodulação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 19: 433-9, 1984.

- WEAVER, R. W. & FREDERICK, L. R. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* L. Merrill. II. Field studies. *Agronomy Journal*, Madison, 66: 233-6, 1974.
- WESTERMANN, D. T.; KLEINKOPF, G. E.; PORTER, L. K.; LEGGETT, G. E. Nitrogen Sources for Bean Seed Production. *Agronomy Journal*, Madison, 73: 660-4, 1981.
- WINARMO, R. & LIE, T. A. Competition between *Rhizobium* strains in nodule formation: Interaction between nodulating and non-nodulating strains. *Plant and Soil*, Dordrecht, 51: 135-42, 1979.

APÊNDICE

Meio de Cultura - Extrato de Levedura e Manitol (YM):

Manitol -----	10g
K ₂ HPO ₄ (Sol. 5%) -----	10ml
MgSO ₄ .7H ₂ O (Sol. 2%) -----	10ml
NaCl (Sol. 1%) -----	10ml
CaCl ₂ (Sol. 2%) -----	10ml*
FeCl ₃ (Sol. 0,1%) -----	10ml*
Extrato de levedura -----	0,4g**
Água destilada -----	1000ml
Ágar -----	12g***
pH -----	6,8

* O meio original sugerido por JORDAN (1984) utiliza 4,0 g/l de CaCO₃, e não possui FeCl₃ na sua formulação.

** Opcional: utilizar 100ml de extrato de levedura, preparado no laboratório: misturar 100g de extrato de levedura (utilizado em padaria) em 1l de água. Deixar estabilizar por 2h, seguindo-se de fervura por 40-60 minutos. Após o resfriamento, separe a solução, armazenando no congelador em frascos de 100ml.

*** Não adicionar o ágar se o meio for líquido.

Solução Nutritiva de Mc Knight:**Solução Estoque D:**

FeCl ₃ (Sol. 4g FeCl ₃ /l)	16,80ml
EDTA Na.2H ₂ O	2,00g
Água destilada, deionizada	1.000,00ml

Solução Estoque A-Z:

H ₃ BO ₃	2,86g
MnSO ₄ .4H ₂ O	2,03g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08g
H ₂ MoO ₄ .4H ₂ O	0,09g
Água destilada, deionizada	1.000,00ml

Solução Completa:

CaSO ₄ .2H ₂ O	37,93g
MgSO ₄ .7H ₂ O	5,00g
KH ₂ PO ₄	4,00g
KCl	7,50g
Solução A-Z	25,00ml
Solução D	25,00ml
NaOH 1N	17,50ml
Água destilada, deionizada	1.175,00ml
Diluir em 20l de água destilada, deionizada.	

Solução de Antibióticos:**Solução Estoque:**

20.000 ppm = 20g/l

Dessa solução estoque fazia-se as diluições até obter-se a concentração desejada.

À exceção da estreptomicina e da tetraciclina (diluídas em água) que foram utilizadas puras, os antibióticos utilizados foram de uso humano com os seguintes nomes comerciais e solventes:

- Espectinomicina: Trobicin - água
- Cloranfenicol: Quemicetina - etanol 90%
- Eritromicina: Ilosone - etanol 90%
- Rifampicina: Rifaldin - metanol 95%

Figura 1. Esquema das sacolas de germinação utilizadas no teste de infecção e indução da nodulação pelos mutantes de *Rhizobium* obtidos.