

MARIA DE FATIMA ALVES
ENGENHEIRA-AGRÔNOMA

MUTANTES DE *Rhizobium japonicum* (KIRCHNER)
BUCHANAN, RESISTENTES A ESTREPTOMICINA E SUA
INFECCIOSIDADE

Orientador : PROF. DR. JOÃO LUCIO DE AZEVEDO

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Uni-
versidade de São Paulo, para obtenção do
título de Mestre.

PIRACICABA
ESTADO DE SÃO PAULO
- 1975 -

A minha família

e

aos Professores

J.L. de Azevedo

J. Dobereiner

V.F. Libonati

minha homenagem

A G R A D E C I M E N T O S

Externamos nossos agradecimentos a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho, principalmente às seguintes pessoas e entidades:

- Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, pela orientação.
- Eng^ã Agr^ã Alaídes Puppim Ruschell.
- Eng^o Agr^o Manoel Albino Coelho de Miranda.
- Técnicos do Laboratório de Genética de Microrganismos da ESALQ, em especial o Sr. Antonio Rocha Campos.
- Sr. Alaor de Oliveira.
- Funcionários das Bibliotecas do Departamento de Genética, do Instituto Zimotécnico e Central da ESALQ.
- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ.
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES.
- Faculdade de Ciências Agrárias do Pará - FCAP.
- Ex - Instituto de Pesquisas Agropecuárias do Norte - IPEAN (M.A.).

ÍNDICE

	<u>página</u>
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2.1. Estudos taxonômicos do gênero <i>Rhizobium</i> envolvendo caracteres genéticos não simbióticos	04
2.2. Mutantes no gênero <i>Rhizobium</i>	06
2.2.1. Mutantes resistentes a antibióticos	06
2.2.2. Mutantes resistentes a fagos	08
2.2.3. Outros tipos de mutantes	09
2.2.4. Uso de marcas de resistência para estudos ecológicos do <i>Rhizobium</i>	12
2.3. Sistemas de recombinação em <i>Rhizobium</i>	13
2.3.1. Conjugação	13
2.3.2. Transdução	14
2.3.3. Transformação	15
2.4. Genética da <i>Leguminosae</i> referente ao fenótipo <i>Nif</i>	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Material	22
3.1.1. Bactéria	22
3.1.2. Meios de cultura	22
3.1.3. Antibiótico	23
3.1.4. Planta hospedeira, substrato, solução nutritiva e inoculantes	23
3.2. Métodos	25
3.2.1. Determinação da curva de sobrevivência à estreptomicina e isolamento de mutantes	25
3.2.2. Curvas de crescimento	26
3.2.3. Taxas de crescimento	26
3.2.4. Crescimento da linhagem original em competição com o crescimento do mutante <i>Str-r</i> 120	27
3.2.5. Determinação da força da estreptomicina através da mistura da linhagem original com o mutante <i>Str-r</i> 120	27
3.2.6. Experimento em casa de vegetação	28

4. RESULTADOS	34
4.1. Resultados dos ensaios	34
4.1.1. Determinação da curva de sobrevivência e obtenção de mutantes resistentes à estreptomicina	34
4.1.2. Curvas de crescimento	40
4.1.3. Determinação das taxas de crescimento das linhagens original e dos mutantes	45
4.1.4. Determinação do crescimento da linhagem original em relação ao mutante <i>Str-r</i> 120, através de mistu- ras de linhagens	45
4.1.5. Determinação da força da estreptomicina através da mistura da linhagem original com a linhagem mutan- te <i>Str-r</i> 120	46
4.2. Resultados obtidos à partir do experimento em casa de ve- getação	49
4.2.1. Determinação do nitrogênio total na planta, número e peso seco de nódulos	49
4.2.2. Eficiência relativa da linhagem original determina- da através do peso seco das plantas	51
4.2.3. Avaliação das fontes de nitrogênio nas plantas	51
4.2.4. Atividade da nitrogenase	52
4.2.5. Reisolamento após passagem no hospedeiro	52
5. DISCUSSÃO	54
5.1. Curva de sobrevivência a estreptomicina	54
5.2. Curvas de crescimento e taxas de crescimento das linhagens original e mutantes	56
5.3. Força do antibiótico	58
5.4. Infecciosidade das linhagens normal e mutantes	60
6. RESUMO E CONCLUSÕES	65
7. SUMMARY AND CONCLUSIONS - RESISTANCE TO STREPTOMYCIN IN <i>Rhizobium japonicum</i> (KIRCHNER) BUCHANAN	67
8. BIBLIOGRAFIA CITADA	69

ÍNDICE DE TABELAS

<u>Tabela</u>		<u>Página</u>
1	Porcentagem de sobreviventes à estreptomicina. <i>Rhizobium japonicum</i> CB-1809 (média de seis repetições)	35
2	Mutantes resistentes à estreptomicina cultivados em meio YMA com diferentes concentrações de estreptomicina, comparação com a linhagem original	39
3	Número médio de células viáveis por ml da linhagem original em diferentes tempos de cultivo	40
4	Número médio de células viáveis por ml da linhagem mutante <i>Str-r</i> 64 I em diferentes tempos de cultivo	41
5	Número médio de células viáveis por ml da linhagem mutante <i>Str-r</i> 120 em diferentes tempos de cultivo	42
6	Número médio de células viáveis por ml da linhagem mutante <i>Str-r</i> 128 IV, em diferentes tempos de cultivo	43
7	Taxas de crescimento da linhagem original e dos mutantes .	45
8	Efeito do período de incubação em meio YMB sobre a porcentagem de linhagens original e estreptomicina resistente <i>Str-r</i> 120, de <i>Rhizobium japonicum</i> em mistura. (Resultado de 3 repetições)	46
9	Quantidade relativa de linhagens, estreptomicina resistente e original, de <i>Rhizobium japonicum</i> , quando cultivadas em mistura	47

<u>Tabela</u>		<u>Página</u>
10	Resultados obtidos a partir do experimento em casa de vegetação. (Médias de 4 repetições de 3 plantas por vaso)..	50
11	Fontes de nitrogênio nas plantas	51
12	Atividade da nitrogenase em nódulos de soja inoculada com <i>Rhizobium japonicum</i> . (Média de 4 repetições)	53

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
1	Curva de sobrevivência à estreptomicina <i>Rhizobium japonicum</i> CB-1809. (Média de 6 repetições)	36
2	Comparação do crescimento da linhagem original com o mutante <i>Str-r</i> 64 I em meio com estreptomicina	37
3	Comparação do crescimento da linhagem original com o mutante <i>Str-r</i> 120, em meio com estreptomicina	37
4	Comparação do crescimento da linhagem original com o mutante <i>Str-r</i> 128 IV, em meio com estreptomicina	38
5	Curvas de crescimento de <i>Rhizobium japonicum</i> CB-1809; <i>Rhizobium japonicum</i> CB-1809 <i>Str-r</i> 64 I; <i>Str-r</i> 120 e <i>Str-r</i> 128.	44
6	<i>M_{Vr}</i> da linhagem CB-1809 <i>Str-r</i> 120 em relação a linhagem original CB-1809 de <i>Rhizobium japonicum</i>	48
7	Aspecto do experimento em casa de vegetação. Da esquerda para a direita: plantas adubadas com nitrogênio, plantas inoculadas com <i>Rhizobium japonicum</i> CB-1809, e plantas inoculadas com um dos mutantes estreptomicina resistente (<i>Str-r</i>)	49

1. INTRODUÇÃO

O fenômeno da simbiose entre *Leguminosae* e bactérias do gênero *Rhizobium*, resultando na fixação do nitrogênio atmosférico é fato bem estudado e comprovado. O conhecimento da fisiologia da nodulação (NUTMAN, 1971a e b) e da bioquímica da fixação (BERGERSEN, 1971) tem evoluído consideravelmente nos últimos anos; no entanto menor ênfase tem sido dada a estudos genéticos da fixação do nitrogênio. A fixação do nitrogênio é resultado da expressão fenotípica de dois genótipos associados. Um método para análise genética do processo de desenvolvimento de nódulos fixadores de nitrogênio consiste na introdução no sistema genético, de elementos diferenciais, ou seja, mutações gênicas. Dentre os mutantes utilizados salientam-se os resistentes a agentes inibidores tais como antibióticos que são facilmente obtidos em linhagens bacterianas.

A maioria dos trabalhos objetivando o estudo genético no gênero,

tem-se prendido mais à espécie de *Rhizobium* que não o *Rhizobium japonicum*, simbionte quase que exclusivamente específico de soja (*Glycine max* (L.) Merril), leguminosa de grande expressão na economia brasileira. Assim, o presente trabalho foi conduzido com a finalidade de se obter mutantes de *Rhizobium japonicum* (Kirchner) Buchanan, resistentes ao antibiótico estreptomicina e estudar alguns aspectos de seu comportamento tanto *in vitro* como *in vivo*, face a estirpe sensível original.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A simbiose *Rhizobium - Leguminosae* para a fixação do nitrogênio atmosférico é estabelecida através de várias fases desde a infecção inicial até a fixação do nitrogênio, passando pelas fases de indução de nódulos, invasão do tecido nodular e formação de bacteróides (NUTMAN, 1971a e b).

Todas essas fases estão sujeitas a modificações de ordem ambiental e de ordem genética. De ordem genética, dois genótipos estão associados, o da bactéria e o da planta hospedeira, e ambos devem ser levados em consideração. Revisão geral sobre o gênero *Rhizobium* é apresentada por DIXON (1969) e uma revisão sobre a genética do gênero *Rhizobium* entre os fixadores de nitrogênio atmosférico é encontrada em BRILL (1974). Assim, a presente revisão vai se deter em quatro itens principais. No primeiro serão abordados os estudos taxonômicos do gênero *Rhizobium* principalmente envolvendo a espécie *R. japonicum*, com relação a caracteres

genéticos, não simbióticos, em especial com referência à composição de bases nitrogenadas do ácido desoxiribonucléico. No segundo item serão revistos os trabalhos realizados com mutantes no gênero *Rhizobium*, especial atenção sendo dada a estudos com mutantes resistentes aos antibióticos e o seu uso para estudos ecológicos. No terceiro item, apresentam-se os trabalhos que evidenciam sistemas genéticos de recombinação no gênero *Rhizobium* e finalmente no quarto item, alguns aspectos da Genética de *Leguminosae* com relação ao genótipo *nif* (fixação de nitrogênio).

2.1. Estudos taxonômicos no gênero *Rhizobium* envolvendo caracteres genéticos não simbióticos

Um trabalho pioneiro visando correlacionar a composição de bases nitrogenadas no DNA de *Rhizobium* e tipo de flagelação foi feito por DELEY & RASSEL (1965). Os autores observaram que as espécies peritríquias tem um crescimento rápido e apresentam porcentagem de guanina + citosina (G + C) que se situa em torno de 58,6 a 63,1%. Sugeriram então que esse grupo fosse constituído por dois subgrupos: *Rhizobium leguminosarum* e *Rhizobium meliloti*. As espécies com flagelação sub-polar apresentavam crescimento lento e seu conteúdo de (G + C) situava-se entre 62,8 a 65,5%, compreendendo *Rhizobium lupini*, *R. japonicum* e *R. "cow-pea"* que os autores propõem que sejam agrupadas em uma única espécie, a *R. japonicum*.

Experimentos de hibridização entre DNA de linhagens de *Agrobacterium*, *Rhizobium* e *Chromobacterium* utilizando DNA de *Agrobacterium tumefaciens* e *R. leguminosarum* como padrão, foram realizados. Por este critério, *R. japonicum*, *R. meliloti* e *R. leguminosarum* são suficientemente distintos justificando a classificação de espécies. *Agrobacterium rhizogenes* apresentou uma maior porcentagem de homologia de DNA com o DNA de *Rhizobium leguminosarum* que com o de *A. tumefaciens* (65% e 52%, respectivamente). A porcentagem de G + C em *R. japonicum* foi igual a 64,4% (HEBERLEIN, DE LEY & TIJTAGAT, 1967).

ELKAN (1969) determinou a composição de bases do DNA de 25 estirpes de *Rhizobium japonicum* encontrando uma variação de 61,47% a 64,09% com diferenças estatísticas significantes. Os isolados eram nutricionalmente variados mas não houve correlação entre eficiência e composição de

base, embora os isolados tenham nodulado *Glycine max* com eficiência variada.

BUNN & ELKAN (1971) encontraram altas taxas de fosfatidilcolina em *Rhizobium japonicum* sugerindo uma relação taxonômica com *Agrobacterium* e com *Pseudomonadales*.

ELKAN (1971) confirmou as propriedades apresentadas no Manual de *BERGEY* que distinguem *Rhizobium japonicum* das outras cinco espécies de *Rhizobium*. Além disso, também foi estudado o grau de relacionamento entre *Rhizobium japonicum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium meliloti* e *R. phaseoli*, e entre estirpes de *Rhizobium japonicum*, através de resistência a antibióticos, reações imunológicas e homologia de DNA. As estirpes de *R. japonicum* foram, em geral, mais resistentes a eritromicina, polimixina B e cloranfenicol e sensíveis a novobiocina. Estas respostas divergiram das espécies controles. Os dados serológicos e os estudos de homologia de DNA mostraram que *R. japonicum* é uma espécie heterogênea, embora os dados serológicos não tenham sido correlacionados com os de homologia de DNA. Características metabólicas como a presença de altas taxas de fosfatidilcolina e catabolismo de glicose e de gluconato por uma única via, a de Entner-Doudoroff (ED) sugerem um relacionamento genético estreito entre *R. japonicum* e *Pseudomonadales*.

WHITE (1972) estudou *Agrobacterium*, *Rhizobium* e outros organismos para suas habilidades de utilizar 61 compostos como única fonte de carbono, metabolismo oxidativo ou fermentativo da glucose, hidrólise do amido, caseína e gelatina, metabolismo anaeróbico da arginina e produção de 3-cetolactose. Os testes confirmaram que há menos similaridade entre *Rhizobium* de crescimento lento e *Rhizobium* de crescimento rápido do que entre estes últimos e *Agrobacterium*.

GIBBINS & GREGORY (1972) desenvolveram estudos de hibridização entre DNA de *Rhizobium* e entre DNA de *Rhizobium* e de *Agrobacterium* por três métodos diferentes. Concluíram que a habilidade de nodular uma determinada planta hospedeira, embora possa não envolver uma grande porção do genoma do *Rhizobium*, permite que a planta de origem sirva como uma indicadora útil ao relacionamento de estirpes. Apenas as espécies de *R. leguminosarum* e *R. trifolii* não puderam ser separadas. *R. phaseoli* agrupou-se mais próximo ao *R. meliloti* e *R. lupini* mais próximo ao *R. japo-*

nicum, mas não justificariam uma fusão pois são espécies claramente distintas. *Agrobacterium tumefaciens* guardou uma relação de homologia de DNA com *R. meliloti* e com *R. lupini*.

2.2. Mutantes no gênero *Rhizobium*

2.2.1. Mutantes resistentes a antibióticos

SCHWINGHAMER & DALMAS (1961) trabalharam com estirpes de *Rhizobium leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. phaseoli* e *R. trifolii*, determinando a relação entre sobrevivência e doses de irradiação luz Ultra Violeta (UV) ou Raios-X, usando culturas em fim da fase log. Apenas *R. leguminosarum* apresentou relação linear de sobrevivência e doses de Raios-X. Houve maior divergência entre estirpes em relação à luz U.V. (400 a 3 000 ergs/mm²) do que ao Raio-X (3 a 7,5 kr). Procuraram distribuir as espécies de *Rhizobium* por suas respostas a 31 antibióticos testados. Somente *R. meliloti* comportou-se como um grupo à parte. Mutantes resistentes, espontâneos ou induzidos, foram isolados e não foram notadas alterações na infecciosidade nem na eficiência de mutantes resistentes à dihidroestreptomicina e resistentes à eritromicina.

GUPTA & KLECZKOWSKA (1962) obtiveram mutantes resistentes à bacteriófagos e mutantes resistentes à estreptomicina, de uma estirpe de *Rhizobium trifolii* sensível a fago e ao antibiótico. Não houve resistência cruzada e houve maior porcentagem de perda da eficiência entre os fagos-resistentes que entre os resistentes ao antibiótico.

SCHWINGHAMER (1964) mostrou que perda de eficiência esteve associada à mutação para resistência a viomicina e a neomicina, em estirpes de *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium trifolii* e *R. meliloti* e as características não reverteram após passagem pelo hospedeiro. Perda de eficiência ocorreu menos frequentemente em mutantes resistentes a canamicina e polimixina e não houve perda de eficiência em estreptomicina-resistentes.

SCHWINGHAMER (1967-a) determinou os padrões de resistência a quinze antibióticos, de estirpes de *Rhizobium leguminosarum*, *R. meliloti*,

R. trifolii e *R. phaseoli*. Obteve mutantes resistentes e verificou que resistência à estreptomicina, cloranfenicol ou grupo de tetraciclina causaram pouca ou nenhuma modificação na eficiência. Resistência à novobiocina, bacitracina ou penicilina foi acompanhada de perda total ou parcial de eficiência. Perda total foi mais frequente em resistentes à viomicina (*Vio-r*) e em resistentes à neomicina (*Neo-r*). Alteração na parede celular causadas por alguns antibióticos poderia ser a responsável pelo decréscimo ou perda da eficiência.

DAMERY & ALEXANDER (1969) isolaram mutantes resistentes à canamicina (*Kan-r*) de *Rhizobium meliloti*, *R. trifolii* e *R. "lotus"*, resistentes à viomicina (*Vio-r*) de *R. meliloti* e de *R. trifolii* e resistentes à neomicina (*Neo-r*) de *R. trifolii*. Todas as marcas alteraram a capacidade de fixação, sendo que *Kan-r* influenciou mais que as outras. Foi verificado que os mutantes produziram mais polissacarídeos que as estirpes originais.

HENDRY & JORDAN (1969) observaram que resistência à viomicina adquirida em "um só passo" e em "múltiplos passos" por uma estirpe eficiente de *Rhizobium meliloti* resultou na ineficiência em fixar nitrogênio.

YU & JORDAN (1971) encontraram maior concentração de cálcio no envelope de mutantes resistentes à viomicina (*Vio-r*) de *Rhizobium meliloti* que no envelope da estirpe original sensível (*Vio-s*). A capacidade de troca de cátions nas células sensíveis foi quase duas vezes maior que nas resistentes, demonstrando que o excesso de cálcio nas células resistentes não é disponível para troca com cátions externos. Resistência à viomicina parece ser devida ao resultado de um decréscimo no número de sítios carregados negativamente e associação com estes sítios, por meio de pontes de Ca^{2+} , de fosfolipídeos capazes de complexar com a droga.

ZELAZNA-KOWALSKA (1971) obteve mutantes de *Rhizobium trifolii* resistentes à estreptomicina, tendo observado que existe diferença de nível de resistência entre as estirpes da mesma espécie; enquanto uma estirpe apresentava resistência a apenas 10 mcg/ml as demais estirpes atingiam resistência a 500 mcg/ml e 1000 mcg/ml. Ensaíados para eficiência, foi verificado que todos os mutantes de uma estirpe (estirpe 24) foram não nodulantes. Nos demais mutantes, resistência acima de 100 mcg/ml causou perda de eficiência.

Mutação para resistência à viomicina em *Rhizobium meliloti* resultou em um acúmulo de fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina na parede celular. Quando o excesso de lipídeo foi removido por EDTA a resistência decresceu. O mecanismo de resistência à viomicina seria uma imobilização do antibiótico nas camadas superficiais da célula como resultado de combinação com fosfolipídeos ligados por pontes de Ca^{2+} . Os mutantes *Vio-r* foram ineficientes em fixar nitrogênio, sendo possível que modificações na parede celular da célula, de algum modo, contribuem para o estado de ineficiência (MACKENZIE & JORDAN, 1972).

ABDEL-WAHAB, RIFAAT & HAMDI (1973) registraram que mutantes de *Rhizobium trifolii* resistentes a baixos níveis de estreptomicina em "um só passo" (5 a 20 mcg/ml), foram similares a estirpe normal em eficiência na fixação de nitrogênio. Resistentes a 50 mcg/ml de estreptomicina foram mais eficientes. Isolados em "múltiplos passos" atingiram resistência de 100 a 400 mcg/ml de estreptomicina e houve correlação positiva entre resistência e eficiência até este limite. Resistentes a 10 - 15 mcg/ml de cloranfenicol não mostraram efeito na fixação de nitrogênio e resistentes a 20 mcg/ml de cloranfenicol não foram eficientes.

BERTALMIÓ (1973) isolou mutantes rifampicina-resistentes, de *Rhizobium trifolii*. Alguns foram tão eficientes em fixar nitrogênio quanto a estirpe selvagem, outros não fixaram. O nível de resistência em ambos foi similar.

2.2.2. Mutantes resistentes a fagos

KLECZKOWSKA (1950) obteve mutantes fago-resistentes de *Rhizobium trifolii* e verificou que esta mutação ocorre independente das alterações morfológicas das colônias e das alterações na capacidade de fixar nitrogênio. O fato de que mutantes não infectivos foram obtidos de apenas uma das quatro estirpes ensaiadas sugere que a tendência a formar tais mutantes varia de uma estirpe para outra. Quanto a eficiência, também houve variação entre estirpes pois algumas deram os mesmos resultados e outras deram resultados diferentes, sobre diferentes plantas testes. É possível que os fagos possam aumentar a proporção de estirpes ineficientes no solo, pois foi observado que mutantes fago-resistentes ineficien-

tes desenvolvem mais rapidamente que estirpes eficientes.

GUPTA & KLECZKOWSKA (1962) observaram que mutantes fago-resistentes de *Rhizobium trifolii* perdiam mais frequentemente a eficiência em fixar nitrogênio que mutantes estreptomicina-resistentes.

Resistência a fagos, mostrada por mutantes de uma estirpe sensível de *Rhizobium trifolii* é provável de se verificar por alterações na estrutura de polímeros na parede celular. Resistência a diferentes fagos deve envolver diferentes modificações. Dois dos mutantes fago-resistentes foram lisados por lisozima e três foram lisados por lipase. Lisozima + EDTA lisou todas as estirpes, porém em taxas diferentes (ATKINS & HAYES, 1972).

2.2.3. Outros tipos de mutantes

JORDAN & CLEMENTE (1955) verificaram que mutantes ineficientes de *Rhizobium trifolii* obtidos a partir de estirpes eficientes, por irradiação com luz ultra-violeta (U.V.), são estimulados no seu crescimento por D-leucilglicina enquanto a estirpe normal é inibida.

HUBBEL & ELKAN (1967) utilizaram dois tipos de estirpes de *Rhizobium japonicum*: os capazes de só nodular plantas NN (nodulantes) de soja e os capazes de nodular tanto plantas NN como nn (não nodulantes) e investigaram vários aspectos bioquímicos dessas estirpes. Encontraram que as estirpes que só nodulam plantas NN tem taxas de formação de ácido indolacético e de redução de nitrato, mais baixas do que as apresentadas por estirpes que nodulam plantas NN e plantas nn. Uma característica marcante foi a capacidade de reduzir TTC (2,3,5-Cloreto de Trifenil Tetrazolio) apresentada somente pelas estirpes do primeiro tipo.

Mutantes resistentes a antimetabólitos como *p*-fluorofenilalanina, norleucina, norvalina, D-metionina, D-leucina, D-histidina ou D-alanina foram isolados e observado que em *Rhizobium leguminosarum* estas marcas foram associadas à perda de infecciosidade enquanto em *R. trifolii* estavam associadas à ineficiência. Cerca de 5% dos mutantes resistentes a análogos foram também auxotróficos parciais e em um mutante de *R. trifolii* o requerimento nutricional pareceu associado à ineficiência. A perda da

habilidade simbiótica foi pronunciada em mutantes resistentes a antagonicos de aminoácidos que mais rapidamente induziram formação de esferoblastos em cultura. Defeitos da parede ou membrana celular são considerados como uma base provável de ineficiência nestes mutantes (SCHWINGHAMER, 1967b).

SCHWINGHAMER (1969) isolou mutantes auxotróficos a partir de mutantes resistentes à antimetabólitos obtidos previamente e verificou que a associação mais comum foi requerimento para vitamina, especialmente tiamina, com resistência a D-aminoácidos. Mutação para resistência a alguns antimetabólitos promove uma fonte de clones com requerimentos nutricionais de diferentes graus de complexidade mas auxotrofia não é essencial para resistência. A capacidade simbiótica variou desde não nodulantes até eficientes e a restauração total ou parcial de eficiência na simbiose muitas vezes acompanhou reversão para prototrofia. A ampla classe de mutação para auxotrofia e resistência a diferentes metabólitos, que deprimem a eficiência, sugerem que a ação de genes para simbiose pode ser modificada por mutação em outros "loci" que normalmente não governam a habilidade para simbiose. Do mesmo modo que reversão para eficiência seria ação de um supressor.

SCHWINGHAMER (1970) mostrou que em *Rhizobium trifolii* uma estirpe simbioticamente ineficiente e riboflavina dependente produziu nódulos eficientes quando suprida de riboflavina. O tempo crítico, para requerimento de riboflavina na simbiose, ocorreu dentro do período de 4 - 8 dias após a inoculação.

LORKIEWICZ & MELKE (1970) isolaram mutantes auxotróficos deficientes para síntese de histidina (his^-) de *Rhizobium trifolii* por meio de Nitroso Guanidina. O teste de infecciosidade foi feito em plântulas crescendo em tubos de ensaio sendo comprovado que o mutante é não infectivo. O prototrófico revertente permaneceu não infectivo.

DUNICAN & CANNON (1971) examinaram o possível controle plasmídico de eficiência usando agentes eliminadores de plasmídios, tais como coranante de acridina e brometo de etídio sobre uma estirpe eficiente de *Rhizobium trifolii*. Usaram *Vio-r* como marca, com base em que sempre esteve associada a ineficiência. Os mutantes *Vio-r* apareceram espontaneamente, em uma taxa de $2,7 \times 10^{-7}$; com acridina orange, o aparecimento de *Vio-r*

foi de $3,5 \times 10^{-6}$ (13 vezes mais que a taxa espontânea) e com brometo de etídio foi de $4,1 \times 10^{-6}$ (15 vezes mais). Sob condições naturais, a perda de eficiência dar-se-ia pela eliminação de plasmídeo por causa de altas concentrações de certos metais, como por exemplo o manganês, no solo.

LORKIEWICZ & RUSSA (1971) utilizaram estirpes de *Rhizobium trifolii* de colonias mucosas lisas e seus mutantes morfológicos de colonias rugosas (entre os quais um era estreptomicina-resistente) para estudos imunológicos. Observaram que antígeno somático da estirpe selvagem absorve anticorpos de antissoro S (liso) e de R (rugoso) e tem maior quantidade de ramnose que os dos mutantes rugosos que são eficientes para este açúcar.

SCHERRER & DÉNARIÉ (1971) isolaram mutantes de *Rhizobium meliloti*, dependentes de adenina, ou de citosina, ou de metionina, ou de cisteína, ou de glicina. Todos os mutantes induziram formação de nódulos sobre lucerna, porém houve diferença quanto a eficiência na fixação de nitrogênio. Os mutantes *gly*⁻ (dependentes de glicina) foram mais eficientes que as estirpes selvagens, os *cys*⁻ (cisteína dependentes) e os *met*⁻ (metionina dependentes) foram tão eficientes quanto as estirpes selvagens, e os *ade*⁻ (adenina dependentes) e *cyt*⁻ (citosina dependente) foram ineficientes. Os prototróficos revertidos, espontaneamente, *ade*⁺ e *cyt*⁺ recuperaram a eficiência e alguns foram mais eficientes que as selvagens. Associação entre ineficiência e auxotrofia para purinas e pirimidinas poderia ser devida a que cada um dos mutantes carrega duas mutações, uma determinando o caráter dependência de adenina e a outra, ineficiência, ou então, cada mutante conduz uma mutação simples que governa os dois caracteres. Houve evidência para concluir que algum defeito no metabolismo da purina ou pirimidina determina a ineficiência.

PANKHURST, SCWINGHAMER & BERGERSEN (1972) analisaram a estrutura e a atividade de redução do acetileno, em nódulos de raízes formados por mutantes riboflavina-dependentes de *Rhizobium trifolii*. Verificaram que nódulos de 2 a 3 dias de idade não apresentavam bacteróides morfológicamente distintos, permanecendo como células vegetativas no citoplasma periférico. Adição de riboflavina foi essencial para a conversão de bactérias vegetativas, da estirpe mutante, em bacteróides funcionais dentro dos nódulos.

BERTALMIÓ (1972) procurou verificar se existe relação entre os genes que controlam as propriedades simbióticas e os do metabolismo de adenina, em *Rhizobium trifolii*. Usou mutantes *ade*⁻ (adenina dependente) obtidos pelo uso de aminopterina. Resistência a doses de 40 a 100mcg/ml de aminopterina correspondeu ao aparecimento de *ade*⁻. Com doses maiores de 100 mcg/ml as colônias tiveram sua morfologia modificada. Aminopterina-resistência não alterou capacidade de nodular. Os mutantes *ade*⁻ não foram nodulantes e os prototróficos, revertidos espontaneamente, readquiriram sua habilidade em nodular tão eficientemente quanto a estirpe original.

2.2.4. Uso de marcas de resistência para estudos ecológicos do *Rhizobium*

O primeiro pesquisador a utilizar marca de resistência a anti-biótico em estudos ecológicos, tais como sobrevivência de estirpes, competição entre estirpes na rizosfera da planta e controle das estirpes que formaram os nódulos nos ensaios de inoculação, foi OBATON (1971). Usou mutantes de *Rhizobium meliloti*, dois dos quais eram resistentes a 740 mcg/ml de estreptomina e o terceiro mutante, resistente a 740 mcg/ml de estreptomina e 79 mcg/ml de canamicina. Não houve perda de eficiência pelos mutantes e durante os dois primeiros anos não apareceu estirpe sensível nas parcelas inoculadas com os mutantes. No terceiro ano 8% de sensíveis foram encontrados, possivelmente, por contaminação de outras parcelas ou pela própria perda de resistência. A reversão só ocorreu após 5 anos de repicagens em tubos de ensaio e 2 anos de simbiose sobre as plantas, daí ser boa marca para os propósitos ecológicos.

SCHWINGHAMER & DUDMAN (1973) verificaram que resistência a estreptomina atingia altos níveis em "um só passo" em estirpes de *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium leguminosarum*, *R. meliloti* e *R. japonicum*. Foi encontrada uma variação nos níveis de resistência natural entre 0,5 mcg/ml a 20 mcg/ml. Resistência natural a estreptomina também foi variada: 0,5 - 2 mcg/ml em *R. trifolii*, 5 mcg/ml em *R. leguminosarum*, 10 mcg/ml em *R. japonicum* e 20 mcg/ml em *R. meliloti*. A perda total ou parcial de nodular eficientemente, dentre os mutantes, foi apenas de 20% e eles não perderam resistência após passagem pela planta. Resistências a

espectinomomicina (*Spc*) e a estreptomicina (*Str*) não são cruzadas. A probabilidade de ser encontrada uma estirpe nativa, resistente a altos níveis de ambos os antibióticos é muito baixa (cerca de 10^{-14}), de tal modo que o uso das duas marcas dispensaria outros testes de identificação de estipes inoculantes, o que é importante, especialmente quando antissoro não é disponível.

2.3. Sistemas de recombinação em *Rhizobium*

2.3.1. Conjugação

HIGASHI (1967) promoveu conjugação entre estirpes de *Rhizobium trifolii* e *R. phaseoli* e depois eliminou da mistura o *R. trifolii* pelo uso de fago específico. As células sobreviventes (progênie de *R. phaseoli*) formaram cordão de infecção em trevo mas mantiveram várias características fisiológicas e imunológicas de *R. phaseoli*. Tratados por acridina-orange, *R. trifolii* e "progênie" de *R. phaseoli* a ação infecciosa sobre trevo diminuiu. A taxa de eliminação, espontânea, de infecciosidade foi de $1,2 \times 10^{-1}$ e com acridina a taxa aumentou para $7,2 \times 10^{-1}$. A infecciosidade seria, portanto, um caráter mediado por um fator epissômico.

HEUMMAN (1968) usou mutantes morfológicos, auxotróficos e diauxotróficos e promoveu conjugação entre os diferentes mutantes. Uma taxa de 10% de recombinantes foi observada e as oito marcas de auxotrofia classificadas em dois grupos, de acordo com a distância no cromossomo, à região *car* determinante de coloração. A circularidade do cromossomo foi evidenciada. O sistema de conjugação é muito estável sendo as células conectadas por um tufo de fímbrias, de modo, que experimentos de conjugação interrompida tornam-se difíceis. Este trabalho foi feito com a espécie de *Rhizobium lupini*.

BOSE & VENKATARAMAN, segundo DUNICAN & CANNON (1971) obtiveram recombinantes (estreptomicina-resistentes, penicilina-resistentes) *Str-r* *Pen-r* por conjugação de *Rhizobium leguminosarum*.

LORKIEWICZ & ZURKOWSKI (1971) descreveram um método para detectar conjugação em *Rhizobium*.

PUHLER, BURKARDT & HEUMANN (1972) transferiram o fator RP4 de *Escherichia coli* para *Rhizobium lupini*, bactéria que possui duas regiões cromossômicas distintas (que são transferidas, separadamente, por conjugação). Transferência de RP4 entre células de *Rhizobium lupini* foi controlada pela marca de estreptomicina no doador. O estabelecimento do fator na célula receptora ocorreu depois de 60 minutos. Este tempo é necessário para a formação da ponte conjugacional ou para a expressão de RP4. Em *R. lupini* RP4 inibiu o sistema de fertilidade pois um doador conduzindo RP4 não transferiu genes cromossômicos para um receptor apropriado e após a "cura" de RP4 o doador recuperou sua atividade normal de transferir genes conjugacionais. O fator RP4 confere resistência a ampicilina, canamicina e tetraciclina. Foi descoberto em *Pseudomonas aeruginosa* e depois transferido para *Escherichia coli*. Nesta bactéria, o RP4 pode coexistir com fatores como F e I sem interferir na fertilidade da mesma.

BERINGER (1973) promoveu transferência, por conjugação, de plasmídios do grupo P entre *Rhizobium leguminosarum*. Primeiramente, foi transferido de *Escherichia coli* para *Rhizobium leguminosarum* (estirpes eficientes e não eficientes) com frequência de 10^{-6} /célula receptora e depois entre *R. leguminosarum*. O padrão de resistência a antibiótico conduzido no plasmídio foi sempre retido e segregação de clones de *Rhizobium R^-* após cultura prolongada em meio não seletivo foi menor que 10^{-3} .

2.3.2. Transdução

Mutantes de *Rhizobium meliloti* resistentes a estreptomicina, lisina-dependente e ineficientes foram lisados por meio de luz ultravioleta. Fagos temperados transduziram resistência a estreptomicina com uma frequência de 10^{-5} a 10^{-7} em um mecanismo de transdução generalizada. A marca de lisina também foi transduzida com frequência de 10^{-5} a 10^{-7} . Dependência de lisina e ineficiência não são marcas estreitamente ligadas, o que foi evidenciado por estudos dos prototróficos. Não apareceram transdutantes eficientes e isso talvez pela abundância de células receptoras inefetivas e competitivas, na mistura usada ou porque as marcas não são ligadas (KOWALSKI, 1971).

KOWALSKI & DÉNARIÉ (1972) promoveram transdução de gene que con-

trola a expressão da fixação do nitrogênio em *Rhizobium meliloti*.

2.3.3. Transformação

A primeira provável evidência de transformação em *Rhizobium* foi dada por KRASILNIKOV (1941), quando observou que um filtrado de cultura estéril, de uma estirpe eficiente de *Rhizobium* foi capaz de modificar uma estirpe ineficiente.

KLEIN & KLEIN (1953) usando DNA de *Agrobacterium tumefaciens* transferiram a capacidade de formar galhas para *Rhizobium leguminosarum*.

BALASSA (1960) registrou a transformação de um mutante cisteína-dependente de *Rhizobium lupini* pelo DNA da estirpe da qual o mutante era derivado. Os mesmos mutantes também foram transformados por DNA de estirpes de *R. meliloti*, transformantes estes que foram capazes de nodular alfafa, porém ineficientemente e os nódulos foram atípicos. Entretanto, isolados dos nódulos foram submetidos a uma segunda transformação e os nódulos, agora, foram típicos e eficientes, sugerindo a necessidade de dois ou mais tipos de transformação sucessivas para produzir a nova especificidade hospedeira. O sistema intraespecífico apresenta uma baixa frequência de transformação levando a crer que no sistema interespecífico as taxas sejam muito mais baixas, de modo que o caráter só será detectado por meio de um forte poder seletivo de formação de nódulos.

Transferência de virulência em *Rhizobium trifolii* foi induzida pela preparação de polissacarídeos que continham DNA. As estirpes doadoras e transformantes mostraram-se ricas em ácido pantotênico, o que não aconteceu com a estirpe receptora (LJUNGGREN, 1961).

LANGE & ALEXANDER (1961) em um experimento utilizando inoculação cruzada em *Melilotus alba*, *Astragalus sinicus* e *Trifolium pratense* em mistura com preparação de polissacarídeos da estirpe específica de cada espécie, conseguiram que houvesse infecção cruzada. A preparação de polissacarídeos perdeu ação quando tratado com desoxiribonuclease o que levou os autores a concluírem que *Rhizobium* não infectivo foi transformado por áci

do desoxiribonucléico de estirpe infectiva ocorrendo, portanto transformação interespecífica, isto é, mudança de especificidade hospedeira.

ELLIS, KALZ & DONCASTER (1962) realizaram transformações em *Rhizobium trifolii* de resistência a estreptomicina, resistência a cloranfenicol e tolerância a cristal violeta, porém os níveis de resistência alcançados pelos transformantes foram baixos (2 a 5 mcg/ml de estreptomicina; 1,5 a 5 mcg/ml de cloranfenicol e 50 mcg/ml de cristal violeta) quando os doadores eram resistentes a 1000 mcg/ml, 50 mcg/ml e 200 mcg/ml, respectivamente.

BALASSA (1963) fez uma revisão dos trabalhos de R. BALASSA, mostrando estudos com *Rhizobium meliloti*, *R. lupini*, *R. leguminosarum* e *R. japonicum*. A competência atinge o máximo no início da fase exponencial do crescimento das estirpes. Transformação de estirpes cisteína dependente (cys^-) por DNA da estirpe selvagem alcançou 5×10^{-3} , taxa que também foi observada para transformação usando DNA de uma estirpe $cys^+ val^-$. Transformação de marcas de resistência à estreptomicina, dependência de estreptomicina e especificidade para infectar alfafa, planta hospedeira foram levadas a efeito, entre *R. meliloti* e *R. lupini*.

Estirpe eficiente de *Rhizobium trifolii* tornou-se ineficiente quando tratada com DNA de uma estirpe ineficiente, ou tratada por estreptomicina, ou por irradiação U.V., ou por fago ou ainda por DNA da estirpe ineficiente + fago (KLECZKOWSKA, 1965).

GADRE, MAZUMDAR, MODI & PAREKH (1967) transferiram de *Rhizobium phaseoli* para *R. "cow-pea"*, resistência a penicilina e habilidade de utilizar frutose.

KERN (1969) promoveu transformações recíprocas entre *Rhizobium leguminosarum* e *Agrobacterium tumefaciens*, usando as marcas de resistência a estreptomicina e a sulfonamida. A taxa de transformação foi de $4,7 \times 10^{-6}$ para estreptomicina e $13 - 16 \times 10^{-6}$ para sulfonamida. Quando *R. leguminosarum* foi o doador, os transformantes só aglutinaram com antissoro de *Agrobacterium*; quando *Agrobacterium* foi o doador houve "segregação": 34 transformantes só reagiram com antissoro de *Rhizobium*, 1 reagiu com antissoro de *Agrobacterium* e 4 reagiram com ambos.

MARECKOVÁ (1969) conseguiu transformação em *Rhizobium japonicum* usando a marca de resistência à estreptomicina.

ZELAZNA, citada em ZELAZNA - KOWALSKA (1971) mostrou que competência é independente do tipo de crescimento e competência máxima ocorre, periodicamente, de 3 em 3 horas durante o crescimento. Depende da densidade da cultura e 15 minutos de exposição ao DNA são necessários para uma transformação ótima.

SEN, PAL & SEN, segundo BRILL (1974) conseguiram uma frequência de transformação da ordem de 10^{-3} a 10^{-2} em *Azotobacter chroococcum* e *A. vinelandii* usando DNA de *Rhizobium leguminosarum*, *R. japonicum*, *R. meliloti* e *R. trifolii*, para as marcas de resistência à estreptomicina e à cristal violeta.

RAINA & MODI (1969) estudaram transformação de estirpes adenina-dependentes (ade^{-}) de *Rhizobium "cow-pea"*, usando DNA, da estirpe selvagem (ade^{+}) como transformante.

RAINA & MODI (1971) usaram um grupo de *Rhizobium "cow-pea"* gelatinase⁻ (não liquefaz gelatina) como receptoras e um grupo de *R. "cow-pea"* e de *R. phaseoli* gelatinase⁺ como doadores. A competência foi atingida no início da fase log de crescimento. A frequência de transformantes foi aumentada pelo acréscimo ao meio mínimo de casaminoácidos e extrato de levedura. Transformação interespecífica foi 10 vezes menor que a intraespecífica, embora as porcentagens de C + G das estirpes doadoras e receptoras fossem similares.

Transformação entre estirpes de *Rhizobium trifolii* foi realizada por RIFAAT, AHMED, HAMDI & ABDEL-WAHAB (1974). Utilizaram a estirpe 204, seu mutante 204 *Cmp-r* 20 (resistente a 20 mcg/ml de cloranfenicol) e a estirpe TS 8 e seu mutante TS 8 *Str-r* 50 (resistente a 50 mcg/ml de estreptomicina). Maior número de transformantes no caso de cloranfenicol,

foi atingido com 36 horas e no caso de estreptomicina o máximo foi alcançado com 48 horas de crescimento. A eficiência em fixar nitrogênio dos transformantes foi sempre semelhante a da doadora, fosse ela Nif^- ou Nif^+ .

2.4. Genética da *Leguminosae* referente ao fenótipo Nif .

WILSON (1939) realizou um trabalho onde correlacionou nodulação com grau de polinização entre as plantas. Plantas auto-férteis, apresentariam maior especificidade com determinadas estirpes de *Rhizobium*, isto porque teriam uma base genética mais estreita. As plantas de polinização cruzada seriam mais "promíscuas", isto é, menos específicas e nodulariam com maior número de estirpes de *Rhizobium*.

AUGHTRY (1948) cruzou *Medicago sativa* com *M. falcata* e comparou o F_1 do cruzamento com progênies de autofecundação de plantas de cada uma das espécies, quanto a resposta com três estirpes de *Rhizobium*, isoladamente e selecionadas previamente. Concluiu que fatores quantitativos controlam a habilidade da planta de manter simbiose com uma dada estirpe de *Rhizobium*. ERDMAN & MEANS (1953) mostraram que esta habilidade é diferente mesmo dentro de uma espécie.

Em soja (*Glycine max*), WILLIAMS & LINCH (1954) observaram que a clorose apresentada pela L6-1743, em Urbana, Ill, estava correlacionada a falta de nodulação nas raízes. A planta L6-1741, irmã da L6-1743, apresentava nódulos e não apresentava clorose. Fizeram cruzamento entre as duas seguindo até a geração F_3 . Fizeram também retrocruzamento para ambos os pais. Todas as plantas foram inoculadas com uma suspensão de estirpes de *Rhizobium*. Os resultados obtidos levaram a concluir que um simples "locus" está envolvido no caráter e que nodulação domina não-nodulação. Propuseram o símbolo *No*, *no* (atualmente substituído por Rj_1 , rj_1).

CLARCK (1957) usando duas linhagens isogênicas de soja, que diferiam apenas na capacidade de nodular, verificou que quando cultivadas em areia, plantas *no no*, nodulam, não o fazendo quando cultivadas em solos. Areia + bentonita inibiu a nodulação comportando-se como o solo.

ELKAN (1962) estudou a rizosfera de duas linhagens isogênicas de

soja (NoNo e nono). *Rhizobium* foi encontrado na zona das raízes de ambas as linhagens, porém em muito maior quantidade na da linhagem nodulante.

CALDWELL (1966) realizou experimentos com a variedade "Hardee" de soja, a qual não nodula com estirpes de *Rhizobium* dos serogrupos 324.44 e 122. Realizou dois cruzamentos: (Hardee x D 60-9647) e (Hardee x F 59-2491). D 60-9647 e F 59-2491 nodulam normalmente com estirpes daqueles grupos. Plantas F_1 , F_2 e F_3 foram analisadas e comparadas com os pais. Os resultados levaram a sugerir um par de genes controlando a infecciosidade e deram os símbolos Rj_2 , rj_2 .

CALDWELL, HINSON & JOHNSON (1966) mostraram que a variedade "Hardee" nodula com outras estirpes de *Rhizobium japonicum*, daí porque o gene Rj_2 parece ser específico para estirpes daqueles dois serogrupos, e portanto, diferente do gene rj_1 que condiciona "resistência" a qualquer estirpe.

VEST (1970) seguindo a mesma linha de trabalho de Caldwell, usou (Clarck x Hardee) e (Hardee x D 60-9647) e concluiu que resposta à inoculação com estirpe do serogrupo 33 é controlada por um gene que não o Rj_2 e propôs o símbolo Rj_3 , rj_3 . O gene dominante condicionaria a nodulação ineficiente.

Outro gene Rj_4 foi descrito por VEST (1972) que causa nodulação ineficiente com estirpe 61 de *Rhizobium japonicum*.

Lotus foi estudada por GERSHON (1961). Usou uma espécie tetraplóide natural, *Lotus corniculatus* que é eficiente com estirpe 3 de *Rhizobium "lotus"* e um tetraplóide obtido de uma espécie naturalmente, diplóide, *Lotus uliginosus* que é eficiente com a estirpe 10. Por meio de cruzamento obteve F_1 , F_2 , F_3 , e retrocruzamentos e estudando especificidade das progênes para as duas estirpes, verificou que ocorreu efeitos de doses de genes envolvidos com eficiência.

Em trevo vermelho (*Trifolium pratense*) a nodulação precoce ou tardia é um fator herdável (NUTMAN, 1946). A não formação de nódulos seria dada pela interação do homocigoto nr com uma partícula citoplasmática - σ (NUTMAN, 1949).

NUTMAN (1954a, 1954b) testou linhagem de trevo vermelho, para eficiência, com uma só estirpe de *Rhizobium trifolii*. Plantas selecionadas foram submetidas a cruzamentos controlados com plantas específicas; o aparecimento de plantas ineficientes e formando numerosos nódulos pequenos evidenciaram que um fator recessivo i_1 , no hospedeiro pode ser responsável pela ineficiência específica com a estirpe A. Plantas com genótipo $i_1 i_1$ foram eficientes com outras onze estirpes e até mesmo com um mutante da estirpe A.

BERGERSEN & NUTMAN (1957) descobriram que um outro fator i_e estava envolvido no processo de desenvolvimento da simbiose. Plantas $i_e i_e$ não apresentam bacteróides nem leghaemoglobina e não há formação de nódulos, propriamente ditos mas sim uma "tumorização". Enquanto i_1 determina ineficiência apenas com a estirpe A, i_e determina ineficiência com qualquer estirpe.

Nas plantas $i_1 i_1$ a infecção processa-se normalmente e as bactérias multiplicam-se no citoplasma hospedeiro, porém não há formação de bacteróides nem de leghaemoglobina. Foi encontrado um fator m que segrega independente do fator i_1 e que suprime a ação deste, possibilitando plantas $i_1 i_1$ nodularem eficientemente com estirpe A (*NUTMAN, 1959*).

Poucos exemplos são conhecidos de estirpes que produzem tecido bacteróide normal mas que não fixam nitrogênio. Um defeito impede a fixação sem influir na estrutura e citologia dos nódulos. Há alguma evidência de que este defeito é causado por um gene recessivo da planta, designado por "t". Não há formação de leghaemoglobina, de tal modo, que a forma recessiva "t" pode paralisar a síntese de leghaemoglobina. Quatro tipos de nódulos ineficientes que diferem estruturalmente dos eficientes, em trevo vermelho, foram registrados e cada um é causado por um fator recessivo diferente, do hospedeiro i_1 , i_e , n e d (*NUTMAN, 1969*).

Plantas nn não possibilitam formação de bacteróides e há uma tumorização perto do córtex. O genótipo dd determina uma multiplicação de bactéria sem entrar em contato com o citoplasma da célula hospedeira. Possivelmente, o gene d influencia os primeiros estádios do desenvolvimento do nódulo. Análise de plantas F_2 mostrou que os genes t , i_1 , i_e , n e d , segregam independentes e parecem ter ação na seguinte sequência: $d \rightarrow n \rightarrow i_e \rightarrow i_1 \rightarrow t$ (*NUTMAN, 1971c*).

MYTTON & JONES (1971) fizeram um trabalho visando o melhoramento do trevo branco (*Trifolium repens* L.) em que o caráter de seleção foi o tecido nodular. Observaram que onde houve menor endocruzamento, apareceu efeito heterótico. Não puderam determinar a importância relativa dos efeitos diretos da seleção sobre o vigor das plantas e os efeitos indiretos que atuam através do sistema nodular. Evidenciaram, no entanto, que fatores quantitativos herdáveis determinam os parâmetros dos nódulos.

NUTMAN, MARECKOVÁ & RAICHEVA (1971) selecionaram plantas de produção e de conteúdo médio de nitrogênio (M) e plantas que deram maior produção e maior conteúdo de nitrogênio (H) e fizeram cruzamento dentro de cada grupo e testes de progênies. Obtiveram resultados que mostram ser possível cruzamentos para aumentar a fixação de nitrogênio sendo isto vantajoso para lugares onde a inoculação da semente pode introduzir no solo *Rhizobium* apropriado ou quando a seleção pode ser feita para uma estirpe dominante de uma população de *Rhizobium* no solo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Bactéria

A estirpe usada foi a *Rhizobium japonicum* CB - 1809 procedente da Austrália e que ensaiada no Brasil (DOBEREINER, FRANCO & GUZMÁN, 1970) mostrou-se de eficiência excepcional. A estirpe foi gentilmente cedida pela Eng. Agr. Alaídes Puppim Ruschell, da EMBRAPA - CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA.

3.1.2. Meios de Cultura

3.1.2.1. Meio líquido

Yeast-Mannitol-Broth (YMB) de VINCENT, 1970, modificado:

K_2HPO_4	0,1 g
KH_2PO_4	0,4 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
NaCl	0,1 g
Manitol	10,0 g
Extrato de levedura (Oxoid)	0,5 g
Azul de Bromotimol (solução alcoólica 0,5% (p/v) 5 ml	
Água destilada	1000 ml

3.1.2.2. Meio sólido

Yeast-Mannitol-Agar (YMA). Ao meio líquido (YMB) foram adicionados 15 g de Agar (Difco).

3.1.3. Antibiótico

O antibiótico usado foi Sulfato de Estreptomicina Fontoura Wyeth S.A. As soluções do antibiótico foram sempre preparadas momentos antes de seu uso, dissolvendo quantidades apropriadas em água destilada esterilizada.

Adição do antibiótico ao meio de cultura foi sempre feita após a autoclavagem do meio, quando este apresentava-se com temperatura em torno de 45°C.

3.1.4. Planta hospedeira, substrato, solução nutritiva e inoculantes

A planta hospedeira foi a soja (*Glycine max* (L.) Merrill) variedade Sta. Rosa, fornecida pelo Instituto Agrônomo de Campinas, cresci-

da em substrato de sílica lavada e esterilizada.

A solução nutritiva usada foi a apresentada em *NORRIS (1964)* com modificações nas dosagens, segundo informações no Instituto Agronômico de Campinas.

1. KCl	149 mg
2. K_2HPO_4	348 mg
3. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	493 mg
4. $CaSO_4 \cdot 2H_2O$	688 mg
5. $FeSO_4$	5%(p/v)
	0,5 ml
Ácido cítrico	5%(p/v)
6. Micronutrientes	
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4 H_2O$	9,2 mg
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	78,5 mg
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	219,8 mg
	0,5 ml
H_3BO_3	1428,3 mg
$MnSO_4 \cdot 4H_2O^*$	2023,3 mg
H_2O	1000 ml

Quantidades para 1 litro de solução nutritiva.

* substituiu-se por $MnSO_4 \cdot H_2O$ 1690 mg.

Para os vasos com adubação nitrogenada foram acrescentados 5 ml de solução 1 M de KNO_3 e 5 ml de solução 1 M de $Ca(NO_3)_2$ a cada litro da solução nutritiva básica.

Os inoculantes foram suspensões de estirpes original e mutantes (cerca de 10^8 bactérias/ml).

3.2. Métodos

3.2.1. Determinação da curva de sobrevivência à estreptomicina e isolamento de mutantes

A curva de sobrevivência à estreptomicina foi determinada preparando-se placas de Petri com meio YMA sem antibiótico e placas de Petri com meio YMA mais antibiótico, em doses crescentes de 4 mcg/ml, 8 mcg/ml, 16 mcg/ml, 32 mcg/ml, 64 mcg/ml e 128 mcg/ml, e semeando-se nessas placas 0,1 ml de diferentes diluições de uma cultura líquida de *Rhizobium japonicum* desenvolvida a 28°C por 7 dias.

As placas assim preparadas foram incubadas a 28°C durante 7 dias, quando então, foram contadas as colônias de bactérias por placa.

Colônias isoladas das concentrações mais elevadas do antibiótico que inibiam grande porcentagem de crescimento foram ensaiadas para confirmação da mutação para resistência, fazendo-se estrias em placas de Petri com meio YMA sem estreptomicina e em placas com meio YMA mais 125 mcg/ml, 250 mcg/ml, 500 mcg/ml, 1000 mcg/ml e 2000 mcg/ml de estreptomicina. Com 7 dias de incubação a 28°C foi feita observação das placas, anotando-se as que apresentavam crescimento.

As colônias comprovadamente mais resistentes foram isoladas em tubos de ensaio com meio YMA, inclinado, sem antibiótico.

Por terem sido, os mutantes, isolados de placas com 64 mcg/ml; com 128 mcg/ml (este de um primeiro ensaio à parte) e com 128 mcg/ml de estreptomicina, os mesmos foram designados, respectivamente de CB-1809 *Str-n* 64, CB-1809 *Str-n* 120 e CB-1809 *Str-n* 128, segundo nomenclatura proposta por DEMEREC, ADELBERG, CLARCK & HARTMAN, 1966. Como foram obtidos vários isolados resistentes nas placas com 64 mcg/ml e 128 mcg/ml os mesmos foram designados de *Str-n* 64 I, *Str-n* 64 II, *Str-n* 64 III, *Str-n* 128 I, *Str-n* 128 II, *Str-n* 128 III, *Str-n* 128 IV, *Str-n* 128 V, *Str-n* 128 VI, *Str-n* 128 VII, *Str-n* 128 VIII.

3.2.2. Curvas de crescimento

Foi feita a curva de crescimento da estirpe original e dos mutantes *Str-n* 120, *Str-n* 64 I, *Str-n* 128 IV, os dois últimos, tomados ao acaso dentre os mutantes isolados de placas com 64 mcg/ml e de placas com 128 mcg/ml de estreptomicina.

A técnica utilizada foi a descrita por AZEVEDO & NEDER (1968). Culturas de 7 dias, das linhagens, foram diluídas a 10^{-3} e estas diluições constituíram-se os inóculos iniciais, permitindo que um determinado número de bactérias fosse inoculado em tubos com 10 ml de meio YMB, os quais foram incubados a 28°C . Amostras de 0,1 ml foram retiradas nos tempos 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas. As amostras foram diluídas apropriadamente e 0,1 ml de cada diluição foi semeado em placas com meio YMA. Os números de colônias por placa foram contados após 5 a 10 dias de incubação.

3.2.3. Taxas de crescimento

As taxas de crescimento foram calculadas segundo a fórmula A:

Fórmula A

$$\frac{\log_{10} N_2 - \log_{10} N_1}{\log_{10} 2}$$

Foram considerados os pontos da curva de crescimento entre 48 e 12 horas, cujo intervalo representa a fase exponencial do crescimento.

As taxas foram expressas em tempo de geração e em geração por hora. O primeiro valor foi calculado dividindo-se o intervalo de tempo entre uma observação e outra pelo valor obtido na fórmula A. Geração por hora foi determinada segundo a fórmula B.

Fórmula B

$$\frac{\log_{10} N_2 - \log_{10} N_1}{(\log_{10} 2) t}$$

onde t é o intervalo de tempo entre as duas observações (*STANIER, DOUDO-ROFF & ADELBERG, 1969*)

3.2.4. Crescimento da linhagem original em competição com o crescimento do mutante *Str-r* 120.

As linhagens foram inoculadas em mistura, em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio YMB.

Amostras foram coletadas nos tempos 0, 24, 48 e 120 horas, sementeadas em placas com YMA e incubadas a 28°C por 7 dias. Após a contagem do número total de colônias por placas, fez-se a réplica de *LEDERBERG & LE-DERBERG (1952)* destas placas para placas com meio YMA mais 400 mcg/ml de estreptomicina.

As placas de réplica foram incubadas a 28°C por 7 dias quando então, foram contados os números de colônias por placa.

Considerando o número total de colônias como 100% foram calculadas as porcentagens de células sensíveis e porcentagens de células resistentes na mistura em diferentes tempos de cultivo.

3.2.5. Determinação da força da estreptomicina através da mistura da linhagem original com o mutante *Str-r* 120

Para a medição da força da estreptomicina, utilizou-se o mutante *Str-r* 120 e seguiu-se o método proposto por *BERGAMIN FILHO (1973)*.

Primeiramente, construiu-se uma tabela onde na 1ª coluna estão os tempos de cultivo; na 2ª coluna, as porcentagens da linhagem sensível; na 3ª, as porcentagens do mutante; na 4ª coluna estão as porcentagens recalculadas de mutantes e na 5ª coluna os logaritmos na base 10 dos valores da 4ª coluna.

As porcentagens recalculadas foram determinadas tomando-se as porcentagens da linhagem sensível como 100%.

Obtida a tabela, calculou-se o coeficiente de regressão (r) e a Meia Vida Relativa (MVR). O valor de r foi obtido de acordo com a equação:

$$x = x_0 \pm rt$$

onde: $x = \log_{10}\%$ Bactérias resistentes (recalculado) em um tempo determinado.

$x_0 = \log_{10}\%$ Bactérias resistentes (recalculado) no tempo 0 horas.

$t =$ intervalo de tempo considerado entre as observações x e x_0 .

MVR é o tempo necessário para uma população de uma linhagem de um microrganismo cair até a metade ou dobrar em relação a uma outra, mutante. A MVR foi calculada pela fórmula:

$$MVR = \frac{\log 1/2}{r}$$

3.2.6. Experimento em casa de vegetação

3.2.6.1. Delineamento do experimento

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições e os seguintes tratamentos:

- a) Testemunha (sem inoculação e sem adubação nitrogenada).
- b) Testemunha (sem inoculação e com adubação nitrogenada).
- c) Inoculação com a estirpe original CB-1809.
- d) Inoculação com o mutante CB-1809 *Str-n* 64 I.

- e) Inoculação com o mutante CB- 1809 *Str-r* 120.
- f) Inoculação com o mutante CB- 1809 *Str-r* 128 IV.
- g) Inoculação de mistura de normal com *Str-r* 64 I.
- h) Inoculação de mistura de normal com *Str-r* 120.
- i) Inoculação de mistura de normal com *Str-r* 128 IV.

O experimento foi montado em vasos plásticos previamente esterilizados com solução a 10% de Lysoform para uso veterinário e depois lavados com água destilada esterilizada. Cada vaso recebeu 2 kg de sílica (areia) lavada e autoclavada durante 4 horas à pressão de 2 atmosferas. Um tubo plástico também esterilizado em solução a 10% de Lysoform e lavado com água destilada esterilizada, foi colocado no centro de cada vaso, para sistema de irrigação (Fig. 7). Esse sistema de irrigação foi usado por ZEMELMAN, LONGERI & HERRERA (1964) e vem sendo utilizado no CENA, sendo que os tubos são de vidro.

As sementes de soja foram esterilizadas, superficialmente, em sublimado corrosivo 1:500 por 30 minutos, e depois lavadas cinco vezes com água destilada esterilizada.

A inoculação das sementes foi feita colocando-as nas suspensões de culturas (com 7 dias de incubação a 28°C em meio YMB, havendo cerca de 10⁸ células/ml) isoladamente, ou em mistura conforme o tratamento.

O plantio foi feito no dia 25 de abril de 1974, colocando-se 10 sementes por vaso.

3.2.6.2. Manutenção

Durante os cinco primeiros dias a irrigação foi feita com água destilada. Aos 5 dias do plantio houve início da germinação, quando passou-se a irrigar com água destilada e com solução nutritiva sem nitrogênio, alternadamente.

Com 8 dias do plantio havia uma germinação de 50%. Aos 12 dias,

foram feitos o desbaste e o transplântio de plantas, deixando-se 3 plantas por vaso. Sempre que possível, o transplântio foi feito de vasos reservas, que não haviam recebido inoculação.

Do dia 10 de maio em diante, passou-se a irrigar com solução nitrogenada os vasos que eram testemunhas com nitrogênio.

3.2.6.3. Coleta de dados

Com 5 dias do início da floração (11 de junho) as plantas foram retiradas dos vasos, tendo-se o cuidado de retirar todo o sistema radicular.

3.2.6.3.1. Determinação da atividade da enzima nitrogenase

No ato da colheita, foram cortados pedaços de raízes contendo nó dulos e imediatamente colocados dentro de vidros limpos e bem vedados com tampas de borracha. Com uma seringa retirou-se de cada vidro 6 ml do ar neles contido, substituindo pelo mesmo volume de gás acetileno. Após 1 hora da introdução do acetileno, fez-se a leitura da atividade da nitrogenase, usando-se o aparelho de cromatografia Beckman GC-65, de propriedade do CENA.

O cálculo de redução do acetileno foi feito usando-se a fórmula:

$$\frac{LVAF}{p/t}$$

onde: L = leitura.

A = amplitude em que foi registrada a atividade da enzima.

F = fator.

V = volume do frasco.

p = peso seco de nódulos usados para a determinação da atividade da nitrogenase.

t = intervalo de tempo entre a colheita e a determinação da atividade.

O fator F é calculado com base na leitura da Amostra Padrão e indica quanto vale um Gc (grau do cromatógrafo).

Utilizou-se $0,5 \times 10^{-3}$ ml de acetileno (amostra padrão), o qual deu leitura igual a 18 com uma amplitude $\times 20$, logo, igual a 360 Gc. Para determinar quanto vale 1 Gc, leva-se em consideração que $0,5 \text{ ml} \times 10^{-3}$ ml da amostra padrão corresponde a 2232×10^{-11} moles, uma vez que 1 mol de qualquer gás corresponde a 22,4 litros. Consequentemente, 360 Gc correspondem a 2232×10^{-11} moles e portanto:

$$1 \text{ Gc} = 6,20 \times 10^{-11} \text{ moles}$$

ou

$$1 \text{ Gc} = 6,2 \times 10^{-2} \text{ nmoles}$$

O método baseia-se em que a nitrogenase, enzima responsável pela fixação do nitrogênio atmosférico, também exerce outras funções como a de reduzir o gás acetileno (C_2H_2) a etileno (C_2H_4).

A razão teórica é de 3 moles de C_2H_2 reduzido para 1 mol de N_2 fixado (RICE & PAUL, 1971), logo a quantidade de N_2 fixado é obtida, dividindo-se por 3 o valor de C_2H_2 reduzido.

3.2.6.3.2. Determinação de peso seco da planta, N total da planta, número e peso seco de nódulos

Após a colheita, os nódulos foram retirados das plantas, postos a secar em estufa a 60°C , depois pesados e contados (incluindo os nódulos que serviram para a determinação da nitrogenase).

As plantas foram secadas em estufa a 60°C com ventilação, pesadas e moídas. O teor de nitrogênio foi determinado pelo método Semi-MicroKjeldahl, conforme descrito em *SARRUGE & HAAG (1974)*.

Análise da variância dos caracteres estudados foram realizadas seguindo a decomposição de grau de liberdade em tratamento e resíduo, tendo havido a perda de 1 Gl. Os valores médios dos caracteres foram comparados pelo teste de Tukey.

3.2.6.3.3. Eficiência relativa da linhagem original (Efr)

BERGERSEN, BROCKWELL, GIBSON & SCHWINGHAMER (1971) determinaram a eficiência de uma estirpe, relacionando a média do peso seco de plantas inoculadas com essa estirpe com a média do peso seco de plantas inoculadas com uma estirpe conhecida.

No presente trabalho, a eficiência da estirpe CB-1809 foi avaliada fazendo o relacionamento com a média do peso seco de plantas que receberam adubação nitrogenada:

$$Efr = \frac{\text{média P.S. plantas inoculadas}}{\text{média P.S. plantas com N combinado}} \times 100$$

3.2.6.3.4. Avaliação das fontes de nitrogênio nas plantas

Considerou-se que o nitrogênio nas plantas foi proveniente de três fontes:

- 1- N_s = Nitrogênio somente reserva das sementes (nos tratamentos sem adubação nitrogenada e nos tratamentos com inoculação mas em que as plantas não nodularam).

2- $N_s + N_c$ = reserva da semente mais nitrogênio combinado (tratamento com solução nitrogenada).

3- $N_s + N_f$ = reserva da semente mais nitrogênio fixado (tratamento com inoculação em que as plantas nodularam).

Por diferença estimou-se as quantidades de N_c e N_f .

3.2.6.3.5. Reisolamento após passagem no hospedeiro

A partir de nódulos de plantas descartadas por ocasião do desbaste e de nódulos das plantas colhidas ao final do experimento, foram feitos reisolamentos tanto em meio sem antibiótico como em meio com 200 mcg/ml de estreptomicina.

4. RESULTADOS

4.1. Resultados dos ensaios

4.1.1. Determinação da curva de sobrevivência e obtenção de mutantes resistentes à estreptomicina

A Tabela 1 apresenta o número de sobreviventes nas concentrações usadas de estreptomicina. Através dos dados da Tabela 1 construiu-se a curva de sobrevivência à estreptomicina (Fig. 1).

Tabela 1 - Porcentagem de sobreviventes à estreptomicina. *Rhizobium japonicum* CB-1809 (média de seis repetições).

Concentrações de estreptomicina (mcg/ml)	Número de sobreviventes	Porcentagem de sobreviventes
0	$7,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^2$
4	$4,7 \times 10^8$	$6,7 \times 10$
8	$2,6 \times 10^8$	$3,7 \times 10$
16	$7,4 \times 10^6$	$0,1 \times 10$
32	$2,0 \times 10^4$	$2,8 \times 10^{-3}$
64	$2,2 \times 10^2$	$3,1 \times 10^{-5}$
128	$3,0 \times 10$	$4,3 \times 10^{-6}$

Foram isoladas três colônias que cresceram em meio YMA contendo 64 mcg/ml de estreptomicina, uma colônia que cresceu em meio YMA contendo 120 mcg/ml de estreptomicina e oito colônias que cresceram em meio YMA contendo 128 mcg/ml de estreptomicina, segundo a metodologia descrita em 3.2.1. A comparação entre a linhagem original e os mutantes, em relação ao nível de resistência é mostrada na Tabela 2. As Figuras 2, 3 e 4 mostram os mutantes *Str-r* 64 I, *Str-r* 120 e *Str-r* 128 IV, comparando-os com a linhagem original. Esses três mutantes foram utilizados nos experimentos posteriores.

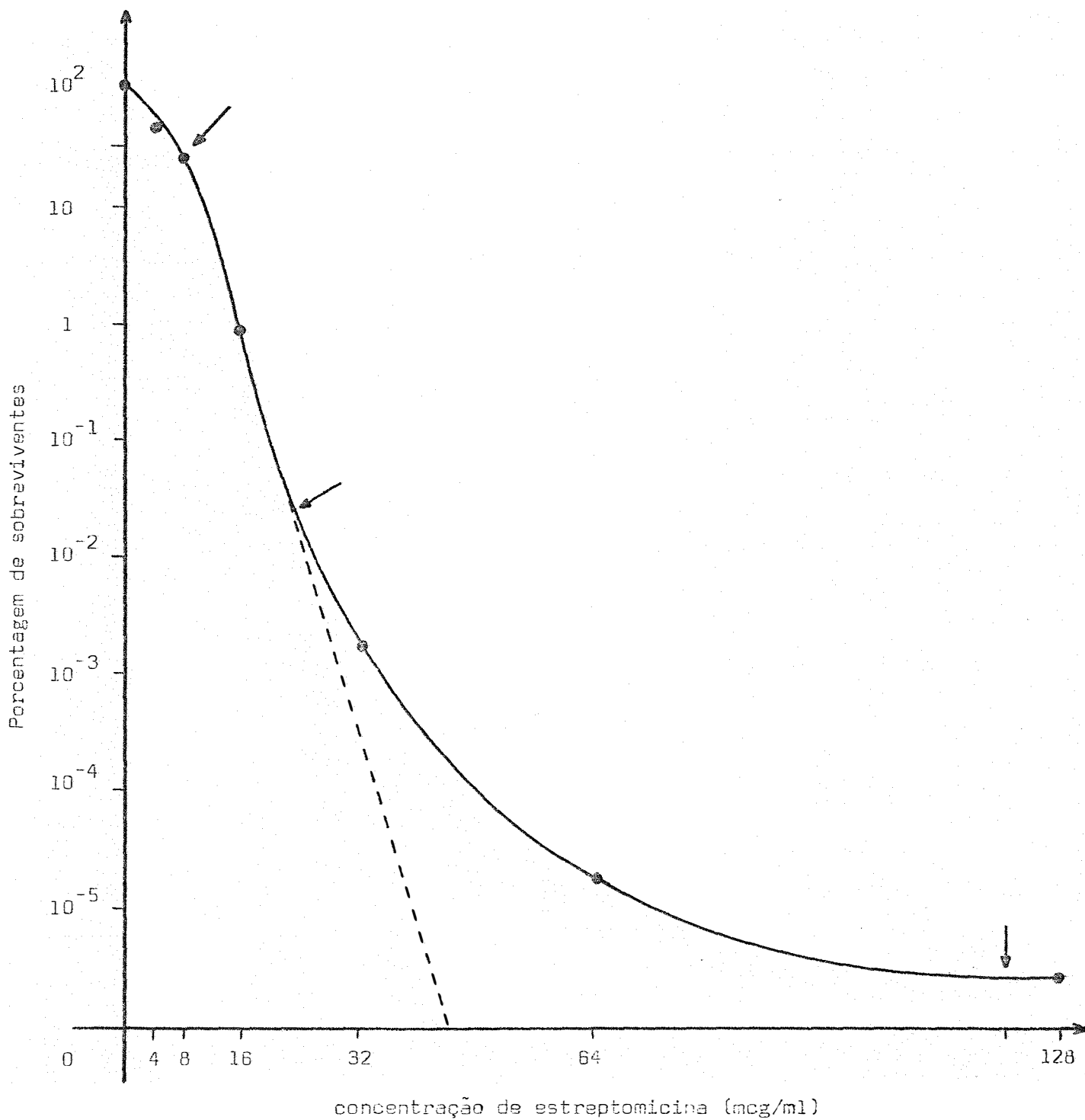


Fig. 1 - Curva de sobrevivência à estreptomicina. *Rhizobium japonicum* CB-1809. (média de seis repetições).



Fig. 2 - Comparação do crescimento da linhagem original com o mutante *Str-r* 64 I em meio com estreptomicina.



Fig. 3 - Comparação do crescimento da linhagem original com o mutante *Str-r* 120, em meio com estreptomicina.

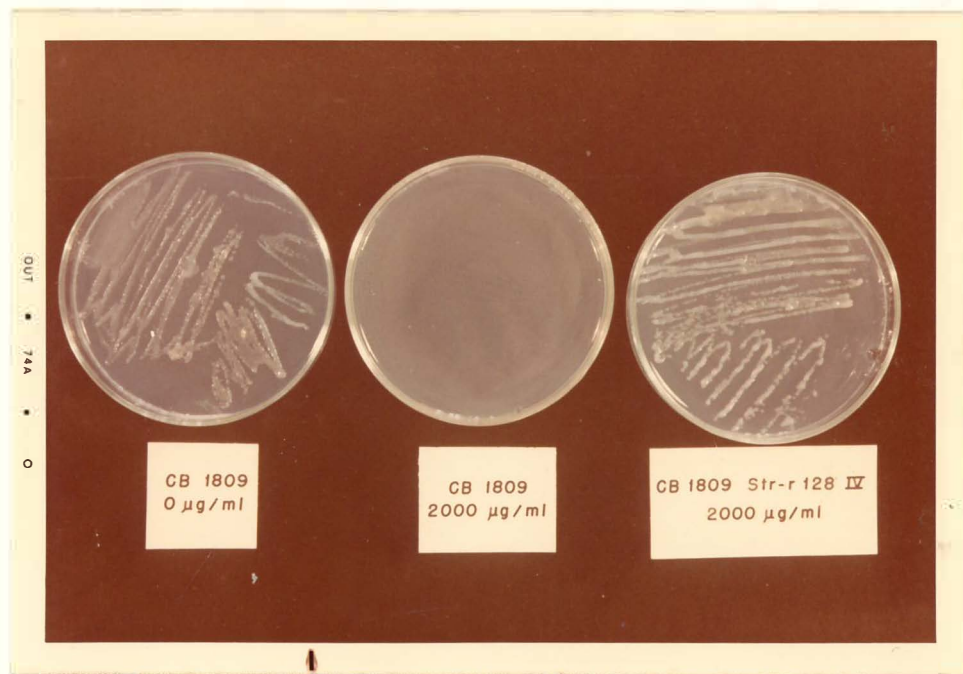


Fig. 4 - Comparação do crescimento da linhagem original com o mutante *Str-r* 128 IV, em meio com estreptomicina.

Tabela 2 - Mutantes resistentes à estreptomicina cultivados em meio YMA com diferentes concentrações de estreptomicina, comparação com a linhagem original.

Material ensaiado	Concentrações de estreptomicina (mcg/ml)					
	0	125	250	500	1000	2000
CB - 1809 - original	+	-	-	-	-	-
CB - 1809 <i>Str-r</i> 64 I	+	+	+	+	+	+
CB - 1809 <i>Str-r</i> 64 II	+	+	+	+	+	+
CB - 1809 <i>Str-r</i> 64 III	+	+	+	+	+	+
CB - 1809 <i>Str-r</i> 120	+	+	+	+	+	+
CB - 1809 <i>Str-r</i> 128 I	+	+	+	+	+	+
CB - 1809 <i>Str-r</i> 128 II	+	+	+	+	+	+
CB - 1809 <i>Str-r</i> 128 III	+	+	+	+	+	+
CB - 1809 <i>Str-r</i> 128 IV	+	+	+	+	+	+
CB - 1809 <i>Str-r</i> 128 V	+	+	+	+	+	+
CB - 1809 <i>Str-r</i> 128 VI	+	+	+	+	+	+
CB - 1809 <i>Str-r</i> 128 VII	+	+	+	+	+	+
CB - 1809 <i>Str-r</i> 128 VIII	+	+	+	+	+	+

+ crescimento

- ausência de crescimento

4.1.2. Curvas de crescimento

Os resultados dos experimentos descritos em 3.2.2. estão nas Tabelas 3, 4, 5 e 6, respectivamente, para a linhagem original, *Str-t* 64 I, *Str-t* 120 e *Str-t* 128 IV. A representação gráfica dos dados para as quatro linhagens está na Fig. 5.

Tabela 3 - Número médio de células viáveis por ml da linhagem original em diferentes tempos de cultivo.

Hrs. de cultivo	Diluições*	Nº médio de colônias p/placa**	Nº de bactérias viáveis p/ml	Nº de bactérias viáveis p/ml (média)	Redução a 1 bactéria
0	10^{-2}	149	$1,49 \times 10^5$	$1,49 \times 10^5$	1
12	10^{-2}	445	$4,45 \times 10^5$	$4,45 \times 10^5$	2,99
24	10^{-3}	443	$4,43 \times 10^6$	$4,06 \times 10^6$	$2,72 \times 10$
	10^{-4}	37	$3,70 \times 10^6$		
48	10^{-5}	58,5	$5,85 \times 10^7$	$6,42 \times 10^7$	$4,31 \times 10^2$
	10^{-6}	7	$7,00 \times 10^7$		
72	10^{-4}	538	$5,38 \times 10^7$	$6,65 \times 10^7$	$4,46 \times 10^2$
	10^{-5}	72,3	$7,23 \times 10^7$		
	10^{-6}	4	$4,00 \times 10^7$		
	10^{-7}	1	$10,00 \times 10^7$		
96	10^{-5}	240	$2,40 \times 10^8$	$3,62 \times 10^8$	$2,46 \times 10^3$
	10^{-6}	34,7	$3,47 \times 10^8$		
	10^{-7}	5	$5,00 \times 10^8$		
120	10^{-6}	45	$4,50 \times 10^8$	$4,50 \times 10^8$	$3,01 \times 10^3$

* - 0,1 ml plaqueado

** - Mínimo de 2 placas.

Tabela 4 - Número médio de células viáveis por ml da linhagem mutante *Stt-k* 64 I em diferentes tempos de cultivo.

Hrs. de cultivo	Diluições*	Nº médio de colonias p/placa**	Nº de bactérias viáveis p/ml	Nº de bactérias viáveis p/ml (média)	Redução a 1 bactéria
0	10^{-1}	92,7	$9,27 \times 10^3$	$4,90 \times 10^4$	1
	10^{-2}	89	$8,90 \times 10^4$		
12	10^{-2}	57	$5,70 \times 10^4$	$6,20 \times 10^4$	1,26
	10^{-3}	6,7	$6,70 \times 10^4$		
24	10^{-2}	71,5	$7,15 \times 10^4$	$5,58 \times 10^4$	1,14
	10^{-3}	4	$4,00 \times 10^4$		
48	10^{-3}	65	$6,50 \times 10^5$	$5,25 \times 10^5$	$1,07 \times 10$
	10^{-4}	4	$4,00 \times 10^5$		
72	10^{-4}	5	$5,00 \times 10^5$	$8,75 \times 10^6$	$1,79 \times 10^2$
	10^{-5}	17	$1,70 \times 10^7$		
96	10^{-5}	44	$4,40 \times 10^7$	$3,20 \times 10^7$	$6,53 \times 10^2$
	10^{-6}	2	$2,00 \times 10^7$		
120	10^{-5}	80,5	$8,05 \times 10^7$	$8,05 \times 10^7$	$1,64 \times 10^3$

* - 0,1 ml plaqueado.

** - Mínimo de 2 placas.

Tabela 5 - Número médio de células viáveis por ml da linhagem mutante *Str-n* 120 em diferentes tempos de cultivo.

Hrs. de cultivo	Diluições*	Nº médio de colônias p/placa**	Nº de bactérias viáveis p/ml	Nº de bactérias viáveis p/ml (média)	Redução a 1 bactéria
0	10^{-2}	73,3	$7,33 \times 10^4$	$7,33 \times 10^4$	1
12	10^{-2}	150	$1,50 \times 10^5$	$1,50 \times 10^5$	2
24	10^{-2}	365	$3,65 \times 10^5$		
	10^{-3}	53	$5,30 \times 10^5$	$4,65 \times 10^5$	6,30
	10^{-4}	5	$5,00 \times 10^5$		
48	10^{-3}	24	$2,40 \times 10^5$		
	10^{-4}	77	$7,70 \times 10^6$	$7,36 \times 10^6$	1×10^2
	10^{-5}	11,5	$1,15 \times 10^7$		
	10^{-6}	1	$1,00 \times 10^7$		
72	10^{-4}	217	$2,17 \times 10^7$		
	10^{-5}	31,3	$3,13 \times 10^7$	$2,88 \times 10^7$	$3,9 \times 10^2$
	10^{-6}	3,3	$3,30 \times 10^7$		
96	10^{-5}	151	$1,51 \times 10^8$		
	10^{-6}	10	$1,00 \times 10^8$	$1,26 \times 10^8$	$1,7 \times 10^3$
120	10^{-5}	112	$1,12 \times 10^8$		
	10^{-6}	16,3	$1,63 \times 10^8$	$1,38 \times 10^8$	$1,88 \times 10^3$

* - 0,1 ml plaqueado.

** - Mínimo de 2 placas.

Tabela 6 - Número médio de células viáveis por ml da linhagem mutante *Str-k* 128 IV, em diferentes tempos de cultivo.

Hrs. de cultivo	Diluições*	Nº médio de colônia p/placa **	Nº de bactérias viáveis p/ml	Nº de bactérias viáveis p/ml (média)	Redução a 1 bactéria
0	10 ⁻²	84,5	8,45 x 10 ⁴	8,45 x 10 ⁴	1
12	10 ⁻²	150	1,50 x 10 ⁵	1,50 x 10 ⁵	1,77
24	10 ⁻²	200	2,00 x 10 ⁵		
	10 ⁻³	51,8	5,18 x 10 ⁵	5,39 x 10 ⁵	6,37
	10 ⁻⁴	9	9,00 x 10 ⁵		
48	10 ⁻⁴	37,3	3,73 x 10 ⁶		
	10 ⁻⁵	1	1,00 x 10 ⁶	2,36 x 10 ⁶	2,79 x 10
72	10 ⁻⁴	238	2,38 x 10 ⁷		
	10 ⁻⁵	60	6,00 x 10 ⁷	3,46 x 10 ⁷	4,09 x 10 ²
	10 ⁻⁶	2	2,00 x 10 ⁷		
96	10 ⁻⁵	197	1,97 x 10 ⁸		
	10 ⁻⁶	14,5	1,45 x 10 ⁸	1,71 x 10 ⁸	2,02 x 10 ³
120	10 ⁻⁵	248	2,48 x 10 ⁸	2,48 x 10 ⁸	2,93 x 10 ³

* - 0,1 ml plaqueado.

** - Mínimo de 2 placas.

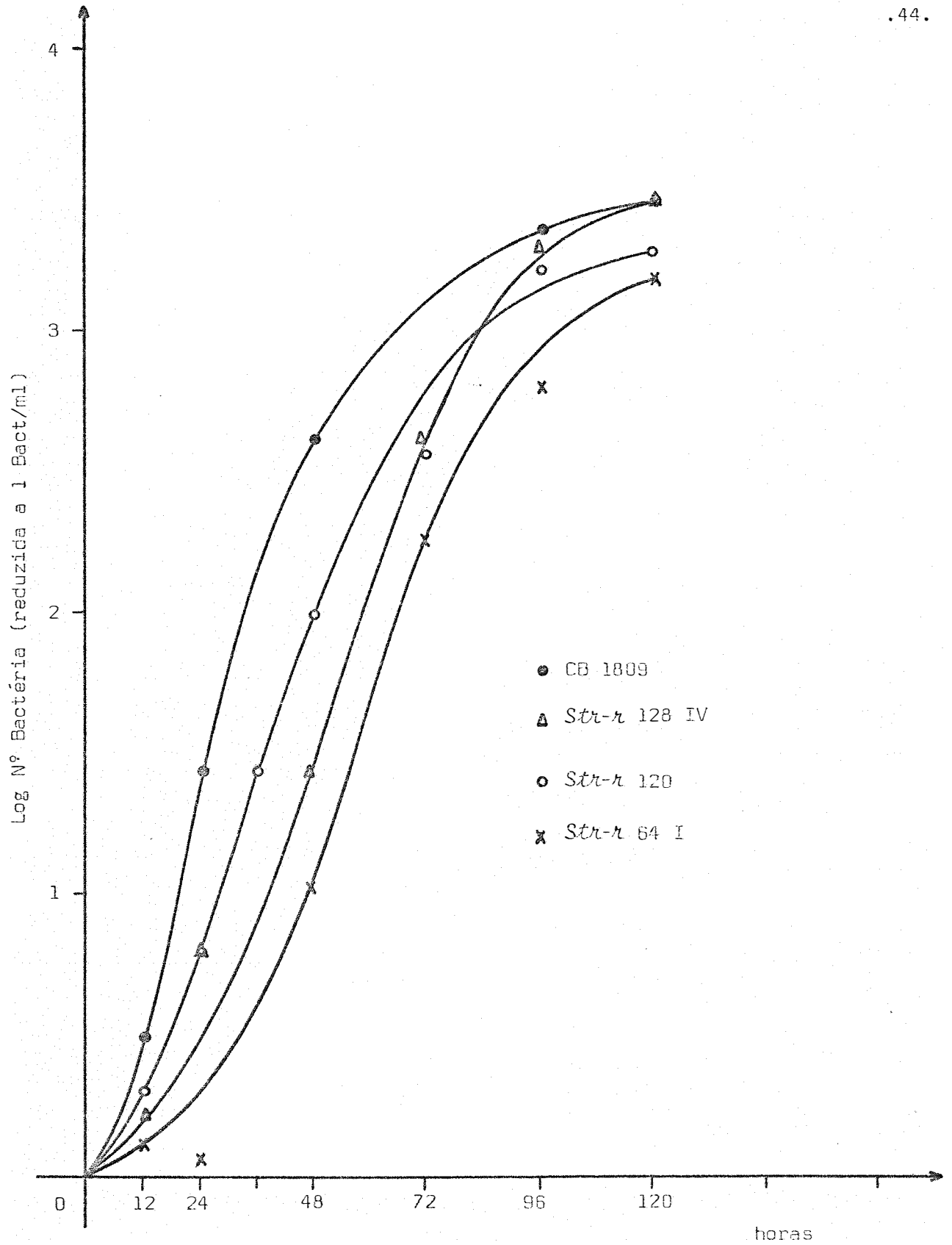


Fig. 5 - Curvas de crescimento de *Rhizobium japonicum* CB-1809
Rhizobium japonicum CB-1809 Str-r 64 I; Str-r 120 e
Str-r 128.

4.1.3. Determinação das taxas de crescimento das linhagens original e dos mutantes

As taxas de crescimento da linhagem original e dos mutantes, expressa em tempo de geração e em gerações por hora, são mostradas na Tabela 7.

Tabela 7 - Taxas de crescimento da linhagem original e dos mutantes.

Linhagens	Gerações/hora	Tempo de geração (hrs.)
Original	0,20	5,04
<i>Str-r</i> 64 I	0,08	11,65
<i>Str-r</i> 120	0,16	6,45
<i>Str-r</i> 128	0,11	9,11

As taxas foram calculadas segundo o item 3.2.3.

4.1.4. Determinação do crescimento da linhagem original em relação ao mutante *Str-r* 120, através de misturas de linhagens

Os resultados dos experimentos de competição entre linhagem original e mutante *Str-r* 120 estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Efeito do período de incubação em meio YMB sobre a porcentagem de linhagens original e estreptomicina resistente *Str-r* 120, de *Rhizobium japonicum* em mistura. (Resultado de 3 repetições).

Tempo de incubação (horas)	Nº total de bactérias*	Nº de bactérias resistentes	% Bactérias resistentes	Médias % bactérias resistentes
0	85	17	20,00	20,26
	84	21	25,00	
	76	12	15,79	
24	103	22	21,36	14,64
	109	13	11,93	
	141	15	10,64	
48	299	63	21,07	15,93
	116	20	17,24	
	116	11	9,48	
120	280	22	7,86	7,47
	290	18	6,21	
	312	26	8,33	
$\chi^2 = 48,1323^{***}$			$p = 0,1$	

* - 3 a 6 placas por repetição.

4.1.5. Determinação da força da estreptomicina através da mistura da linhagem original com a linhagem mutante *Str-r* 120.

a) Determinação da quantidade relativa de linhagens, cultivadas em mistura (Tabela 9), calculada como descrito em 3.2.5.

Tabela 9 - Quantidade relativa de linhagens, estreptomicina resistente e original, de *Rhizobium japonicum*, quando cultivadas em mistura.

Tempo (horas)	% Bactérias sensíveis	% Bactérias resistentes	% Bactérias resistentes (recalculada)	$x = \log_{10} \% \text{ resistentes (recalculada)}$
0	79,74	20,26	25,41	1,4050
24	85,36	14,64	17,15	1,2343
48	84,07	15,93	18,95	1,2776
120	92,53	7,47	8,07	0,9069

b) Determinação do coeficiente de regressão (κ) e da Meia Vida relativa ($MV\kappa$).

$$\kappa = - 0,0039 \pm 0,000787$$

$$MV\kappa \text{ máxima} = 97,10 \text{ horas}$$

$$MV\kappa \text{ média} = 77,20 \text{ horas}$$

$$MV\kappa \text{ mínima} = 64,04 \text{ horas}$$

A equação da reta é:

$$x = 1,39 - 0,0039 t$$

e está representada na Fig. 6.

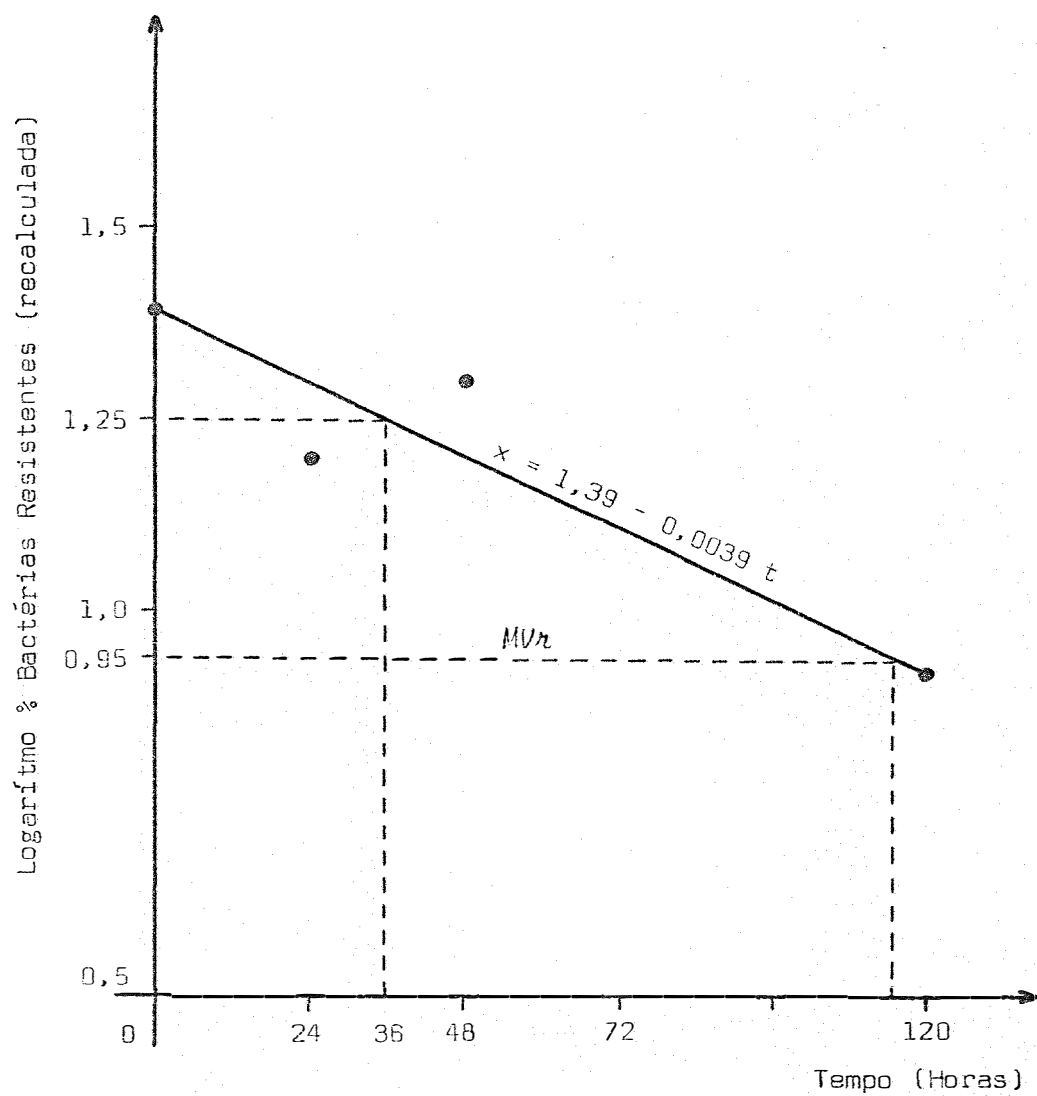


Fig. 6 - MVR da linhagem CB-1809 Str- κ 120 em relação a linhagem original CB-1809 de *Rhizobium japonicum*.

4.2. Resultados obtidos a partir do experimento em casa de vegetação

4.2.1. Determinação do nitrogênio total na planta, número e peso seco de nódulos

Na Tabela 10 são mostradas as médias de peso seco das plantas, de porcentagem de nitrogênio nas plantas, de nitrogênio total nas plantas, de número e de peso seco de nódulos, que foram determinados conforme a descrição 3.2.6.3.2. Também as análises de variância dos caracteres são apresentadas nesta Tabela.

A Figura 7 mostra aspectos das plantas inoculadas com a linhagem original, com mutantes e plantas sem inoculação adubadas com nitrogênio.



Fig. 7 - Aspecto do experimento em casa de vegetação. Da esquerda para a direita: plantas adubadas com nitrogênio, plantas inoculadas com *Rhizobium japonicum* CB-1809, e plantas inoculadas com um dos mutantes estreptomicina resistente (*Str-r*).

Tabela 10 - Resultados obtidos a partir do experimento em casa de vegetação. (Médias de 4 repetições de 3 plantas por vaso).

Tratamentos	Peso seco planta (g/vaso)	N%	N Total (mg/vaso)	Nódulos		
				Peso seco (mg/vaso)	Número	
Sem inoculação						
Sem nitrogênio	2,1945 c	1,141 b	25,045 c	0,00 b	0,00 d	
com nitrogênio	4,7950 a	2,625 a	125,803 a	0,00 b	0,00 d	
Com inoculação						
CB - 1809	3,3370 b	3,284 a	109,573 ab	379,80 a	80,00 a	
Stt-t 64 I	2,0468 c	1,136 b	23,188 c	0,00 b	0,00 d	
Stt-t 120	2,1498 c	1,100 b	23,660 c	0,00 b	0,00 d	
Stt-t 128 IV	2,0225 c	1,148 b	23,258 c	0,00 b	0,00 d	
CB - 1809 + Stt-t 64 I	2,8530 b	2,675 a	77,000 b	248,21 a	29,00 c	
CB - 1809 + Stt-t 120	3,4968 b	3,019 a	106,568 ab	353,05 a	52,00 b	
CB - 1809 + Stt-t 128 IV	3,2668 b	3,197 a	104,580 ab	337,21 a	52,00 b	
Fontes Variação Gl						
Tratamentos	8	31,18***	40,98***	38,58***	123,79***	843,27***
Resíduo	26					
Tukey (p = 0,05)		0,846	0,777	36,042	4,06	0,85
C.V. (%)		11,40	14,30	20,90	19,87	9,70

Os dados de número e peso seco de nódulos foram analisados transformados $\sqrt{x + 0,5}$. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as médias, ao nível de 5%.

4.2.2. Eficiência relativa da linhagem original determinada através do peso seco das plantas

Determinada como descrito em 3.2.6.3.3. a eficiência relativa ($E_f r$) da linhagem original foi de 69,50%. Quando inoculada em mistura com o mutante *Str-r* 64 I a eficiência relativa foi reduzida para 59,45%. Em mistura com o mutante *Str-r* 120 a $E_f r$ foi 73,00% e em mistura com o *Str-r* 128 IV foi de 68,10%.

4.2.3. Avaliação das fontes de nitrogênio nas plantas

As quantidades de nitrogênio nas plantas, calculadas segundo o item 3.2.6.3.4 estão na Tabela 11.

Tabela 11 - Fontes de nitrogênio nas plantas.

Fontes de nitrogênio	mg N por vaso
Reserva da semente	23,787
Adubação nitrogenada	102,016
Fixação biológica por CB - 1809	83,120

4.2.4. Atividade da nitrogenase

A Tabela 12 mostra a atividade da enzima nitrogenase determinada e calculada de acordo com o descrito em 3.2.6.3.1.

4.2.5. Reisolamento após passagem no hospedeiro

Não houve crescimento nas placas que continham meio de cultura mais antibiótico.

5. DISCUSSÃO

5.1. Curva de sobrevivência a estreptomicina

O aumento da concentração de estreptomicina no meio de cultura provoca um decréscimo no número de colônias formadas, o que é evidenciado pela Tabela 1. A curva de sobrevivência (Fig. 1) pode ser dividida em quatro partes, cujos limites estão assinalados por setas. A primeira parte atinge 8 mcg/ml mostrando que a viabilidade cai, relativamente, muito pouco com as primeiras doses do antibiótico, obtendo-se ainda 37% de sobreviventes. A segunda parte da curva vai de 8 mcg/ml a cerca de 24 mcg/ml, percebendo-se um decréscimo acentuado do número de sobreviventes com o aumento da concentração da estreptomicina, decréscimo esse que ocorre, praticamente, em ritmo exponencial negativo. Na terceira parte

da curva (de cerca de 24mcg/ml até cerca de 120mcg/ml) o decréscimo da viabilidade deixa de ser exponencial, caindo menos acentuadamente. A quarta parte torna-se paralela ao eixo das abcissas, mostrando que sempre aparecerão sobreviventes resistentes a droga.

O modelo de sobrevivência obtido demonstra que a população de *Rhizobium japonicum* CB-1809 não é uniforme. Se a população fosse uniforme, só seriam encontradas as duas primeiras partes da curva, sendo que a queda da viabilidade continuaria em escala logarítmica negativa seguindo a linha pontilhada teórica indicada na Fig. 1. A diferença entre essa linha teórica e a linha observada (terceira parte da curva) mostra que existem na população indivíduos com diferença de resistência (há os mais resistentes e os menos resistentes, constituindo-se estes últimos a maioria da população). A quarta parte da curva representa um pequeno número de indivíduos que são altamente resistentes a estreptomicina.

O comportamento da bactéria em relação a estreptomicina vem apoiar a hipótese de que existem vários genes, com diferentes potenciais, determinando resistência a esse antibiótico (AZEVEDO, 1961). Isto explica porque os mutantes de *Rhizobium trifolii*, isolados por ZELAZNA-KOWALSA (1971) apresentaram resistências diferentes a doses de estreptomicina, dentro de uma mesma estirpe. Resultados semelhantes foram encontrados por DEMEREC (1951) em *Escherichia coli*; AZEVEDO (1961) em *Xanthomonas campestris* e SCHWINGHAMER & DALMAS (1961) em *Rhizobium trifolii*, confirmando assim que modelo de resistência é uma característica do antibiótico (GURGEL & AZEVEDO, 1975).

No presente trabalho tentativas de isolar mutantes resistentes a diferentes doses de estreptomicina mostraram que todas as colônias isoladas e ensaiadas foram, de imediato, resistentes a altas concentrações da estreptomicina, como pode ser constatado pelos resultados apresentados na Tabela 2. Assim, a mutação deve ter ocorrido no gene que determina o maior potencial de resistência, tornando a bactéria altamente resistente ao antibiótico em uma só passagem, segundo o modelo de "um só passo" (DEMEREC, 1948). Nesse particular, isolamentos de maior número de colônias deverão ser feitos para tentar conseguir mutantes a diferentes doses de estreptomicina.

Os mutantes obtidos foram resistentes sem serem dependentes de estreptomicina. Não se mostraram morfológicamente diferentes da estirpe original, apresentando, inclusive a característica de produção de álcali, o que foi indicado pelo azul de bromotimol no meio YMA (Figs. 2, 3, 4). ZELAZNA-KOWALSKA (1971) encontrou mutantes de *R. trifolii* resistentes a 100mcg/ml de estreptomicina que se tornaram dependentes da droga e tiveram sua morfologia alterada, de colônias lisas para colônias rugosas. Uma explicação para o caso é que provavelmente, outros genes mutaram além do que conferiu resistência a estreptomicina. KLECZKOWSKA (1950) encontrou que morfologia da colônia em *Rhizobium trifolii* era independente do caráter resistência a estreptomicina, de resistência a fagos e de fixação do nitrogênio.

Pelos dados obtidos pode-se verificar que resistência natural a estreptomicina por *Rhizobium japonicum* CB-1809, ou seja, a concentração mínima inibitória (CMI) está em torno de 10mcg/ml a 16mcg/ml, o que concorda com dados obtidos por ELKAN (1971) e SCHWINGHAMER & DUDMAN (1973).

5.2. Curvas de crescimento e taxas de crescimento das linhagens original e mutantes

Observando-se a Fig. 5 representativa das Tabelas 3, 4, 5 e 6, verifica-se que a sequência de crescimento dos mutantes estreptomicina-resistentes, estudados, embora possuísse certa similaridade com a estirpe original, apresentou, entretanto, algumas diferenças. O mutante *Str-r* 64 I sofreu um retardamento de entrada na fase logarítmica. O mutante *Str-r* 128 inicialmente foi semelhante ao *Str-r* 120 mas na fase log mostrou-se mais lento e entre 84 e 120 horas tendeu a crescer mais que o *Str-r* 120. A fase exponencial foi mais prolongada para os mutantes, que para a estirpe original, pois esta teve sua fase log até as 48 horas de cultivo, passando daí a um crescimento lento até atingir o platô e para os mutantes prolongou-se até mais ou menos 72 e até 96 horas de cultivo; este aspecto parece ter sido o fator que contribuiu para os mutantes alcançarem 10^8 células/ml ao final de 120 horas juntamente com a estirpe original.

Nas placas de contagem o crescimento visível das colônias da estirpe original foi sempre mais rápido (5 dias) que dos mutantes (7 a 10 dias). As colônias do mutante *Str-k* 120 eram iguais as da original enquanto que as dos mutantes *Str-k* 64 I e *Str-k* 128 eram ligeiramente menores.

O tempo de geração, isto é, o tempo necessário para as células dobrarem o seu número foi de aproximadamente 5 horas para a estirpe original, 12 horas para o mutante *Str-k* 64 I, 6 horas para o *Str-k* 120 e 9 horas para o *Str-k* 128, o que vem evidenciar ser o mutante *Str-k* 120 o mais aproximado da original e esclarecer o seu aparecimento nas placas de contagem logo após a original e antes dos demais mutantes.

O tempo de geração obtido para a estirpe original assemelha-se ao tempo de geração encontrado para a estirpe 508 de *Rhizobium japonicum* e os tempos de geração calculados para os mutantes estão, praticamente dentro dos limites encontrados por *ELKAN*, 1971 (de 3 a 10 horas). Também as estirpes estudadas pelo autor citado atingiram o platô com 120 horas de cultivo, alcançando todas ao final, similar concentração de células, uma vez que as estirpes com menores taxas de crescimento tiveram redução da fase log.

No presente trabalho, as menores taxas de crescimento dos mutantes foram compensadas com período mais longo da fase log.

SCHWINGHAMER & DALMAS (1961) encontraram que mutantes resistentes a eritromicina em *R. trifolii* tiveram o seu crescimento mais vagaroso que a estirpe original T₅.

DAMERY & ALEXANDER (1969) não encontraram alterações entre as taxas de crescimento das estirpes normais e dos mutantes resistentes a canamicina, de *Rhizobium trifolii* (4,5 horas para a estirpe 86 e seu mutante 86 KA e 4,7 e 4,8 horas para a estirpe 205 e seu mutante 205 KA, respectivamente).

É citado na revisão de *WATANABE* (1972) que células resistentes com tempo de geração inalterado indicam, geralmente, uma resistência devida a plasmídeo. Dados semelhantes foram encontrados por *AOKI-WATANABE* (1973).

No caso presente, parece haver uma confirmação de que a mutação ocorrida foi cromossomal pois os mutantes tiveram taxas de crescimento alteradas e desenvolveram-se em altas concentrações de estreptomicina (2000 mcg/ml praticamente 20x a CMI, concordante com *SCHWINGHAMER, 1967b*) indicando não se tratar de mutação epissômica.

DEMEREZ (1951) constatou em *Escherichia coli* a desvantagem seletiva dos mutantes resistentes, achando tempo de geração igual a 20 minutos para a selvagem e 25 minutos para os resistentes. *AZEVEDO & NEDER (1963)* acharam que o tempo de geração de mutantes aureomicina resistentes de *Xanthomonas campestris* era de 131 minutos, enquanto para a estirpe sensível o tempo de geração foi de 96 minutos.

Uma vez que as taxas de crescimento dos mutantes foram diminuídas, o gene preexistente que foi alterado produzindo mutação que confere resistência a estreptomicina parece controlar uma importante função no metabolismo do *Rhizobium japonicum* CB - 1809 (*BERGAMIN FILHO, 1973*).

5.3. Força do antibiótico

Verificou-se que estreptomicina funcionou como uma pressão seletiva modificando a proporção de genótipos da população de *Rhizobium japonicum* CB - 1809. Após a remoção da pressão seletiva, isto é, voltando a cultivar os mutantes em meio sem estreptomicina, houve uma seleção em direção a população original - Seleção Estabilizadora (*VAN DER PLANK, 1968*), daí porque estreptomicina comportou-se como uma droga forte em relação a estirpe de bactéria estudada.

Força da droga é uma característica do complexo droga-microrganismo. Dois mutantes resistentes a uma mesma droga mas cada um deles tendo um gene diferente conferindo resistência, a força da droga será forte se todos os mutantes tiverem suas taxas de crescimento em relação a da sensível diminuídas; se as taxas de crescimento aumentarem, a droga será fraca e se as taxas de crescimento mantiverem-se inalteradas, a droga será neutra (*BERGAMIN FILHO, KIMATI & AZEVEDO, 1975*). O primeiro caso foi o que se observou, no presente trabalho.

Para determinar quantitativamente a força da estreptomicina em relação ao *Rhizobium japonicum* CB-1809 (através do mutante resistente e com base no conceito de Meia Vida relativa (MVr) utilizou-se o método da mistura da estirpe original com a mutante, por ser considerado o de maior precisão e o que mais se assemelha ao que ocorre em condições naturais.

Analisando-se a Tabela 8 verifica-se que houve diferença significativa entre o número de bactérias sensíveis e resistentes nos diversos tempos ensaiados, tendo a percentagem final de mutantes resistentes (7,47%) diferido estatisticamente da percentagem inicial (20,26%) no espaço de 120 horas. AZEVEDO & NEDER, 1963 encontraram para *Xanthomonas campestris* uma redução de 48,5% para 14,3% em 72 horas e BERGAMIN FILHO (1973) encontrou redução de 61,51% para 51,96% em 96 horas para *Corynebacterium michiganense*. Pode-se deduzir por esses dados que para *Xanthomonas*, estreptomicina é ainda mais forte que para *Rhizobium japonicum* CB-1809.

O valor obtido para o coeficiente de regressão ($r = -0,0039 \pm 0,000787$) é próximo do encontrado para *Corynebacterium michiganense* ($r = -0,00179 \pm 0,0007681$) por BERGAMIN FILHO, 1973. O sinal negativo do coeficiente de regressão indica que estreptomicina é uma droga forte em relação ao *Rhizobium japonicum* CB-1809 à semelhança do que ocorreu para *C. michiganense*, notando-se uma ligeira tendência de ser mais forte para *Rhizobium*.

Os valores de MVr foram mais baixos que os encontrados para *C. michiganense* (MVr máxima = 294,52; MVr média = 168,16 e MVr mínima = 117,64) indicando que a ação da estreptomicina é mais forte para *Rhizobium japonicum* CB-1809 pois bastam 77 horas para a população de resistentes cair até a metade em relação a população da selvagem (BERGAMIN FILHO, 1973).

Os dados obtidos permitiram a construção da Fig. 6 onde se vê traçada a linha de regressão ($x = 1,39 - 0,0039 t$) e onde se nota $MVr = 77$, conforme o calculado.

Estes dados vem confirmar tratar-se de uma mutação cromossomal pois desde que a resistência seja dada por aquisição de fatores R, as bactérias ganham genes de resistência e não perdem aqueles outros genes que possibilitam ocorrência de Seleção Estabilizadora.

5.4. Infecciosidade das linhagens normal e mutantes

Pela Tabela 10, nota-se a ausência de nodulação em todas as plantas cujas sementes foram inoculadas unicamente com estirpes mutantes, o que evidencia que os mutantes isolados, resistentes a estreptomicina foram não nodulantes.

O número de nódulos nas plantas inoculadas com mistura de linhagem normal e mutante, foi inferior ao número de nódulos nas plantas inoculadas só com a estirpe original. Isto é perfeitamente compreensível uma vez que o número de células da estirpe original, no primeiro caso, foi da ordem de 5×10^7 cél/ml (e o mutante que foi introduzido, também nessa ordem, não foi nodulante) enquanto em inoculação isolada o número de células foi de 10^8 cél/ml.

Percebe-se, entretanto, que este fato não teve influência sobre o peso dos nódulos, que foi estatisticamente igual em todos os casos, mesmo nas plantas inoculadas com CB-1809 *Str-r* 64 I, que deu menor número de nódulos, o que vem comprovar que há um equilíbrio de compensação entre número de nódulos e tamanho do tecido nodular, por meio de um mecanismo auto-regulador controlado geneticamente (NUTMAN, 1967). Comprovou-se também que 5×10^7 cél/ml já é uma boa fonte de infecção.

O peso seco das plantas que receberam adubação nitrogenada foi maior que o das plantas inoculadas com estirpe normal, porém a porcentagem de nitrogênio, nas plantas, foi estatisticamente igual em ambos, indicando a eficiência da inoculação.

Nitrogênio total nas plantas que foram inoculadas com mistura das linhagens original e mutante *Str-r* 64 I mostrou-se inferior em relação as demais plantas noduladas, podendo isto ser devido ao replantio de plântulas (para obtenção do "stand" de 3 plantas/vaso) que só então receberam inoculação. Para maior garantia da inoculação, portanto, a mesma deveria ser feita antes do plantio.

A determinação da atividade da nitrogenase (Tabela 12) confirma os dados obtidos pelo método de determinação de nitrogênio total nas plantas. Houve redução na atividade da nitrogenase quando a linhagem origi-

nal foi inoculada junto com *Str-π* 64 I. Verifica-se neste tratamento que a porcentagem de nitrogênio equivaleu ao das plantas adubadas com ni- trogênio e nos demais tratamentos onde houve nodulação, a porcentagem foi ligeiramente superior, porém não houve diferença significativa entre e- les.

As plantas que foram inoculadas só com mutantes. comportaram-se em todos os aspectos semelhantes as plantas controles (sem adubação ni- trogenada e sem inoculação) como pode ser visto nos dados da Tabela 10.

Em relação as plantas adubadas com nitrogênio, a estirpe origi- nal mostrou-se com uma eficiência de 70%, revelando-se bastante eficien- te. As diferenças encontradas foram devidas a completa ausência de ni- trogênio combinado, nos vasos, para suprir o período da "fome de nitrogê- nio".

Os dados apresentados na Tabela 11 indicam a necessidade de, pe- lo menos, uma quantidade mínima de nitrogênio combinado no início do de- senvolvimento da planta, pois entre o esgotamento da reserva da semente e o início da fixação biológica do nitrogênio, a planta ressentia-se da falta de nitrogênio conseguindo menor desenvolvimento como foi comprova- do pelo peso seco (Tabela 10).

Pelo exposto, pode-se verificar que a mutação, na estirpe CB 1809 de *Rhizobium japonicum*, para resistência a estreptomicina foi acompanha- da da perda de capacidade de formar nódulos na soja, planta hospedeira. Diante disso, pode-se pensar que a mutação ocorrida concorreu, de algum modo, para a perda de infecciosidade, isto é, os mutantes não foram há- beis em penetrar nas raízes, ou então, a infecciosidade não foi altera- da mas sim passos iniciais do desenvolvimento para formação de nódulos.

Para saber qual das duas características foi inibida, trabalhos citológicos devem ser conduzidos à semelhança do que foi feito por *HI- GASHI (1967)* que detectou presença de cordão de infecção em trevo inocu- lado com "progênie" de (*Rhizobium trifolii* x *Rhizobium phaseoli*), indi- cando que foram capazes de infectar, eram portanto In_3^+ , porém não desen- volveram os demais passos da nodulação e por isso eram não nodulantes (NN).

Três hipóteses podem ser levantadas com base nos resultados obti- dos:

- 1) O gene mutado confere alta resistência a estreptomicina e a perda da eficiência ou infecciosidade é um efeito pleiotrópico.
- 2) O gene mutado é um gene determinante da eficiência ou infecciosidade que ao mutar acarreta resistência a estreptomicina.
- 3) tanto o gene que confere alta resistência a estreptomicina em *Rhizobium*, como um gene que determina a eficiência do processo da fixação de nitrogênio sofreram mutação, de forma dependente ou independente.

Se a primeira hipótese fosse a verdadeira poderia ser pensado que sempre que o indivíduo fosse resistente a altas doses de estreptomicina seria também não nodulante. Poderia se aventar que essa primeira hipótese seria contrariada pelos trabalhos de GUPTA & KLECZKOWSKA (1962) que encontraram em *Rhizobium trifolii* mutantes resistentes a 500 mcg/ml de estreptomicina e que em sua maioria foram eficientes; de SCHWINGHAMER (1967a) que obteve entre mutantes resistentes a doses maiores que 100mcg/ml de estreptomicina, em *Rhizobium trifolii*, aqueles que continuaram eficientes e os que perderam parcialmente a eficiência; de OBATON (1971) que trabalhou com mutantes de *R. meliloti* resistentes a 740 mcg/ml de estreptomicina e eram eficientes. ABDEL-WAHAB, RIFAAT & HAMDI (1973) encontraram em *Rhizobium trifolii* mutantes resistentes a doses de 100 mcg/ml e 400 mcg/ml de estreptomicina que não perderam a eficiência. SCHWINGHAMER & DUDMAN (1973) também encontraram em *R. trifolii* mutantes resistentes a doses superiores a 250 mcg/ml de estreptomicina, eficientes e não eficientes.

No entanto, sabendo-se que o gene responsável pela resistência ao antibiótico estreptomicina em bactérias é o gene responsável pela produção de uma proteína ribossômica, a proteína S12 da sub-unidade 30S (DAVIES, 1964; COX, WHITE & FLAKS, 1964) que uma vez alterada impede a ação do antibiótico em questão (TRAUBE & NOMURA, 1968) é razoável supor-se que mutações em diferentes sítios desse gene poderiam produzir diferentes efeitos. Assim, mutação em um determinado sítio poderia ocasionar alteração na sequência de aminoácidos da proteína e conseqüente alteração na conformação da mesma levando a uma aquisição de resistência da bactéria

mutada sem alterar a eficiência. Em outros casos o sítio mutado poderia ocasionar a produção de uma proteína que simultaneamente acarretaria resistência a estreptomicina e perda de eficiência. Mutações em diferentes sítios, de um mesmo gene, causando efeitos diversos já são bastante conhecidos em microrganismos e os casos mais discutidos se referem a mutações no gene de triptofano sintetase em *Neurospora* e *Escherichia coli* (YANOFSKY, CARLTON, GUEST, HELSINKI & HENNING, 1964 e YANOFSKY, DRAPEAU, GUEST & CARLTON, 1967). Para que essa hipótese seja comprovada ou não, futuros estudos terão que ser realizados obtendo-se mais mutantes resistentes ao antibiótico, ensaiando-se as suas capacidades de nodulação e efetuando-se a seguir experimentos de recombinação entre os diferentes mutantes e ensaiando-se a resistência e eficiência desses recombinantes intragênicos.

A segunda hipótese seria válida se todos os indivíduos não nodulantes fossem resistentes a altas concentrações de estreptomicina.

O trabalho de ZELAZNA-KOWALSKA (1971) pode servir de argumento contra a segunda hipótese, uma vez que a autora obteve mutantes não nodulantes resistentes a altas concentrações de estreptomicina (100 mcg/ml) e a baixas concentrações (10 mcg/ml - 20 mcg/ml), em *Rhizobium trifolii*. Entretanto, mais uma vez pode-se pensar que diferentes sítios mutantes dentro de um mesmo cistron possam estar envolvidos, acarretando efeitos diversos.

Para o caso da terceira hipótese, então, existiriam indivíduos não nodulantes-sensíveis, não nodulantes-resistentes a doses elevadas de estreptomicina, nodulantes-sensíveis e nodulantes-resistentes.

A terceira hipótese tem como apoio o mesmo trabalho de ZELAZNA-KOWALSKA (1971) em *R. trifolii* que usando um mutante *Str-n* 100 (500) NN como doador e *Str-n* eficiente, como receptora, obteve transformantes *Str-n* 500 NN.

No entanto, sabendo-se que mutação espontânea é um evento raro, seria altamente improvável, embora não impossível, que duas mutações independentes ocorressem na mesma bactéria acarretando uma delas resistên-

cia e a outra, perda de eficiência. Talvez esses dois genes mutados fossem ligados de tal modo que um único evento fosse o responsável pelas duas alterações. Se esses dois genes estivessem contíguos ao longo do material genético da bactéria, uma deleção poderia eliminá-los conjuntamente mas é muito provável que esta, causasse também letalidade. A deleção poderia, entretanto, ser apenas parcial, envolvendo uma pequena porção dos dois cistrons o que acarretaria produção de proteínas com atividades modificadas de tal maneira que suas funções fossem apenas parcialmente alteradas, sem causar letalidade.

Outras explicações mais especulativas, como as que envolvem sistema de regulação, poderiam ser levantadas mas, em qualquer dos casos, futuros estudos com um grande número de mutantes de efeitos diversos e sistemas de recombinação terão que ser realizados.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

Utilizando-se a estirpe CB - 1809 de *Rhizobium japonicum* foram isolados mutantes resistentes a estreptomicina com o propósito de estudar o comportamento dos mesmos comparativamente a estirpe sensível original.

Determinou-se a curva de sobrevivência da estirpe original frente a estreptomicina resultando que o modelo de resistência seguido foi o de "um só passo", encontrando-se a CMI em torno de 10 - 16 mcg/ml de estreptomicina.

Foram obtidas curvas de crescimento das linhagens sensível e resistentes a estreptomicina e através delas calculadas as taxas de crescimento das mesmas. O tempo de geração variou de 5 horas a 12 horas, havendo diminuição na taxa de crescimento dos mutantes resistentes.

Crescimento em mistura de linhagens original e mutante resistente a estreptomicina mostrou que a porcentagem de mutantes caiu de 20,26% no início do cultivo para 7,47% ao final de 120 horas de cultivo. O valor da Meia Vida relativa (MV_r) no caso foi de 77 horas.

Inoculação de soja, em experimento de casa de vegetação, revelou que os mutantes perderam a capacidade de nodular, enquanto a estirpe original apresentou eficiência em fixar nitrogênio de ordem de 70% em relação as plantas adubadas com nitrogênio. A atividade da nitrogenase, medida em cromatógrafo de gás, foi em torno de 35 mcMoles de N_2 fixado/hora/vaso. Hipóteses para explicar a perda da capacidade nodulatória pelos mutantes resistentes, são discutidas.

Dos resultados podemos, portanto, concluir que:

- 1) Com relação a estreptomicina a concentração mínima inibitória para *Rhizobium japonicum* CB-1809 está em torno de 10mcg/ml - 16 mcg/ml.
- 2) O modelo de resistência a estreptomicina seguido é o de "um só passo".
- 3) As mutações para resistência obtidas foram cromossomais, em vista da alta resistência e das diminuições das taxas de crescimento dos mutantes.
- 4) Estreptomicina mostrou-se uma droga forte para a estirpe estudada e em 77 horas de cultivo, a população de mutantes cai para metade da população original.
- 5) Os mutantes estreptomicina-resistentes perderam a capacidade de nodular soja, planta hospedeira da estirpe original.

7. SUMMARY AND CONCLUSIONS

Streptomycin resistant mutants were obtained from the CB 1809 strain of *Rhizobium japonicum* with the aim to study the behaviour of such mutants in comparison with the original strain.

The survival curve of the original strain in the presence of streptomycin did show that the followed model was the "one step" resistant model. The MIC was around 10 - 16 mcg/ml of streptomycin.

The growth curves of original and streptomycin resistant strains were obtained and from them were determined the generation times for each studied strain. Generation times varied from 5 to 12 hours and the growth rates of resistant mutants were allways bellow of that of the original sensitive strain.

A mixed growth of a mutant strain and the original strain did show that the percentage of mutants decreased from 20,25% to 7,47% after 120 hours of mixed culture. The value of the relative half life was 77 hours.

Resistant mutant strains were not able to nodulate *Glicine max.* The original strain, on the other hand, did show efficiency in nitrogen fixation of about 70% in relation to plants which received nitrogen. The nitrogenase activity, measured by gas chromatography was around 35 mcMoles of fixed N_2 /hour/vase. The possible causes of the nodulation inability of the resistant mutants are discussed.

From the obtained results the following conclusions can be drawn:

- 1) In relation to streptomycin the MIC for *Rhizobium japonicum* CB 1809 was between 10 mcg/ml to 16 mcg/ml.
- 2) The resistance model was the "one step" model.
- 3) The resistant mutants obtained had chromosomal mutations which conferred resistance to the antibiotic since the growth rate decreased and high levels of resistance were obtained in all cases.
- 4) Streptomycin could be considered a strong drug in relation to the studied strain. After 77 hours of mixed growth, the mutant population decreased to half of the original mutant population.
- 5) All the streptomycin resistant mutants tested were not able to nodulate *Glicine max.*

8. BIBLIOGRAFIA CITADA

ABDEL-WAHAB, S.M.; RIFAAT, O.M. & HAMDI, Y.A. - Characteristics of certain antibiotic-resistant mutants of *Rhizobium trifolii* strains. GIAM IV. São Paulo, Brasil, julho 1973.

AOKI-WATANABE, D.S. - Contribuição ao estudo do crescimento de *Escherichia coli* sensível e resistente a drogas por mutação e aquisição de fatores R. Tese Doutorado Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, São Paulo, 1973.

ATKINS, G.J. & HAYES, A.H. - Surface changes in a strain of *Rhizobium trifolii* on mutation to bacteriophage resistance. *Journal General Microbiology* 73: 273 - 278, 1972.

- AUGHTRY, J.D. - Effect of genetic factors in *Medicago* in symbiosis with *Rhizobium*. *Memoir* n° 280. Cornell University, Ithaca, N.Y., 1974.
- AZEVEDO, J.D. de - Resistência e mutação de *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson, em relação a alguns antibióticos. Tese Doutorado Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, São Paulo, 1961.
- AZEVEDO, J.L. de & NEDER, R.N. - Comparação entre o crescimento de *Xanthomonas campestris* (Pammel) linhagens mutantes resistentes a antibióticos e linhagens não mutantes de Pammel Dowson. *Anais da ESALQ* 20: 160 - 173, 1963.
- AZEVEDO, J.L. de & NEDER, R.N. - Manual de Genética de Bactérias. Publicação Didática n° 10, IGEN - ESALQ, Piracicaba, São Paulo, 1968.
- BALASSA, G. - Genetic transformation of *Rhizobium*: a review of the work of R. Balassa. *Bacteriological Reviews* 27: 228 - 241, 1963.
- BALASSA, R. - Transformation of a strain of *Rhizobium lupini*. *Nature*, London 188: 246 - 247, 1960.
- BERGAMIN FILHO, A. - O conceito de força de drogas ilustrado com resistência de *Corynebacterium michiganense* (Smith) Jensen a antibióticos. Dissertação para grau de Mestre, ESALQ, Piracicaba, São Paulo, 1973.
- BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. & AZEVEDO, J.L. de - O conceito de força de drogas. *Summa Phytopathologica* 1: 31 - 42, 1975.
- BERGERSEN, F.J. - The Biochemistry of symbiotic nitrogen fixation in legumes. In *As Leguminosas na Agricultura Tropical*: 98 - 121. Editores J.Dobereiner, P.A.da Eira, A.A. Franco e A.B. Campelo. IPEACS, Rio de Janeiro, 1971.

- BERGERSEN, F.J.; BROCKWELL, J.; GIBSON, A.H. & SCHWINGHAMER, E.A. - Studies of natural populations and mutants of *Rhizobium* in the improvement of legume inoculants. *Plant and Soil*, Volume Especial: 3 - 16, 1971.
- BERGERSEN, F.J. & NUTMAN, P.S. - Symbiotic effectiveness in nodulated red clover. IV. The influence of the host factors i_1 and i_e upon nodule structure and cytology. *Heredity* 11: 175 - 184, 1957.
- BERINGER, J.E. - R-factor transfer studies in *Rhizobium leguminosarum*. Simposy Bacterial Plasmids, 28th Meeting Society General Microbiology, Kent, Canterbury, 1973.
- BERTALMIÓ, M. BARATE de - Modificación de las propiedades simbióticas en mutantes adenina-dependentes de *Rhizobium trifolii*. VI RELAR, Montevideo, Uruguay, outubro 1972.
- BERTALMIÓ, M. BARATE de - Effectiveness and rifampicin-resistance in *Rhizobium trifolii*. GIAM IV. São Paulo, Brasil, julho 1973.
- BRILL, W.J. - Genetics of N_2 - fixing organisms. In *The Biology Nitrogen Fixation*. A. Quispel., ed. North Holland Publ. Co., Amsterdam, 1974.
- BUNN, C.K. & ELKAN, G.H. - The phospholipid composition of *Rhizobium japonicum*. *Canadian Journal Microbiology* 17: 291 - 295, 1971.
- CALDWELL, E.E. - Inheritance of a strain-specific ineffective nodulation in soybeans. *Crop Science* 6: 427 - 428, 1966.
- CALDWELL, B.E.; HINSON, K. & JOHNSON, H.W. - A strain-specific ineffective nodulation reactions in the soybean *Glycine max* L. Merril. *Crop Science* 6: 495 - 496, 1966.

- CLARCK, F. - Nodulation responses of two near isogenic lines of the soybean. *Canadian Journal Microbiology* **3**: 113 - 123, 1957.
- COX, E.C.; WHITE, J.R. & FLAKS, J.G. - Streptomycin action and the ribosome. *Proceedings National Academy Science* **51**: 703 - 709, 1964.
- DAMERY, J.T. & ALEXANDER, M. - Physiological differences between effective and ineffective strains of *Rhizobium*. *Soil Science* **108**: 209 - 216, 1969.
- DAVIES, J. - Studies on the ribosomes of streptomycin sensitive and resistant strains of *Escherichia coli*. *Proceedings National Academy Science* **51**: 659 - 663, 1964.
- DE LEY, J. & RASSEL, A. - DNA base composition flagellation and taxonomy of the genus *Rhizobium*. *Journal General Microbiology* **41**: 85 - 91, 1965.
- DEMEREK, M. - Origin of bacterial resistance to antibiotics. *Journal of Bacteriology* **56**: 63 - 74, 1948.
- DEMEREK, M. - Studies of the streptomycin-resistance system of mutations in *Escherichia coli*. *Genetics* **36**: 585 - 597, 1951.
- DEMEREK, M.; ADELBERG, E.A.; CLARCK, A.J. & HARTMAN, P.E. - A proposal for a uniform nomenclature in Bacterial Genetics. *Genetics* **54**: 61 - 76, 1966.
- DIXON, R.O.D. - Rhizobia (with particular reference to relationships with host plants). *Annual Review Microbiology* **23**: 137 - 158, 1969.

- DOBEREINER, J.; FRANCO, A.A. & GUZMÁN, I. - Estirpes de *Rhizobium japonicum* de excepcional eficiência. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **5**: 155 - 161, 1970.
- DUNICAN, L.K. & CANNON, F.C. - The Genetic control of symbiotic properties in *Rhizobium*: evidence for plasmid control. *Plant and Soil*, Volume Especial: 73 - 79, 1971.
- ELKAN, G.H. - Comparison of rhizosphere microorganisms of genetically related nodulating and non-nodulating soybean lines. *Canadian Journal Microbiology* **8**: 79 - 87, 1962.
- ELKAN, G.H. - Deoxyribonucleic acid base composition of isolates of *Rhizobium japonicum*. *Canadian Journal Microbiology* **15**: 490 - 493, 1969.
- ELKAN, G.H. - Biochemical and genetical aspects of the taxonomy of *Rhizobium japonicum*. *Plant and Soil*, Volume Especial: 85 - 104, 1971.
- ELLIS, N.J.; KALZ, G.G. & DONCASTER, J.J. - Transformation in *Rhizobium trifolii*. *Canadian Journal Microbiology* **8**: 835 - 840, 1962.
- GADRE, S.V.; MAZUMDAR, L.; MODI, V.V. & PAREKH, V. - Interspecific transformation in *Rhizobium*. *Archiv für Mikrobiologie* **57**: 388 - 391, 1967.
- GERSHON, D. - Genetic studies of effective nodulation in *Lotus* spp. *Canadian Journal Microbiology* **7**: 961 - 963, 1961.
- GIBBINS, A.M. & GREGORY, K.F. - Relatedness among *Rhizobium* and *Agrobacterium* species determined by three methods of nucleic acid hybridization. *Journal of Bacteriology* **111**: 129 - 141, 1972.

- GUPTA, B.M. & KLECZKOWSKA, J. - A study of some mutations in a strain of *Rhizobium trifolii*. *Journal General Microbiology* **27**: 473 - 476, 1962.
- GURGEL, J.T.A. & AZEVEDO, J.L. de - Resistência de microrganismos aos antibióticos. In *Antibióticos* (C.S. Lacaz, organizador): 234 - 253, Editora Edgar Blucher e Ed. Universidade de São Paulo, 1975.
- HEBERLEIN, G.T.; DE LEY, J. & TIJTGAT, R. - Deoxyribonucleic acid homology and taxonomy of *Agrobacterium*, *Rhizobium* and *Chromobacterium*. *Journal of Bacteriology* **94**: 116 - 124, 1967.
- HENDRY, G.S. & JORDAN, D.C. - Ineffectiveness of viomycin-resistant mutants of *Rhizobium meliloti*. *Canadian Journal Microbiology* **15**: 671 - 675, 1969.
- HEUMANN, W. - Conjugation in starforming *Rhizobium lupini*. *Molecular General Genetics* **102**: 132 - 144, 1968.
- HIGASHI, S. - Transfer of clover infectivity of *Rhizobium trifolii* to *Rhizobium phaseoli* as mediated by an episomic factor. *Journal General Applied Microbiology* **13**: 391 - 403, 1967.
- HUBBEL, D.H. & ELKAN, G.H. - Correlation of physiological characteristics with nodulating ability in *Rhizobium japonicum*. *Canadian Journal Microbiology* **13**: 235 - 241, 1967.
- JORDAN, D.C. & CLEMENTE, C.L. SAN - The utilization of peptides and L- and D- aminoacids by effective and ineffective strains of *Rhizobium meliloti*. *Canadian Journal Microbiology* **1**: 659 - 667, 1955.

- KERN, H. - Interspezifische transformationen zwischen *Agrobacterium tumefaciens* und *Rhizobium leguminosarum*. *Archiv fur Mikrobiologie* **66**: 63 - 68, 1969.
- KLECZKOWSKA, J. - A study of phage-resistant mutants of *Rhizobium trifolii*. *Journal General Microbiology* **4**: 298 - 310, 1950.
- KLECZKOWSKA, J. - Mutations in symbiotic effectiveness in *Rhizobium trifolii* caused by transforming DNA and other agents. *Journal General Microbiology* **40**: 377 - 384, 1965.
- KLEIN, D.T. & KLEIN, R.M. - Transmittance of tumor-inducing ability to avirulent crown-gall and related bacteria. *Journal of Bacteriology* **66**: 220 - 228, 1953.
- KOWALSKI, M. - Transduction in *Rhizobium meliloti*. *Plant and Soil*, Volume Especial: 63 - 66, 1971.
- KOWALSKI, M. & DÉNARIÉ, J. - Transduction of a gene controlling expression of nitrogen fixation in *Rhizobium meliloti*. *Compte Rendue Academie Science Paris*, Série D **275**: 141 - 144, 1972.
- KRASILNIKOV, N.A. - Mutability of nodule bacteria. *Compte Rendue Academie Science*. URSS **1**: 31, 1941.
- LANGE, R.T. & ALEXANDER, M. - Anomalous infections by *Rhizobium*. *Canadian Journal Microbiology* **7**: 959 - 961, 1961.
- LEDERBERG, J. & LEBERBERG, E.M. - Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *Journal of Bacteriology* **63**: 399 - 406, 1952.
- LJUNGGREN, H. - Transfer of virulence in *Rhizobium trifolii*. *Nature*, London **191**: 623, 1961.

- LORKIEWICZ, Z. & MELKE, A. - Isolation of histidine-requiring mutant of *Rhizobium trifolii*. *Biologie du Sol* **12**: 18 - 19, 1970.
- LORKIEWICZ, Z. & RUSSA, R. - Immunochemical studies of *Rhizobium* mutants. *Plant and Soil*, Volume Especial: 105 - 109, 1971.
- LORKIEWICZ, Z. & ZURKOWSKI, W. - The method of conjugation of Rhizobia. *Biologie du Sol* **14**: 41, 1971.
- MACKENZIE, G.R. & JORDAN, D.C. - Cell-wall composition and viomycin resistance in *Rhizobium meliloti*. *Canadian Journal Microbiology* **18**: 1168 - 1170, 1972.
- MARECKOVÁ, H. - Transformation in *Rhizobium japonicum*. *Archive fur Mikrobiologie* **68**: 113 - 115, 1969.
- MYTTON, L.R. & JONES, D.G. - The response to selection for increased nodule tissue in white clover (*Trifolium repens* L.). *Plant and Soil*, Volume Especial: 17 - 25, 1971.
- NORRIS, D.O. - Techniques used in work with *Rhizobium*. In *Some concepts and methods in sub-tropical pasture research*. Bulletin **47**: 186 - 198, Commonwealth Agricultural Bureaux, England, 1964.
- NUTMAN, P.S. - Genetic factors concerned in the symbiosis of clover and nodule bacteria. *Nature*, London **157**: 463, 1946a.
- NUTMAN, P.S. - Variation within strains of clover nodule bacteria in the size of nodule produced and the effectivity of the symbiosis. *Journal of Bacteriology* **51**: 411 - 431, 1946b.
- NUTMAN, P.S. - Nuclear and cytoplasmic inheritance of resistance to infection by nodule bacteria in red clover. *Heredity* **3**: 263 - 291, 1949.

- NUTMAN, P.S.* - Symbiotic effectiveness in nodulated red clover. I.
Variation in host and in bacteria. *Heredity* **8**: 35 - 46, 1954a.
- NUTMAN, P.S.* - Symbiotic effectiveness in nodulated red clover. II.
A major gene or ineffectiveness in the host. *Heredity* **8**: 47 - 60,
1954b.
- NUTMAN, P.S.* - Sources of incompatibility effecting nitrogen fixation in
legume symbiosis. Simposy Society for Experimental Biology
Nº 13: 42 - 58, Londres, 1959.
- NUTMAN, P.S.* - Varietal differences in the nodulation of subterranean
clover. *Australian Journal Agricultural Research* **18**: 381 - 425,
1967.
- NUTMAN, P.S.* - Genetics of symbiosis and nitrogen fixation in legumes.
Proceedings Royal Society Botanic **172**: 417 - 437, 1969.
- NUTMAN, P.S.* - The physiology of root-hair formation. In *As Leguminosas
na Agricultura Tropical*, p. 66 - 74. Ed. J. Dobereiner, P.A. da
Eira, A.A. Franco e A.B. Campelo, IPEACS, Rio de Janeiro, 1971a.
- NUTMAN, P.S.* - The physiology of nodule formation. In *As Leguminosas na
Agricultura Tropical*, p. 75 - 81. Ed. J. Dobereiner, P.A. da Ei-
ra, A.A. Franco e A.B. Campelo, IPEACS, Rio de Janeiro, 1971b.
- NUTMAN, P.S.* - Genetics of legume nodulation. In *As Leguminosas na Agri-
cultura Tropical*, p. 122 - 132. Ed. J. Dobereiner, P.A. da Eira,
A.A. Franco e A.B. Campelo, IPEACS, Rio de Janeiro, 1971c.
- NUTMAN, P.S.; MARECKOVÁ, H. & RAICHEVA, L.* - Selection for increased
nitrogen fixation in red clover. *Plant and Soil*, Volume Especial:
27 - 31, 1971.

- OBATON, M.M. - Utilization de mutants spontanés résistants aux antibiotiques pour l'étude écologique des *Rhizobium*. *Compte Rendue Académie Science Paris*, Série D **272**: 2630 - 2633, 1971.
- PANKHURST, C.E.; SCHWINGHAMER, E.A. & BERGERSEN, F.J. - The structure and acetylene-reducing activity of root nodules formed by a riboflavin requiring mutant of *Rhizobium trifolii*. *Journal General Microbiology* **70**: 161 - 177, 1972.
- PUHLER, A.; BURKARDT, J. & HEUMANN, W. - Genetic experiments with the *Pseudomonas aeruginosa* R-factor RP₄ in *Rhizobium lupini*. *Journal General Microbiology* **73**: xxvi, 1972.
- RAINA, J.L. & MODI, V.V. - Genetic transformation in *Rhizobium*. *Journal General Microbiology* **57**: 125 - 130, 1969.
- RAINA, J.L. & MODI, V.V. - Further studies on genetic transformation in *Rhizobium*. *Journal General Microbiology* **65**: 161 - 165, 1971.
- RICE, W.A. & PAUL, E.A. - The acetylene reduction assay for measuring nitrogen fixation in waterlogged soil. *Canadian Journal Microbiology* **17**: 1049 - 1056, 1971.
- RIFAAT, O.M.; AHMED, K.A.; HAMDI, Y.A. & ABDEL-WAHAB, S.M. - Interstrain transformation of antibiotic resistance in *Rhizobium trifolii*. *Egyptian Journal Genetics and Cytology* **3**: 68 - 78, 1974.
- SARRUGE, J.R. & HAAG, H.P. - Análises químicas em plantas. Departamento de Química, ESALQ, Piracicaba, 1974.
- SCHERRER, A. & DÉNARIÉ, J. - Symbiotic properties of some auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* and of their prototrophic revertants. *Plant and Soil*, Volume Especial: 39 - 45, 1971.

- SCHWINGHAMER, E.A.* - Association between antibiotic resistance and ineffectiveness in mutant strains of *Rhizobium* spp. *Canadian Journal Microbiology* **10**: 221 - 233, 1964.
- SCHWINGHAMER, E.A.* - Effectiveness of *Rhizobium* as modified by mutation for resistance to antibiotics. *Antonie Leeuwenhoek Journal Bacteriology Serology* **33**: 121 - 136, 1967a.
- SCHWINGHAMER, E.A.* - Loss of effectiveness and infectivity in mutants of *Rhizobium* resistant to metabolic inhibitors. *Canadian Journal Microbiology* **14**: 355 - 367, 1967b.
- SCHWINGHAMER, E.A.* - Mutation to auxotrophy and prototrophy as related to symbiotic effectiveness in *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Canadian Journal Microbiology* **15**: 611 - 622, 1969.
- SCHWINGHAMER, E.A.* - Requirement for riboflavin for effective symbiosis on clover by an auxotrophic mutant strain of *Rhizobium trifolii*. *Australian Journal Biologie Science* **23**: 1187 - 1196, 1970.
- SCHWINGHAMER, E.A. & DALMAS, R.L.* - Studies on induced variation in the Rhizobia. II. Radiation sensitivity and induction of antibiotic-resistance markers. *Applied Microbiology* **9**: 410 - 414, 1961.
- SCHWINGHAMER, E.A. & DUDMAN, W.F.* - Evaluation of spectinomycin resistance as a marker for ecological studies with *Rhizobium* spp. *Journal Applied Bacteriology* **36**: 263 - 272, 1973.
- STANIER, R.Y.; DOUDOROFF, M. & ADELBERG, E.A.* - *Mundo dos Micróbios* (Trad. Elfried Kirchner), Ed. Edgar Blucher - Ed. Universidade de São Paulo, 1969.

- TRAUBE, P. & NOMURA, M. - Streptomycin resistance mutation in *Escherichia coli*; altered ribosome protein. *Science* **160**: 198 - 199, 1968.
- VAN DER PLANK, J.E. - *Disease resistance in plants*, New York and London, Academic Press, 1968.
- VEST, G. - Rj₃ - a gene conditioning ineffective nodulation in soybean. *Crop Science* **10**: 34 - 35, 1970.
- VEST, G. - Rj₄ - a gene conditioning ineffective nodulation in soybean. *Crop Science* **12**: 692 - 693, 1972.
- VINCENT, J.M. - *A manual for the practical study of root-nodule bacteria*. IPB, Handbook n° 15, Oxford, Blackwell Scient. Publ., 1970.
- WATANABE, T. - Infections drug resistance in bacteria. *Current Topics in Microbiology Immunology* **56**: 43 - 98, 1972.
- WHITE, L.O. - The taxonomy of the crown-gall organism *Agrobacterium tumefaciens* and its relationship to rhizobia and other agrobacteria. *Journal General Microbiology* **72**: 565 - 574, 1972.
- WILLIAMS, L.F. & LYNCH, D.L. - Inheritance of a non-nodulating character in the soybean. *Agronomy Journal* **46**: 28 - 29, 1954.
- WILSON, J.K. - Leguminous plants and their associate organisms. *Memoir* n° 221. Cornell University, Ithaca, N.Y., 1939.
- YANOFSKY, C.; CARLTON, B.C.; GUEST, J.R.; HELSINKI, D.R. & HENNING, U. - On the colinearity of gene structure and protein structure. *Proceedings National Academy Science* **51**: 266 - 272, 1964.

- YANOFSKY, C.; DRAPEAU, G.R.; GUEST, J.R. & CARLTON, B.C. - The complete aminoacid sequence of the tryptophan A protein (α -subunit) and its colinear relationship with the genetic map of A gene. *Proceedings National Academy Science* **57**: 296 - 298, 1967.
- YU, K.K.Y & JORDAN, D.C. - Cation content and cation-exchange capacity of intact cells and cell envelopes of viomycin-sensitive and resistant strains of *Rhizobium meliloti*. *Canadian Journal Microbiology* **17**: 1283 - 1286, 1971.
- ZELAZNA-KOWALSKA, I. - Correlation between streptomycin resistance and infectiveness in *Rhizobium trifolii*. *Plant and Soil*, Volume Especial: 67 - 71, 1971.
- ZEMELMAN, R.; LONGERI, L. & HERRERA, A. - Efectividad comparativa de inoculantes comerciales y cepas naturales de *Rhizobium meliloti* en alfafa. I^o Reunião Latinoamericana sobre inoculantes para leguminosas. Montevideo, Uruguai, agosto 1964.