

FIXAÇÃO DE DINITROGÊNIO PELO *Rhizobium phaseoli*:  
I - EM SIMBIOSE COM CULTURA DE TECIDO DE FEIJOEIRO;  
II - ASSIMBIOTICAMENTE

VERA LUCIA GONÇALVES DE ASSIS

Orientadora : DRA. ALAIDES PUPPIN RUSCHEL

Dissertação apresentada à Escola Superior de  
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade  
de São Paulo, para obtenção do título de  
Mestre em Solos e Nutrição de Plantas.

PIRACICABA  
Estado de São Paulo - Brasil  
Agosto, 1978

Aos meus pais

D E D I C O

Ao Francisco

O F E R E Ç O

## AGRADECIMENTOS

- À *Dra. Alaídes Puppin Ruschel* pela orientação segura durante o curso e realização da pesquisa bem como pela amizade e apoio demonstrados em todas as horas de convivência.
- Ao *Dr. Otto Jesu Crocomo* pela atenção prestada, sempre que solicitada.
- À *Dra. Siu Mui Tsai Saito* pelas sugestões e críticas apresentadas durante o desenvolvimento do presente trabalho.
- À *Bióloga Maria Angélica Rossi* pelas observações sugeridas.
- Ao *Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA)* na pessoa de seu Diretor *Dr. Admar Cervellini* pelas facilidades oferecidas.
- À *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)* pela ajuda financeira.
- À *Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"* pela oportunidade oferecida.
- Aos *laboratoristas do Setor de Microbiologia do Solo do CENA* pela ajuda inestimável que sempre me prestaram.

## I N D I C E

	<u>Página</u>
1. RESUMO . . . . .	01
2. INTRODUÇÃO . . . . .	04
3. REVISÃO DE LITERATURA. . . . .	08
4. MATERIAL E MÉTODOS . . . . .	20
4.1. Simbiose de <i>R. phaseoli</i> em cultura de tecido de raiz de feijoeiro pela técnica de <i>HOLSTEN</i> <i>et alii</i> , 1971 . . . . .	21
4.1.1. Obtenção das raízes para inoculação do meio . . . . .	21
4.1.2. Estabelecimento da relação simbiótica..	23
4.2. Simbiose de <i>R. phaseoli</i> em cultura de tecido de raiz de feijoeiro pela técnica usada por <i>CHILD &amp; LaRUE</i> , 1974 . . . . .	24
4.2.1. Estabelecimento da simbiose. . . . .	26
4.3. Fixação livre por <i>rhizobía</i> em meio de cultura	26
4.3.1. Culturas de bactérias utilizadas . . . . .	26
4.3.2. Técnica utilizada . . . . .	27
4.4. Desenvolvimento das bactérias. . . . .	29
4.4.1. Meios de cultura utilizados no experi- mento com cultura de tecido. . . . .	29

	<u>Página</u>
4.4.2. Meios de cultura utilizados nos experimentos de fixação de N pelo <i>Rhizobium</i> ..	30
4.5. Observação da atividade da nitrogenase. . . . .	30
4.6. Exame citológico do tecido . . . . .	32
4.7. Experimentos de simbiose entre <i>R. phaseoli</i> e cultura de tecido . . . . .	33
4.8. Experimentos sobre fixação livre de <i>rhizobia</i> em meio definido. . . . .	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO . . . . .	36
6. CONCLUSÕES . . . . .	50
7. SUMMARY. . . . .	52
8. LITERATURA CITADA. . . . .	54

## LISTA DE TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
1 - Composição do meio 67-V modificado para o desenvolvimento de <i>callus</i> de raiz de feijoeiro ...	22
2 - Composição do meio B5 para culturas em suspensão de células vegetais . . . . .	25
3 - Estirpes utilizadas no trabalho e suas procedências . . . . .	27
4 - Composição do meio CS-7 para observação da fixação de N em ausência de tecido vegetal . . .	28

## LISTA DE QUADROS

<u>Quadro</u>	<u>Página</u>
1 - Atividade da nitrogenase - C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> por frasco de 70 ml com cultura em suspensão de células da raiz do feijoeiro, inoculadas com <i>R. phaseoli</i> - <u>es</u> tirpe 127-K17. . . . .	37
2 - Atividade da nitrogenase - C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> por frasco de 70 ml com cultura em suspensão das células da raiz do feijoeiro, inoculadas com <i>R. phaseoli</i> - <u>es</u> tirpe 3610. Meio de cultura com 10% de KNO <sub>3</sub> ..	37
3 - Atividade da nitrogenase - C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> por frasco de 125 ml com células da raiz do feijoeiro em LNB5, inoculada com <i>R. phaseoli</i> - estirpe 3610 ..	38
4 - Atividade da nitrogenase - C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> por frasco com células da raiz de feijoeiro em meio 67-V <u>modi</u> ficado líquido e em LNB5, inoculados com <i>R. pha</i> - <u>seoli</u> 127-K17 e 3610, respectivamente . . . . .	38
5 - Atividade da nitrogenase - C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> por segmento de ± 1 cm <sup>2</sup> de colônia no 4º, 5º e 6º dia de <u>in</u> cubação sob atmosfera normal . . . . .	41
6 - Atividade da nitrogenase - C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> por segmento de ± 1 cm <sup>2</sup> de colônia no 6º dia de incubação sob atmosfera normal . . . . .	42

Quadro

Página

7 - Atividade da nitrogenase - $C_2H_4$ por segmento de $\pm 1 \text{ cm}^2$ de colônia no 6º, 7º e 8º dias de incubação sob atmosfera de mistura pAr 0,90 e pO <sub>2</sub> 0,10 . . . . .	43
8 - Atividade da nitrogenase - $C_2H_4$ por segmento de $\pm 1 \text{ cm}^2$ de colônia no 3º, 4º e 7º dias de incubação sob atmosfera de mistura pAr 0,90 e pO <sub>2</sub> 0,10 . . . . .	44
9 - Atividade da nitrogenase - $C_2H_4$ por segmento de $\pm 1 \text{ cm}^2$ de colônia no 3º, 4º, 5º, 6º e 7º dias de incubação sob atmosfera de mistura 9:1 de Ar + O <sub>2</sub> . . . . .	45
10 - Atividade da nitrogenase - $C_2H_4$ por segmento de $\pm 1 \text{ cm}^2$ de colônia no 3º e 4º dias de incubação sob atmosfera normal . . . . .	46

\*\*\*\*\*

## 1. RESUMO

\*\*\*\*\*

Desde o início desta década, quando *HOLSTEN e colaboradores (1971)* conseguiram estabelecer a simbiose entre células de raiz de soja e *Rhizobium japonicum "in vitro"*, vários pesquisadores tem tentado repetir esse trabalho.

A presente dissertação objetivou testar a metodologia aplicada para o estabelecimento de relação simbiótica entre células da raiz do feijoeiro e *R. phaseoli*. Assim, técnicas específicas de cultura de tecido foram usadas, com vistas à obtenção de *callus* de feijoeiro e posterior inoculação com estirpes promissoras de *R. phaseoli* como 127-K17 e 3610, em dois meios de cultura.

Paralelamente foram desenvolvidos estudos para

verificar a habilidade de fixar dinitrogênio livremente por diferentes estirpes de *R. phaseoli*, em meio de cultura.

Na pesquisa *Rhizobium* x cultura de tecido de feijoeiro, a metodologia usada consistia na obtenção e cultivo dos *calli*, sendo os mesmos inoculados com a bactéria em cultura pura. Foram feitas observações morfológicas das células inoculadas, utilizando microscopia comum nos quatro experimentos realizados.

Um total de cinco experimentos foram conduzidos para verificar a habilidade de quinze estirpes de *R. phaseoli* em fixar dinitrogênio atmosférico assimbioticamente.

Em todos os experimentos, a atividade de nitrógenase (enzima responsável pela fixação por via biológica) foi avaliada através da técnica de redução do acetileno em cromatógrafo de gás.

Os resultados do estudo da simbiose "*in vitro*" não foram reproduzíveis, concluindo-se que, para o caso de feijoeiro, ao serem aplicadas, tais técnicas devem merecer aperfeiçoamento.

As duas únicas estirpes de *R. phaseoli* que conseguiram fixar dinitrogênio assimbioticamente com repetição de resultados foram: 3610 e C-13. As demais apresentaram re

sultados não confiáveis uma vez que não foram reproduzíveis.

Esse estudo permitiu concluir que a fixação livre do dinitrogênio por *R. phaseoli* é dependente dos seguintes fatores: presença de baixos níveis de nitrogênio mineral e intermediários do ciclo dos ácidos tri-carboxílicos no meio de cultura e condições microaerofílicas para expressão da atividade da nitrogenase, como em outros *rhizobía* já estudados.

\*\*\*\*\*

## 2. INTRODUÇÃO

\*\*\*\*\*

Para satisfazer a crise iminente no suprimento de alimentos do mundo é imperativo que os recursos deste planeta sejam mobilizados tão rápida e efetivamente quanto possível. Básico a esta mobilização é o conhecimento dos processos dinâmicos da biosfera que afetam a disponibilidade de nitrogênio, um dos elementos mais frequentemente limitantes na produção de víveres e de grande importância para economia da agricultura (*HARDY et alii, 1968; BURRIS, 1972*).

Assim como a fotossíntese assimila o CO<sub>2</sub> livremente disponível na atmosfera, a fixação do nitrogênio vale-se do ilimitado suprimento de N atmosférico e seu papel em promover a disponibilidade do N foi há muito reconhecido (*HARDY et alii, 1968; BROTONEGORO, 1974*).

A existência de organismos fixadores de  $N_2$  foi estabelecida em 1862 mas não foi entendida até 1894 quando Winogradsky isolou e caracterizou o anaeróbico *Clostridium pasteurianum*, uma bactéria que poderia usar  $N_2$  como única fonte de nitrogênio. Desde então uma ampla variedade de microrganismos capazes de fixar dinitrogênio foram caracterizados, com o uso de  $^{15}N_2$  e, mais recentemente, através da técnica da redução do acetileno (DALTON & MORTENSON, 1972).

O gênero *Rhizobium* é caracterizado por sua habilidade em formar nódulos e fixar nitrogênio nas raízes das leguminosas.

As leguminosas de grão ocupam um lugar predominante na dieta humana. Entre elas se destaca o feijão (*Phaseolus vulgaris*), o qual se cultiva em maior extensão na América Latina, Extremo Oriente e África (GUTIÉRREZ et alii, 1975).

A associação *Rhizobium phaseoli* - *Phaseolus vulgaris* tem sido relativamente negligenciada em comparação com a grande quantidade de informações que se tem sobre outros sistemas fixadores de dinitrogênio (VINCENT, 1977). O desconhecimento dos fatores que afetam a fixação simbiótica do N pelo feijoeiro impede uma maior difusão da prática da inoculação nesta cultura (RUSCHEL & REUSZER, 1973).

Quanto melhor compreendida for a associação existente entre *R. phaseoli* e *P. vulgaris* em muito ter-se-á contribuído à melhoria da produção daquela planta.

A simbiose *Rhizobium* - Leguminosae tem sido estudada "*in vitro*", utilizando cultura de tecido e sendo avaliada através da atividade da nitrogenase, enzima responsável pela fixação do dinitrogênio por via biológica.

No primeiro trabalho, relatando associação simbiótica "*in vitro*" (HOLSTEN *et alii*, 1971) foram usadas culturas em suspensão com *rhizobia* e células de raízes de soja num meio nutritivo completo, sendo concluído que este sistema pode ser utilizado posteriormente para elucidar os fatores que controlam o processo da nodulação e fixação de nitrogênio. Por outro lado, é sabido que vários produtos vegetais tais como açúcares e intermediários do ciclo dos ácidos tri-carboxílicos favorecem o crescimento rhizobiano. Assim, PAGAN e colaboradores (1975) formularam um meio de cultura definido (CS7), utilizando tais produtos para examiná-los como possíveis indutores da atividade da nitrogenase em cultura de *Rhizobium*, na ausência de células vegetais.

A presente dissertação objetivou estudar a metodologia e possíveis implicações da fixação biológica de nitrogênio na simbiose de *R. phaseoli* e células provenientes de cultura de tecido de raízes de feijoeiro.

Em paralelo com os estudos de cultura de tecido foram realizados testes para verificar a habilidade de diferentes estirpes de *R. phaseoli* em fixar nitrogênio atmosférico na ausência de material vegetal sobre meio de cultura definido.

\*\*\*\*\*

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

\*\*\*\*\*

A demanda crescente de proteína para consumo humano e o grande interesse sobre os métodos atuais de produção de alimentos, dirigiram atenção à fixação biológica do di-nitrogênio (GIBSON, 1976). As leguminosas e seus produtos finais prontamente utilizáveis representam um dos principais meios para aumentar a fixação do N, em escala global.

Uma técnica que tem sido aperfeiçoada para observar a fixação de dinitrogênio por leguminosas "in vitro" é a cultura de tecidos. Essa técnica se baseia no conhecimento da totipotência celular e na obtenção de tecidos em diferentes graus de diferenciação os quais podem reproduzir órgãos ou até regenerar o vegetal completo (SHARP & CROCOMO, 1975).

A demonstração da fixação do dinitrogênio por

*rhizobia* vivendo livremente surgiu a partir de estudos sobre fixação simbiótica em cultura de tecido vegetal. *HOLSTEN et alii* (1971) relataram o estabelecimento de simbiose fixadora de dinitrogênio entre *Rhizobium japonicum* e culturas em suspensão de células da raiz de soja, observando em exames detalhados do tecido mostraram estruturas semelhantes aos fios de infecção do sistema "*in vivo*" e que somente 1 a 10% das células apresentavam microrganismos intracelulares.

O trabalho daqueles pesquisadores foi recebido com grande agitação no meio científico como a primeira tentativa no sentido de simplificar esta associação fixadora de dinitrogênio. A fixação, embora pequena, aconteceu sem a nodulação, leghemoglobina e formação dos bacteróides aparentemente necessários na planta intacta.

Outros laboratórios não foram capazes de repetir este trabalho até que *PHILLIPS (1974a)* e *CHILD & LaRUE (1974)*, independentemente desenvolveram sistemas comparáveis nos quais a atividade da nitrogenase ( $C_2H_2$ ) foi detectada e reproduzida em associações *callus* de soja - *Rhizobium* sobre meio de cultura solidificado com agar.

*PHILLIPS (1974a)* não observou redução do acetileno em culturas líquidas. Somente quando uma suspensão líquida de *Rhizobium* e células de soja foi colocada sobre um meio sólido, foi constatada a produção de etileno dependente

do acetileno, após 7 - 14 dias.

*CHILD & LaRUE (1974)* estabeleceram uma relação simbiótica "*in vitro*" entre células da raiz da soja cultivadas como uma fina camada de *callus* sobre a superfície de um meio sólido definido, contendo baixos níveis de nitrogênio inorgânico.

Tanto *PHILLIPS (1974a)* como *CHILD & LaRUE(1974)*, comparando a atividade do nódulo e na cultura de tecido notaram correlação entre ambas o que indicava a importância do genótipo dos hospedeiros em determinar o nível de atividade desenvolvido: a planta forneceria substâncias necessárias para que a nitrogenase exercesse sua função. Trabalhos posteriores relataram que a atividade da nitrogenase era maior quando fontes de nitrogênio como glutamina e intermediários do ciclo dos ácidos tri-carboxílicos (Ciclo de Krebs) foram incluídos no meio de cultura com agar (*PHILLIPS, 1974b; CHILD e LaRUE, citados por GIBSON, 1977*). *BROWN e DILWORTH (1975)* afirmam que tanto glutamina como glutamato estão envolvidos na assimilação do íon amônio por *rhizobia*.

A indução da atividade da nitrogenase em seis estirpes de *R. japonicum* separadas de suspensões de células de soja, cultivada em filtros de 0,2 a 0,4 micra, foi estudada por *REPORTER & HERMINA (1975)*. Estes autores encontraram níveis de atividade comparáveis aos obtidos com bacteróides

nos nódulos, quando a bactéria foi cultivada adjacente a um vaso contendo o meio a partir do qual as células tinham sido filtradas e concluíram que algum(s) fator(es) essencial(ais) excretado pelas células vegetais estava presente. Obviamente, conforme observou GIBSON (1976) estudos posteriores devem ser exigidos para determinar quais são estes fatores envolvidos.

Segundo citação de RANGA RAO (1976) as primeiras pesquisas com células de cultura de tecido de leguminosas e estirpes de *Rhizobium* do "cowpea" não foram bem sucedidas para muitos pesquisadores. Assim, DILWORTH & PARKER (1969) propuseram que a planta hospedeira sintetizaria a proteína ou parte da proteína necessária à síntese completa da nitrogenase na bactéria.

No entanto, nos três últimos anos vários casos de associação "in vitro", mostrando atividade da nitrogenase, foram estabelecidos entre cultura de tecidos de leguminosas bem como de não leguminosas. Assim, RANGA RAO et alii (1974) estabeleceram a simbiose "in vitro" entre *R. leguminosarum* e *callus* de raiz de ervilha (*Pisum sativum*). CHILD (1975) relatou a atividade da nitrogenase ( $C_2H_2$ ) em *Rhizobium* do grupo "cowpea" com *callus* de trevo doce (*Melilotus alba* Ders.) *Vicia hajastana* bem como com cultura de tecido de não leguminosas como capim-cevadinha (*Bromus inermis* Leyss.), trigo (*Triticum monococcum*) e nabo (*Brassica napus* L.). Enquanto que SCOWCROFT e GIBSON (1975) observaram redução do acetileno e

incorporação de  $^{15}\text{N}_2$  em associações da estirpe 32H1 de *Rhizobium* do "cowpea" com culturas de células, não só de seu hospedeiro natural (*V. unguiculata*), como com a não leguminosa (*Nicotiana tabacum*). RANGA RAO (1976) também mostrou atividade da nitrogenase em cultura de tecido de raiz, caule e folhas de três linhagens de *Trifolium pratense* infectadas com *R. trifolii*, *Stylosanthes gracilis* e cultura de tecido de raiz de cenoura inoculadas com outras duas estirpes de *Rhizobium* sp.

Como afirmam SCHETTER e HESS (1977) estas investigações demonstraram claramente que não era restrito às leguminosas a capacidade de indução da atividade da nitrogenase. Assim, os mesmos autores estabeleceram associações "in vitro" entre *callus* de plantas hortícolas e *Rhizobium* sp. com altos níveis na atividade da nitrogenase.

Através de todos estes trabalhos ficou evidente que as células de não leguminosas parecem não inibir a expressão da atividade da nitrogenase. A fixação de nitrogênio por *rhizobia* em nódulos de *Trema cannabina*, relatada por TRINICK (1973), foi um sinal otimista para o estabelecimento de uma associação simbiótica entre plantas não leguminosas de valor econômico e *rhizobia*.

Foi observado por SCOWCROFT & GIBSON (1975), LARUE et alii (1975b) e CHILD (1975), que *rhizobia* continuaram fixando N após o *callus* haver sido removido, indicando que a

expressão da nitrogenase é despertada por um fator desconhecido, difusível, provavelmente um produto vegetal comum não só às leguminosas, e de natureza mais nutricional do que reguladora.

*CROCOMO et alii* (1975) preconizam que a fusão de protoplastos de feijão, soja e uma não-leguminosa oferece a possibilidade de obtenção de fixação de N em sistemas deficientes em N, citando como exemplo o milho.

*CAPLIN e STEWARD* (1949) afirmam que culturas de células vegetais em meio líquido produzem crescimento maior e mais uniforme além de apresentarem vantagens óbvias, seja em experimentos de absorção, seja em estudos sobre efeitos nutritivos de solutos específicos. Segundo *GAMBORG* (1966) este tipo de cultura é um método conveniente tanto para produção de células de plantas superiores, bem como de enzimas vegetais em grandes quantidades. As atividades específicas das enzimas obtidas de culturas de células em suspensão foram consideravelmente mais altas do que aquelas obtidas de extratos de tecido diferenciados.

Apesar da importância da fixação de nitrogênio pouca informação precisa era disponível até 1968 para definir, em termos quantitativos, a extensão desse fenômeno na biosfera. Em 1968, *HARDY et alii* desenvolveram a metodologia para aplicação do método da redução do acetileno, que determinava

a atividade fixadora de N em diferentes sistemas. Uma vez que este método tenha potencial para promover avanços fundamentais e práticos, acredita-se que ele represente um dos mais importantes desenvolvimentos em pesquisa nessa área.

Este método baseia-se na redução de  $C_2H_2$  a  $C_2H_4$ , envolvendo somente dois elétrons na reação. Quantidades tão pequenas como 1 nmol ou ( $28 \times 10^{-9}$ ) de  $C_2H_4$  podem ser detectadas, fornecendo sensibilidade  $10^3$  vezes maior do que é possível com análises de  $^{15}N$  (HARDY *et alii*, 1968).

As atividades em termos de redução do acetileno e nitrogênio fixado foram similares para nitrogenase de bactérias fixadoras livres e/ou de bacteróides dos nódulos das leguminosas (HARDY *et alii*, 1968; KLUCAS *et alii*, 1968), estabelecendo a validade do método. Embora haja outros sistemas produtores de etileno na natureza, estes não constituem um risco, uma vez que controles adequados sejam incluídos nos experimentos.

A aparentemente total dependência do *Rhizobium* sp., com a planta hospedeira deixaram perplexos durante muitos anos os pesquisadores, interessados em fixação biológica do dinitrogênio. Segundo POSTGATE (1975) tal fato, baseado em dados experimentais, pode parecer a um estranho mais um dogma do que uma conclusão. Entretanto, o fato de não se publicar descobertas puramente negativas constitui uma convenção em

publicação científica. Logo, a ausência de tal documentação não fez justiça ao esforço que tinha sido feito neste sentido pois, apesar de freqüentes tentativas, não foram obtidos até 1974, com sucesso, fixação de N por *Rhizobium*, na ausência de material vivo. Sem dúvida, a planta contribui com informação genética importante à simbiose nos nódulos o que levou *DILWORTH & PARKER (1969)* a sugerir que alguns dos genes determinantes da habilidade do *Rhizobium* em fixar N (genes pertencentes ao grupo "*nif*" na linguagem dos geneticistas) foram "depositados" sobre a planta hospedeira. Recentemente, porém, estudos apoiando opinião contrária foram realizados, concluindo que o *Rhizobium* possui a cota completa dos genes "*nif*" os quais estão "mudos" nas células a espera de algum fator que os "desperte".

*DUNICAN & TIERNEY (1974)* usaram uma estirpe de *Klebsiella aerogenes* que normalmente não fixava N e transferiram material de *R. trifolii* para ela, obtendo progênie fixadora de N a qual, presumivelmente, estaria usando "*nif*" rhizobiano. Entretanto, como os próprios autores reconheceram, a possibilidade de que *K. aerogenes* possuísse genes "*nif*" em cripta (latentes) e que algum ativador tivesse sido transferido não foi excluída. A técnica utilizada por estes pesquisadores permitiu, pela primeira vez, a comparação bioquímica das enzimas da nitrogenase no tecido nodular "*in vivo*" com aquelas sintetizadas pela estirpe híbrida sob condições assimbióticas.

Estudos sobre a genética dos organismos fixadores de nitrogênio, particularmente bactérias do gênero *Rhizobium*, e evidências de fixação em cultura de tecido de leguminosas e não leguminosas levaram ao estudo da fixação de N por *Rhizobium*, cultivado sobre meio definido sólido e líquido.

Assim, *PAGAN et alii* (1975) formularam o meio CS7 sobre o qual *Rhizobium* sp. - estirpe 32H1 fixava dinitrogênio na ausência de material vegetal, e tentando caracterizar os fatores difusíveis que promovem a expressão da nitrogenase, *KURZ & LaRUE* (1975) testaram culturas de *callus* de várias espécies vegetais e acharam que extratos de células de arroz e de cenoura quando adicionadas ao meio LNB5 permitiram a expressão da atividade da enzima (avaliada em  $C_2H_4$ ) pelo *Rhizobium* do "cowpea" cultivado na ausência de células vegetais. *McCOMB et alii* (1975) também mostraram que uma estirpe do *Rhizobium* do "cowpea" fixou nitrogênio quando cultivada sobre um meio determinado.

*KEISTER* (1975) mostrou a atividade da nitrogenase ( $C_2H_4$ ) em culturas puras, líquidas de *Rhizobium* sp., descrevendo que os fatores mais importantes são uma baixa densidade de células e uma muito baixa concentração de oxigênio. Este autor concluiu que a planta hospedeira poderia fornecer um ambiente apropriado à fixação do N em simbiose, mas não a informação genética.

Estudando fixação assimbiótica de nitrogênio por *Rhizobium* em meio líquido definido *TJEPKEMA & EVANS (1975)* concluíram que o *Rhizobium* não tem exigências raras, exceto condições microaerofílicas e talvez a presença de um intermediário do ciclo dos ácidos tri-carboxílicos no meio de cultura.

*KURZ & LaRUE (1975)* não detectaram redução do acetileno nos experimentos onde ou frutose ou manitol constituía a única fonte de carbono. Entretanto, a fixação aumentou com xilose ou arabinose, evidenciando que pentoses constituem as fontes de carbono preferidas por *rhizobia*.

*GIBSON et alii (1976)* examinaram as condições físicas (temperatura de crescimento, tensão de oxigênio e pH do meio) e nutricionais (concentração de vários açúcares, álcoois, ácidos carboxílicos e fontes de N combinadas) que afetam a atividade da nitrogenase em *Rhizobium* do "cowpea" e concluíram ser possível que a família Rhizobiaceae possua toda a informação genética necessária à síntese da nitrogenase, sendo de grande interesse, portanto, a regulação genética a fisiológica desses genes.

*RANGA RAO (1977)* definiu um meio de cultura sólido, contendo fontes combinadas de nitrogênio e obteve atividade da nitrogenase em culturas de *Rhizobium* sp., dependente da concentração de glutamina no meio.

*Bergensen et alii*, citado por *YATES (1977)*, mostraram que a remoção do succinato de uma cultura contínua da estirpe do "*cowpea*" causou uma elevação na quantidade de  $O_2$  dissolvido por diminuição na absorção do  $O_2$  e perda da atividade da nitrogenase. Esta foi restaurada quando o succinato, voltou a ser fornecido e a quantidade de  $O_2$  dissolvido baixou. A necessidade de duas fontes de carbono não é real e uma fonte de quatro carbonos como o succinato foi um substrato facilmente utilizável como proteção respiratória. *PHILLIPS et alii (1973)* mostraram que *rhizobia* cultivado anaerobicamente produz proteínas que podem transferir elétrons à nitrogenase, o mesmo não acontecendo em condições aeróbicas. Assim, conforme observa *YATES (1977)* está implícito que  $O_2$  reprime a síntese das proteínas da nitrogenase.

*EVANS & KEISTER (1976)* demonstraram a redução do acetileno por culturas não agitadas de *rhizobia* sob níveis de oxigênio atmosférico. Quando agitadas, concentrações de oxigênio de 1% e maiores provocaram inibição.

Segundo *KURZ & LaRUE (1975)* e *PAGAN et alii (1975)*, a existência de uma zona microaerofílica dentro da massa na qual as bactérias exibem atividade da nitrogenase é a melhor explicação para culturas puras desenvolvidas sobre agar. As bactérias nessas condições produziram uma secreção viscosa semelhante a *Desulfovibrio gummosa (HILL, 1971)* e *Mycobacterium flavum (BIGGINS & POSTGATE, 1969)*.

*GALLO et alii* (1977, não publicado) descreveram um método para estudar a simbiose de *P. vulgaris* "in vitro", obtendo a atividade da nitrogenase em plantas noduladas originadas de culturas de embrião. Os autores concluem que este método poderia ser aplicado a diferentes estudos de fixação simbiótica de N e experimentos onde fosse necessário eliminar as reservas das sementes.

\*\*\*\*\*

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

\*\*\*\*\*

Neste trabalho foram utilizados dois diferentes métodos para o estabelecimento da simbiose entre *R. phaseoli* e *P. vulgaris*, "*in vitro*" em cultura de tecido. Também foi estudada a fixação do dinitrogênio por *R. phaseoli*, cultivado sobre meio definido.

Em ambas as pesquisas, a atividade da nitrogenase foi analisada através da redução do acetileno em cromatógrafo de gás.

4.1. Simbiose de *R. phaseoli* em cultura de tecido de raiz de feijoeiro pela técnica de *HOLSTEN et alii*, 1971.

4.1.1. Obtenção das raízes para inoculação do meio

*Desinfecção das sementes* - Sementes de feijoeiro cv. Venezuela-350 foram superficialmente desinfectadas, mergulhando-as em uma solução N% de hipoclorito comercial (Q-Boa) e lavando-as com água estéril, 6 a 8 vezes, até que o cheiro do hipoclorito desaparecesse completamente.

Após vários insucessos, tendo em vista a contaminação por microrganismos endógenos da semente com a utilização desta técnica de desinfecção, novas sementes da mesma cultivar foram esterelizadas, usando-se uma solução a 0,2% de sublimado corrosivo (20 g  $HgCl_2$  + 50 ml de HCl conc.) conforme recomendado por *VINCENT (1970)*. Assim, sementes grandes e uniformes foram escolhidas, mergulhadas em álcool por três minutos para solubilização de ésteres e colocadas em sublimado corrosivo por 10 minutos. As sementes foram então lavadas pelo menos 5 vezes com água estéril.

*Germinação das sementes* - Sementes desinfectadas foram postas a germinar a  $26 \pm 2^{\circ}C$ , sendo colocadas sobre a superfície do meio 67-V modificado (Tabela 1; *VELIKY & MARTIN, 1970*; *CROCOMO et alii, 1975*) preparado especialmente para esta finalidade, contendo os sais minerais e agar.

Nas primeiras vezes, 50 ml de meio de cultura foram distribuídos em frascos Erlenmeyer de 250 ml, onde se colocavam cerca de cinco sementes para germinar no escuro, utilizando-se papel aluminizado sobre os frascos. Devido ao risco de contaminação, posteriormente utilizaram-se tubos de ensaio com 8 ml de meio de cultura e uma semente por tubo.

*Inoculação* - Foi utilizado o meio de cultura 67-V modificado, conforme Tabela 1.

Tabela 1 - Composição do meio 67-V modificado para o desenvolvimento de *callus* de raiz de feijoeiro.

Componentes	mg/l	Componentes	mg/l
Sacarose	30000	Na <sub>2</sub> EDTA	18,60
Caseína hidrolizada	2000	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	200
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	150	Thiamina HCl	800
KCl	200	Piridoxina HCl	0,50
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	250	Ácido nicotínico	1,25
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100	Pantetonato de Ca	1,00
KNO <sub>3</sub>	800	Inositol	100
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,25	Cinetina	1
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,25	NAA	0,10
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	4,00	2,4-D	1,5
ZnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1,50	IAA	7,5
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,25	Água deionizada	1000
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5,00	pH 5,7 solução N de	
KI	0,05	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ou KOH	
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	13,90	Agar	10000
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20,00		

Quando a raiz principal estava com aproximadamente 4 cm, 2 a 3 explantes de 5 mm foram retirados a cerca de 2,5 cm da extremidade da raiz.

Estes explantes foram incubados a  $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$  sobre 50 ml do meio de cultura sólido 67-V modificado, contidos em frascos Erlenmeyers de 250 ml e tampados com algodão. Todos os frascos de meio de cultura eram esterilizados em autoclave à 1 atm de pressão e  $120^{\circ}\text{C}$ , por 20 minutos.

Após 10 - 14 dias uma massa com ativo crescimento de células (*callus*) desenvolveu-se sobre o explante da raiz. Estes *calli* foram asséptica e periodicamente sub-cultivados para meio 67-V modificado, sólido e líquido (sem agar). As culturas líquidas foram incubadas em clinostato a 1 rpm no escuro bem como em agitador de "vai e vem" nas condições dos laboratórios de Cultura de Tecido e Microbiologia do Solo do CENA, respectivamente. Subcultivos em ambos os sistemas foram realizados periodicamente a fim de manter uma população de células dividindo-se ativamente.

#### 4.1.2. Estabelecimento da relação simbiótica

Frascos Erlenmeyer de 250 ml, contendo 50 ml de meio 67-V modificado líquido (Tabela 1) com células em ativo crescimento, foram inoculadas com 1 ml de uma suspensão

bacteriana (*R. phaseoli*, estirpe 127-K17 suspensa em água estéril) e retornaram ao agitador para incubação. Após 3 - 7 dias, os conteúdos dos frascos foram filtrados usando papel de filtro SS nº 595. Nesta ocasião determinou-se o peso das células em suspensão após filtração e secagem das mesmas em estufa a 65°C ventilada, equivalendo-se, em média, a 0,25g/frasco na época da inoculação com o *Rhizobium*.

A fim de ser avaliada a atividade da nitrificação, pela técnica da redução do acetileno (descrita em 4.5), células da raiz do feijoeiro e porções de *callus* inoculadas com a bactéria foram lavadas com meio 67-V modificado e transferidas para frascos de 70 ml.

#### 4.2. Simbiose de *R. phaseoli* em cultura de tecido de raiz de feijoeiro pela técnica usada por CHILD & LaRUE, 1974.

Após várias tentativas sem sucesso no estabelecimento da simbiose, usando a técnica de HOLSTEN e colaboradores (1971) e tendo conhecimento de que outros pesquisadores foram incapazes de repetir o citado trabalho, passou-se a testar o método de Gamborg (GAMBORG, 1970), usado por CHILD & LaRUE (1974).

*Inoculação* - Foi utilizado o meio de cultura

B5 (GAMBORG, 1970), de acordo com a Tabela 2. Assim, conforme foi descrito anteriormente (item 4.1.1.) culturas em suspensão de células da raiz de feijoeiro foram transplantadas para 50 ml de meio B5 (Tabela 2) suplementado com 2 µg/ml de ácido 2,4-di-cloro fenoxiacético (2,4-D), contido em frascos Erlenmeyer e mantidas em agitador de "vai e vem". Todos os frascos foram cobertos com papel aluminizado a  $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . A fim de manter as células de raiz em ativo crescimento, após 5 a 7 dias de incubação era realizada nova transferência da mesma para meio fresco.

Tabela 2 - Composição do meio B5 para culturas em suspensão de células vegetais.

Componentes	mg/l	Componentes	mg/l
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	150	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	10
KNO <sub>3</sub>	2500	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134	ZnSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	250	CuSO <sub>4</sub>	0,025
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	150	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
Fe-EDTA	28	KI	0,750
Ácido nicotínico	1	Sacarose	20000
Tiamina: HCl	10	Água deionizada até 1000 ml	
Piridoxina: HCl	1	pH 5,5 com solução N de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
myo-inositol	100	ou HCl	

Nota: O meio LNB5 também utilizado no método de Gamborg difere apenas na quantidade de KNO<sub>3</sub> que passa a ser 1000mg/l.

#### 4.2.1. Estabelecimento da simbiose

Culturas em suspensão de células da raiz do feijoeiro (2,5 ml de uma cultura com 2 a 5 dias de idade) desenvolvidas em meio B5, diluído 1:5 foram espalhadas sobre a superfície de 50 ml de meio sólido LNB5 (ver Nota, Tabela 2) em frascos Erlenmeyer de 125 ml. Após o crescimento das células em uma fina camada de *callus* (7 a 14 dias) foi feita a inoculação com bactérias.

#### 4.3. Fixação livre por *rhizobía* em meio de cultura

##### 4.3.1. Culturas de bactérias utilizadas

Foram utilizadas estirpes de *R. phaseoli* e uma de *R. japonicum* da Seção de Microbiologia do Solo do CENA, Piracicaba-SP. cujas procedências podem ser vistas na Tabela 3.

Tabela 3 - Estirpes utilizadas no trabalho e suas procedências

E s t i r p e s	Procedência do isolado
<i>R. phaseoli</i>	
C-01	Piracicaba (SP)
C-05	Piracicaba (SP)
C-13	Tietê (SP)
C-14	Piracicaba (SP)
C-18	Capão Bonito (SP)
C-19	Sengês (PR)
C-23	Itapetininga (SP)
Str. C-14	Piracicaba (SP)
CIAT-57	CIAT - Colombia
127-K17	Nitragin Co.(EE.UU.)
127-K14	Nitragin Co.(EE.UU.)
3610 (Sorologica- mente = 127-K14)	Rothamsted Exp. Sta. (Inglaterra)
<i>R. japonicum</i>	
CB-1809	Collection Brisbane (Austrália)

C - Isolada no CENA, em Piracicaba.

#### 4.3.2. Técnica utilizada

As estirpes de *R. phaseoli* e a de *R. japonicum* foram testadas sobre o meio CS-7, desenvolvido por *PAGAN et alii (1975)* cuja composição encontra-se na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição do meio CS-7 para observação da fixação de N em ausência de tecido vegetal.

Componentes	em mM	Componentes	em $\mu$ M
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2,2	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	58
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,7	$\text{H}_3\text{BO}_3$	82
KCl	0,9	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,14	KI	6
Glutamina	2	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,8
myo-inositol	5,6	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,4
Succinato de sódio	25	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,4
L-arabinose	25	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	54
Água deionizada até 1000 ml.		$\text{Na}_2$ -EDTA	54
Agar 10 g/l		Tiamina:HCl	15
pH 5,9 com solução N		Ácido nicotínico	41
de $\text{H}_2\text{SO}_4$ ou KOH		Piridoxina : HCl	2,4

Em todos os experimentos conduzidos, estirpes de *Rhizobium* foram inicialmente cultivadas sobre o meio YWA (cuja composição encontra-se em 4.4.), suspensas em água estéril e espalhadas uniformemente com o auxílio de um bastão encurvado sobre o meio CS-7 distribuído em placas de Petri e incubadas a 28°C. Após 3 dias, segmentos de agar de  $\pm 1 \text{ cm}^2$ , com denso crescimento bacteriano, foram retirados assepticamente e transferidos para frascos de 10 ml (tipo penicilina)

e selados com tampa de borracha apropriada. A fim de ser determinada a atividade da nitrogenase das bactérias a atmosfera dos frascos foi trocada por uma mistura 9:1 de argônio e oxigênio, de acordo com *PAGAN et alii (1975)*.

Frascos controle, sem a bactéria, eram também utilizados para verificar-se provável contaminação de etileno no acetileno utilizado e no sistema.

#### 4.4. Desenvolvimento das bactérias

##### 4.4.1. Meios de cultura utilizados no experimento com cultura de tecido

*R. phaseoli* - Estirpe 127-K17 (Nitragin Co., Milwaukee, Wis.) foi cultivada em meio de cultura 79 + manitol, composto de (em g/l):  $K_2HPO_4$  - 0,5;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  - 0,2; NaCl - 0,1; manitol 10,0; extrato de levedura - 2,0; agar - 12,0;  $CaCO_3$  - 2,0; solução alcoólica de azul de bromotimol a 0,5% - 5 ml; água destilada até 1000 ml.

Em testes posteriores foi usada *R. phaseoli* estirpe 3610 (Rothamsted Exp. Sta., Harpenden, Inglaterra), cultivada em meio YWA, cuja composição (em g/l) é a seguinte: manitol 5,0; glutamato de sódio - 0,5;  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  - 0,36;  $CaCl_2$  - 0,04; agar - 12,0; extrato de levedura - 50 ml; água destilada até 1000 ml.

Todos os meios de cultura foram autoclavados conforme já descrito anteriormente.

#### 4.4.2. Meios de cultura utilizados nos experimentos de fixação de N pelo *Rhizobium*

Utilizou-se o meio YMA, que difere do YWA, descrito anteriormente apenas nos teores de manitol (10 g/l) e extrato de levedura (100 ml/l).

#### 4.5. Observação da atividade da nitrogenase

Utilizou-se o método da redução do acetileno, que avalia a atividade da nitrogenase, enzima responsável pela fixação biológica do dinitrogênio. A determinação dos gases foi feita, utilizando-se um cromatógrafo de gás Beckman GC-65, equipado com detector de ionização de chama e coluna de vidro de 2 m com Poropak N de 80 a 100 mesh.

Na simbiose cultura de tecido x *Rhizobium* foram realizadas medidas da atividade sob atmosfera normal. Nos ensaios de fixação de N pelo *Rhizobium* uma mistura 9:1 de argônio e oxigênio foi utilizada. Os frascos com as amostras para análise foram injetados com 10% do seu volume em acetileno, tendo-se o cuidado de retirar igual volume do ar selado

no frasco antes de realizar esta operação.

Amostras de  $0,5 \text{ cm}^3$  foram retiradas após 1,2 e 4 horas de incubação a  $28^\circ\text{C}$  ou como especificado no texto.

*Cálculo de atividade da nitrogenase* - O etileno evoluído foi calculado, utilizando-se um padrão de 500 ppm (0,5 ml de etileno puro adicionado a um frasco de 1000 ml do qual retirou-se 0,5 ml do ar selado em seu interior). Três amostras de 0,5 ml do padrão eram analisadas no cromatógrafo antes de correr as amostras dos experimentos (também de 0,5 ml). A altura do pico de etileno foi medida com o auxílio de uma régua comum.

*Procedimento do cálculo:*

$$\begin{array}{r}
 1 \text{ mol } (\text{C}_2\text{H}_2) \text{ a } 0^\circ\text{C} \qquad \qquad \qquad 22,400 \text{ ml} \\
 x \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad 0,5 \text{ ml } (0,5 \times 10^3) = 2,5 \times 10^{-4} \\
 x = 1,116 \times 10^{-8} \\
 11,16 \times 10^{-9} \quad \text{ou} \quad 11,16 \text{ nmoles}
 \end{array}$$

*No cromatógrafo:*

$$\begin{array}{r}
 11,16 \text{ nmoles} \qquad \qquad \text{média de três leituras em mm x atenuação x "range"} \\
 y \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad 1 \text{ mm} \\
 y = \text{nmoles de etileno/mm} \quad (\text{K a } 0^\circ\text{C})
 \end{array}$$

*Fator de correção para a temperatura:*

$$\frac{273^{\circ}\text{K} + 25^{\circ}\text{C}}{273^{\circ}\text{K}} = 1,09$$

$$1,09 \times y = y \text{ nmoles/mm (K a } 25^{\circ}\text{C)}$$

Teor de etileno na amostra = Z

$$Z = L \times \text{atenuação} \times \text{"range"} \times K \times 2 \times V$$

L = Leitura da amostra no cromatógrafo.

V = Volume do frasco onde a amostra estava contida

x 2 = porque era injetado somente 0,5 ml

mas, V x "range" x 2 x K = constante A

$$Z = L \times A$$

#### 4.6. Exame citológico do tecido

Amostras da cultura de tecido inoculada com a bactéria foram observadas em microscópio ótico Zeiss standard, usando a técnica histoquímica do cloreto de zinco iodado (JENSEN, 1962). Através desta técnica, paredes celulósicas ficam coloridas de roxo, paredes lipídicas de marrom avermelhado e paredes lignificadas de amarelo alaranjado.

#### 4.7. Experimentos de simbiose entre *R. phaseoli* e cultura de tecido

*Experimento nº 1* - Porções de *callus* de células da raiz do feijoeiro inoculadas com 127-K17 foram testadas para atividade da nitrogenase com os seguintes tratamentos:

- A - controle: frasco de 70 ml com  $C_2H_2$ .
- B - porções de *callus* inoculados desenvolvidos no clinostato.
- C - idem no agitador. Resultados no Quadro 1.

*Experimento nº 2* - Frascos contendo células da raiz de feijoeiro em meio de cultura 67-V modificado e preparado com 10% da quantidade de  $KNO_3$  (80 mg/l) recomendada e inoculados com estirpe 3610. A atividade da nitrogenase foi avaliada nos seguintes tratamentos:

- A - controle +  $O_2$  (ar).
- B - células da cultura de tecido + bactéria +  $O_2$  (ar).
- C - células da cultura de tecido + bactéria + 9:1 Ar e  $O_2$ . (Quadro 2).

*Experimento nº 3* - Células da raiz do feijoeiro espalhadas sobre o meio LNB5 e inoculadas com *R. phaseoli*

estirpe 3610 foram testadas para atividade da nitrogenase com os seguintes tratamentos com 3 repetições:

- A - controle: 50 ml de água + (Ar + O<sub>2</sub>) - 9:1.
- B - células da cultura de tecido + bactéria + (Ar e O<sub>2</sub>) após 10 dias de incubação.
- C - células da cultura de tecido + bactéria + (Ar + O<sub>2</sub>) após 16 dias de incubação (Quadro 3).

*Experimentos em que a atividade da nitrogenase foi nula:*

1. Cinco frascos com células da raiz do feijoeiro inoculadas com a estirpe 127-K17 testados para atividade da nitrogenase.
2. Células da raiz do feijoeiro espalhadas sobre o meio LNB5 e inoculadas com *R. phaseoli* - estirpe 3610, foram testadas para atividade da nitrogenase recebendo fluxo por 30" de uma mistura 9:1 de Ar e O<sub>2</sub> (Quadro 4).

#### 4.8. Experimentos sobre fixação livre de *rhizobia* em meio definido

*Experimento nº 1* - Três estirpes de *R. phaseoli* e uma de *R. japonicum* foram testadas em relação a ativi-

de da nitrogenase a partir do 4º, 5º e 6º dias de incubação. De cada estirpe eram feitas duas repetições (Quadro 5).

*Experimento nº 2* - Quatro estirpes de *R. phaseoli* foram testadas para verificar a atividade da nitrogenase após o 6º, 7º e 8º dias de incubação, sendo retiradas duas repetições de cada estirpe (Quadro 6).

*Experimento nº 3* - Dez estirpes de *R. phaseoli* e uma de *R. japonicum* foram testadas para atividade da nitrogenase sob atmosfera normal e sob atmosfera de uma mistura 9:1 de Ar e O<sub>2</sub>. Foi também testada a influência do Micostatin (10 gotas em 1000 ml de meio) tendo em vista o risco da contaminação ao abrir-se as placas diariamente para retirar as amostras (Quadro 7).

*Experimento nº 4* - Neste experimento foi testada a colocação da suspensão bacteriana em frascos com capacidade para 10 ml onde foi colocado 1 ml de meio de cultura CS7 e 1 gota de inóculo (Quadro 8).

*Experimento nº 5* - Neste experimento foram testadas 7 estirpes de *R. phaseoli* e uma de *R. japonicum* do 3º ao 7º dias de incubação sob atmosfera de 9:1 de Ar + O<sub>2</sub> (Quadro 9).

*Experimento em que a atividade da nitrogenase foi nula* - Neste foram testadas 7 estirpes de *R. phaseoli* as quais não apresentaram atividade da nitrogenase após o 3º e 4º dias de incubação (Quadro 10).

\*\*\*\*\*

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

\*\*\*\*\*

Os dados relativos à simbiose *R. phaseoli* e cultura de tecido de raízes de feijão são encontrados nos Quadros 1 a 4. Observa-se que os teores de etileno obtidos (Quadro 1), os quais indicam possível atividade da nitrogenase no sistema, são equivalentes aos obtidos por *HOLSTEN et alii* (1971) e *CHILD & LaRUE* (1974). Entretanto, verifica-se que somente uma amostra (A<sub>2</sub>) apresenta atividade crescente em relação ao tempo, o que vem a indicar que a fixação de nitrogênio nas outras amostras atingiu uma fase estacionária em período inferior a 15 minutos ou então os níveis de etileno observados não podem ser considerados como pertinentes à atividade pois conforme observa *POSTGATE* (1975) o etileno é um produto normal no metabolismo vegetal.

Quadro 1 - Atividade da nitrogenase -  $C_2H_4$  por frasco de 70 ml com cultura em suspensão de células da raiz do feijoeiro, inoculadas com *R. phaseoli* - estirpe 127-K17.

Amostras	nmoles de $C_2H_4$ após			
	15 min	30 min	45 min	1 h
A <sub>1</sub>	8,075	6,056	7,065	7,065
A <sub>2</sub>	4,009	5,047	11,009	7,065
A <sub>3</sub>	7,065	7,065	7,065	7,065

Quadro 2 - Atividade da nitrogenase -  $C_2H_4$  por frasco de 70 ml com cultura em suspensão das células da raiz do feijoeiro inoculadas com *R. phaseoli* - estirpe 3610. Meio de cultura com 10% de  $KNO_3$ .

Amostras	nmoles de etileno após 1 h
B <sub>1</sub>	30,375
B <sub>2</sub>	5,063
B <sub>3</sub>	0
B <sub>4</sub>	15,188
B <sub>5</sub>	20,25
B <sub>6</sub>	0

Quadro 3 - Atividade da nitrogenase -  $C_2H_4$  por frasco de 125 ml com células da raiz do feijoeiro em LNB5, inoculada com *R. phaseoli* - estirpe 3610.

Amostras	13 <sup>o</sup> dia incubação após 1 h	Amostras	14 <sup>o</sup> dia incubação após 1 h
C <sub>5</sub>	160,175	C <sub>1</sub>	0
C <sub>8</sub>	312,9	C <sub>3</sub>	0
C <sub>9</sub>	514,05	C <sub>4</sub>	0
C <sub>11</sub>	86,675		
C <sub>12</sub>	11,175		

Quadro 4 - Atividade da nitrogenase -  $C_2H_4$  por frasco com células da raiz de feijoeiro em meio 67-V modificado líquido e em LNB5, inoculados com *R. phaseoli*-estirpe 127-K17 e 3610, respectivamente.

Amostras	Meio 67-V	Amostras	Meio LNB5
a	0	I	0
b	0	II	0
c	0	III	0
d	0	VII	0
e	0	X	0
f	0		

Embora *HOLSTEN et alii* (1971) conseguissem fixação de nitrogênio por *R. japonicum*, associado com células de raízes de soja em meio de cultura com 60 mM de nitrogênio combinado é sabido que altos níveis deste elemento no meio, especialmente nitrato inibem a fixação. Por isso, *PHILLIPS* (1974) sugere uma investigação mais detalhada a respeito dos componentes do meio de cultura ao se tentar estabelecer uma relação simbiótica entre *Rhizobium* e uma leguminosa "*in vitro*", pois experimentos realizados por esse autor demonstraram que a produção de etileno é inibida por nitrogênio mineral. *CHILD & LaRUE* (1974) concluíram que baixos níveis tanto de nitrato como de amônio foram necessários para atividade da nitrogenase em associações de células de soja - *R. japonicum*. Decrescendo o teor inicial de nitrato nos meios de cultura, observou-se altos níveis de atividade de nitrogenase (Quadros 2 a 3) após uma hora de incubação sob acetileno em algumas estirpes, contrastando como outras onde a fixação ( $C_2H_4$ ) de nitrogênio foi nula. Talvez os resultados positivos fossem devidos a fatores ainda desconhecidos e involuntariamente controlados. Corroborando esta premissa, nota-se que amostras altamente eficientes na redução de acetileno no 13º dia de incubação apresentaram atividade nula um dia após (Quadro 3) enquanto que outros experimentos em diferentes meios de cultura apresentaram dados inteiramente nulos (Quadro 4).

Levando-se em consideração o caráter efetividade, o qual indicaria o suprimento de nitrogênio necessário ao

máximo crescimento da planta, através da simbiose, verifica-se que no feijoeiro, normalmente, a fixação não atinge altos níveis, embora *R. phaseoli* eficientes sejam sempre encontrados e usados na inoculação. As dificuldades encontradas talvez possam ser devidas à baixa efetividade desta simbiose. Trabalhos nos quais a percentagem de células nodulares infectadas em feijão é menor do que em soja ou amendoim (VINCENT, 1974) e que atividades nodulares específicas em feijão são menores do que metade daquelas encontradas para soja (HARDY et alii, 1968) implicam em que *Phaseolus* desenvolve uma associação menos eficiente entre as leguminosas noduladoras. Onde se conclui que a técnica da associação de *Rhizobium* e cultura de tecido para ser aplicada ao estudo da simbiose *Rhizobium* - *Phaseolus* deveria merecer uma pesquisa mais detalhada.

Os resultados obtidos na avaliação da fixação de nitrogênio ( $C_2H_4$ ) assimbioticamente por *R. phaseoli* são apresentados nos Quadros 5 a 10.

Sob atmosfera normal de oxigênio (ar) observam-se baixos níveis de atividade da nitrogenase para algumas estirpes (Quadros 5 e 6) em resultados pouco consistentes de acordo com as repetições (Quadro 5); porém, experimento subsequente onde somente 10% da atmosfera era de  $O_2$  (Quadros 6, 7 e 8) verificou-se capacidade de fixação de nitrogênio ( $C_2H_4$ ) mais elevada para algumas estirpes (Str. C-14 e 3610), o que está de acordo com GIBSON et alii (1976); PAGAN

Quadro 5 - Atividade da nitrogenase -  $C_2H_4$  por segmento de  $\pm 1 \text{ cm}^2$  de colônia no 4º, 5º e 6º dia de incubação sob atmosfera normal.

Estirpes	Dias de incubação		
	4º	5º	6º
127-K17 a	0	0,201	0,201
127 K17 b	0	-	-
127-K14 a	0,603	0,151	0,201
127-K14 b	0	-	-
CB 1809 a	0	traços	traços
CB 1809 b	0,502	-	traços
C-23 a	traços	0,101	-
C-23 b	0,302	-	-

b = repetição de a

Quadro 6 - Atividade da nitrogenase -  $C_2H_4$  por segmento de  $\pm 1 \text{ cm}^2$  de colônia no 6º dia de incubação sob atmosfera normal.

Estirpes	6º dia incubação		
	1 h	2 h	24 h
C-01	0	0	0
C-05	0,419	0	0
C-13	7,533	11,72	24,901
C-14	-	0,837	1,046
C-18	-	0,419	0,419
C-19	0,628	0,628	0,628
C-23	0,209	0	0
127-K17	0,628	-	-
CIAT 57	0	0	0
3610	0,209	0	0
CB-1809	0,209	0	0

Quadro 7 - Atividade da nitrogenase -  $C_2H_4$  por segmento de  $\pm 1 \text{ cm}^2$  de colônia no 6º, 7º e 8º dias de incubação sob atmosfera da mistura  $pAr 0,90$  e  $pO_2 0,10$ .

Estirpes	I n c u b a ç ã o					
	6º dia	7º dia			8º dia	
	1 h	1 h	2 h	17 h	1 h	17 h
C-01 a	-	-	-	-	-	-
C-01 b	-	-	-	-	-	-
127-K17 a	-	-	-	-	-	-
127-K17 b	-	-	-	-	-	-
Str C-14 a	0,894	0,728	1,821	-	-	-
Str C-14 b	0,894	-	0,728	0,728	-	-
3610 a	-	7,648	10,806	80,852	-	100,155
3610 b	1,342	0,728	1,457	343,804	-	91,419

(-) Níveis de etileno iguais ao tratamento controle.

Quadro 8 - Atividade da nitrogenase -  $C_2H_4$  por segmentos de  $\pm 1 \text{ cm}^2$  de colônia no 30, 40 e 70 dias de incubação sob atmosfera de mistura pAr 0,90 e pO<sub>2</sub> 0,10.

Estirpes	+ (Ar + O <sub>2</sub> )		
	30 dia incubação	40 dia incubação	70 dia incubação
127-K17	0,978	-	-
CIAT 57	0,489	-	-
C-01	0,978	-	-
3610 (vidrinho)	1,468	-	-
3610 (2 x glu)	4,892	-	-
3610 (2 x glu)	20,057	-	-

Quadro 9 - Atividade da nitrogenase -  $C_2H_4$  por segmentos de  $\pm 1 \text{ cm}^2$  de colônia no 3º, 4º, 5º, 6º e 7º dias de incubação sob atmosfera de mistura 9:1 de Ar +  $O_2$ .

Estirpes	Dias de incubação - após 30'				
	3º	4º	5º	6º	7º
C-05	-	-	9,233	1,269	-
C-18	7,930	3,155	-	0,931	0,339
C-19	-	2,008	-	1,607	-
C-23	-	-	4,757	-	2,205
CIAT 57	-	14,627	6,435	-	0,848
127-K17	-	0,860	0,839	-	1,018
3608	-	1,434	-	-	5,597
CB 1809	-	2,008	-	0,761	0,678

Quadro 10 - Atividade da nitrogenase -  $C_2H_4$  por segmentos de  $\pm 1 \text{ cm}^2$  de colônia no 3º e 4º dias de incubação sob atmosfera normal.

Estirpes	Dias de incubação	
	3º	4º
C-13	0	0
C-14	0	0
C-18	0	0
C-19	0	0
Str C-01	0	0
CIAT 57	0	0
3610	0	0

*et alii* (1975); EVANS & KEISTER (1976). Segundo estes autores o *Rhizobium* para fixar livremente precisaria de baixas tensões de O<sub>2</sub>. Naqueles resultados positivos encontrados sob atmosfera normal de ar as condições ideais seriam encontradas pelo próprio *Rhizobium* ao desenvolver-se no meio, penetrando numa zona do agar propícia à fixação, como exemplo pode-se citar a estirpe C-13 (Quadro 6).

O período de incubação em que a estirpe pode demonstrar atividade da nitrogenase "*in vitro*" é variável. Nota-se pelo Quadro 7 que a estirpe 3610 apresentou altos níveis de fixação somente no 7º dia de incubação (após 1, 2 e 17 h, sob atmosfera de Ar + O<sub>2</sub>). Isto não concorda com os resultados encontrados por PAGAN *et alii* (1975) nos quais a atividade da nitrogenase foi detectada no 4º dia e aumentou linearmente durante os quatro dias seguintes. Segundo GIBSON *et alii* (1977), citando Bergensen (1976), a diminuição de glutamina no meio determinou aumento da fixação de nitrogênio em culturas no quimiostato, o que indicaria no presente trabalho que no meio de agar quando o nível ideal fosse obtido a atividade da nitrogenase expressar-se-ia.

GIBSON *et alii* (1977) também relataram diminuição da fixação com a perturbação do meio. Tentando controlar tal situação foi distribuído 1 ml de meio de cultura em frascos de 10 ml sobre a superfície do qual foi distribuído uma gota de inóculo; ao analisar-se a atividade da nitrogenase so

mente verificou-se etileno mensurável no 3º dia (Quadro 8). Deve-se ressaltar que no presente caso a camada de meio de 1 ml foi por demais delgada e desidratou-se durante o período de incubação, não havendo portanto atividade da nitrogenase nos dias seguintes. *RANGA RAO (1977)* obteve resultados positivos, cultivando *Rhizobium* sp. sobre uma camada de 10 ml de meio de cultura em tubos de ensaio de 25 ml.

Observando-se porém, o Quadro 10, nota-se que o caráter de determinação do início da fixação é dependente da estirpe uma vez que maior atividade é apresentada em diferentes dias. As estirpes C-18, CIAT 57 e C-05 apresentaram picos de fixação no 3º, 4º e 5º dias respectivamente.

Experimento feito com diferentes estirpes sob ambiente aeróbico no 3º e 4º dias de incubação apresentou resultados negativos, isto é, sem atividade da nitrogenase (Quadro 10). Depois, observou-se que a fixação provavelmente dar-se-ia a partir do 5º dia.

Nas nossas condições *R. japonicum* - estirpe CB 1809 que apresentou resultados positivos nos experimentos realizados por *PAGAN et alii (1975)* comportou-se de forma diferente. Os níveis de atividade apresentados por esta estirpe foram nulos ou extremamente baixos (Quadros 5, 6 e 9). Conforme observaram *GIBSON et alii (1977)* estes resultados não reproduzíveis indicam sutilezas indefinidas existentes em cul

turas de *rhizobía* particularmente quando se tenta induzir a atividade da nitrogenase. Segundo os mesmos autores, até que fatores responsáveis por esta variação na atividade da nitrogenase sejam definidos, situações contraditórias deverão aparecer sempre que diferentes laboratórios publiquem seus resultados e concluem que deveria ser exigida toda atenção a este aspecto da fixação de dinitrogênio por *rhizobía* em cultura pura.

O estudo da genética e da fisiologia de *rhizobía* fez lento progresso enquanto envolveu infecção de plantas. À medida que métodos forem desenvolvidos para cultivar *rhizobía* fixadoras de dinitrogênio em culturas puras, líquidas e sólidas, geneticistas serão capazes de caracterizar os genes relacionados com a fixação e talvez obter mutantes com propriedades superiores. Ao mesmo tempo em que bioquímicos poderão investigar a relação da fixação de nitrogênio com o ambiente e determinar a natureza dos nutrientes fornecidos pelo *rhizobíum*.

Para *GIBSON et alii (1977)* a principal vantagem da demonstração da fixação de nitrogênio por estirpes de *rhizobía* em cultura pura reside em poder estudar a bactéria independentemente do hospedeiro. Assim, a relação entre planta e bactéria em simbiose poderá ser melhor definida e pesquisas dirigir-se-ão à planta ou à bactéria, quando apropriado, procurando sempre encontrar taxas de fixação mais altas e mais eficientes.

\*\*\*\*\*

## 6. CONCLUSÕES

\*\*\*\*\*

Os dados apresentados e discutidos permitem as seguintes conclusões:

- 1) As duas metodologias, que utilizaram as técnicas da cultura de tecidos, para serem aplicadas ao estudo da simbiose *Rhizobium - Phaseolus "in vitro"* não apresentaram resultados satisfatórios, devendo merecer um estudo mais detalhado.
  
- 2) Não foi observada nenhuma transformação na morfologia das células inoculadas, provenientes de cultura de tecidos.

- 3) A fixação livre do dinitrogênio por *Rhizobium phaseoli* relaciona-se com a presença de baixos níveis de nitrogênio mineral bem como intermediários do ciclo dos ácidos tri-carboxílicos no meio de cultura, enquanto que condições microaerofílicas são exigidas para expressão da atividade da nitrogenase.
  
- 4) Entre as estirpes de *R. phaseoli* testadas as duas únicas que demonstraram atividade da nitrogenase mensurável foram 3610 e C-13.
  
- 5) Entre as estirpes de *R. phaseoli* testadas, verificou-se que o período necessário para que a atividade da nitrogenase se expresse é variável.

\*\*\*\*\*

## 7. SUMMARY

\*\*\*\*\*

Since the beginning of the decade, when *HOLSTEN and co-workers (1971)* succeeded in establishing the symbiosis between soybean root cells and *Rhizobium japonicum* "in vitro", other research workers have been trying to repeat the experiment.

The objective of the present work was to test the methodology applied to establish the symbiotic relationship between bean root cells and *R. phaseoli*. Specific techniques of tissue culture were used to obtain callus in bean plants with subsequent inoculation with promising *R. phaseoli* strains, such as 127-K17 and 3610, in two cultura media.

Correlated studies were also made to evaluate the ability of different strains of *R. phaseoli* to fix

dinitrogen in culture medium in the absence of plant cells.

The method used in the studies of *Rhizobium* x bean tissue culture, consisted of obtaining and growing calli and inoculating them with a pure culture of *Rhizobium* bacteria. The morphology of the inoculated cells was observed by light microscope for the four experiments.

Five experiments were conducted to check the ability of fifteen strains of *R. phaseoli* to fix atmospheric dinitrogen asymbiotically.

Nitrogenase activity (enzyme responsible for biological nitrogen fixation) was evaluated using the acetylene reduction technique and gas chromatography for all experiments.

The results of the "*in vitro*" experiments were not reproducible, which suggests that the techniques used should be improved.

Only two *R. phaseoli* strains fixed dinitrogen asymbiotically reproducibly (3610 and C-13). The others were not reliable as the results were not reproducible.

It was concluded that free dinitrogen fixation by *R. phaseoli* depends on two factors: low levels of mineral nitrogen and tricarboxylic acid cycle intermediates in the culture media and microaerophilic conditions to enable expression of nitrogenase activity, as found with other *Rhizobia* already studied.

\*\*\*\*\*

## 8. LITERATURA CITADA

\*\*\*\*\*

BIGGINS, D.R. & POSTGATE, J.R. Nitrogen fixation by cultures and cell-free extracts of *Mycobacterium flavum*. *J. Gen. Microbiol.*, 56:181-93. 1969.

BROTONEGORO, S. Nitrogen fixation and nitrogenase activity of *Azotobacter chroococcum*. Wageningen Weenman & Fonen, 1974. 77p.

BROWN, C.M. & DILWORTH, M.J. Ammonia assimilation by *Rhizobium* cultures and bacteroids. *J. Gen. Microbiol.*, 86:39-48. 1975.

BURRIS, R.H. Nitrogen fixation-Assay Methods and Techniques. *Methods Enzymol.* (s.1), 24-B:415-31. 1972.

- CAPLIN, S.M. & STEWARD, F.C. A technique for the controlled growth of excised plant tissue in liquid media under aseptic conditions. *Nature*, London, 163:920-1. 1949.
- CHILD, J.J. & LaRUE, T.A. A simple technique for the establishment of nitrogenase in soybean callus culture. *Plant Physiol.*, Lancaster, 53:88-90. 1974.
- CHILD, J.J. Nitrogen fixation by a *Rhizobium* sp. in association with non-leguminous plant cell culture. *Nature*, London, 253:350-1. 1975.
- CROCOMO, O.J., PETERS, J.E. e SHARP, W.R. A literature review and the requirement for growth of *Phaseolus vulgaris* in tissue culture. *Arq. Biol. Tecnol.*, 18(1):25-31. 1975.
- DALTON, H. & MORTESON, L.E. Dinitrogen fixation ( $N_2$ ) (with a biochemical emphasis). *Bacteriol. Rev.* Baltimore, 36(2): 231-60. 1972.
- DILWORTH, M.J. & PARKER, C.A. Development of nitrogen fixing systems in legumes. *J. Theor. Biol.*, 25:208-18. 1969.
- DUNICAN, L.K. & TIERNEY, A.B. Genetic transfer of nitrogen fixation from *Rhizobium trifolii* to *Klebsiella aerogenes*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* N. York, 57:62-72. 1974.

- EVANS, W.R. e KEISTER, D.L. Reduction of acetylene by stationary cultures of free-living *Rhizobium* sp. under atmospheric oxygen levels. *Can. J. Microbiol.* Ottawa, 22:949-52. 1976.
- GALLO, L.A., RUSCHEL, A.P., CROCOMO, O.J. Short communication on the nitrogenase activity of nodulated plants obtained from embryo cultures. Piracicaba, CENA, 1977. 3p.
- GAMBORG, O.L. Aromatic metabolism in plants II. Enzymes of the shikimate pathway in suspension cultures of plant cells. *Can. Jour. Biochem.* Ottawa, 44:791-9. 1966.
- GAMBORG, O. The effect of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension cultures. *Plant Physiol.*, Lancaster, 45:372-5. 1970.
- GIBSON, A.H.; SCOWCROFT, W.R.; CHILD, J.J. e PAGAN, J.D. Nitrogenase activity in cultured *Rhizobium* sp. strain 3241. Nutritional and physical considerations. *Arch. Microbiol.* 108:45-54. 1976.
- GIBSON, A.H. Limitation to dinitrogen fixation by legumes. In: *Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation*. W.E. Newton and C.J. Nyman, Eds., Washington, p.400-28. 1976.

GIBSON, A.H., SCOWCROFT, W.R. e PAGAN, J.D. Nitrogen fixation in plants: an expanding horizon? In: *Recent development in nitrogen fixation*. W.E. Newton, J.R. Postgate e C. Rodrigues - Barrueco, Eds. London, Academic Press, p.387-416. 1977.

GUTIERREZ, P.U., INFANTE, M. e PINCHINAT, A. *Situación del cultivo de frijol en America Latina*. Colombia, CIAT, nov. 1975. 33p. (Série ES-19).

HARDY, R.W.F., HOLSTEN, R.D., JACKSON, E.K. e BURNS, R.C. The acetylene - ethylene assay for N<sub>2</sub> - fixation: laboratory and field evaluation. *Pl. Physiol.*, Lancaster, 43:1185-1207. 1968.

HILL, S. Influence of oxygen concentration on the colony type of *Desulfovibrio desulfurans* grown on nitrogen-free media. *J. Gen. Microbiol.*, 67:77-83. 1971.

HOLSTEN, R.D., BURNS, R.C., HARDY, R.W.F. e HEBERT, R.R. Establishment of symbiosis between *Rhizobium* and plant cells *in vitro*. *Nature*, London, 232:173-6. 1971.

JENSEN, W.A. Botanical histochemistry. Principles and Practice, San Francisco, Freeman Co., 1962. 408p.

- KEISTER, D.L. Acetylene reduction by pure cultures of *rhizobia*. *J. Bacteriol.*, 123(3):1265-6. 1975.
- KLUCAS, R.V., KOCH, B., RUSSEL, S.A. e EVANS, H.J. Purification and some properties of the nitrogenase from soybean nodules. *Plant Physiol.*, Lancaster, 43:1906-12. 1968.
- KURZ, W.G.W. & LaRUE, T.A. Nitrogenase activity in *rhizobia* in absence of plant host. *Nature*, London, 256:407-8. 1975.
- LaRUE, T.A., CHILD, J.J. e KURZ, W.G.W. Assymbiotic dinitrogen fixation by *Rhizobium* spp. In: *Rhizobium Newsletter*, Sidney, University of Sydney, 20(2):92-7. 1975.
- LaRUE, T.A., KURZ, W.G.W. e CHILD, J.J. Methods for growing nitrogen - fixing bacteria separated from plant cells. *Can. Jour. Microbiol.*, Ottawa, 21(11):1884-6. 1975b.
- Mc COMB, J.A., ELLIOT, J. e DILWORTH, M.J. Acetylene reduction by *Rhizobium* in pure culture. *Nature*, London, 256:409-10. 1975.
- PAGAN, J.D., CHILD, J.J., SCOWCROFT, W.R. e GIBSON, A.H. Nitrogen fixation by *Rhizobium* cultured on a defined medium. *Nature*, London, 256:406-7. 1975.

- PHILLIPS, D.A. Factors affecting the reduction of acetylene by *Rhizobium* - soybean cell - association *in vitro*. *Plant Physiol.*, Lancaster, 53:67-72. 1974a.
- PHILLIPS, D.A. Promotion of acetylene reduction by *Rhizobium* soybean cell associations *in vitro*. *Plant Physiol.* Lancaster, 54:654-5. 1974b.
- PHILLIPS, D.A.; DANIEL, R.M.; APPLEBY, C.A. e EVANS, H.J. Isolation from *Rhizobium* of factors which transfer electrons to soybean nitrogenase. *Plant Physiol.*, Lancaster, 51:136-8. 1973.
- POSTGATE, J. New nitrogen - fixing symbiosis *in vitro*. *Nature*, London, 253:305. 1975.
- RANGA RAO, V., SOPORY, S. e SUBBA RAO, N.S. Establishment of symbiosis *in vitro* between *Rhizobium* and pea (*Pisum sativum*) root callus. *Curr. Sci.*, 43:503-5. 1974.
- RANGA RAO, V. Nitrogenase activity in *Rhizobium* associated with leguminous and non-leguminous tissues cultures. *Plant Sci. Lett.*, Amsterdam, 6(2):77-83. 1976.
- RANGA RAO, V. Nitrogenase activity of *Rhizobium* sp. strain 1552 on defined medium. *Plant Sci. Lett.*, Amsterdam, 8(4):363-6. 1977.

- REPORTER, M. & HERMINA, N. Acetylene reduction by transfilter suspension cultures of *Rhizobium japonicum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, N. York, 64(4):1126-33. 1975.
- RUSCHEL, A.P. & REUSZER, H.W. Fatores que afetam a simbiose *Rhizobium phaseoli* - *Phaseolus vulgaris*. *Pesq. Agropec. bras.*, Ser. Agron. Rio de Janeiro, 8:287-92. 1973.
- SCHETTER, C. & HESS, D. Nitrogenase activity in *in vitro* associations between callus tissues of non-leguminous horticultural plants and *Rhizobium*. *Plant Sci. Lett.*, Amsterdam, 9:1-5. 1977.
- SCOWCROFT, W.R. & GIBSON, A.H. Nitrogen fixation by *Rhizobium* associated with tobacco and cowpea cell cultures. *Nature*, London, 253:351-2. 1975.
- SHARP, W.R. & O.J. CROCOMO (eds.). 1975. Application of Nuclear Energy to the Study of Cellular and Developmental Biology. Handbook of Plant Tissue Cultures. CENA/CNEN/OEA. Piracicaba, São Paulo. Brazil.
- TJEPKEMA, J. & EVANS, H.J. Nitrogen fixation by free-living *Rhizobium* in a defined liquid medium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, N. York, 65(2):625-8. 1975.

TRINICK, M.J. Symbiosis between *Rhizobium* and the non-legume, *Trema aspera*. *Nature*, London, 244:459-460. 1973.

VELIKY, I.A. & MARTIN, S.M. A fermenter for plant cell suspension cultures. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, 16:223-6. 1970.

VINCENT, J.M. *A manual for the practical study of the root nodule bacteria*. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1970. 211p. (IBP Handbook n° 15).

VINCENT, J.M. Root-nodule symbiosis with *Rhizobium*. In: *The biology of nitrogen fixation*. Amsterdam, A. Quispel Ed., 1974. p.266-341.

VINCENT, J.M. The *Rhizobium phaseoli* - *Phaseolus vulgaris* symbiosis: A Mini-Review. Piracicaba, s.ed., 1977. 11p.

YATES, M.G. Physiological aspects of nitrogen fixation. In: *Recent developments in nitrogen fixation*. London, Academic Press, 1977. p.219-70.