

RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS E FUNGICIDAS ASSOCIADA COM A CAPACIDADE SIMBIÓTICA DE ESTIRPES DE RHIZOBIUM PHASEOLI¹

JOÃO CARLOS PEREIRA², PAULO EMILIO LOVATO³ e CAIO VIDOR⁴

RESUMO - Desenvolveu-se a presente pesquisa com feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) em areia irrigada com solução nutritiva sem presença de N, visando verificar a estabilidade mutagênica, a infectividade e a capacidade de fixar N₂ por parte dos mutantes espontâneos de *R. phaseoli* resistentes a antibióticos e fungicidas. Houve variações nos níveis de resistência entre as estirpes aos diferentes biocidas utilizados. Perdas na capacidade infectiva ou fixadora de N₂ dos mutantes de *R. phaseoli* não estiveram relacionadas com o tipo de antibióticos ou fungicidas, e nem com as concentrações utilizadas. Algumas estirpes mostraram mais capacidade de fixação de N₂, em comparação com SEMIA 487 e SEMIA 492, atualmente incluídas entre as estirpes recomendadas aos fabricantes de inoculantes. O mutante SEMIA 4002-ST₁ apresentou-se mutagenicamente estável. Os resultados confirmam as proposições quanto à viabilidade de utilização de mutantes em estudos ecológicos de *Rhizobium*, desde que estes mantenham suas características mutagênicas e não apresentem resistência cruzada aos antibióticos.

Termos para indexação: *Phaseolus vulgaris*, inoculação, infectividade, eficiência, feijão.

RESISTANCE TO ANTIBIOTICS AND FUNGICIDES ASSOCIATED WITH SYMBIOTIC EFFECTIVENESS OF RHIZOBIUM PHASEOLI STRAINS

ABSTRACT - Experiments with *Phaseolus vulgaris* L. grown in sand irrigated with N-free nutrient solution were conducted to evaluate the mutagenic stability, infectivity, and N₂-fixing ability of *R. phaseoli* spontaneous mutants resistant to antibiotics and fungicides. There were variations on resistance levels among the *Rhizobium* strains to the different biocides. Loss of infective ability or decrease in efficiency for N₂ fixation observed for several mutants were not related to the type of antibiotic and fungicide nor to the different concentration used. Some mutant strains exhibited a higher N₂-fixing ability when compared to SEMIA 487 and SEMIA 492 which are being used by inoculant manufacturers. The mutant SEMIA 4002-ST₁ was mutagenically stable. The results support the idea about the possibility of using spontaneous mutants in ecological of *Rhizobium* as long as they have mutagenic stability and have no cross-resistance to the antibiotics.

Index terms: *Phaseolus vulgaris*, inoculation, infectivity, efficiency, beans.

INTRODUÇÃO

A utilização de técnicas imunológicas para avaliar o comportamento de diferentes estirpes de *Rhizobium* torna-se inviável quando existe simi-

laridade antigênica entre elas, dada a grande frequência de reações cruzadas. Nestas condições, o acompanhamento de uma estirpe na presença de outras pertencentes a um mesmo sorogrupo só poderá ser feito se a referida estirpe apresentar outros atributos que possibilitem a sua diferenciação das demais.

Assim, tem sido proposta a utilização de mutantes resistentes a antibióticos e/ou fungicidas como técnica viável em estudos ecológicos do *Rhizobium* (Obaton 1971, Odeyemi & Alexander 1977). Esta técnica permite fazer avaliações qualitativas e quantitativas da população mutante pelo uso de meios seletivos contendo o biocida ao qual o mutante é resistente. Porém, deve-se considerar que o caráter de resistência pode determinar uma melhor capacidade de colonização e sobrevivência no

¹ Aceito para publicação em 13 de dezembro de 1985. Parte da dissertação de Mestrado em Agronomia (Área de concentração: Solos) - Faculdade de Agronomia, UFRS - do primeiro autor. Pesquisa financiada pelo CNPq e FINEP.

² Eng. - Agr., EMBRAPA/UAPNPBS, km 47, CEP 23460 Seropédica, RJ.

³ Eng. - Agr., Prof.-Auxiliar, Centro de Ciências Agrárias da UFSC. Estrada do Itacorubi, s/n, CEP 88000 Florianópolis, SC.

⁴ Eng. - Agr., Seção de Microbiologia do Solo, IPAGRO/Secretaria da Agricultura, RS, Prof.-Adjunto, Dep. de Solos, UFRS, e Bolsista do CNPq. Caixa Postal 776, CEP 90000 Porto Alegre, RS.

solo, como conseqüência de modificações nas características morfológicas da bactéria e na sensibilidade a fagos e a antibióticos (Kowalska 1977), o que poderá dar margem a possíveis interpretações errôneas sobre o verdadeiro comportamento da população sensível do solo. Além dessas variações, também têm sido encontradas alterações na capacidade infectiva e fixadora de N_2 em mutantes de *Rhizobium* resistentes a diferentes antibióticos quando relacionados com as estirpes-matrizes. Assim, Schwinghamer (1964) observou a manutenção da infectividade e a perda da capacidade de fixar nitrogênio em mutantes de *R. leguminosarum*, *R. trifolii* e *R. meliloti*, resistentes aos antibióticos viomicina e neomicina. Por outro lado, Levin & Montgomery (1974) demonstraram que não houve relação entre resistência a certos antibióticos com a infectividade e eficiência, ao estudarem o efeito de 55 antibióticos em estirpes de *R. japonicum*.

As variações no comportamento apresentadas pelas estirpes mutantes podem ser conseqüência da ação dos antibióticos sobre a célula bacteriana, que por sua vez pode estar relacionada com interferências na estrutura ou função da parede ou membrana celular, ou inibindo um processo metabólico interno (Tavares 1982).

O presente trabalho teve como objetivo obter e avaliar a estabilidade, a resistência cruzada e a eficiência simbiótica de mutantes espontâneos de *R. phaseoli*, com vistas à utilização dos mesmos em estudos envolvendo a ação de fatores biológicos e não biológicos do solo sobre a população de *Rhizobium*.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se as estirpes SEMIA 476 (cc 511 = CIAT 57 = SMS 376), SEMIA 484 (IPAGRO, isolamento número 12/68), SEMIA 486 (IPAGRO, isolamento 34/68), SEMIA 487 (IPAGRO, isolamento 29/71), SEMIA 491 (NITRAGIN, 127 K17), SEMIA 492 (CENA, C-05), SEMIA 4002 (CIAT 255), SEMIA 4003 (UNIVERSIDADE DE MINNESOTA, QA 1062), SEMIA 4012 (CENA, C-12) e SEMIA 4026 (IPAGRO, isolamento CAR-29), pertencentes à coleção de culturas do IPAGRO/Secretaria de Agricultura do Rio Grande do Sul, para obtenção de mutantes espontâneos resistentes aos antibióticos estreptomicina (Fontoura, Wyeth), canamicina (Sigma Chemical), viomicina (Sigma Chemical), utilizados na for-

ma de sulfato; novobiocina (Sigma Chemical), utilizado na forma de sal sódico, e aos fungicidas thiram, benomyl e PCNB.

Para avaliação da resistência natural das estirpes matrizes, utilizou-se o meio água de levedura-manitol-ágar (ALMA), descrito por Vincent (1970), com temperatura em torno de 50°C, no qual foi adicionada uma quantidade de solução estoque do biocida, previamente esterilizada por filtração através de membrana com poros de 0,45 µm de diâmetro (Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts), suficiente para se obter as concentrações de 20, 50, 100 e 200 µg/ml de estreptomicina e de 10, 20, 50 e 100 µg/ml para a canamicina, novobiocina, viomicina, thiram, benomyl e PCNB. Após homogeneização e distribuição de 10 ml em placas-de-petri, as estirpes foram riscadas e incubadas a 28°C por três dias, para observações do crescimento bacteriano.

Esta técnica também serviu para obtenção de mutantes com uma ou duas marcas de resistência nas concentrações de 500, 1.000, 5.000 e 10.000 µg/ml de estreptomicina e de 10, 20 e 50 µg/ml para os demais antibióticos e fungicidas, sendo que foram distribuídos 10 ml do meio contendo o biocida em placas-de-petri contendo 1 ml de uma suspensão de cada estirpe, com, aproximadamente 10⁸ células. As placas foram incubadas a 28°C até o aparecimento de colônias emergentes típicas de *Rhizobium* em meio seletivo, sendo então transferidos para tubos com meio ALMA sem antibióticos e armazenados a 4°C.

A avaliação da capacidade infectiva dos mutantes até então obtidos foi realizada em câmara de crescimento (treze horas dia, temperatura 20°C - 25°C e 10.000 lux), utilizando-se vasos "Leonard" contendo areia e carvão vegetal na proporção de 4:1, para eliminar possível toxicidade de manganês relacionada com a areia (Peres & Vidor 1980). Os vasos foram esterilizados em autoclave a 121°C e 1,5 atm por duas horas.

Foram semeadas seis sementes por vaso da cultivar de feijão Turrialba-4, previamente desinfetadas em álcool 96%GL por cinco minutos, HgCl₂ 0,1% por dois minutos, e sete lavagens consecutivas com água destilada esterilizada. Nove dias após foi feito o desbaste, deixando-se duas plantas por vaso.

As estirpes mutantes utilizadas como inóculo foram suspensas em solução salina em fase exponencial de crescimento e adicionou-se cada uma a um vaso à razão de 1 ml por planta. Utilizou-se a solução nutritiva descrita por Specht et al. (1956), periodicamente, em intervalos alternados com água destilada esterilizada durante o ciclo da planta.

A colheita foi feita aos 42 dias após a semeadura (florescimento pleno), para avaliações visuais da intensidade de nodulação, do desenvolvimento e coloração da parte aérea, bem como do rendimento de matéria seca da mesma após secagem em estufa a 65°C até peso constante.

Avaliou-se também o potencial de fixação do N_2 das estirpes SEMIA 476, SEMIA 487, SEMIA 491, SEMIA 492, SEMIA 4002 e SEMIA 4012; dos isolamentos prove-

nientes de Winnipeg-Canadá 1P, 2P, 4P, 6P e 8P; e dos mutantes SEMIA 476-ST (mutante espontâneo da estirpe SEMIA 476, resistente a 200 µg/ml de estreptomicina), SEMIA 476-VIO (mutante da estirpe SEMIA 476 resistente a 50 µg/ml de viomicina), SEMIA 487-ST₁ (500 µg/ml de estreptomicina), SEMIA 487-ST₂ (5.000 µg/ml de estreptomicina), SEMIA 487-NOV (20 µg/ml de novobiocina), SEMIA 491-ST₁, SEMIA 491-ST₂, SEMIA 491-ST₃, SEMIA 492-ST₁, SEMIA 492-ST₂, SEMIA 492-ST₃, SEMIA 4002-ST₁, SEMIA 4002-ST₂, SEMIA 4012-ST₁, SEMIA 4012-ST₃, SEMIA 4012-ST₄ (resistentes a 1.000 µg/ml de estreptomicina), CIAT 161 ST + SP (resistente a 50 µg/ml de estreptomicina e 200 µg/ml de espectinomicina), CIAT 166 SP (200 µg/ml de espectinomicina), CIAT 407 SP (200 µg/ml de espectinomicina), CIAT 407 ST (50 µg/ml de estreptomicina), CIAT 407 ST + SP (50 µg/ml de estreptomicina e 200 µg/ml de espectinomicina), CIAT 904 ST (50 µg/ml de estreptomicina) e CIAT 904 SP (200 µg/ml de espectinomicina).

Além dos tratamentos inoculados, utilizaram-se duas testemunhas sem inoculação, sendo uma com nitrogênio mineral. Para propiciar um melhor desenvolvimento inicial das plantas, adicionaram-se 35 mg de nitrogênio/vaso na forma de NH₄NO₃, sendo que na testemunha nitrogenada foram adicionadas 70 mg por períodos regulares durante o ciclo da planta totalizando 700 mg de N por vaso. Os diferentes tratamentos foram dispostos segundo o delineamento de blocos completos casualizados, com três repetições.

Colheram-se as plantas no florescimento pleno (45 dias após semeadura), para avaliações do peso dos nódulos secos, bem como do rendimento de matéria seca e nitrogênio total da parte aérea, determinado pelo método descrito por Tedesco (1978).

Fez-se avaliação quantitativa da estabilidade mutagênica através de diluições em séries, utilizando-se as estirpes SEMIA 487-NOV, SEMIA 4002-ST₁, isoladamente e em mistura, em placas contendo o meio ALMA sem e com estreptomicina e/ou novobiocina. As culturas foram suspensas em solução salina (sais do meio ALMA diluído a 25%) após crescimento, por quatro dias, a 28°C, sendo então equalizadas por turbidimetria em relação à menor turva (colorímetro fotoelétrico marca Dadeko), para padronização do número de células por mililitro de suspensão. A diluição inicial das suspensões individualizadas e da mistura foi feita em 90 ml de solução salina com diluições posteriores em 18 ml até a diluição final de 10⁷. Nas diluições de 10⁵, 10⁶ e 10⁷ foram utilizadas três placas-de-petri por diluição contendo 1 ml do meio ALMA sem e com antibiótico. Após quatro dias a 28°C, fez-se a contagem do número de colônias em cada placa.

Os mutantes SEMIA 476-1, SEMIA 476-12, SEMIA 476-16, SEMIA 487-1, SEMIA 487-8, SEMIA 487-11 e SEMIA 487-18 foram avaliados quanto à estabilidade mutagênica e à resistência cruzada aos antibióticos, através do crescimento bacteriano proveniente de suspensões nodulares em meios seletivos. Para isto, utilizaram-se dez nódulos

de cada vaso, previamente hidratados em água destilada, que foram desinfestados em placas de porcelana com álcool 96°GL por um minuto, HgCl₂ 0,1% por dois minutos e seis lavagens consecutivas em água destilada esterilizada. Em seguida, cada nódulo foi colocado em tubo com 0,5 ml de solução salina previamente esterilizado, no qual foi macerado em condições assépticas. Esta suspensão foi repicada para placas-de-petri e dividida em dez partes, correspondendo cada uma a um nódulo, contendo o meio ALMA sem e com antibióticos, nos quais foi adicionado um fungistático (cicloheximida) na concentração de 20 µg/ml de maneira semelhante aos antibióticos. Após incubação por quatro dias a 28°C, avaliou-se o crescimento bacteriano, e considerou-se que a estirpe com o caráter mutagênico estável cresceria no meio que continha o antibiótico, ao qual apresentou resistência, e que apresentava resistência cruzada no meio que continha antibiótico diferente daquele em que foi isolado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As estirpes de *R. phaseoli* apresentaram comportamento diferenciado em relação à resistência natural aos antibióticos e fungicidas utilizados (Tabela 1). Todas as estirpes apresentaram crescimento exuberante na maior concentração dos fungicidas benomyl e PCNB (100 µg/ml de meio), o que impossibilitou a determinação dos níveis de resistência delas a estes fungicidas. Por outro lado, as estirpes apresentaram variações nas suas resistências quando foi utilizado o fungicida thiram nas concentrações de 10, 20, 50 e 100 µg/ml de meio, sendo que as estirpes SEMIA 476 e SEMIA 484 não cresceram na menor concentração utilizada. Entretanto, as estirpes SEMIA 491 e SEMIA 492 apresentaram crescimentos abundantes nesta concentração, mas foram inibidas na presença de 20 µg/ml. Por sua vez, os crescimentos das estirpes SEMIA 487, SEMIA 4002, SEMIA 4012 e SEMIA 4026 só foram inibidos na concentração de 50 µg/ml. Esta variação pode estar relacionada com diferenças na capacidade de metabolização deste fungicida pelas estirpes (Odeyemi & Alexander 1977).

Observa-se, ainda, que houve variações nos níveis de resistência das estirpes aos antibióticos utilizados. Estes níveis atingiram concentrações mais elevadas para a canamicina, exceção feita à estirpe SEMIA 4012, que não cresceu na presença de 10 µg/ml de meio, o que indica sua alta sensibilidade a este antibiótico. Verifica-se, também,

TABELA 1. Resistência natural de estirpes de *R. phaseoli* quando crescidas em meios seletivos contendo antibióticos e fungicidas.

Estirpes	Antibióticos					Fungicida*
	STR***	CAN	ESP	NOV	VIO	THR
SEMIA 476	20**	100	20	10	50	10
SEMIA 484	20	100	20	10	50	10
SEMIA 487	20	100	50	10	50	50
SEMIA 491	100	50	20	10	50	20
SEMIA 492	20	20	10	10	20	20
SEMIA 4002	20	100	20	10	50	50
SEMIA 4012	20	10	10	10	20	50
SEMIA 4026	20	50	10	10	20	50

* Testes com os fungicidas benomyl e PCNB demonstraram que as estirpes apresentaram crescimento exuberante até a maior concentração utilizada (100 µg/ml).

** Os valores numéricos representam as concentrações (µg/ml) em que ocorreu inibição de crescimento.

*** STR = estreptomina; CAN = canamicina; ESP = espectinomicina; NOV = novobiocina; VIO = viomicina; THR = thiram.

que as estirpes apresentaram resistência natural a doses mais concentradas de viomicina do que à estreptomina e à espectinomicina. O comportamento das estirpes em relação à estreptomina e espectinomicina foi similar: para a estreptomina, de um modo geral, a resistência natural foi inferior à menor concentração utilizada (20 µg/ml); e para a novobiocina, a resistência natural foi inferior a 10 µg/ml de meio para todas as estirpes utilizadas.

A diversidade de comportamento apresentada por estas estirpes, em relação a resistência natural aos antibióticos utilizados, pode estar relacionada com a antibiose exercida pela população microbiana nos solos dos quais elas foram isoladas. Assim, a resistência natural estaria na dependência do percentual de microrganismos antagonísticos presentes no solo (Patel 1974), produzindo simultaneamente um ou vários antibióticos com diferentes intensidades (Porter 1971).

Os resultados da avaliação quantitativa dos níveis de resistência de estirpes mutantes a 200 µg/ml dos fungicidas benomyl e PCNB encontram-se na Tabela 2. Observa-se que para os mutantes CIAT 407 ST + SP, CIAT 166 SP e CIAT 904 ST os números de células bacterianas foram semelhantes na ausência e presença destes fungicidas, evidenciando que não houve redução ou inibição no crescimento

destas estirpes, que as concentrações bacteriostáticas e bactericidas destes fungicidas são superiores a 200 µg/ml. Por sua vez, o mutante SEMIA 4002-ST₁ apresentou redução no número de células quando em presença do fungicida PCNB, demonstrando que a concentração utilizada apresentou efeito bacteriostático. Resultados semelhantes foram obtidos por Rao & Sharma (1981) quando estudaram o efeito destes fungicidas em concentrações de 100, 200 e 300 ppm no crescimento de diferentes espécies de *Rhizobium*, sendo que PCNB estimulou o crescimento de estirpes de *R. leguminosarum*. Isso provavelmente ocorreu graças à capacidade das estirpes utilizadas em metabolizarem esses fungicidas ou a modificações ocorridas nos seus princípios ativos quando em solução aquosa (Brown 1978).

O comportamento das estirpes mutantes inoculadas na cultivar Turrialba-4 em relação à infectividade e à eficiência foi bastante diversificada (Tabela 3). O parâmetro infectividade foi avaliado através da presença ou ausência de nódulos, já que normalmente a ausência de nódulos observada é resultante da perda da capacidade infectiva das estirpes (Levin & Montgomery 1974). Além disso, a eficiência simbiótica também foi avaliada através do rendimento de matéria seca da parte aérea,

TABELA 2. Resistência natural de mutantes espontâneos de *R. phaseoli* crescidos em meio de cultura na ausência e presença dos fungicidas benomyl e PNCB (200 µg/ml). Dados expressos como log do número de bactérias por mililitro de suspensão. Médias de três repetições.

Estirpes	Origem e nível de resistência-µg/ml	Benomyl		PNCB	
		0	200	0	200
SEMIA 4002-ST ₁	STR 1.000	9,0 a*	8,9 a	9,1 a	8,6 b
CIAT 407 ST + SP	STR 50, ESP 200	8,4 a	8,5 a	N.F.	N.F.
CIAT 166 SP	ESP 200	N.F.	N.F.	8,6 a	8,8 a
CIAT 904 ST	STR 50	N.F.	N.F.	8,4 a	8,6 a

N.F. = Não foi feito; STR = Estreptomomicina; ESP = Espectinomomicina.

* Médias na ausência e presença de cada fungicida, seguida de letras iguais, não diferem significativamente pelo teste de Duncan (P > 0,05).

tendo em vista que este parâmetro apresenta alta correlação com o teor de N total da parte aérea de plantas crescidas em areia e solução nutritiva sem nitrogênio (Vincent 1970).

O mutante da estirpe SEMIA 492, isolado de meio seletivo contendo 50 µg/ml de viomicina ou 100 µg/ml de canamicina, e os dois da estirpe SEMIA 4026, resistente a 1.000 µg/ml de estreptomomicina, perderam a capacidade infectiva. Resultados semelhantes também foram obtidos para a maioria dos mutantes da estirpe SEMIA 486, resistente a diferentes tipos e concentrações de antibióticos ou fungicidas, sendo que as plantas inoculadas com estes mutantes apresentavam-se amareladas, pouco desenvolvidas, e sem nódulos. Entretanto, a hipótese de inoculação de contaminantes não pode ser rejeitada, tendo em vista que os isolamentos foram feitos apenas com base na morfologia das colônias.

A avaliação visual também demonstrou, de modo geral, que as plantas noduladas apresentaram um bom desenvolvimento da parte aérea com coloração esverdeada. Os rendimentos de matéria seca obtidos foram bastante variáveis, oscilando entre 1,2 g para a estirpe SEMIA 4012-ST₁ a 5,5 g para a SEMIA 484-6/C₂. Esta variação também ocorreu entre mutantes da mesma matriz, o que evidencia perdas parciais ou totais da eficiência simbiótica (Schwinghamer 1964).

Observa-se que as perdas na habilidade infectiva ou fixadora de nitrogênio dos mutantes de *R. phaseoli* não estiveram relacionadas com os antibióti-

cos ou fungicidas e nem com as concentrações utilizadas. Resultados semelhantes foram obtidos por Levin & Montgomery (1974), para mutantes de *R. japonicum* e por Hagedorn (1979) para mutantes de *R. trifolii* com resistência a diversos antibióticos. Estas alterações parecem estar intimamente relacionadas com a estirpe de *R. phaseoli* utilizada, o que confirma observações feitas por outros pesquisadores que relacionaram a perda da infectividade e a variação na eficiência simbiótica em estirpes de *R. trifolii* resistentes a diferentes concentrações de cloranfenicol, penicilina e estreptomomicina a diferenças entre estirpes (Kowalska 1971, Abdel-Wahab et al. 1976).

As perdas da capacidade infectiva e as variações na eficiência simbiótica das estirpes mutantes podem ser resultantes dos diferentes mecanismos de aquisição de resistência dos antibióticos pelas células, onde ocorrem modificações genéticas a nível do cromossoma bacteriano ou de partículas de ADN autônomas (plasmídeos) presentes no citoplasma celular (Tavares 1982); que podem causar alterações nas funções celulares com conseqüências nas propriedades simbióticas dos mutantes.

O rendimento de matéria seca da parte aérea (Fig. 1), o nitrogênio total (Fig. 2) e o peso dos nódulos secos (Fig. 3) foram utilizados como parâmetros indicadores da eficiência fixadora das estirpes.

Comparando o comportamento de diferentes estirpes com as estirpes SEMIA 487 e SEMIA 492, atualmente incluídas entre as estirpes recomenda-

TABELA 3. Resposta da cultivar de feijão Turrialba-4 à inoculação com estirpes mutantes de *R. phaseoli*, resistentes a antibióticos e/ou fungicidas quando utilizados individualmente em meio e solução nutritivos.

Estirpes* (SEMIA)	Origem e nível** de resistência ($\mu\text{g/ml}$)	Avaliação visual***		
		Nodulação	Parte aérea	
			Intensidade	Coloração
476-C ₁	CAN 50	A	V	3,0
476-C ₂	CAN 50	A	V	3,5
476-C ₄	CAN 50	A	A	2,0
484-6/C ₁	STR 5.000, CAN 50	M	A	2,4
484-6/C ₂	STR 5.000, CAN 50	A	V	5,5
486-3	STR 5.000	O	A	2,4
486-3/C ₁	STR 5.000, CAN 50	O	A	2,2
486-3/T ₁	STR 5.000, THR 50	P	A	1,7
486-6/T ₁	STR 10.000, THR 50	O	A	2,0
487-B ₁	BNL 50	A	V	4,9
487-1	STR 500	A	V	4,0
487-1/C ₁	STR 500, CAN 50	A	V	2,6
491-1	STR 1.000	A	V	3,6
492-1	STR 1.000	A	V	3,6
492-2	VIO 50	A	V	3,5
492-2/S ₁	VIO 50, STR 1.000	A	V	3,0
492-2/C ₁	VIO 50, CAN 100	O	A	2,5
4002-S ₁	STR 1.000	A	V	4,8
4002-C ₁	CAN 50	A	V	5,0
4003-1	STR 5.000	A	V	3,4
4003-1/T ₁	STR 5.000, THR 50	A	V	2,9
4003-2	STR 5.000	A	V	4,4
4003-2/T ₁	STR 5.000, THR 50	M	V	4,1
4012-ST ₁	STR 1.000	A	A	1,2
4012-ST ₂	STR 1.000	A	A	2,7
4026-ST ₁	STR 1.000	O	A	2,3
4026-ST ₂	STR 1.000	O	A	2,3
Testemunha	—	O	A	2,4

* Os índices que acompanham o número de código das estirpes representam colônias isoladas de diferentes fontes e níveis de resistência. Assim, os índices C₁, C₂ e C₄ referem-se às colônias 1, 2 e 4 replicadas do meio seletivo contendo 50 μg de canamicina por ml.

** STR = estreptomicina; CAN = canamicina; NOV = novobiocina; THR = thiram; BNL = benomyl.

*** Parte aérea - desenvolvimento: B = bom, M = médio, F = fraco; Coloração: V = verde, A = amarela; Nodulação - Intensidade: A = abundante, M = média, P = pouca, O = ausente.

das aos fabricantes de inoculantes, observou-se a ocorrência de um grupo de estirpes com maior eficiência, outro com eficiência intermediária, e ainda outro, inferior a estas duas estirpes. As plantas inoculadas com as estirpes SEMIA 487-ST₂, CIAT 407 ST + SP, SEMIA 4002-ST₁, SEMIA 487 e CIAT 407 destacaram-se por apresentarem os maiores rendimentos de matéria seca e os teores

mais altos de nitrogênio total na parte aérea, com pesos de nódulos que variaram de 708 a 934 mg/vaso. Em contrapartida, as plantas inoculadas com as estirpes mutantes SEMIA 4012-ST₃ e SEMIA 4012-ST₁ apresentaram os mais baixos rendimentos de matéria seca, N total e peso de nódulos secos. Estas variações na eficiência fixadora das estirpes podem estar relacionadas com o período de

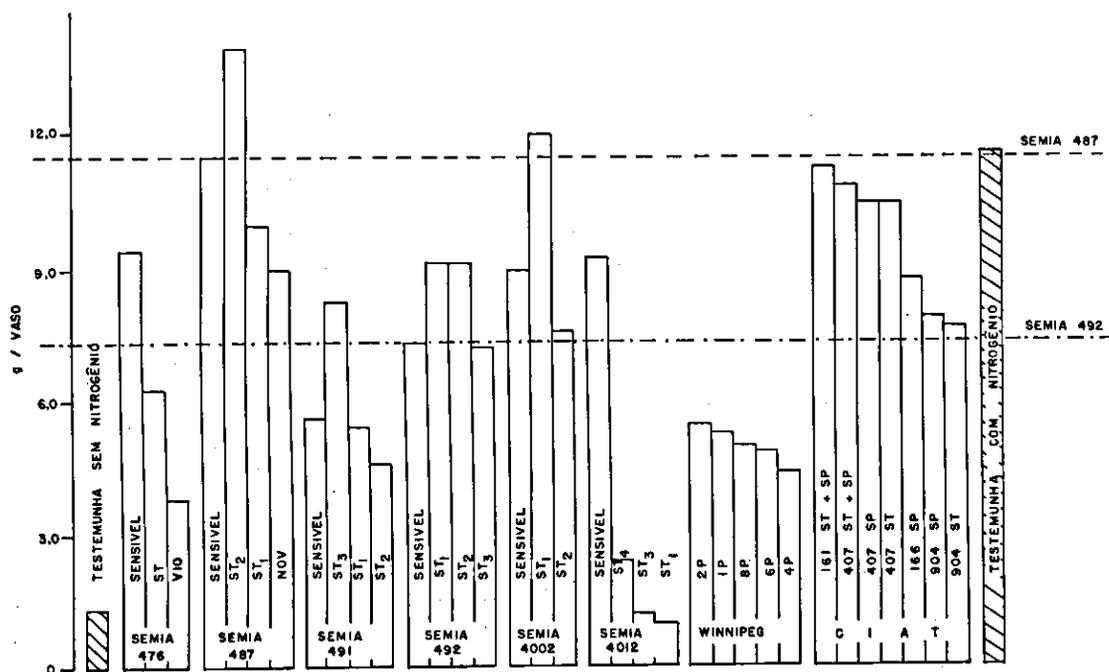


FIG. 1. Rendimento de matéria seca da parte aérea em resposta à inoculação com estirpes *R. phaseoli* na cultivar de feijão Turrialba-4 em areia e solução nutritiva. Médias de três repetições. Tukey (5%), W = 6,54 g.

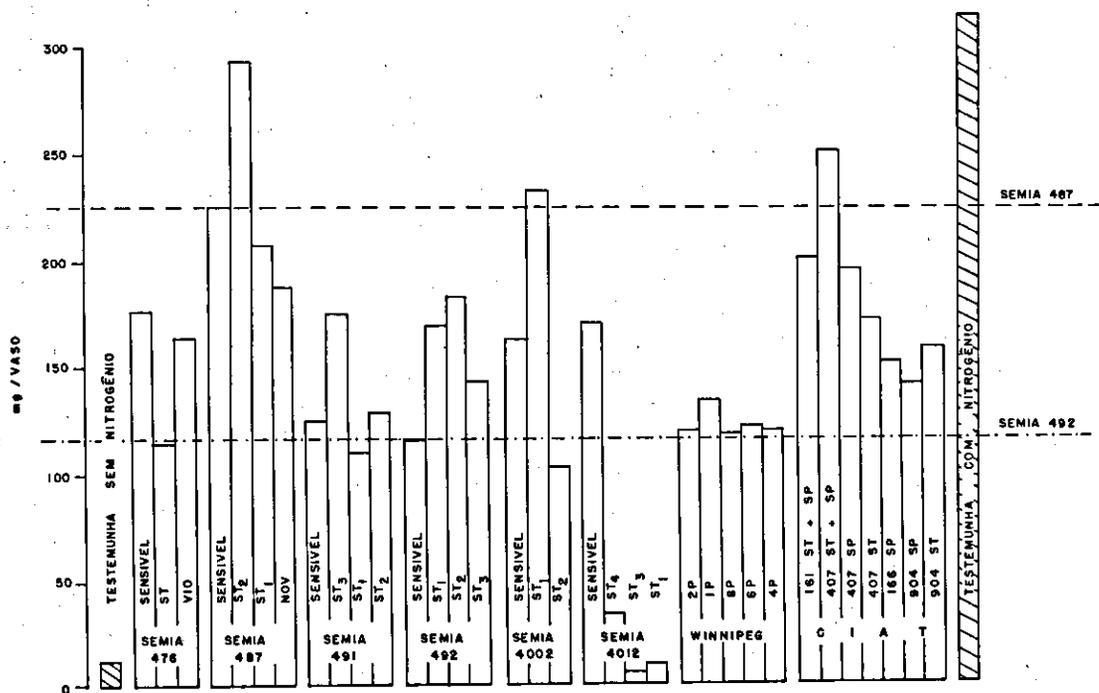


FIG. 2. Nitrogênio total da parte aérea em resposta à inoculação com estirpes de *R. phaseoli* na cultivar de feijão Turrialba-4 em areia e solução nutritiva. Médias de três repetições. Tukey (5%), W = 139,72 mg.

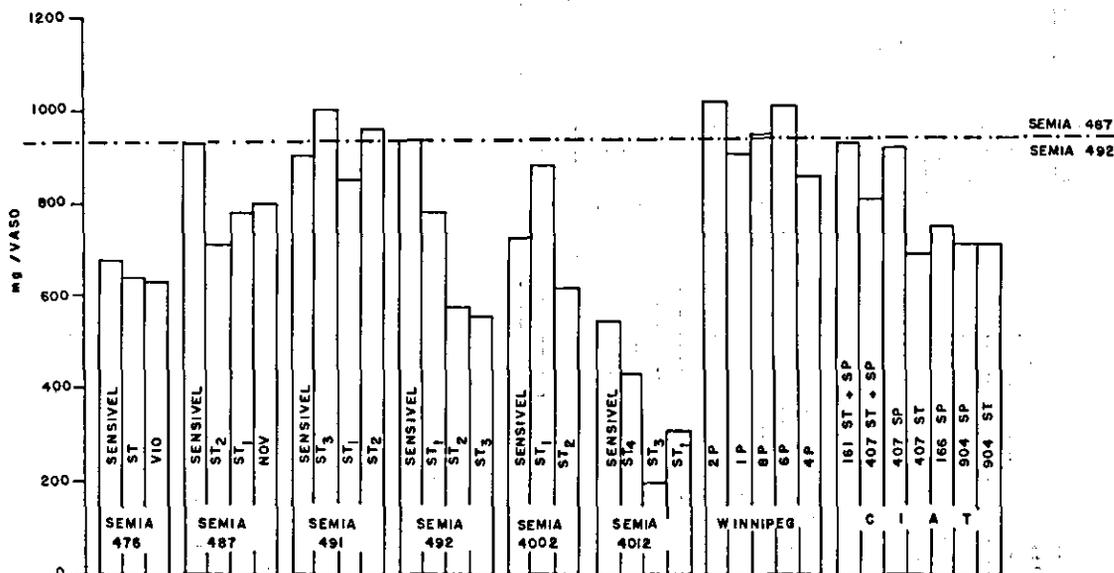


FIG. 3. Peso de nódulos secos em respostas à inoculação com estirpes de *R. phaseoli* na cultivar de feijão Turrialba-4 em areia e solução nutritiva. Médias de três repetições. Tukey (5%), $W = 729,88$ mg.

fixação (Voss 1981) ou com as características intrínsecas das estirpes (Freney & Gibson 1974, Havelka & Hardy 1976).

O teor de N total apresentou alta correlação com o rendimento de matéria seca da parte aérea ($r = 0,943$), confirmando resultados obtidos por outros pesquisadores (Lopes et al. 1976, Vidor et al. 1979). A baixa correlação do peso de nódulos com estes parâmetros ($r = 0,516$ para o N total e $r = 0,595$ para a matéria seca) demonstra que a avaliação da eficiência das estirpes em fixar nitrogênio através do peso de nódulos pode induzir a erros de interpretação. Os altos pesos de nódulos, bem como os baixos rendimentos de matéria seca e N total apresentados pelas plantas que foram inoculadas com os isolamentos provenientes de Winnipeg-Canadá (2P, 6P e 8P) e com as estirpes SEMIA 492 e SEMIA 491 e seus mutantes evidenciam diferenças marcantes na eficiência nodular entre grupos de estirpes. Portanto apesar de estas estirpes terem induzido uma nodulação exuberante, elas apresentaram baixa eficiência fixadora.

Com base no crescimento bacteriano das suspensões nodulares em meios seletivos, avaliou-se a estabilidade mutagênica dos mutantes eficientes das estirpes SEMIA 476 e SEMIA 487 (Tabela 4). Observa-se que as suspensões nodulares das estirpes

mutantes resistentes a estreptomicina, SEMIA 476-16, SEMIA 487-1 e SEMIA 487-18 apresentaram crescimento quando repicadas em meio contendo este antibiótico, fato que caracteriza a manutenção de suas características mutagênicas. Em contrapartida, somente 80% dos nódulos do mutante SEMIA 476-1 apresentaram crescimento bacteriano, provavelmente em decorrência de uma reversão parcial destas características. Por sua vez, as suspensões nodulares dos mutantes SEMIA 476-12, SEMIA 487-8 e SEMIA 487-11 com resistência a canamicina não apresentaram crescimento bacteriano quando foram repicadas em meio contendo este antibiótico, evidenciando a perda das características mutagênicas desses mutantes.

Esta variação poderia ser explicada por alterações que estes antibióticos (ambos aminoglicosídeos) provocam quando são ligados à fração 30 S do ribossoma (Gollobin & Levin 1974, Levin & Montgomery 1974), inibindo a síntese protéica e alterando a codificação do DNA com conseqüentes modificações na síntese da cadeia polipeptídica; um ou vários resíduos de aminoácidos de sua seqüência específica podem ser substituídos por outros (Lehninger 1976), o que poderá provocar alterações reversíveis ou irreversíveis na célula bacteriana.

TABELA 4. Rendimento de matéria seca da parte aérea de feijão (cultivar Turrialba-4) inoculado com estirpes sensíveis ou mutantes de *R. phaseoli* em areia e solução nutritiva, e estabilidade mutagênica de mutantes resistentes aos antibióticos estreptomomicina ou canamicina.

Estirpes	Origem e nível de resistência (µg/ml)	Antibióticos	Matéria seca (g/vaso)	Estabilidade mutagênica (%)
SEMIA 476-0	Sensível	—	5,57	—
SEMIA 476-1	STR 500	Estreptomomicina	4,84	80
SEMIA 476-12	CAN 100	Canamicina	5,63	0
SEMIA 476-16	STR 500	Estreptomomicina	6,69	100
SEMIA 487-0	Sensível	—	6,79	—
SEMIA 487-1	STR 500	Estreptomomicina	5,13	100
SEMIA 487-8	CAN 50	Canamicina	5,58	0
SEMIA 487-11	CAN 50	Canamicina	6,22	0
SEMIA 487-18	STR 500	Estreptomomicina	6,32	100

CONCLUSÕES

1. As estirpes de *R. phaseoli* apresentaram variações na resistência natural aos antibióticos e fungicidas utilizados.

2. Os mutantes apresentaram comportamento diferenciado em relação à capacidade infectiva, à eficiência fixadora de nitrogênio e à estabilidade mutagênica.

3. A resistência à estreptomomicina se mostra mais promissora do que a canamicina.

4. Os resultados apresentados confirmam as proposições quanto à possibilidade de utilização de mutantes em estudos ecológicos do *Rhizobium*, desde que os mesmos mantenham as suas características mutagênicas e as relacionadas com a simbiose estáveis, e que não apresentem reações cruzadas.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-WAHAB, S.M.; RIFAAT, O.M.; AHMED, K.A. & HAMD, Y.A. Resistance to antibiotics in *Rhizobium trifolii* and its relation to nitrogen fixation. Zentralbl. Bakteri. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 2, 131:170-8, 1976.
- BROWN, A.W.A. Ecology of pesticides. New York, Wiley, 1978. p.436.
- FRENEY, J.R. & GIBSON, A.H. Non-protein nitrogen accumulation in legume nodules. Bull. R. Soc. N.Z., (12):37-40, 1974.
- GOLLOBIN, G.S. & LEVIN, R.A. Streptomycin resistance in *Rhizobium japonicum*. Arch. Microbiol., 101:83-90, 1974.
- HAGEDORN, C. Relationship of antibiotic resistance to effectiveness in *Rhizobium trifolii* populations. Soil Sci. Soc. Am. J., 43:921-5, 1979.
- HAVELKA, V.D. & HARDY, R.W.F. Photosynthate as a major factor limiting nitrogen fixation by field grown legumes with emphasis on soybeans. In: NUTMAN, P.D., ed. Symbiotic nitrogen fixation in plants. Cambridge, Cambridge Univ. Press, 1976. p.421.
- KOWALSKA, I.Z. Correlation between streptomycin resistance and infectiveness in *Rhizobium trifolii*. Plant Soil, 1971, p.67-71. Número especial.
- KOWALSKA, I.Z. Correlation between streptomycin resistance and symbiotic properties of *Rhizobium*. Acta Microbiol. Pol., 26(3):223-41, 1977.
- LEHNINGER, A.L. Mutações. In: ———. Bioquímica; componentes moleculares das células. São Paulo, E. Blücher, 1976. v. 1, p.47.
- LEVIN, R.A. & MONTGOMERY, M.P. Symbiotic effectiveness of antibiotic resistant mutants of *Rhizobium japonicum*. Plant Soil, 41:669-76, 1974.
- LOPES, E.S.; GIARDINI, A.R.; KIIHL, R. & IGUE, T. Especificidade hospedeira e pré-seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* para as variedades Santa Rosa, Viçosa e IAC-2 de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Bragantia, 35(1):1-12, 1976.
- OBATON, M.M. Utilization de mutants spontanés résistants aux antibiotiques pour l'étude écologique des *Rhizobium*. C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. C, 272:2630-3, 1971.
- ODEYEMI, O. & ALEXANDER, M. Use of fungicide-re-

- sistant rhizobia for legume inoculation. *Soil Biol. Biochem.*, 9:247-51, 1977.
- PATEL, J.J. Antagonism of actinomycetes against rhizobia. *Plant Soil*, 41:395-402, 1974.
- PERES, J.R.R. & VIDOR, C. Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* e competitividade por sítios de infecção nodular em cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). *Agron. sulriogr.*, 16(2):205-19, 1980.
- PORTER, J.N. Prevalence and distribution of antibiotic-producing actinomycetes. *Adv. Appl. Microbiol.*, 14:73-92, 1971.
- RAO, A.V. & SHARMA, R.L. Note on compatibility of fungicides with rhizobia and pea - *Rhizobium leguminosarum* association. *Indian J. Agric. Sci.*, 51(2):135-7, 1981.
- SCHWINGHAMER, E.A. Association between antibiotic resistance and infectiveness in mutant strains of *Rhizobium* spp. *Can. J. Microbiol.*, 10(2):221-3, 1964.
- SPECHT, A.W.; ERDMAN, L.W.; MEANS, V.M. & RESNICKY, J.W. Effect of nutrition on *Trifolium hirtum* inoculated with *Rhizobium trifolii*. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 29:489-95, 1956.
- TAVARES, W. Manual de antibióticos para estudantes de medicina. Rio de Janeiro, Atheneu, 1982. 374p.
- TEDESCO, M.J. Métodos de análise de nitrogênio total, amônia, nitrito e nitrato em solos e tecidos vegetais. Porto Alegre, UFRS. Fac. Agron., 1978. 20p. (Informativo Interno, 01/78).
- VIDOR, C.; BROSE, E. & PEREIRA, J.S. Competição por sítio de infecção nodular entre estirpes de *Rhizobium japonicum* em cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). *Agron. sulriogr.*, 15(2):227-38, 1979.
- VINCENT, J.M. A manual for the practical study of root-nodules bacteria. London, Burgess/IBP, 1970. 164p.
- VOSS, M. Seleção de *Rhizobium phaseoli* de regiões produtoras de feijão do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, UFRS. Fac. Agron., 1981. 75p. Tese Mestrado - Solos.