

# EFICIÊNCIA E CAPACIDADE COMPETITIVA DE ESTIRPES DE *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* BV. *PHASEOLI* EM FEIJÃO<sup>1</sup>

JOÃO CARLOS PEREIRA<sup>2</sup>, CAIO VIDOR<sup>3</sup>, PAULO EMÍLIO LOVATO<sup>4</sup>  
e ALBERTO DE FIGUEIREDO PENTEADO<sup>5</sup>

RESUMO - Conduziram-se dois experimentos em casa de vegetação, sendo um em areia e solução nutritiva e o outro em solo (Passo Fundo-LVEd), para avaliar a eficiência e a capacidade competitiva por sítios de nódulos (Cultivar Turrialba-4), entre estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* resistentes ou sensíveis a antibióticos. A tipificação dos nódulos evidenciou, tanto em areia quanto em solo, a presença de nódulos originários de infecções múltiplas. A característica de resistência aos antibióticos não alterou a constituição antigênica dos mutantes em comparação com suas estirpes matrizes. Algumas estirpes resistentes à estreptomina reverteram à forma sensível, variando entre 13 e 32% de reversão. No tratamento representado pela mistura das estirpes SEMIA 487, SEMIA 487-2 e SEMIA 487-Nov, a SEMIA 487-2 (resistente à estreptomina) ocorreu em 82% dos nódulos, enquanto a resistente a novobiocina ocorreu em 54%. A tipificação dos nódulos evidenciou a alta capacidade competitiva por sítios de nódulos, apresentada pela estirpe SEMIA 4002-S1.

Termos para indexação: *Phaseolus vulgaris*, nódulos, estirpes, antibióticos, infecções múltiplas.

## EFFICIENCY AND COMPETITIVENESS OF *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* BV. *PHASEOLI* STRAINS IN FIELD BEANS

ABSTRACT - Two experiments were conducted in greenhouse with sand-nutrient solution or soil (Passo Fundo-Oxisol) to evaluate effectiveness and competitiveness for nodules sites among *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* strains, resistant or sensitive to antibiotics when used as single or multi-strain inoculant on *Phaseolus vulgaris* (Cultivar Turrialba-4). Nodule typing showed double nodule occupancy by strains in both experiments. Resistance to antibiotics did not alter antigenic characteristics of the strains but some mutants were less competitive as compared to the parent strain. Some mutants resistant to streptomycin reverted to the sensitive type culture, varying from 13 to 32%. In the multi-strain inoculant (SEMIA 487 + SEMIA 487-2 + SEMIA 487-Nov) strain SEMIA 487-2 (resistant to streptomycin) occupied 82% of the nodules, whereas strain SEMIA 487-Nov (resistant to novobiocin) occupied 54%. Nodule typing also demonstrated a high competition of strain SEMIA 4002-S1 (resistant to streptomycin) for nodule sites.

Index terms: *Phaseolus vulgaris*, nodules, strains, antibiotics.

## INTRODUÇÃO

A inoculação do feijão com estirpes eficientes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* nem sempre resulta em aumento da produtividade da cultura, devido à competição por sítios de nódulos formados, que geralmente ocorre entre as estirpes utilizadas nos inoculantes e as estabelecidas no solo. Nestas condições, a capacidade competitiva é de fundamental importância, pois permite maior ocupação dos nódulos por estirpes de comprovada eficiência

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 7 de fevereiro de 1991

Extraído da Dissertação de Mestrado em Agron. (Área de Solos) Fac. de Agron. UFRGS - do primeiro autor. Pesquisa financiada pelo CNPq e FINEP.

<sup>2</sup> Eng. - Agr., EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa em Biol. do Solo, Km 47, CEP 23851 Seropédica, RJ.

<sup>3</sup> Eng. - Agr., Prof. - Adj., Dep. de Solos, UFRGS, Bolsista do CNPq. Caixa Postal 776, CEP 90001 Porto Alegre, RS.

<sup>4</sup> Eng. - Agr., Prof. - Assist., Centro de Ciências Agrárias/UFSC. Estrada do Itacorubi s/n, CEP 80000 Florianópolis, SC.

<sup>5</sup> Eng. - Agr. *In memoriam*.

simbiótica e conseqüentemente a maximização do N<sub>2</sub> fixado.

Nos solos onde não há resposta à inoculação, geralmente encontram-se estirpes que podem atingir concentrações de 10<sup>6</sup> células por grama de solo e que podem ser eficientes ou ineficientes em determinado hospedeiro (Trinick 1982). Nesta situação, as estirpes presentes no inoculante necessitam competir ativamente por substratos e pelo nicho já ocupado por outros microrganismos.

Segundo Trinick (1982), a competição por sítios de infecção nodular envolve características inerentes à leguminosa, com influências em nível de espécies e de cultivares (Vincent 1974, 1977), e também inerentes ao rizóbio. Esse comportamento também foi evidenciado por Vidor et al. (1979) ao estudarem a habilidade competitiva de cinco estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*, quando utilizadas em mistura em cultivares de soja, e por Johnson & Means (1964) que observaram maior capacidade competitiva em treze estirpes de *B. japonicum*, de um total de 299, em comparação com a estirpe indutora de clorose USDA 76.

Assim, para que a utilização de inoculantes tenha maior possibilidade de sucesso, torna-se necessário selecionar estirpes de rizóbio que, além de formarem uma simbiose eficiente em um grande número de cultivares da leguminosa hospedeira também possuam alta capacidade competitiva por sítio de nódulos formados (Vidor et al. 1979).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento de estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* sensíveis e resistentes a antibióticos e fungicidas quanto à capacidade competitiva por sítios de nódulos em areia com solução nutritiva e em solo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Experimento I

A eficiência simbiótica e a capacidade competitiva por sítios de nódulos na cultivar de feijão Turrialba-4 foram estudadas mediante a inoculação de onze estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* resistentes

ou sensíveis a antibióticos e fungicidas, utilizadas em diferentes combinações. O experimento foi conduzido em vasos-Leonard com areia e solução nutritiva sem N, sendo que a caracterização das estirpes e a metodologia utilizada para a instalação do experimento foram descritas por Pereira et al. (1991).

As culturas utilizadas como inóculo foram suspensas em solução salina e ajustadas para uma mesma turbidez em colorímetro fotoelétrico Dadeko. O número de células de cada suspensão foi determinado pelo método de diluição em placas, obtendo-se uma concentração variável entre 2,7 x 10<sup>8</sup> a 7,2 x 10<sup>8</sup> células/ml. Nos vasos adicionou-se 1 ml por planta destas suspensões, contendo as seguintes misturas de estirpes sensíveis ou mutantes:

- I- SEMIA 476 + SEMIA 476-16
- II- SEMIA 476 + SEMIA 484 + SEMIA 487 + SEMIA 4002
- III- SEMIA 476-16 + SEMIA 484-6 + SEMIA 487-2 + SEMIA 4002-S<sub>1</sub>
- IV- SEMIA 484 + SEMIA 484-6
- V- SEMIA 487 + SEMIA 487-1
- VI- SEMIA 487 + SEMIA 487-2 + SEMIA 487-NOV
- VII- SEMIA 487-2 + SEMIA 486-ST + TH + SEMIA 4002-S<sub>1</sub>
- VIII- SEMIA 4002 + SEMIA 4002-S<sub>1</sub>

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos completamente casualizados com quatro repetições.

Fez-se a colheita do experimento quando as plantas estavam em floração plena (47 dias após semeadura), para avaliação do peso dos nódulos secos, do rendimento de matéria seca e do nitrogênio total da parte aérea, bem como do percentual de ocorrência das estirpes nos nódulos.

A identificação das estirpes nos nódulos foi feita através de meios seletivos contendo os antibióticos aos quais os mutantes são resistentes e através de reações de aglutinação entre antissoros específicos aos diferentes sorogrupos (fornecidos pela Seção de Microbiologia do Solo/IPAGRO) e antígenos nodulares.

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, HgCl<sub>2</sub> 0,1% por dois minutos e seis lavagens consecutivas em água destilada esterilizada. Em seguida cada nódulo foi macerado em condições assépticas, em tubo com 0,5 ml de solução salina previamente esterilizados. Esta suspen-

são foi repicada para placas-de-Petri, dividida em dez partes, correspondendo cada uma a um nódulo, contendo o meio-água de levedura-manitol-água (Vincent 1970), 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, considerando-se que a estirpe com o caráter mutagênico cresceria no meio contendo o antibiótico ao qual apresentou resistência.

Após o repique das suspensões nodulares para as placas contendo os meios seletivos, adicionou-se 1 ml de NaCl 0,85% aos tubos com o restante das suspensões, sendo então transferidos para o banho-maria à temperatura de 100°C durante 30 minutos, para facilitar a sedimentação dos resíduos nodulares (Means et al. 1964).

Do sobrenadante adicionaram-se três gotas com pipetas-Pasteur nas cavidades dispostas horizontalmente em bandejas de celulósido transparentes (Modelo 240-V-CS Clear, Limbro Chemical Co, Inc. New Haven, Conn). No sentido vertical, adicionou-se com pipetas de 1 ml, uma gota dos antissoros das estirpes SEMIA 487 e SEMIA 4002, diluídas 25 vezes, e uma gota de solução fisiológica para observação de possíveis aglutinações espontâneas. As bandejas foram mantidas em banho-maria a 52°C durante 60 minutos, após o qual observaram-se as

reações. Considerou-se como positivas as suspensões claras com aglutinações no fundo da cavidade, e negativas, as suspensões turvas com ausência da aglutinação.

## Experimento II

Em experimento descrito por Pereira et al. (1991), avaliou-se a capacidade competitiva por sítios de nódulos de doze estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* em relação à população desse rizóbio já existente no solo Passo Fundo (Latossolo Vermelho-Escuro distrófico). A metodologia utilizada para caracterização das estirpes nos nódulos, por aglutinação e pelo uso de meios seletivos, é semelhante à apresentada para o experimento I deste trabalho.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias dos valores obtidos para peso de nódulos secos, rendimento de matéria seca e N total da parte aérea, foram utilizadas como parâmetros indicadores da eficiência simbiótica das estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, sensíveis e resistentes a antibióticos, quando inoculadas em mistura na cultivar Turrialba-4 (Tabela 1).

**TABELA 1. Resposta da cultivar de feijão Turrialba-4 à inoculação com diferentes misturas de estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* sensíveis e/ou resistentes a antibióticos e fungicidas em areia e solução nutritiva. Médias de quatro repetições.**

| Estirpes  | Nódulos secos | Matéria seca | N total |
|---|---------------|--------------|---------|
|   | mg/vaso       | g/vaso       | mg/vaso |
| SEMIA 476 + SEMIA 476-16  | 471           | 5,26         | 175b    |
| SEMIA 476 + SEMIA 484 + SEMIA 487 +<br>+ SEMIA 4002                       | 455           | 4,44         | 138b    |
| SEMIA 476-16 + SEMIA 484-6 +<br>+ SEMIA 487-2 + SEMIA 4002-S <sub>1</sub> | 441           | 7,47         | 253 a   |
| SEMIA 484 + SEMIA 484-6   | 477           | 5,72         | 186 ab  |
| SEMIA 487 + SEMIA 487-1   | 550           | 4,70         | 156 b   |
| SEMIA 487 + SEMIA 487-2 + SEMIA 487-NOV                                   | 397           | 4,58         | 133 b   |
| SEMIA 487-2 + SEMIA 486-ST + TH +<br>+ SEMIA 4002-S <sub>1</sub>          | 381           | 4,04         | 150 b   |
| SEMIA 4002 + SEMIA 4002-S <sub>1</sub>                                    | 388           | 3,72         | 137 b   |

Médias seguidas de mesma letra dentro do parâmetro N total não diferem significativamente ( $P > 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Verifica-se que as plantas inoculadas com as estirpes em diversas misturas não resultaram em diferenças significativas da nodulação e do rendimento de matéria seca da parte aérea. Entretanto, os valores médios obtidos para o N total evidenciam a superioridade dos tratamentos constituídos pela mistura das estirpes SEMIA 476-16 + SEMIA 484-6 + SEMIA 487-2 + SEMIA 4002-S<sub>1</sub> e das estirpes SEMIA 484 + SEMIA 484-6.

Embora não tenham apresentado diferenças significativas, os valores obtidos para o rendimento de matéria seca apresentaram alta correlação com os obtidos para o teor de N total das plantas ( $r = 0,958$ ), sendo que o mesmo não se verificou para o peso de nódulos secos quando foi correlacionado com o N total das plantas ( $r = 0,219$ ). Estes dados confirmam resultados anteriores (Pereira et al. 1991), onde demonstrou-se maior sensibilidade deste parâmetro nestas condições.

Além da eficiência simbiótica, também avaliou-se, através da utilização de meios se-

letivos e da sorologia, a capacidade competitiva das estirpes por sítios de infecção nodular. Para isto, utilizaram-se os antissoros das estirpes SEMIA 487 e SEMIA 4002, já que a estirpe SEMIA 491 apresentou estrutura antigênica semelhante (reação cruzada) à SEMIA 487 e as estirpes SEMIA 476 e SEMIA 484 semelhante à SEMIA 4002.

Na Tabela 2, observa-se através dos meios seletivos, que nos tratamentos representados pela mistura das estirpes SEMIA 476 + SEMIA 476-16, SEMIA 484 + SEMIA 484-6 e SEMIA 4002 + SEMIA 4002-S<sub>1</sub>, os percentuais de ocorrência dos mutantes nos nódulos foram menores do que os das estirpes matrizes, o que evidencia a redução na capacidade competitiva de algumas estirpes mutantes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. Observações semelhantes foram feitas por Bromfield & Jones (1979) para mutantes de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, com dupla marca de resistência, que foram menos competitivas por sítios de nódulos do que a estirpe matriz quando

**TABELA 2. Ocorrência de estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* nos nódulos da cultivar de feijão Turrialba-4 em areia e solução nutritiva em resposta à inoculação. Média de três repetições.**

| Estirpes   | Nódulos tipificados | Estirpes  |                  |                  | Nódulos tipificados | Estirpes (antissoros) |            |
|--|---------------------|-----------|------------------|------------------|---------------------|-----------------------|------------|
|  |                     | Sensíveis | Mutantes         |                  |                     | SEMIA 487             | SEMIA 4002 |
|  |                     |           | EST <sup>1</sup> | NOV <sup>2</sup> |                     |                       |            |
|  | Número              | -----     | %                | -----            | Número              | -----                 | %          |
| SEMIA 476 + SEMIA 476-16   | 79                  | 67        | 33               | NFD <sup>3</sup> | 45                  | 0                     | 100        |
| SEMIA 476 + SEMIA 484 + SEMIA 487 + SEMIA 4002                       | 78                  | 100       | 0                | 0                | 41                  | 0                     | 100        |
| SEMIA 476-16 + SEMIA 484-6 + SEMIA 487-2 + SEMIA 4002-S <sub>1</sub> | 74                  | 32        | 68               | NFD              | 12                  | 0                     | 100        |
| SEMIA 484 + SEMIA 484-6  | 80                  | 92        | 8                | NFD              | 43                  | 0                     | 100        |
| SEMIA 487 + SEMIA 487-1  | 78                  | 42        | 58               | NFD              | 52                  | 100                   | 0          |
| SEMIA 487 + SEMIA 487-2 + SEMIA 487-NOV                              | 67                  | 36        | 82               | 54               | 52                  | 100                   | 0          |
| SEMIA 487-2 + SEMIA 486-ST + TH + SEMIA 4002-S <sub>1</sub>          | 79                  | 13        | 77               | NFD              | 18                  | 0                     | 100        |
| SEMIA 4002 + SEMIA 4002-S <sub>1</sub>                               | 80                  | 61        | 39               | NFD              | 68                  | 0                     | 100        |

1 - EST - Estreptomicina; 2 - NOV = Novobiocina; 3 - NFD = Não foi determinado.

Sorogrupos: SEMIA 487 = SEMIA 486 = SEMIA 491  
SEMIA 4002 = SEMIA 476 = SEMIA 484

comparadas com uma estirpe ineficiente de alta capacidade competitiva. Estas alterações, assim como outras na capacidade infectiva e na eficiência simbiótica das mutantes, podem ser resultantes dos diferentes mecanismos de aquisição de resistência aos antibióticos pelas células bacterianas (Tavares 1982). Além disso, estas alterações podem ser resultantes de variações na eficiência em fixar o  $N_2$  por parte de isolamentos obtidos a partir da mesma estirpe (Peres et al. 1984).

A utilização de meios seletivos também proporcionou a observação de reversão das características mutagênicas das células mutantes resistentes à estreptomicina. Esta reversão esteve em torno de 13% para o tratamento constituído pela mistura das estirpes SEMIA 487-2 + SEMIA 486-ST + TH + SEMIA 4002-S<sub>1</sub> e em 32% para o tratamento SEMIA 476-16 + SEMIA 484-6 + SEMIA 487-2 + SEMIA 4002-S<sub>1</sub>, sendo que os motivos para esta instabilidade possivelmente sejam os mesmos descritos anteriormente (Gollobin & Levin 1974, Levin & Montgomery 1974, Lehninger 1976). Este fato também pode explicar o maior percentual de ocorrência das estirpes matrizes SEMIA 476, SEMIA 484 e SEMIA 4002 nos nódulos das plantas quando inoculadas em mistura com os seus respectivos mutantes. Além disso, verifica-se que, para a mistura das estirpes SEMIA 487 + SEMIA 487-2 + SEMIA 487-NOV, a estirpe mutante resistente a estreptomicina foi mais competitiva, ocorrendo em 82% dos nódulos tipificados, enquanto a estirpe mutante, resistente a novobiocina, ocorreu em 54%. Assim, fica evidenciado através da soma desses percentuais a ocorrência de infecções duplas nos nódulos das plantas inoculadas com a mistura destas estirpes, o que confirma observações feitas por outros pesquisadores sobre a presença de duas ou mais estirpes no mesmo nódulo (Skrdleta & Karimova 1969, Lindemann et al. 1974, Bromfield & Jones 1980).

Nos tratamentos onde as estirpes inoculadas pertencem a um mesmo sorogruppo, a tipificação sorológica dos nódulos indicou que não houve contaminações entre tratamentos, pois

as suspensões nodulares reagiram somente com o antissor das estirpes inoculadas no vaso. Além disso, esta técnica evidenciou que não houve alterações na estrutura antigênica das estirpes mutantes em comparação com as estirpes matrizes (Schwinghamer & Dudman 1973, Brockwell et al. 1977).

A tipificação dos nódulos através da sorologia também evidenciou a alta capacidade competitiva da estirpe SEMIA 4002-S<sub>1</sub> nos nódulos das plantas inoculadas quando em mistura com as estirpes SEMIA 487-2 e SEMIA 486-ST + TH. Apesar de esta estirpe apresentar uma relação de concentração na ordem de 1:2 em comparação com as outras duas estirpes (SEMIA 486-ST + TH e SEMIA 487-2), que pertencem ao mesmo sorogruppo, ela ocorreu em 100% dos nódulos. Estes dados demonstram que a ocorrência das estirpes nos nódulos pode não estar relacionada com suas concentrações no inoculante e confirmam as observações feitas por Skrdleta & Karimova (1969), de que as estirpes mais competitivas tendem a dominar, mesmo quando utilizadas em concentrações bem menores do que as das outras de menor capacidade competitiva.

A tipificação sorológica dos nódulos das cultivares Bat-76, ICA-Pijao, Porrillo Sintético e Turrialba-4 também permitiu avaliar o grau de especificidade entre os simbiotes, através de informações a respeito da habilidade nodulífera das estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* sensíveis e resistentes a antibióticos que foram introduzidas e das já existentes no solo Passo Fundo.

Os resultados referentes aos trabalhos sem inoculação (Tabela 3) demonstram uma elevada percentagem de ocorrência de estirpes já existentes no solo, com estrutura antigênica semelhante à da estirpe SEMIA 487 nos nódulos das quatro cultivares, sendo que a cultivar Turrialba-4 ainda apresentou uma elevada percentagem de nódulos induzidos por estirpes que não se relacionaram sorologicamente com nenhum dos dois antissoros testados.

Verifica-se que o percentual de ocorrência da estirpe mutante SEMIA 484-6 nos nódulos foi inferior ao da sua estirpe matriz. Esta me-

**TABELA 3. Ocorrência de estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* em nódulos de feijão no solo Passo Fundo (Latossolo Vermelho Escuro distrófico) em resposta à inoculação. Médias de três repetições.**

| Estirpes                  | Número de nódulos tipificados | BAT-76                |            |            | ICA Pijao             |            |            | Porrillo sintético    |            |            | Turrialba-4           |            |            |
|---------------------------|-------------------------------|-----------------------|------------|------------|-----------------------|------------|------------|-----------------------|------------|------------|-----------------------|------------|------------|
|                           |                               | Estirpes (antissoros) |            |            | Estirpes (antissoros) |            |            | Estirpes (antissoros) |            |            | Estirpes (antissoros) |            |            |
|                           |                               | SEMIA 487             | SEMIA 4002 | Sem reação | SEMIA 487             | SEMIA 4002 | Sem reação | SEMIA 487             | SEMIA 4002 | Sem reação | SEMIA 487             | SEMIA 4002 | Sem reação |
|                           |                               | ----- % -----         |            |            |                       |            |            |                       |            |            |                       |            |            |
| SEMIA 476                 | 216                           | 0                     | 96         | 4          | 9                     | 79         | 15         | 5                     | 89         | 11         | 5                     | 95         | 3          |
| SEMIA 476-16              | 203                           | 13                    | 76         | 11         | 0                     | 92         | 8          | 17                    | 81         | 4          | 0                     | 96         | 4          |
| SEMIA 484                 | 182                           | 6                     | 82         | 12         | 0                     | 65         | 35         | 2                     | 87         | 11         | 0                     | 96         | 4          |
| SEMIA 484-6               | 185                           | 17                    | 0          | 83         | 13                    | 0          | 87         | 11                    | 6          | 83         | 31                    | 6          | 63         |
| SEMIA 487                 | 170                           | 100                   | 3          | 0          | 83                    | 0          | 17         | 98                    | 0          | 2          | 96                    | 5          | 4          |
| SEMIA 487-1               | 164                           | 100                   | 0          | 0          | 100                   | 0          | 0          | 100                   | 0          | 0          | 89                    | 3          | 8          |
| SEMIA 487-2               | 208                           | 100                   | 0          | 0          | 98                    | 0          | 2          | 100                   | 0          | 0          | 77                    | 0          | 23         |
| SEMIA 487-NOV             | 201                           | 96                    | 0          | 4          | 100                   | 0          | 0          | 100                   | 0          | 0          | 71                    | 5          | 29         |
| SEMIA 491                 | 190                           | 61                    | 6          | 33         | 30                    | 2          | 68         | 80                    | 14         | 6          | 26                    | 12         | 65         |
| SEMIA 491-3               | 191                           | 11                    | 19         | 70         | 24                    | 2          | 74         | 78                    | 0          | 22         | 16                    | 2          | 84         |
| SEMIA 4002                | 202                           | 2                     | 96         | 4          | 0                     | 93         | 7          | 0                     | 98         | 2          | 5                     | 97         | 3          |
| SEMIA 4002-S <sub>1</sub> | 223                           | 0                     | 87         | 13         | 2                     | 94         | 4          | 4                     | 96         | 0          | 10                    | 97         | 2          |
| Testemunha - N            | 207                           | 58                    | 2          | 40         | 78                    | 7          | 15         | 69                    | 0          | 31         | 45                    | 8          | 49         |
| Testemunha + N            | 188                           | 90                    | 2          | 8          | 72                    | 14         | 14         | 88                    | 0          | 12         | 41                    | 4          | 57         |

Sorogrupos: SEMIA 487 = SEMIA 491

SEMIA 4002 = SEMIA 476 = SEMIA 484

nor ocorrência foi acompanhada por um aumento no percentual de estirpes já existentes no solo com estrutura antigênica diferente da estirpe matriz SEMIA 484, o que evidencia a redução na capacidade competitiva deste mutante e confirma observações semelhantes feitas para diversas estirpes mutantes no experimento anterior.

Com base neste percentual, verifica-se que a estirpe SEMIA 491 apresentou a menor capacidade competitiva do seu sorogrupo, sendo que nas cultivares ICA-Pijao e Turrialba-4 a sua ocorrência nos nódulos foi inferior à das estirpes estabelecidas. Similarmente, observa-se uma redução na capacidade competitiva do mutante SEMIA 491-3.

A sorologia também demonstrou, através da soma dos percentuais superiores a 100%, a presença de nódulos originários de infecções múltiplas que ocorreram em diferentes graus de intensidade, tendo em vista as reações simultâneas de aglutinação observadas. As variações na intensidade das reações podem ser consequência das diferentes concentrações de células das estirpes nos nódulos.

As variações obtidas na capacidade competitiva das estirpes por sítios de nódulos formados, assim como na ocorrência de nódulos resultantes de infecções múltiplas entre as cultivares utilizadas, confirmam observações de outros pesquisadores, segundo os quais a habilidade nodulífera das estirpes é influenciada pela presença da planta hospedeira (Rovira 1969, Bohlool & Schmidt 1974).

## CONCLUSÕES

1. As estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, sensíveis e resistentes a antibióticos e fungicidas, apresentaram comportamento diferenciado em relação à eficiência fixadora de nitrogênio e à capacidade competitiva por sítios de nódulos formados.
2. Estirpes com resistência à estreptomina apresentaram reversão da característica mutagênica.
3. A estirpe SEMIA 4002-S<sub>1</sub>, devido à estabilidade mutagênica, à ausência de reações cruzadas e à alta capacidade competitiva por sítios de nódulos formados, mostrou-se pro-

missora para a utilização em estudos ecológicos do rizóbio.

## REFERÊNCIAS

- BOHLOOL, B.B.; SCHMIDT, E.L. Lectins: a possible basis for specificity in the *Rhizobium*-legume root nodule symbiosis. **Science**, New York, v.185, p.269-271, 1974.
- BROCKWELL, J.; SCHWINGHAMER, E.A.; GAULT, R.R. Ecological studies of root-nodule bacteria introduced into field environments, V. A critical examination of the stability of antigenic and streptomycin-resistance markers for identification of strains of *Rhizobium trifolii*. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.9, p.19-24, 1977.
- BROMFIELD, E.S.P.; JONES, D.G. The competitive ability and symbiotic effectiveness of doubly labelled antibiotic resistant mutants of *Rhizobium trifolii*. **Annals Applied Biology**, Cambridge, v.91, p.211-219, 1979.
- BROMFIELD, E.S.P.; JONES, D.G. Studies on double strain occupancy of nodules and the competitive ability of *Rhizobium trifolii* on red and white clover grown in soil and agar. **Annals Applied Biology**, Cambridge, v.94, p.51-59, 1980.
- GOLLOBIN, G.S.; LEVIN, R.A. Streptomycin resistance in *Rhizobium japonicum*. **Archives of Microbiology**, New York, v.101, p.83-90, 1974.
- JOHNSON, H.W.; MEANS, V.M. Selection of competitive strains of soybean nodulating bacteria. **Agronomy Journal**, Madison, v.56, p.6062, 1964.
- LEHNINGER, A.L. Mutações. In: \_\_\_\_\_ . **Bioquímica**; componentes moleculares das células. São Paulo: Edgar Blücher, 1976. p.47.
- LEVIN, R.A.; MONTGOMERY, M.P. Symbiotic effectiveness of antibiotic resistant mutants of *Rhizobium japonicum*. **Plant and Soil**, the Hague, v.41, p.669-676, 1974.
- LINDEMANN, W.C.; SCHMIDT, E.L.; HAM, G.E. Evidence for double infection within soybean nodules. **Soil Science**, Baltimore, v.118, p.274-279, 1974.
- MEANS, V.M.; JOHNSON, H.W.; DAT, R.A. Quick serological method of classifying strains of *Rhizobium japonicum* in nodules. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.87, p.547-553, 1964.
- PEREIRA, J.C.; VIDOR, C.; LOVATO, P.E.; PENTEADO, A. de F. Simbiose entre feijão e estirpes de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli* sensíveis e resistentes a antibióticos e fungicidas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.26, n.7, p.1097-1105, 1991.
- PERES, J.R.R.; VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R. Variabilidade na eficiência em fixar nitrogênio entre isolados de uma mesma estirpe de *R. japonicum*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.8, p.193-196, 1984.
- ROVIRA, A.D. Plant root exudates. **The Botanical Review**, New York, v.35, p.35-37, 1969.
- SCHWINGHAMER, E.A.; DUDMAN, W.F. Evaluation of spectinomycin resistance as marker for ecological studies with *Rhizobium* spp. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v.36, p.263-272, 1973.
- SKRDLETA, V.; KARIMOVA, J. Competition between two somatic serotypes of *Rhizobium japonicum* used as double strain inocula in varying proportions. **Archives of Microbiology**, New York, v.66, p.25-28, 1969.
- TAVARES, W. **Manual de antibióticos para estudantes de medicina**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1982. 374p.
- TRINICK, M.J. Competition between rhizobial strains for nodulation. In: VINCENT, J.M. (Ed.). **Nitrogen fixation in legumes**. Sidney: Academic, 1982. p.229-237.
- 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). **Agronomia Sulriograndense**, Porto Alegre, v.15, n.2, p.227-238, 1979.
- VINCENT, S.M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. London: International Biological Programme, 1970. 164p.

VINCENT, J.M. *Rhizobium*, general microbiology. In: HARDY, R.W.F.; SILVER, W.S. (Ed.). **A treatise on dinitrogen fixation**; biology. New York: Willey, 1977. p.277-366.

VINCENT, J.M. Root-nodule symbioses with *Rhizobium*. In: QUISPÉL, A. (Ed.). **The biology of nitrogen fixation**. Amsterdam: North-Holland, 1974. p.265-341.