

EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ESTABILIDADE DE ESTIRPES DE *Rhizobium* EFETIVAS NA NODULAÇÃO DO FEIJOEIRO.

Patrícia Pereira Pinto⁽¹⁾, Ruy Raposeiras⁽¹⁾, Maria Rita Scotti Muzzi Marques Leitão⁽¹⁾, Edilson Paiva⁽²⁾, Lucy Seldin⁽³⁾, Nadja Maria Horta de Sá⁽¹⁾.

1 - Departamento de Botânica, ICB/UFMG-31.270-901. B. H^{le}.M.G. 2 - EMBRAPA/ CNPMS-MG, 35.701-970, Sete Lagoas - M.G. 3 - Instituto de Microbiologia UFRJ, 21.944-970, R.J.

Introdução

Tem sido freqüentemente observado, que após exposição a temperaturas elevadas, estirpes de *Rhizobium* sofrem alterações nas suas características simbióticas (Mathis et al, 1985; Barbour & Elkan 1989). Estirpes de *Rhizobium* capazes de nodular o feijoeiro são particularmente sensíveis devido suas características genéticas. Os genes responsáveis pela fixação de nitrogênio (genes *nif*) estão localizados em um plasmídio *Psym* e seu complexo genoma contem seqüências repetidas que propiciam sítios de recombinação e rearranjos genômicos (Flores et al, 1987; Martinez et al, 1987). Com o aumento da temperatura, deleções plasmidiais (Trevors, 1986) e rearranjos genômicos (Soberon Chaves et al, 1986) podem ocorrer resultando em perdas ou alterações das propriedades simbióticas. Conseqüentemente, essa instabilidade genética pode comprometer a utilização dessas estirpes como inoculantes. Neste estudo, avaliamos o efeito de choques térmicos sucessivos sobre a performance de fixação de N₂ e características genéticas de estirpes de *Rhizobium* efetivas na nodulação do feijoeiro.

Material e Métodos

- Culturas líquidas padronizadas das estirpes de *Rhizobium tropici* (BR 322 e SLA 2.2) e *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (SLA 1.5 e SLP 2.10) foram inoculadas em solo estéril (0,7 ml de inóculo bacteriano / g de solo) e submetidas a choques térmicos sucessivos (45°C por 4 horas) com intervalos de 48 horas. Ao final de 4 choques, foram obtidas colônias isoladas, por incorporação do solo inoculado, em meio de cultura YMA. Três colônias, escolhidas aleatoriamente de cada uma das estirpes de *Rhizobium*, foram inoculadas separadamente em vaso de Leonard, contendo sementes pré-germinadas de feijoeiro. Após 30 dias de crescimento, as plantas foram colhidas e avaliadas quanto a produção de massa seca.

- Para caracterização genética via AP-PCR ("Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction, fingerprinting") estirpes de *Rhizobium* originais e suas respectivas colônias isoladas obtidas após choques térmicos, tiveram seu DNA extraído (Sá et al, 1993), amplificado usando o primer aleatório S34 (5' GGT TCG ATT GGG GGT TGG TGT AAT ATA 3'), de acordo com Steindel et al, 1993 e os produtos da amplificação visualizados através de coloração pela prata (Santos et al, 1993).

Resultados e Discussão

O comportamento entre e dentro de cada estirpe de *Rhizobium*, após estresse térmico, foi variável nas duas espécies testadas. Todas as colônias provenientes das estirpes de *R. tropici* (BR 322 e SLA2.2) nodularam e fixaram nitrogênio na planta hospedeira. De acordo com a tabela 1,

os níveis de fixação de N₂ , avaliados pela produção de massa seca, mostram diferenças significativas ou entre si ou em relação a estirpe original não submetida ao estresse térmico. Já entre as colônias provenientes das estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (SLA 1.5 e SLP 2.10) duas delas, uma proveniente da estirpe SLA 1.5 e outra da estirpe SLP 2.10 não nodularam a planta hospedeira. As demais colônias, assim como ocorreu com aquelas provenientes das estirpes de *R. tropici* nodularam e fixaram nitrogênio em níveis significativamente diferentes. A variabilidade na eficiência de fixação de N₂ dentro de uma mesma estirpe tem sido relatada em estirpes de *Rhizobium* (Peres et al, 1994; Weaver & Wright, 1987) e especificamente em estirpes capazes de nodular o feijoeiro (Sá et al, 1994), porém a perda da capacidade de nodulação ocorrida em algumas colônias das estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* indicam a maior instabilidade dessa espécie.

A análise dos produtos de amplificação do DNA das diferentes colônias dentro de uma mesma estirpe de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *R. tropici*, submetidas ao estresse térmico, mostrou também em nível genético, a variabilidade refletida nas suas características fenotípicas. Os perfis obtidos a partir das colônias provenientes das estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, foram mais diversificados em relação a estirpe original do que aqueles obtidos a partir das colônias provenientes de estirpes de *R. tropici*. Esses resultados confirmam as informações da literatura sobre a aparente maior estabilidade das estirpes de *R. tropici* em relação as estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*.

Tabela 1: Produção de massa seca (peso planta), dados em valores médios de 3 repetições, de diferentes colônias de *R. tropici* e *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, após choque térmico sucessivo.

Estirpes de <i>Rhizobium</i>		Produção de massa seca (g)		
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	Controle*	Colônia 1	Colônia 2	Colônia 3
SLA1.5	0,832 ^a	0,551 ^b	não nodulou	0,434 ^b
SLP2.10	0,354 ^b	0,788 ^a	0,648 ^{ab}	não nodulou
<i>R. tropici</i>				
BR322	0,424 ^a	0,205 ^b	0,435 ^a	0,554 ^a
SLA2.2	0,618 ^a	0,287 ^b	0,382 ^b	0,555 ^a

* O controle é representado pela estirpe original não submetida ao choque térmico.

^{a,b} - valores médios seguidos pelas mesmas letras não diferem significativamente de acordo com Duncan 5% de probabilidade.

Referências Bibliográficas

- BARBOUR, W. M., ELKAN, G. H. Relationship of the presence and copy number of plasmids to exopolysaccharide production on symbiotic effectiveness in *Rhizobium fredii* USDA 206. Applied and Environmental Microbiology. v. 55, p. 813-818. 1989.
- FLORES, M.; GONZÁLEZ, V.; PARDO, M. A.; LEIJA, A.; MARTINEZ, E.; ROMERO, D.; PINERO, D.; D'AVILA, G. & PALACIOS, R. Genomic instability in *Rhizobium phaseoli*. J. Bacteriol. v. 170: n.3, p. 1191-1196. 1988.
- MARTINEZ, E., PALACIOS, R., SÁNCHEZ, F. Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. Journal of Bacteriology, v. 169, n. 6, p. 2828-2834. 1987.
- MATHIS, J. N., BARBOUR, W. M., ELKAN, G. H. Effect of sym plasmid curing on symbiotic effectiveness in *Rhizobium fredii*. Applied and Environmental Microbiology, v. 49, p. 1385-1388. 1985.
- PERES, J. R. R.; VARGAS, M. A.; SUHET, A. R. Variabilidade na eficiência em fixar nitrogênio entre isolados de uma mesma estirpe de *Rhizobium japonicum*. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 8, p.193-196. 1984.
- SÁ, N. M. H. Seleção e caracterização de estirpes de *Rhizobium* eficientes e estáveis na fixação de N₂ em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Instituto de Microbiologia da UFRJ - Tese de Doutorado. 1994.
- SANTOS, F. R.; PENA, S. D. J. & EPPELEN, J. T. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. Hum. Genet. 90, 655-656. 1993.
- SOBERON-CHAVES, G., NÁJERA, R., OLIVEIRA, H. et al., Genetic rearrangements of a *Rhizobium phaseoli* symbiotic plasmid. Journal of Bacteriology. v. 167 n. 2, P. 487-491. 1986.
- STEINDEL, M.; DIAS NETO, E.; MENEZES, C. L. P.; ROMANHA, A. AND SIMPSON, A. L. G. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. Molecular and Biochemical Parasitology 60, 71-80. 1993.
- TREVORS, J. T. Plasmid curing in bacteria FEMS. Microbiol. Rev. 32.149 - 157. 1986.
- WEAVER, R. W. & WRIGHT, S. F. Variability in effectiveness of rhizobia during culture and in nodules. Appl. Environ. Microbiol. 53: 2972-2974. 1987.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.