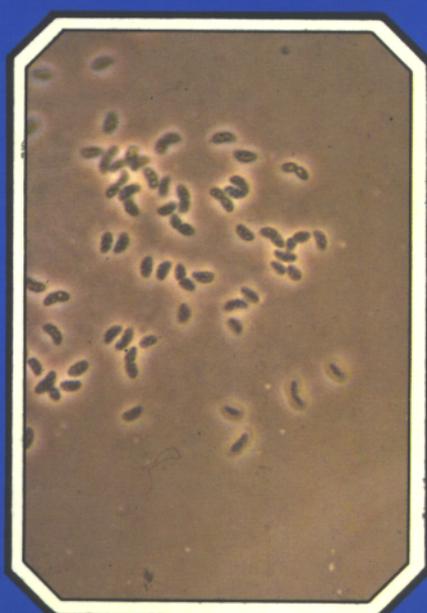
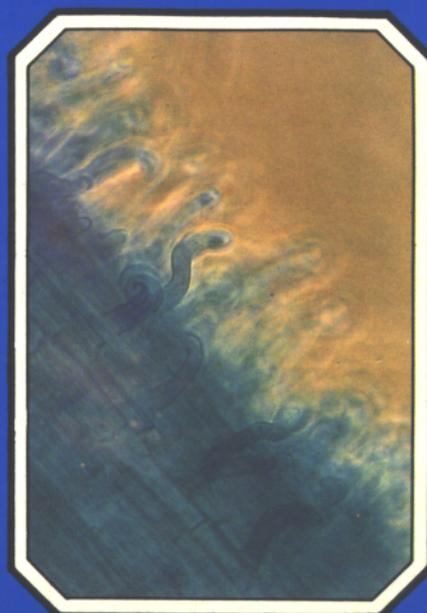
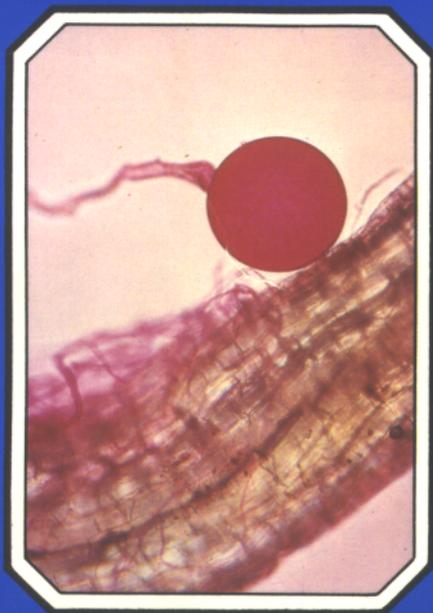


MANUAL DE MÉTODOS EMPREGADOS EM ESTUDOS DE MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA



QUANTIFICAÇÃO DA COMPETITIVIDADE NODULAR DE
RHIZOBIUM E BRADYRHIZOBIUM

Ricardo S. Araujo¹

12.1. Introdução

A inconsistência dos resultados da inoculação de sementes de leguminosas com *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, em nível de campo, faz com que a adoção dessa tecnologia de baixo custo seja, muitas vezes, encarada com ceticismo pelos produtores. Muitos dos casos de insucesso da inoculação são atribuídos à baixa competitividade das estirpes de bactérias inoculadas, que não são capazes de prevalecer nos nódulos do hospedeiro (Baldwin & Fred, 1929; Nicol & Thornton, 1941; Weaver & Frederick, 1974; Meade et al., 1985; Triplett & Sadowsky, 1992). Esse quadro é particularmente sério quando o cultivo é realizado em solos que contenham uma determinada quantidade de bactérias naturalizadas capazes de nodular aquela espécie de planta. Por essa razão, é importante que os programas visando a seleção de inoculantes para leguminosas considerem, também, a competitividade nodular das bactérias em teste, o que demanda a existência de métodos simples e confiáveis para análise.

Considera-se competitividade nodular como a capacidade de uma determinada estirpe de estar presente na maioria dos nódulos do hospedeiro, mesmo representando a minoria numérica na população de bactérias que fazem contato com as raízes. Este conceito permite a aplicação de modelos matemáticos que relacionam a ocupação nodular com a representatividade de cada estirpe no inóculo. O modelo que será descrito neste capítulo foi desenvolvido por Beattie et al. (1989), e pode ser aplicado tanto para estirpes isogênicas, testadas sob condições controladas, como para estudos de campo sobre a competitividade de estirpes promissoras para produzir inoculantes. A interpretação dos resultados é simples, fornecendo uma medida da competitividade de cada estirpe, e permitindo determinar a dose de inoculante adequada para melhorar a ocupação dos nódulos pelo inoculante no campo.

¹ Pesquisador, Ph.D., EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP), Cx. Postal 179, CEP 74001-970, Goiânia, GO.

12.2. O Modelo de Beattie et al. (1989)

Este modelo aplica um tratamento de regressão linear para interpretar a interdependência entre a ocupação nodular e a proporcionalidade entre duas estirpes no inóculo, ou entre uma estirpe inoculada e a população naturalizada de rizóbios nos casos de estudos com solo. A equação que descreve essa interdependência é:

$$\log \frac{P_A}{P_B} = IC_{A:B} + k \log \frac{I_A}{I_B} \quad (\text{Equação 1})$$

onde:

P_A = percentagem de nódulos ocupados pela estirpe A;

P_B = percentagem de nódulos ocupados pela estirpe B;

$IC_{A:B}$ = índice de competitividade (ponto onde a reta intercepta o eixo das ordenadas);

k = constante (inclinação da reta);

I_A = concentração de células da estirpe A no inóculo (nº/mL);

I_B = concentração de células da estirpe B no inóculo.

O modelo acima foi testado com um par de estirpes de *Rhizobium* que nodulam o feijoeiro, e foi capaz de descrever a competitividade relativa dessas estirpes sob condições de câmara de crescimento, casa de vegetação e de campo. Maiores detalhes sobre o seu desenvolvimento podem ser encontrados em Beattie et al. (1989).

12.3. Aplicações do Modelo para os Estudos com Estirpes Isogênicas

As aplicações descritas aqui foram empregadas com sucesso para estudar a correlação entre determinados fenótipos e a competitividade nodular de *Rhizobium* spp. para o feijoeiro (Milner et al., 1992; Araujo, 1993). Em estudos como esses, onde se pretende determinar se uma estirpe é mais competitiva que uma outra para estudar a correlação entre fenótipos, o mais indicado é a realização de uma análise genética de mutantes definidas (mutantes apenas no fenótipo em estudo) e independentes, e suas variantes com o fenótipo restaurado por clones específicos de bibliotecas genômicas das estirpes originais. A aplicação do modelo permite quantificar o grau de alteração na competitividade em consequência da mutação.

No exemplo de Araujo (1993) buscava-se estabelecer uma correlação entre a capacidade de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Rlp) e *R. etli* (Re) de produzir exopolissacarídeos (EPS) e sua competitividade nodular. Foram geradas duas coleções de mutantes independentes (ver capítulo 11), por inserção do transpóson Tn5, deficientes na produção de colônias gomosas quando crescidas a 28°C, em meio de cultura rico em carbono (YM, ver capítulo 2). Foram também empregadas variantes

cujos fenótipos haviam sido restaurados por clones específicos de bibliotecas genômicas das estirpes originais.

Procedimento:

1 - Partindo de uma estirpe original (com ou sem uma marca de resistência a antibiótico), gerar mutantes por inserção do transposon Tn5 (ou outro), definidas quanto ao fenótipo desejado (é necessário que o fenótipo mutante seja discernível, de alguma forma, do original). Selecionar mutantes independentes para estudos posteriores.

Nota: em análises genéticas é importante que se estude o maior número possível de mutantes independentes para estabelecer correlações concretas; basta que apenas uma mutante fuja à regra para impedir uma conclusão sobre a correlação entre fenótipos.

2 - Se houver uma biblioteca genômica disponível, obter as variantes com fenótipos restaurados e reservá-las para análise.

Nota: todas as estirpes (originais e mutantes) empregadas em análises como essas devem ser estocadas sob condições favoráveis à manutenção de suas propriedades genéticas (liofilização, congelamento a -80° C, ou em nitrogênio líquido).

3 - Certificar-se de que as mutantes apresentam apenas um fenótipo mutante, aquele que se quer estudar. As demais características e propriedades das mutantes devem ser idênticas às das estirpes originais.

4 - Para os ensaios de competitividade, crescer culturas da estirpe original, das mutantes e suas variantes em tubos de ensaio ou frascos contendo meio YM ou TY líquidos, sem antibióticos, por três dias, a 28° C, com aeração (para *Bradyrhizobium* crescer por cinco a sete dias).

5 - Preparar diluições das culturas, em água destilada esterilizada, de forma a obter suspensões com uma absorbância a 600 nm (A_{600}) igual a 0,1.

Nota: para culturas cuja correlação entre absorbância e concentração de células é conhecida, pode-se pular a próxima etapa, necessária para equalizar as concentrações de células no inóculo.

6 - Fazer a contagem do número de bactérias/mL nessas suspensões em hemacitômetro ou câmara de Petroff-Hauser, ao microscópio. Ajustar as suspensões com água destilada esterilizada de forma a obter a mesma concentração de células em todas.

7 - Fazer diluições apropriadas das suspensões para contar o número de células por plaqueamento em meio de cultura específico (adicionar os antibióticos apropriados). Esses números serão necessários para determinar as proporções celulares nas suspensões empregadas para a inoculação.

8 - Partindo das suspensões ajustadas, fazer diluições de cinco a 1000 vezes, conforme a necessidade, em água destilada esterilizada. Por exemplo, podem-se fazer as diluições 5X, 10X, 20X, 50X, 100X, 500X e 1000X. Um volume de cerca de 100 mL de cada diluição é adequado. Fazer a contagem da concentração de células nas suspensões diluídas como no item 7. O número de diluições necessárias vai depender do número de tratamentos desejados. Cada tratamento é a mistura de uma mutante ou variante com a estirpe original, como por exemplo, nas combinações a seguir:

<u>Estirpe Original</u>	:	<u>Mutante ou Variante</u>
1	:	1000
1	:	500
1	:	100
1	:	50
1	:	20
1	:	10
1	:	5
1	:	1
5	:	1
10	:	1
		etc.

O número de tratamentos vai variar com o número de mutantes em teste. Pode-se diminuir o número de combinações de cada par, mas são necessárias pelo menos três combinações por par, incluindo a mistura na proporção 1:1 e uma outra em cada direção. O modelo se aplica melhor quando são utilizadas pelo menos cinco combinações.

9 - Preparar as plantas hospedeiras (sementes ou plântulas), esterilizadas, de acordo com um dos métodos descritos no capítulo 3. Serão necessárias oito a dez plantas (unidades experimentais) por tratamento.

10 - Preparar as misturas da estirpe original com cada mutante ou variante, como nos exemplos a seguir:

a) 500 Original : Mutante 1

Tomar 6 mL da suspensão da estirpe original com $A_{600} = 0,1$ e misturar com 6 mL da diluição 500X da mutante; agitar vigorosamente e empregar para inoculação em seguida. Não armazenar misturas antes da inoculação.

b) 1 Original : Mutante 20

Tomar 6 mL da diluição 20X da estirpe original e misturar com 6 mL da suspensão da mutante com $A_{600} = 0,1$. Proceder como no exemplo anterior.

11 - Inocular as sementes ou plântulas correspondentes a cada tratamento com 1 mL das misturas imediatamente após serem preparadas. Inocular o mesmo número de repetições com as suspensões individuais ($A_{600} = 0,1$) para fins de controle.

12 - Após inocular todas as sementes ou plântulas, levá-las à câmara de crescimento ou casa de vegetação, e mantê-las de acordo com os procedimentos recomendados no capítulo 3.

13 - Para plantas que nodulam rapidamente (ex.: soja, feijão, caupi) a colheita pode ser realizada 21 dias após o plantio/inoculação. Na colheita, remover as plantas de seu substrato e lavar bem as raízes em água corrente. Destacar seis nódulos de cada uma das oito plantas para análise.

Nota: caso haja necessidade, os nódulos podem ser armazenados para análise posterior. Para isso, transferir os nódulos de cada planta para tubos de microcentrifuga devidamente identificados e adicionar cerca de 500 μL de solução de glicerol a 15%, levando-os ao congelador. Esses nódulos deverão ser processados em no máximo 30 dias. Para estocagens mais longas os nódulos podem ser armazenados sobre CaCl_2 anidro.

A amostra deve ser de no mínimo 48 nódulos. Havendo falta de espaço ou material podem-se utilizar seis unidades experimentais por tratamento, colhendo-se oito nódulos de cada planta.

14 - Processar os nódulos para identificação de seus ocupantes de acordo com métodos de rotina como resistência a antibióticos (Beattie & Handelsman, 1989), sorologia (ver capítulo 8), perfil eletroforético em géis de poliacrilamida (Kamicker & Brill, 1983), etc. Computar as duplas ocupações, acrescentando-as aos dados de ocupação individual por cada uma das estirpes. Transformar esses dados em percentagem de nódulos ocupados por cada estirpe, e calcular a proporção $P_{\text{ORIG}}:P_{\text{MUT}}$ e seu logaritmo decimal. Após a obtenção desses dados, resgatar os resultados das contagens de números de células nas suspensões inoculantes.

15 - Calcular a proporção de células em cada uma das misturas; calcular o logaritmo decimal dessa proporção.

Ex.: mistura 1 Original : Mutante 50 (proporção teórica)

nº células/mL da diluição 50X da estirpe original: $5,21 \cdot 10^5$

nº células/mL da suspensão da mutante com $A_{600} = 0,1$: $2,25 \cdot 10^7$

proporção $I_{\text{ORIG}}:I_{\text{MUT}} = 5,21 \cdot 10^5 / 2,25 \cdot 10^7 = 1/43,2$ (proporção calculada)

$\log I_{\text{ORIG}}:I_{\text{MUT}} = -1,635$

16 - Elaborar as curvas de competição utilizando as percentagens de nódulos ocupados por cada estirpe, em cada combinação, no eixo das ordenadas (Y) e os valores dos logaritmos decimais das proporções de inóculo no eixo das abscissas (X). Uma curva de competição característica de um par de estirpes igualmente competitivas, elaborada a partir de dados teóricos (gerados pela aplicação do modelo) é representada na Figura 12.1. O ponto de interseção das duas curvas indica a composição de inóculo necessária para que cada estirpe ocupe 50% dos nódulos do hospedeiro. Como as duas estirpes do exemplo são igualmente competitivas, cada uma ocupará 50% dos nódulos quando representar 50% do inóculo (proporção 1:1; $\log = 0$).

Quando uma mutante é significativamente menos competitiva que a estirpe original, o ponto de interseção das curvas se desloca para uma proporção de inóculo que favoreça a mutante (Figura 12.2a). Se a restauração do fenótipo da mutante estiver associada à restauração da competitividade, o ponto de interseção das curvas se deslocará novamente em direção ao zero (Figura 12.2b). As curvas de competição são excelente recurso visual para caracterizar a competitividade de um par de estirpes.

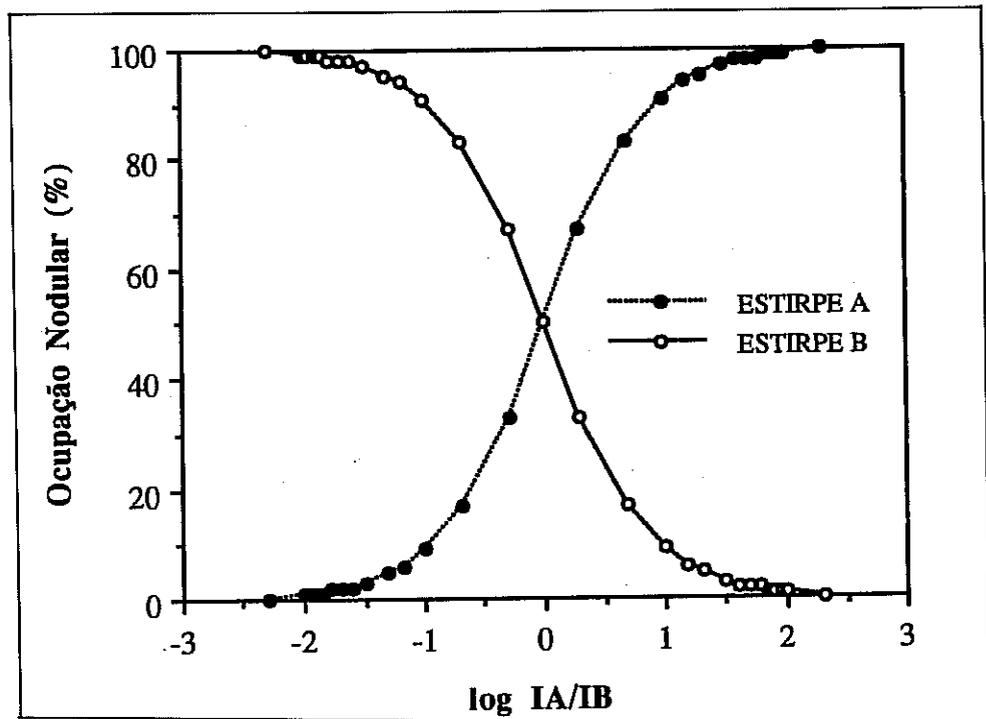


FIGURA 12.1. Curva teórica de competição pela nodulação entre duas estirpes igualmente competitivas.

17 - Para aplicar o modelo, utilizar os seguintes valores:

$$X = \log I_{\text{ORIG}}:I_{\text{MUT}}$$

$$Y = \log P_{\text{ORIG}}:P_{\text{MUT}}$$

Utilizando um programa de análise estatística por computador, ou a calculadora, fazer a regressão de Y sobre X. A transformação em log permite a linearização, gerando uma equação de primeiro grau. O índice de competitividade ($IC_{\text{ORIG:MUT}}$) equivale ao ponto de interseção da reta no eixo das ordenadas. No caso de duas estirpes igualmente competitivas a reta passará pela origem, e IC será igual a zero. Se, na análise de variância da regressão, for observado que os dados descrevem uma reta que não passa pela origem ($b_0 \neq 0$), conclui-se que há uma diferença significativa na competitividade das estirpes em teste. Assim, se:

$IC_{\text{ORIG:MUT}} > 0$, a mutante é menos competitiva que a estirpe original;

$IC_{\text{ORIG:MUT}} = 0$, as duas estirpes são igualmente competitivas;

$IC_{\text{ORIG:MUT}} < 0$, a mutante é mais competitiva que a estirpe original.

A interpretação dessa análise permite dizer se a mutação que deu origem ao novo fenótipo alterou também, significativamente, a competitividade da estirpe, possibilitando o estabelecimento de correlações entre fenótipos.

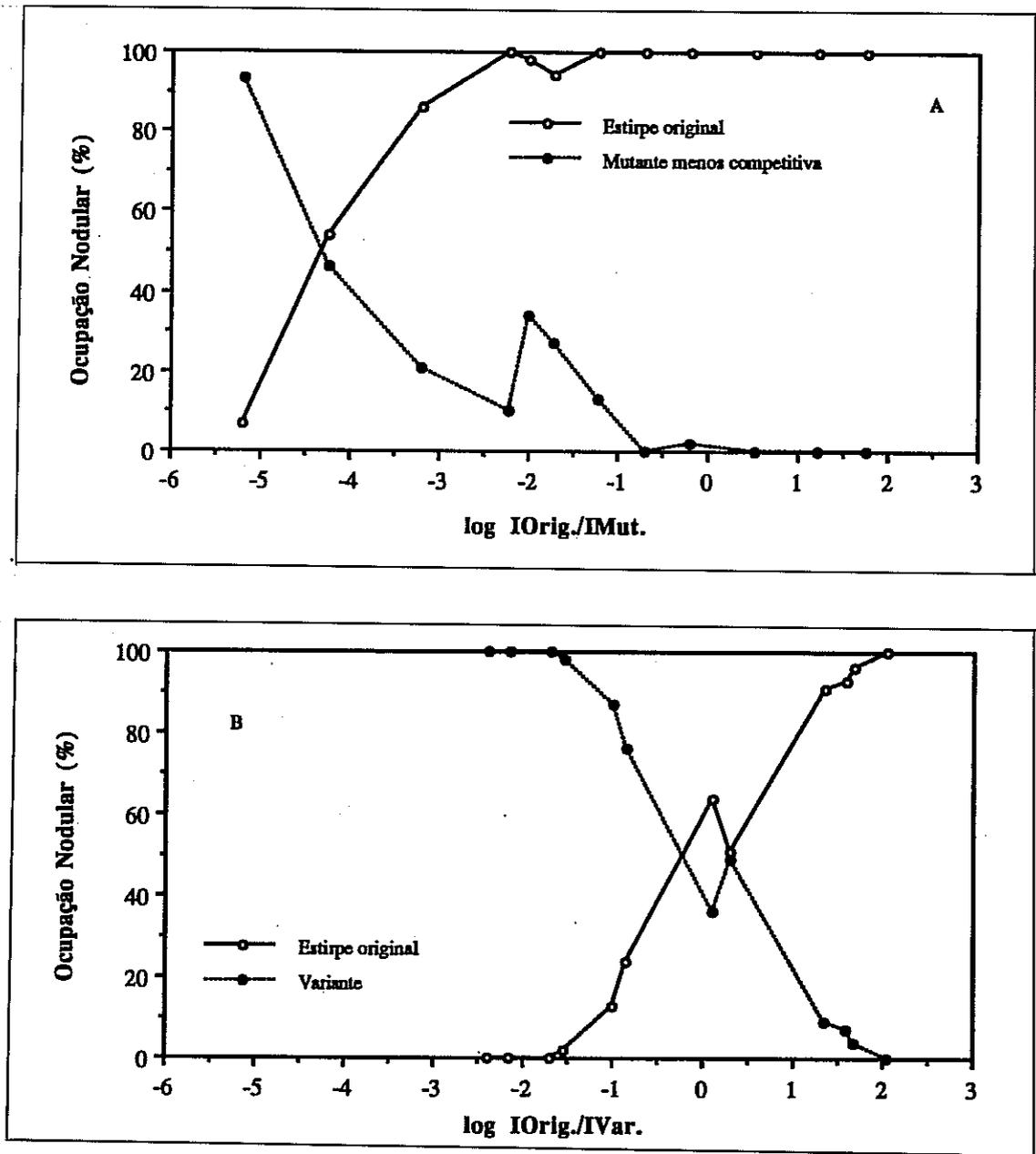


FIGURA 12.2. Curvas reais de competição entre a estirpe original e uma mutante menos competitiva (A) e entre a estirpe original e a variante com fenótipo restaurado (B).

12.4. Aplicação do Modelo para Estudos de Competitividade no Solo

O modelo de Beattie et al. (1989) também pode ser aplicado para avaliar o desempenho de inoculantes quanto à habilidade de competir com as populações naturalizadas de rizóbios homólogos. Nesses casos também se aplicam diferentes proporções de inóculo de acordo com o tamanho da população naturalizada. Esta análise, entretanto, não permite inferir sobre correlações entre fenótipos e a competitividade nodular das estirpes no solo, pois a população naturalizada de rizóbios é, provavelmente, muito heterogênea, o que implica em que o inoculante e as bactérias naturalizadas sejam diferentes em diversos fenótipos que podem interferir na competitividade. Os efeitos de certos fenótipos sobre a competitividade no solo só poderão ser estudados se forem testadas mutantes também (os testes com organismos geneticamente alterados não devem ser realizados no campo sem os devidos cuidados).

Procedimento:

1 - Antes de mais nada é preciso conhecer o tamanho da população de rizóbios homólogos no solo onde será realizado o experimento. O melhor é que se tenha uma noção ou estimativa da concentração desses rizóbios/g de solo antes do experimento. Caso não seja possível, a contagem deve ser realizada paralelamente ao experimento.

Nota: não se deve guardar o solo para esperar o resultado da contagem, pois isso pode alterar a concentração de bactérias até o momento de plantio do experimento.

2 - Determinar a concentração de rizóbios homólogos/g de solo pela técnica do número mais provável (NPM - capítulo 3), utilizando o mesmo hospedeiro (espécie e cultivar) do experimento.

3 - Crescer as culturas de bactérias como descrito anteriormente, e preparar as suspensões com $A_{600} = 0,1$.

4 - Calcular a concentração de células nas suspensões com $A_{600} = 0,1$ por contagem em hemacitômetro ou câmara de Petroff-Hauser. Fazer também a contagem por plaqueamento em meio de cultura específico.

Nota: uma suspensão com $A_{600} = 0,1$ tem uma concentração de células na ordem de grandeza de 10^7 , variando com a estirpe. Se o solo contiver uma população alta, na ordem de grandeza de 10^6 , e for desejável utilizar, de acordo com o experimento um $I_{INOC}/I_{SOLO} = 10$, será necessário calcular a concentração de células na cultura original para determinar a diluição necessária para obter a concentração desejada.

5 - Preparar as suspensões diluídas conforme descrito anteriormente, de acordo com a necessidade para obter as diferentes proporções de inóculo em relação à população do solo. Para esses cálculos considera-se que uma semente, ao ser plantada, é exposta a aproximadamente 1 g de solo. Assim, o número de céls./g de solo é igual ao número de céls./semente. Esse número deve ser utilizado para cálculo das proporções de inóculo, que serão obtidas dividindo-se o número de céls./mL da suspensão diluída pelo número/g de solo (equivalente ao número de células/semente).

6 - No caso de experimentos em vasos com solo, inocular as sementes aplicando 1 mL das suspensões diretamente sobre as mesmas, imediatamente após o plantio. Se os experimentos forem plantados no campo, uma alternativa para facilitar a inoculação é umedecer as sementes com as suspensões de inóculo (diluídas como necessário) e polvilhá-las com turfa seca, esterilizada, para recobri-las. Nesses casos, é importante:

a) contar o número de sementes a serem inoculadas de forma a ajustar o volume de inóculo de acordo com a concentração para que cada semente receba, ao ser plantada, o número de células necessário para fornecer a proporção $I_{\text{INOC}}/I_{\text{SOLO}}$ desejada;

b) fazer a contagem, em placas, do número de células realmente aplicado a cada semente, em cada tratamento. Esses dados serão os mais importantes para cálculos do $I_{\text{INOC}}/I_{\text{SOLO}}$ para a aplicação do modelo.

7 - Manter as plantas de acordo com os procedimentos adequados para cada situação. É importante dar às plantas todas as condições apropriadas para crescimento (adubação, irrigação, tratos culturais, etc.). Colher as plantas a partir de 30 dias após o plantio/inoculação. Coletar os nódulos e processá-los como descrito anteriormente. No caso de plantas crescidas em solo, os nódulos que devem ser amostrados são aqueles distribuídos por uma distância de até 2 cm ao redor da coroa da planta, visto que são esses nódulos que são normalmente induzidos pelo inoculante. Os nódulos nas raízes secundárias servirão para dar uma noção da migração do inóculo pelo solo, mas não devem ser analisados para inferir sobre a competitividade dos inoculantes.

8 - De posse dos dados, elaborar as curvas de competição e aplicar o modelo matemático, conforme descrito anteriormente, para calcular o IC das estirpes inoculadas em relação à população do solo. As curvas de competição, nesses casos, permitem ainda determinar a dose de inóculo necessária para se conseguir que as estirpes inoculadas ocupem a maioria dos nódulos do hospedeiro, o que serve de subsídio para a elaboração de estratégias para a inoculação em massa.

12.5. Considerações Finais

O esquema de análise sugerido neste capítulo proporciona uma boa base para inferência sobre a competitividade nodular entre duas estirpes isogênicas ou entre estirpes inoculantes e a população de rizóbios do solo, e se aplica a análises genéticas de correlações entre fenótipos bacterianos e sua competitividade nodular, no caso de estirpes isogênicas. É possível, também, determinar a dose de inóculo que se deve empregar para que certas estirpes ocupem a maioria dos nódulos do hospedeiro quando utilizadas como inoculantes em solos com populações estabelecidas de rizóbios homólogos. Entretanto, essa análise não oferece uma medida da contribuição da maior competitividade de certas estirpes para a fixação do nitrogênio e a nutrição da planta hospedeira.

O modelo também não leva em conta os eventos que ocorrem na espermosfera (região de influência da semente em germinação) e que podem influenciar os rizóbios entre a inoculação e a infecção dos pelos radiculares. Dados como estes e como aqueles provenientes da análise nutricional das plantas devem sempre acompanhar as inferências sobre a competitividade nodular dos rizóbios.

12.6. Referências Bibliográficas

- ARAUJO, R.S. **Mutational analysis of the cell surface and nodulation competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli***. Madison: University of Wisconsin, 1993. 118p. (Tese de Doutorado).
- BALDWIN, I.L.; FRED, E.B. Strain variation in the root nodule bacteria of clover, *Rhizobium trifolii*. **J. Bacteriol.**, v.17, p.17-18, 1929.
- BEATTIE, G.A.; CALYTON, M.K.; HANDELSMAN, J. Quantitative comparison of the laboratory and field competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.55, p.2755-2761, 1989.
- BEATTIE, G.A.; HANDELSMAN, J. A rapid method for the isolation and identification of *Rhizobium* from root nodules. **J. Microbiol. Met.**, v.9, p.29-33, 1989.
- MEADE, J.; HIGGINS, P.; O'GARA, F. Studies on the inoculation and competitiveness of a *Rhizobium leguminosarum* strain in soils containing indigenous rhizobia. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.49, p.899-903, 1985.
- MILNER, J.L.; ARAUJO, R.S.; HANDELSMAN, J. Molecular and symbiotic characterization of exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium tropici* strain CIAT899. **Mol. Microbiol.**, v.6, p.3137-3147, 1992.
- NICOL, H.; THORNTON, H.G. Competition between related strains of nodule bacteria and its influence on infection of the legume host. **Proc. R. Soc. London**, v.130, p.32-59, 1941.
- TRIPLETT, E.W.; SADOWSKY, M.J. Genetics of competition for nodulation of legumes. **Ann. Rev. Microbiol.**, v.46, p.399-428, 1992.
- WEAVER, R.W.; FREDERICK, L.R. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* L. Merrill. I. Greenhouse studies. **Agron.J.**, v.66, p.229-232, 1974.