

VARIABILIDADE NA EFICIÊNCIA EM FIXAR NITROGÊNIO ENTRE ISOLADOS DE UMA MESMA ESTIRPE DE *RHIZOBIUM JAPONICUM*⁽¹⁾

J. R. R. PERES ⁽²⁾, M. A. T. VARGAS⁽²⁾ & A. R. SUHET⁽²⁾

RESUMO

Foi conduzido um trabalho em vasos "Leonard" visando estudar a variabilidade na eficiência em fixar N₂ de isolados de *Rhizobium japonicum* obtidos a partir de nódulos da variedade de soja IAC-2. As plantas foram inoculadas com as estirpes 29W e 965, separadamente, com inoculante na forma líquida. No estágio de floração, foi avaliada a atividade específica da nitrogenase de cada nódulo, através da técnica de redução do acetileno, tendo-se verificado grande variação entre os nódulos (0,8 a 5,6nmoles de C₂H₄/miligrama de nódulos/hora para a estirpe 29W e de 2,0 a 14,0nmoles de C₂H₄/miligrama de nódulo/hora para a 965). A partir desses nódulos, foram obtidos alguns isolados, agrupados de acordo com a atividade da nitrogenase, e preparados inoculantes líquidos, os quais foram reinoculados em plantas da mesma variedade, cultivadas em vasos "Leonard". Quando as plantas atingiram o estágio de floração, foi avaliada a eficiência dos isolados, tendo-se encontrado alta correlação entre essa eficiência e a atividade da nitrogenase dos nódulos que deram origem aos inoculantes. Em todos os parâmetros avaliados (N total, peso da parte aérea e peso de nódulos), houve diferenças de até três vezes entre o menor e o maior valor observado para os diversos isolados, exceto no número de nódulos, indicando que as diferenças ocorreram em função da eficiência em fixar o N₂ e não da infectividade dos isolados. Esses resultados mostram a importância de testar a eficiência das estirpes para manutenção das culturas-estoque, bem como a possibilidade de obter isolados de maior eficiência do que a estirpe original e que já apresentem as características desejáveis para fabricação de inoculantes comerciais.

SUMMARY: VARIABILITY IN THE EFFICIENCY OF NITROGEN FIXATION OF ISOLATES FROM THE SAME STRAIN OF *RHIZOBIUM JAPONICUM*

A greenhouse experiment was conducted in sterilized Leonard jar assemblies in order to study the variation in the N₂ fixation efficiency of *Rhizobium japonicum* isolates obtained from nodules of soybean variety IAC-2. Plants of that variety were inoculated separately with strains 29W and 965, using liquid medium. At flowering, specific nitrogenase activity (SNA) of each nodule was estimated using the acetylene reduction technique. Nodules from the different isolates showed a large variation in their SNA (0.8 to 5.6nmoles ethylene/h/mg of nodules for strain 29W and 2.0 to 14.0nmoles ethylene/h/mg of nodules for strain 965). From these nodules several isolates were obtained and used to prepare liquid inoculants which were used to inoculate soybean plants cultivated under the same conditions as above. At flowering, the efficiency of the isolated strains was estimated and a highly significant positive correlation was obtained between that efficiency and the nitrogenase activity of the nodules which originated the inoculant. The parameters used to determine the N₂ fixation (total nitrogen, dry weight of plant and dry weight of nodules) showed variation up to three fold between the lowest and the highest values obtained with the isolates, except for the number of nodules which did not change. These data indicate that the differences in the isolates obtained from a single strain were due to differences in their N₂ fixing efficiency rather than infectivity. These results not only demonstrate the importance of testing the efficiency of the strains for the maintenance of stock cultures, but also offer the possibility of obtaining highly efficient isolates from a single strain of *Rhizobium* which has other desirable traits to be use as commercial inoculants.

(1) Trabalho apresentado no XVIII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, Salvador (BA), setembro, 1981. Recebido para publicação em outubro de 1983 e aprovado em julho de 1984.

(2) Pesquisador da EMBRAPA, Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados (CPAC/EMBRAPA), Caixa Postal 70.0023, 73.300 - Planaltina (DF).

INTRODUÇÃO

Um dos problemas com que os rizobiologistas e os produtores de inoculantes têm-se defrontado, é a variabilidade das culturas-estoque de *Rhizobium*. As repicagens necessárias tanto para a manutenção quanto para a distribuição das estirpes, podem resultar em culturas com características fisiológicas diferentes da original. Essas diferenças podem estar relacionadas principalmente à eficiência em fixar nitrogênio (N_2) e à capacidade de formar nódulos e de competir com outras estirpes de *Rhizobium* por sítios de infecção nodular (Labandera & Vincent, 1975; Maier & Brill, 1978; Roughley, 1976; Vincent, 1974).

Kuykendall & Elkan (1976) demonstraram acentuada variação na eficiência de fixar o N_2 em quatro colônias de *R. japonicum* provenientes de uma mesma estirpe. Hubell (1970) observou que culturas derivadas de uma estirpe de *R. trifolii* apresentavam diferentes habilidades de formar nódulos. Labandera & Vincent (1975), trabalhando com essa mesma espécie, encontraram maior infectividade das culturas do que a da estirpe original, sendo, no entanto, ineficientes.

As causas dessas modificações ainda não estão bem esclarecidas. Segundo Roughley (1976), Strijdom & Allen (1967) e Staphorst & Strijdom (1971), as repicagens frequentes ou o uso de altos níveis de aminoácidos no meio de cultura aumentam as chances de ocorrência de variações nas características das estirpes de *Rhizobium*. Contudo, Roughley (1976) observou que culturas mantidas em meio comum com ágar-manitol-extrato de levedura, e mesmo culturas liofilizadas, podem também apresentar tais variações.

Neste trabalho, objetivou-se estudar a variação na fixação de N_2 por isolados de uma mesma estirpe de *R. japonicum*, bem como a possibilidade de selecionar isolados mais eficientes do que a estirpe original.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi conduzido um ensaio em vasos "Leonard" com areia e vermiculita (1:2, v/v) e solução nutritiva isenta de N (Norris, 1964), autoclavados a 121°C por uma hora. Nos vasos, foi plantada soja (*Glycine max* L. (Merrill)) variedade IAC-2, inoculada com as estirpes 29W e 965, individualmente, na forma de inoculante líquido, aos cinco dias após a emergência. A superfície das sementes, previamente esterilizadas pela imersão em etanol 95% por três minutos e em solução de $HgCl_2$ 0,1% por dois minutos, foi submetida a sete lavagens com água esterilizada.

Na época da floração, as plantas foram colhidas, sendo coletados alguns nódulos de cada estirpe, destacados das raízes e colocados individualmente em frascos de 6,0ml, que foram hermeticamente fechados com rolhas de borracha. Imediatamente foi substituído 0,6ml do ar por acetileno em cada frasco, deixando-se em incubação por uma hora à temperatura ambiente. O etileno produzido foi medido, injetando-se 0,5ml da mistura de gases de cada frasco em um cromatógrafo de gás, com coluna Poropak N, tendo-se o nitrogênio como gás de arraste. Os nódulos foram divididos em três grupos com base na atividade da nitrogenase, utilizando-se o seguinte critério: foi determinada a média da atividade da nitrogenase de todos os nódulos, considerando-se como de baixa aqueles que apresentaram atividade três vezes menor do que a atividade média e, de alta atividade, os nódulos com atividade três vezes maior do que a média. Foram obtidos alguns isolados de nódulos dos três grupos mencionados e, as estirpes neles presentes foram identificadas sorologicamente, através da reação dos extratos dos nódulos em solução fisiológica com os antissoros das estirpes 29W e 965, conforme descrito por Vincent (1970).

A partir dos isolados, prepararam-se inoculantes em meio líquido com manitol e extrato de levedura, onde as

culturas cresceram por três dias, sendo após centrifugadas e ressuspensas em solução fisiológica. Estas suspensões (inoculantes) foram padronizadas para uma mesma densidade ótica, utilizando-se um colorímetro fotoelétrico, resultando numa população com aproximadamente 10^8 células/mlilitro (método de diluição em placas). Tais inoculantes foram empregados em dois experimentos em condições de casa de vegetação, sendo um com os isolados da estirpe 29W e, outro, com os da 965. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com três repetições. Foram aplicados 4,0ml de inoculante por vaso com duas plantas, que foram colhidas no estágio de floração plena, sendo determinada a nodulação, o peso da matéria seca e o N total da parte aérea. Para avaliação do seu número e peso, os nódulos foram destacados das raízes, secos a 65°C por 48 horas, contados e pesados. A parte aérea das plantas foi também seca para a determinação do seu peso e teor de nitrogênio pelo método microkjeldahl (Tedesco, 1978).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 mostra a variabilidade na eficiência de fixação de N_2 entre os nódulos da estirpe 29W e 965, estimada pela atividade específica da nitrogenase (nmoles de C_2H_4 /miligramma de nódulo fresco/hora). Não houve correlação significativa entre a atividade da nitrogenase dos nódulos e seus pesos ($r^2 = -0,27$ e $r^2 = 0,28$ para as estirpes 29W e 965 respectivamente). Como eram todos nódulos jovens, pode-se concluir que as diferenças observadas foram devidas principalmente às desigualdades de eficiência do *Rhizobium* presente nos mesmos. Os dados seguiram uma distribuição normal para a estirpe 29W e uma distribuição assimétrica para a estirpe 965, com um deslocamento da curva para a esquerda. Os nódulos da estirpe 965 apresentaram atividade específica da nitrogenase em média duas vezes mais elevada do que os da 29W (Figura 1). Os valores encontrados foram inferiores aos obtidos normalmente em análise de cromatografia de gás, devido terem sido os nódulos destacados do sistema radicular.

A análise sorológica revelou que os nódulos apresentavam a mesma constituição antigênica das estirpes originais, comprovando a existência de grande variabilidade genética para fixação de N_2 dentro da população dessas estirpes. Resultados semelhantes foram obtidos por Hubell (1970) e Labandera & Vincent (1975) com *R. trifolii* e por Kuykendall & Elkan (1976) com *R. japonicum*.

No quadro 1 estão apresentados os dados relativos aos parâmetros de avaliação da fixação de N_2 dos experimentos onde se objetivou verificar se as eficiências dos isolados das estirpes 29W e 965 correlacionavam com as dos nódulos a partir dos quais os isolados foram obtidos. Pode-se observar que, para a estirpe 29W, houve estreita relação entre o nível de atividade da nitrogenase dos nódulos originários dos isolados e o peso da matéria seca, o peso dos nódulos e o N total das plantas.

As curvas de regressão determinadas a partir dos dados observados para todas as repetições encontram-se na figura 2. Os coeficientes de correlação estimados apresentaram valores altamente significativos, exceto para o número de nódulos. A ausência de correlação com o número de nódulos indica que a variação na eficiência em fixar o N_2 não está associada à capacidade de formar nódulos dos isolados. Esses dados demonstram que, para a estirpe 29W, a atividade específica da nitrogenase é um parâmetro confiável para avaliar a eficiência do *Rhizobium* presente no interior dos nódulos, e que a cromatografia de gás utilizando nódulos individuais pode ser empregada para obter culturas mais eficientes na fixação de N_2 .

Os isolados da estirpe 965 apresentaram uma variação significativa em todos os parâmetros medidos. Todos os isolados obtidos proporcionaram pesos de plantas menores do

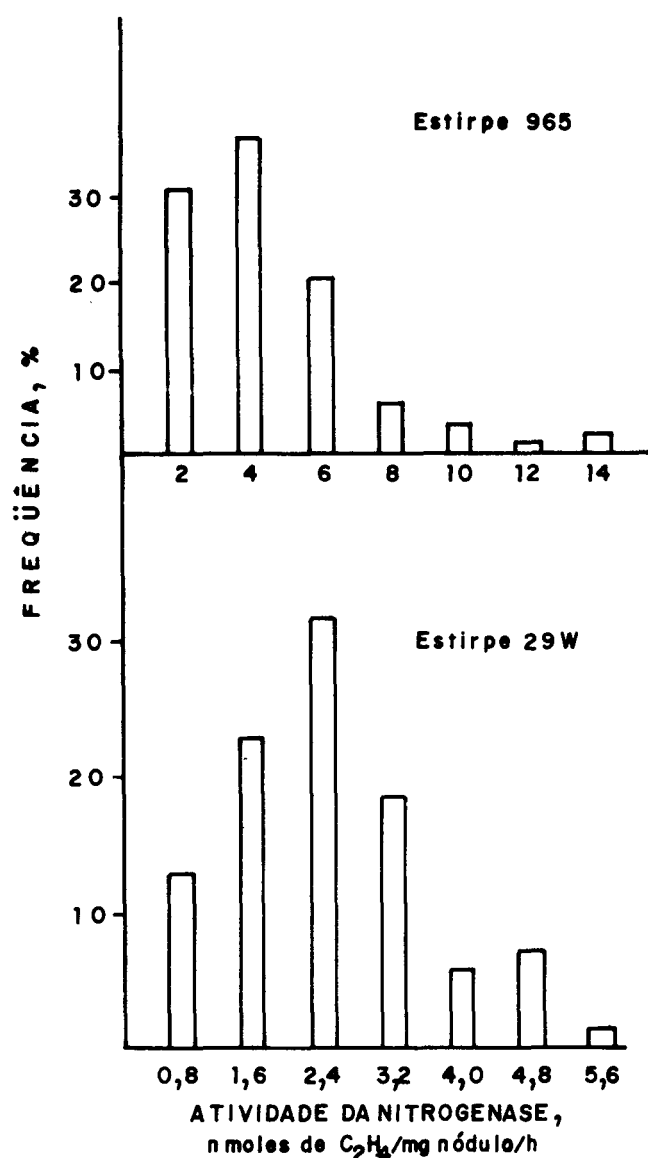


Figura 1. Frequência de classes da atividade da nitrogenase de nódulos de soja, cultivar IAC-2, inoculada com estirpes de *Rhizobium japonicum*.

que a estirpe original (Quadro 1), os quais não correlacionaram com a atividade dos nódulos que lhes deram origem. Isso indica que, para essa estirpe, a medida da atividade da nitrogenase pela redução do acetileno não fornece um valor seguro sobre o nível de fixação de N₂ nos nódulos. Uma possível explicação seria a evolução de H₂ no nódulo durante o processo de fixação de N₂, desviando parte do fluxo de elétrons que seriam utilizados nessa fixação. Segundo Schubert et alii (1978), essa perda de energia pode ser superior a 30%. Na presença de acetileno, a evolução de H₂ é inibida, e toda a atividade das enzimas é utilizada para reduzir o acetileno em etileno. Com isso, o nível de fixação de N₂ seria superestimado na análise cromatográfica, pois incluiria na atividade da nitrogenase estimada os elétrons que, em condições naturais, seriam transferidos para o hidrogênio. Essa hipótese pode ser reforçada por observações de campo onde plantas de soja, inoculadas com a estirpe 965, mostraram sintomas típicos de deficiência de N, apesar de apresentarem grande quantidade de nódulos róseos e um nível de atividade de nitrogenase (avaliada através da redução do acetileno) relativamente elevado (dados não publicados).

Quadro 1. Eficiência dos isolados de *Rhizobium japonicum* das estirpes 29W e 965, medida pela produção de matéria seca, N total e nodulação da soja, variedade IAC-2, cultivada em vasos "Leonard"⁽¹⁾

Identifi- cação do isolado	Nível de atividade da nitrogenase	Matéria seca	Nitrogênio total	Nodulação/planta	
				Número	Peso seco
		g/planta	mg/planta	mg	
Estirpe 29W					
14W	baixo	0,81cd	24de	69b	112cd
21W	baixo	0,86cd	28de	79ab	124cd
26W	baixo	0,63d	20e	63b	84d
32W	médio	0,89cd	27de	65b	125bc
43W	médio	1,21bc	46bc	76ab	159bc
3W	médio	0,93cd	22de	72b	118cd
16W	médio	0,86cd	27de	80ab	117cd
44W	médio	1,21bc	39cd	104a	177abc
46W	médio	1,60ab	59ab	79ab	197ab
29W	alto	1,54b	59ab	84ab	196ab
5W	alto	1,49b	62ab	67b	182abc
8W	alto	1,95a	72a	82ab	244a
C.V. %					
		19	24	21	24
Estirpe 965					
51K	baixo	1,36d	—	49c	250abc
54K	baixo	2,03bcd	—	42c	212bcd
74K	baixo	1,86cd	—	36c	179dc
76K	baixo	2,16bcd	—	51c	270ab
59K	médio	1,92bcd	—	42c	227abcd
82K	médio	2,55abc	—	54bc	257abcd
965	médio	3,24a	—	87a	303a
60K	alto	1,90cd	—	34c	173d
63K	alto	2,29bcd	—	38c	196bcd
70K	alto	2,94a	—	78ab	248abcd
87K	alto	2,75ab	—	57bc	241abcd
90K	alto	1,90cd	—	42c	185bcd
C.V. %					
		19	—	28	19

(1) Valores seguidos pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si (Duncan 5%).

leno) relativamente elevado (dados não publicados). Segundo Maier & Brill (1978), uma das principais causas das variações entre as estirpes quanto à eficiência em fixar N₂ é a diferença do nível de evolução de H₂ nos nódulos.

O reisolamento de estirpes de *Rhizobium* é utilizado rotineiramente por órgãos de pesquisa para a renovação de culturas-estoque armazenadas durante algum tempo. A metodologia utilizada baseia-se na inoculação das estirpes em plantas cultivadas em vasos "Leonard" esterilizados. Dessas plantas, são selecionados nódulos, com base na cor e aspecto, para a obtenção dos isolados. Os resultados aqui obtidos demonstram o grande risco de obter estirpes de menor eficiência do que a original, quando se emprega esse procedimento. Ficou também evidente que, para a estirpe 29W, o uso da cromatografia de gás pode substituir a seleção visual dos nódulos baseada em critérios empíricos, e constitui um método mais seguro e rápido de testar grande quantidade de nódulos, seguindo-se a obtenção de isolados a partir apenas de nódulos com alta atividade específica da nitrogenase.

De acordo com os resultados deste trabalho, fica demonstrada a grande variação existente na eficiência de fixar o N₂ dentro de uma mesma estirpe de *Rhizobium*, bem como a possibilidade de obter estirpes de maior eficiência fixadora de N₂ a partir das que já possuem outras características necessárias para a produção de inoculantes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos Técnicos de Laboratório Ademildo Santos da Silva e Vilderete de Castro Alves, ao Auxiliar de Laboratório Emílio Taveira e ao Técnico Agrícola Osmar Teago, o valioso auxílio na instalação e condução dos experimentos.

LITERATURA CITADA

- HUBELL, D. H. Studies on the root hair "curling factor" of *Rhizobium*. Bot. Gaz., Chicago, 4:337-342, 1970.
- KUYKENDALL, L. D. & ELKAN, G. H. *Rhizobium japonicum* derivatives differing in nitrogen-fixing efficiency and carbohydrate utilization. Appl. Env. Microbiol., Baltimore, 32:511-519, 1976.
- LABANDERA, C. A. & VINCENT, J. M. Loss of symbiotic capacity in commercially useful strains of *Rhizobium trifolii*. J. Appl. Bact., Londres, 39:209-211, 1975.
- MAIER, R. J. & BRILL, W. T. Mutant strains of *Rhizobium japonicum* with increased ability to fix nitrogen for soybean. Science, Washington, 201:448-450, 1978.
- NORRIS, D. O. Techniques used in work with *Rhizobium*. In: A Committee of Division of Tropical Pasture, C.S.I.R.O., Australia. Some concepts and methods in sub-tropical pasture research. Hurley, Berkshire, Farham Royal, Commonwealth Bureau of Pastures and Field Crops Bulletin, 1964. p.186-198. (CAB. Bull., 47)
- ROUGHLEY, R. J. The production of high quality inoculants and their contribution to legume yield. In: NUTMAN, P. S., ed. Symbiotic nitrogen fixation in plants. Cambridge University Press, 1976. p.125-136.
- SCHUBERT, K. R.; JENNINGS, N. T.; EVANS, H. J. Hydrogen reaction of nodulated leguminous plants. II. Effects on dry matter accumulation and nitrogen fixation. Pl. Physiol., Lancaster, 61:398-401, 1978.
- STAPHORST, J. L. & STRIJDOM, B. W. Infectivity and effectiveness of colony isolates of ineffective glycine-resistant *Rhizobium meliloti* strains. Phytophylactica, Pretoria, 3:131-136, 1971.
- STRIJDOM, B. W. & ALLEN, O. N. Studies with strains of *Rhizobium meliloti* cultivated on media supplemented with amino acids. S. afr. J. agr. Sci., Pretoria, 10:623-630, 1967.
- TEDESCO, M. J. Métodos de análise de nitrogênio total, amônia, nitrito e nitrato em solos e tecido vegetal. Porto Alegre, Faculdade de Agronomia, Departamento de Solos, 1978. 19p. (Informativo Interno, 1)
- VINCENT, J. M. A manual for the practical study of root nodule bacteria. International Biological Programme. London, Burgess, 1970. 164p.
- VINCENT, J. M. Root-nodule symbioses with *Rhizobium*. In: QUISPÉL, A., ed. The biology of nitrogen fixation. Amsterdam, NorthHolland Publishing Company, 1974. p.266-307.

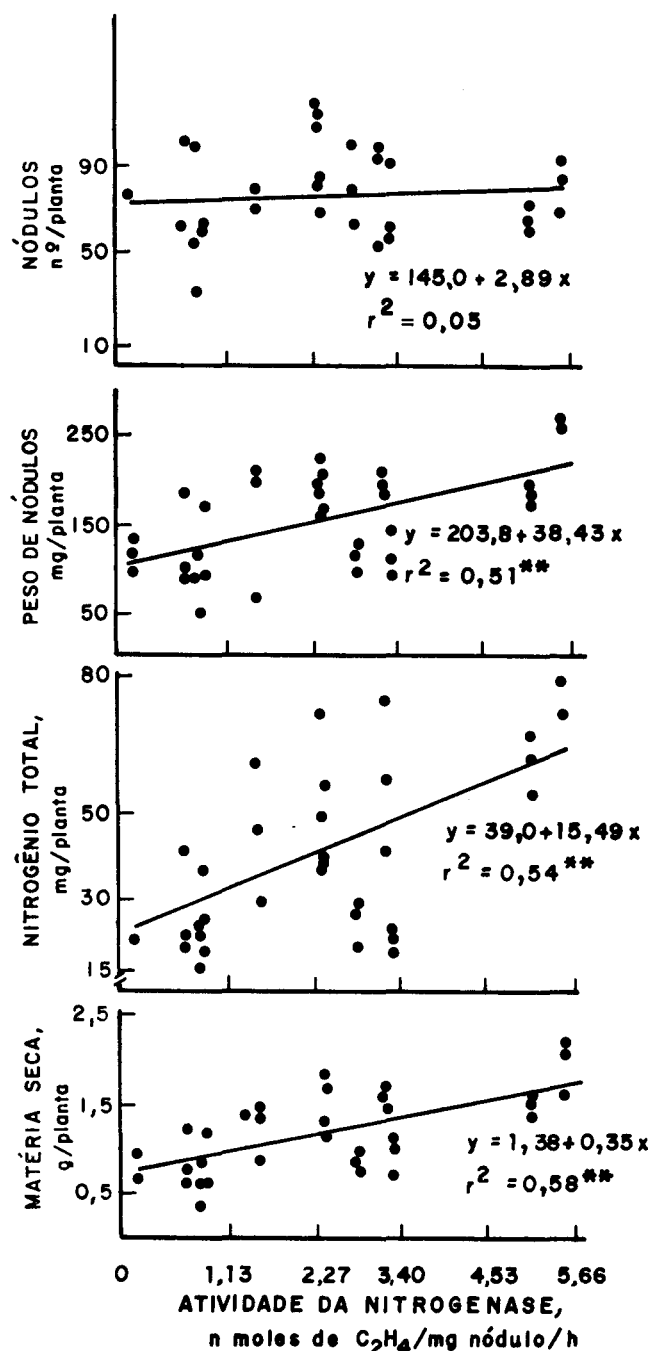


Figura 2. Correlação entre a atividade da nitrogenase de nódulos provenientes da estirpe 29W e parâmetros indicadores da fixação do N_2 expresso por planta.