

SELEÇÃO, EM MEIO DE CULTURA COM ASPARAGINA, DE ESTIRPES DE *Rhizobium japonicum* DE EFICIÊNCIA NODULAR EXCEPCIONAL¹

FÁBIO DE O. PEDROSA², AVÍLIO A. FRANCO³ e JOHANNA DÖBEREINER⁴

SÍNOPSE.— Foram feitos cinco ensaios de laboratório com estirpes de *Rhizobium japonicum* de eficiência normal e excepcional, usando meio de cultura com diversas concentrações de asparagina, com a finalidade de elaborar um método de laboratório para identificar as estirpes excepcionais.

Em meio de cultura líquido com 400 ppm de DL-asparagina, incubado de 7 a 8 dias a 30°C, a inibição do desenvolvimento das estirpes com eficiência nodular excepcional foi acima de 60% quando comparado com o desenvolvimento no mesmo meio com 100 ppm de DL-asparagina. As estirpes normais mostraram menor ou nenhuma inibição do seu desenvolvimento na presença das 400 ppm de asparagina. De 34 estirpes, 11 foram identificadas como excepcionais. Testes sorológicos indicaram que estas 11 estirpes excepcionais se originaram de apenas duas fontes, uma delas comum a duas estirpes de origem australiana, e a outra, a todas as restantes, que apresentam maior ou menor parentesco entre si.

INTRODUÇÃO

A produção de inoculantes altamente eficazes e que garantam um aproveitamento máximo do processo simbiótico de fixação do nitrogênio atmosférico, está condicionada à disponibilidade de estirpes de *Rhizobium* altamente eficazes, tanto na produção abundante de tecido nodular como ainda no funcionamento eficiente do mesmo. A seleção de estirpes para aquela finalidade atualmente é feita pela avaliação do nitrogênio total fixado durante o ciclo da planta, sendo, portanto, um processo lento e trabalhoso.

A procura de um método mais simples para diferenciar estirpes de *Rhizobium* em relação à sua maior ou menor eficácia tem atraído muitos pesquisadores, mas o progresso neste sentido tem sido relativamente pequeno.

Katznelson e Zagallo (1957) observaram que a oxidação de succinato por estirpes eficazes é mais rápida que por ineficazes. Gupta e Sen (1965) verificaram uma certa correlação entre o consumo de glicose em meio de cultura e a eficácia das estirpes de *Rhizobium* e Schwinghamer (1967) encontrou perda da eficiência com maior frequência nas mutantes resistentes à viomicina. Nenhum destes autores, entretanto, se preocupa em diferenciar entre estirpes que produzem muitos nódulos e outras que produzem tecido nodular mais eficiente, podendo isto ser a causa dos resultados pouco coincidentes. Já Hubbell e Elkan (1967) tentaram achar diferenças fisiológicas aparentes em meio de cultura entre estirpes de *R. japonicum* de maior ou menor capacidade de iniciar nódulos. Entre numerosos testes, a formação pronunciada de cápsulas, a inabilidade de metabolizar ni-

trito e a de reduzir cloreto de 2, 3, 5, trifênil tetrazólico (TTC) se destacaram como características das estirpes com maior capacidade de iniciar nódulos, nodulando mesmo plantas das linhagens de soja, que normalmente não nodulam.

Em trabalhos anteriores (Döbereiner *et al.* 1968, Pedrosa *et al.* 1969), foram descritos dois grupos distintos de estirpes de *R. japonicum* designados normais e excepcionais. As estirpes excepcionais formaram nódulos com eficiência aproximadamente duas vezes maior que os formados pelas normais. Os formados pelas estirpes excepcionais ainda continham o dobro de molibdênio e 27% mais leg-hemoglobina, não havendo, entretanto, correlação entre teor de Mo ou de leg-hemoglobina e eficiência nodular dentro de cada grupo. Isto foi atribuído a diferenças qualitativas entre os sistemas enzimáticos dos dois grupos.

Dorosinsky *et al.* (1966) sugeriram que para *Pisum*, *Lupinus* e *Vicia*, a atividade de desidrogenase de *Rhizobium*, em meio de cultura, poderia servir para avaliar a eficiência das estirpes sem, entretanto, trazer resultados convincentes. Uma série de ensaios realmente indicou uma redução mais rápida do TTC (Pedrosa & Döbereiner, dados não publicados) pelas estirpes excepcionais, sendo, entretanto, esta reação extremamente sensível e dependente de uma série de fatores experimentais como temperatura e luz, o que dificultou a elaboração de um método.

Moustafa e Greenwood (1967), analisando as isoenzimas de esterase e de fosfatase ácida em formas vegetativas e em bacteróides de *R. lupini*, não encontraram diferenças nas primeiras. Entretanto, os bacteróides de uma estirpe de eficiência nodular elevada mostraram diferenças nestas enzimas. Foi esta a única referência encontrada que tenta correlacionar características enzimáticas com maior ou menor eficiência nodular.

Como *Rhizobium* não fixa nitrogênio em meio de cultura, é pouco provável que se achem diferenças relacionadas com a atividade de nitrogenase em meio de cultura. Além da redução do N₂ em NH₃, a incorporação deste último em aminoácidos é dependente da estirpe de *Rhizobium* tendo sido encontradas variações consideráveis na composição de aminoácidos de nódulos induzidos por estirpes diferentes (Greenwood & Bathurst

¹ Recebido 12 mai. 1971, aceito 16 ago. 1971.

Apresentado na V Reunião Latino-Americana de *Rhizobium*, Rio de Janeiro, julho 1970.

² Eng.º Agrônomo, cursando Pós-graduação no Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, e bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq).

³ Eng.º Agrônomo do Setor de Solos do Instituto de Pesquisa Agropecuária do Centro-Sul (IPEACS), Km 47, Campo Grande, GB, ZC-26, e Pesquisador Assistente do CNPq.

⁴ Pesquisador em Agricultura do Setor de Solos do IPEACS e Pesquisador Conferencista do CNPq.

1968). No mesmo trabalho, entretanto, a composição dos aminoácidos produzidos pela mesma estirpe, independentemente da sua eficiência e do hospedeiro, foi surpreendentemente constante.

Além de ácido glutâmico e aspártico, as amidas destes ácidos foram encontradas como produtos primários da incorporação da amônia em nódulos (Kennedy 1966). Resultados recentes em nódulos de ervilhas mostraram que a asparagina corresponde a 64% do total de aminoácidos translocados dos nódulos para a planta (Pate *et al.* 1969).

Se a taxa de incorporação, e não a da fixação de N, for fator limitante do processo global de fixação de N, a síntese de asparagina ou glutamina em lugar dos aminoácidos correspondentes poderia justificar a eficiência nodular aproximadamente duas vezes maior das estirpes excepcionais (Döbereiner *et al.* 1968). Neste caso, estas estirpes apresentariam um sistema enzimático diferente no metabolismo da asparagina ou glutamina, o qual possivelmente poderia ser detectado também em meio de cultura. Atividades enzimáticas em *Rhizobium japonicum* associadas à incorporação de amônia em aminoácidos foram observadas recentemente por Fottrell e Mooney (1969) em meio de cultura.

Foram estas ponderações e as observações preliminares de uma inibição mais acentuada das estirpes excepcionais pela DL-asparagina (Döbereiner *et al.* 1968) que nos levaram a pesquisar o metabolismo desta amida com intuito de elaborar um método prático, que permita diferenciar as estirpes excepcionais em meio de cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram feitos cinco ensaios de laboratório para pesquisar o efeito da DL-asparagina no desenvolvimento de estirpes normais e excepcionais de *R. japonicum*. Em todos estes ensaios foi usado o meio de cultura de Fred e Waksman modificado: 10 g de D (-) manitol, nos 4 primeiros ensaios, e 10 g de sacarose, no último, mais: K_2HPO_4 , 0,1 g; KH_2PO_4 , 0,4 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2 g; NaCl, 0,1 g; extrato de levedura, 25 ml, e água destilada para completar 1 litro. As culturas foram incubadas em um agitador rotativo na temperatura ambiente e o seu desenvolvimento foi avaliado em unidades Klett num colímetro Summerson com litro 540 μ .

Para as curvas de crescimento foram usados frascos de Erlenmeyer de 125 ml nos quais foram soldados lateralmente tubos colorimétricos, permitindo, assim, leituras frequentes sem abertura dos frascos.

No primeiro ensaio foram determinadas as curvas de crescimento de uma estirpe normal (SM_{1b}) e outra excepcional (R_{4a}), com 6 concentrações de DL-asparagina (0, 100, 200, 400, 800 e 1.600 ppm). Tendo sido a melhor diferenciação entre as duas estirpes na concentração de 400 ppm, foi feito um segundo ensaio com 300, 400 e 500 ppm de DL-asparagina. No terceiro ensaio tentou-se confirmar a diferenciação com 400 ppm de DL-asparagina entre duas estirpes normais (SM_{1b} e R58) e uma excepcional (R54a). No quarto ensaio foi comparado o efeito de concentrações crescentes de DL-asparagina com as de ácido aspártico em três estirpes normais e três excepcionais.

O quinto ensaio foi feito em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio de cultura e incubados em posição inclinada em estufa a 30°C. Este ensaio foi feito para confirmar as diferenças entre estirpes normais e excepcionais com um número maior de estirpes. Para isto, além de tubos contendo 400 ppm de DL-asparagina, foram

usadas testemunhas contendo 100 ppm de DL-asparagina, concentração esta que tem demonstrado máximo desenvolvimento da maioria das estirpes.

As estirpes de *Rhizobium* foram divididas em normais e excepcionais de acordo com trabalho anterior (Döbereiner *et al.* 1968), que foi confirmado posteriormente, em vários experimentos.

Os testes de aglutinação sorológica foram feitos desenvolvendo-se os antígenos no mesmo meio de cultura usado anteriormente, acrescentando 2 g de agar-agar por litro. Após o desenvolvimento das culturas (7 dias), fez-se uma diluição a 1:1 em solução fisiológica com 8 g de NaCl por litro e inoculação intravenosa em coelhos. No 1.º dia inoculou-se 1 cm³, no 2.º, 2 cm³, e assim sucessivamente até o 5.º dia com 5 cm³. Após 15 dias da última inoculação, determinou-se o título do anti-soro, fazendo-se diluições segundo Vincent (1941).

RESULTADOS

Nas Fig. 1 a 6 podem-se observar as curvas de crescimento de duas estirpes características de *R. japonicum*, uma normal e outra excepcional, com concentrações crescentes de DL-asparagina. As concentrações de 100 e 200 ppm estimularam fortemente o desenvolvimento de ambas as estirpes mas com 400 ppm, após desenvolvimento inicial igual, a estirpe excepcional entrou em uma segunda fase latente que durou de 100 até 170 horas, tendo então reiniciado o seu desenvolvimento. Com esta concentração de DL-asparagina, a estirpe normal não foi praticamente afetada em seu desenvolvimento (Fig. 4). Acima de 800 ppm, ambas as estirpes foram seriamente inibidas, sendo que com 1.600 ppm o desenvolvimento só se iniciou 160 horas após a inoculação (Fig. 5 e 6).

Nas Fig. 7 a 9 são apresentados os resultados do segundo ensaio que foi feito para confirmar o primeiro e precisar melhor a concentração de DL-asparagina em que a diferença de crescimento das duas estirpes foi mais acentuada. Com 300 ppm (Fig. 7) se nota leve tendência da estirpe excepcional de uma segunda fase latente enquanto as estirpes normais não foram afetadas. Com 400 ppm, a estirpe excepcional repetiu curva de crescimento muito semelhante à observada no primeiro ensaio e as duas estirpes normais pouco foram afetadas. Já com 500 ppm, a excepcional teve uma só fase estacionária de mais de 200 horas enquanto as normais ainda apresentaram desenvolvimento razoável.

Na Fig. 10 são apresentados os resultados do terceiro ensaio que confirmam com duas estirpes normais e duas excepcionais as observações feitas nos dois primeiros ensaios.

Em todas estas curvas a maior diferença entre normais excepcionais parece ter sido em torno das 200 horas (8 a 9 dias de incubação).

No quarto ensaio (Fig. 11) foi observado novamente o efeito benéfico de até 150 ppm de DL-asparagina no desenvolvimento de todas as estirpes. Concentrações maiores inibiram fortemente as estirpes excepcionais (três neste ensaio) apresentando-se as estirpes normais muito mais tolerantes. No mesmo ensaio tentou-se comparar o efeito da asparagina com o do ácido aspártico na forma de aspartado de sódio. Fica aparente que este último praticamente não afetou nenhuma das estirpes, nem estimulando nem inibindo o desenvolvimento (Fig. 12).

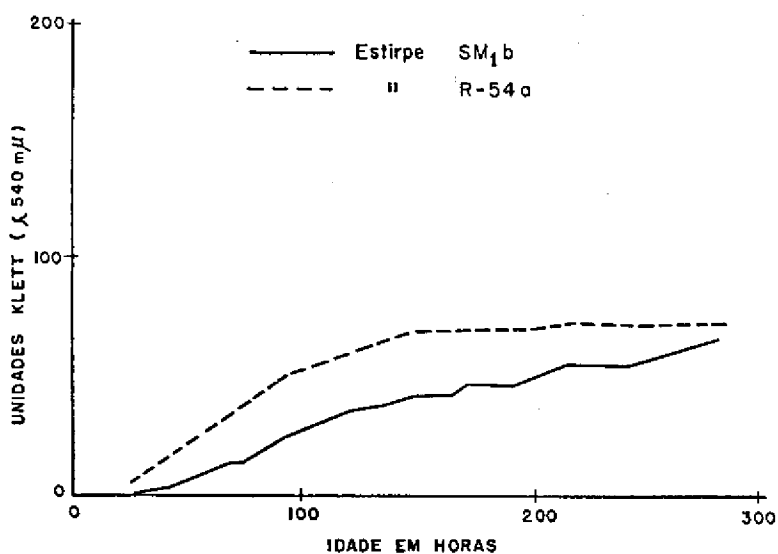


FIG. 1. Resultados do ensaio I (melão sem asparagina).

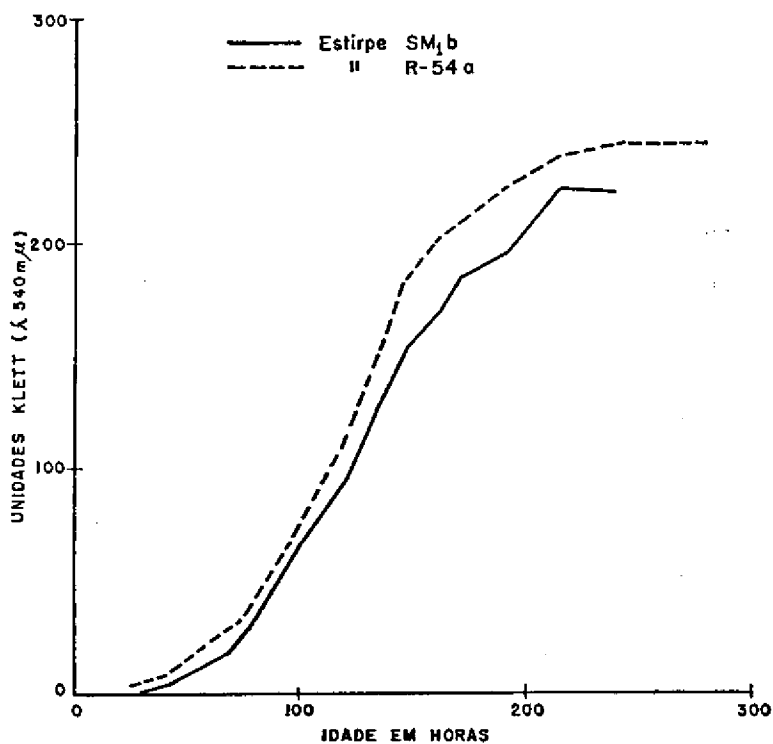


FIG. 2. Resultados do ensaio I (melão com 100 ppm de asparagina).

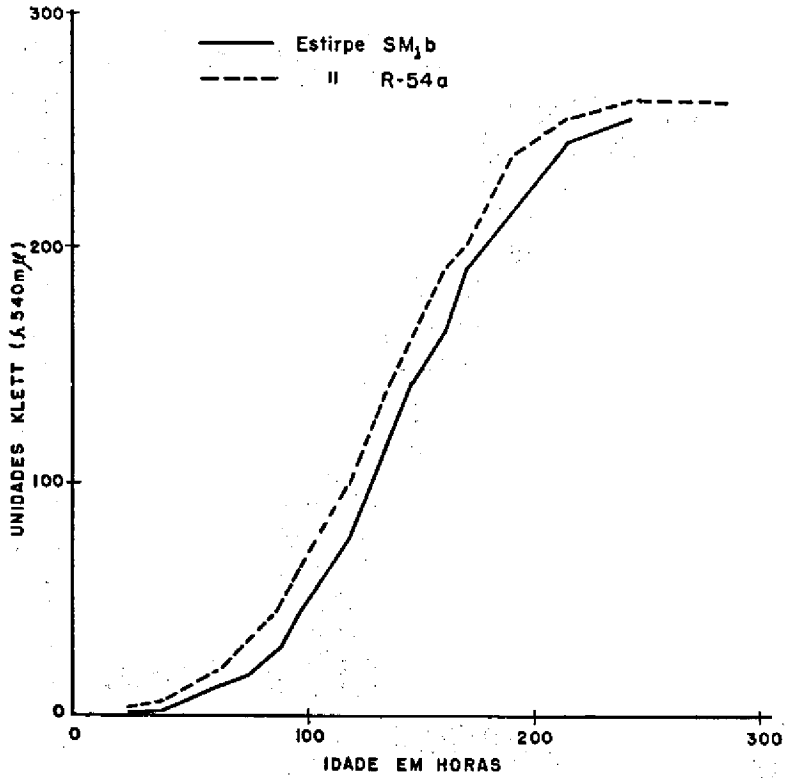


FIG. 3. Resultados do ensaio I (meio com 200 ppm de asparagina).

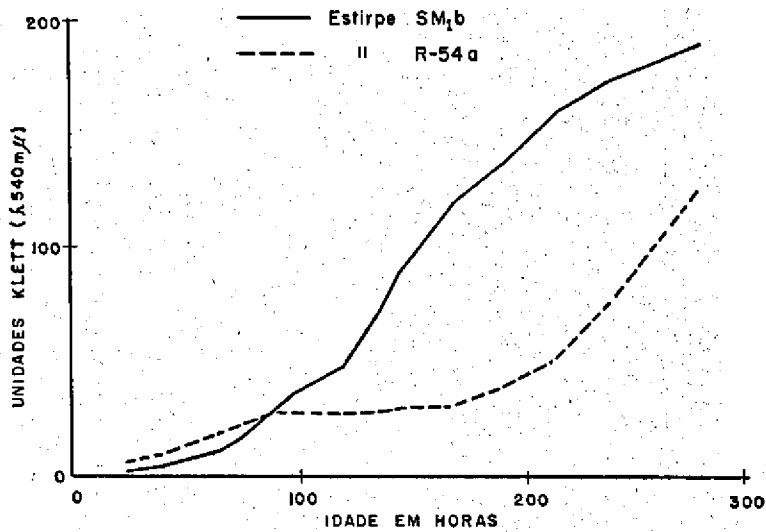


FIG. 4. Resultados do ensaio I (meio com 400 ppm de asparagina).

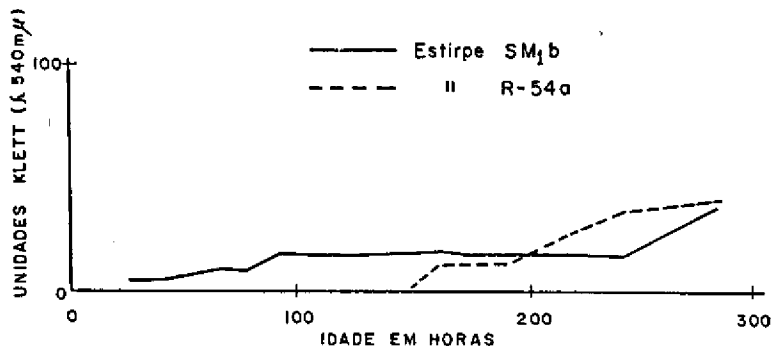


FIG. 5. Resultados do ensaio I (meio com 800 ppm de asparagina).

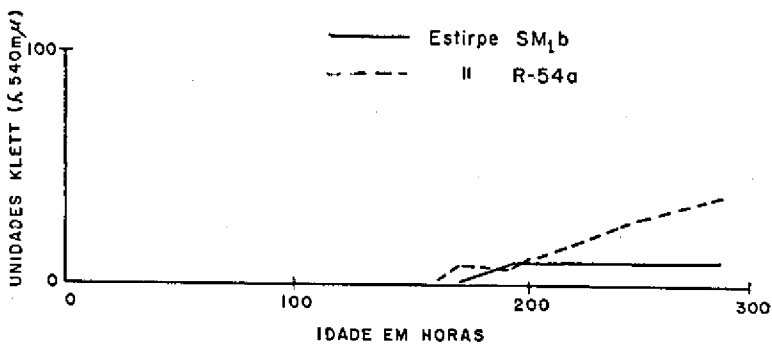


FIG. 6. Resultados do ensaio I (meio com 1.600 ppm de asparagina).

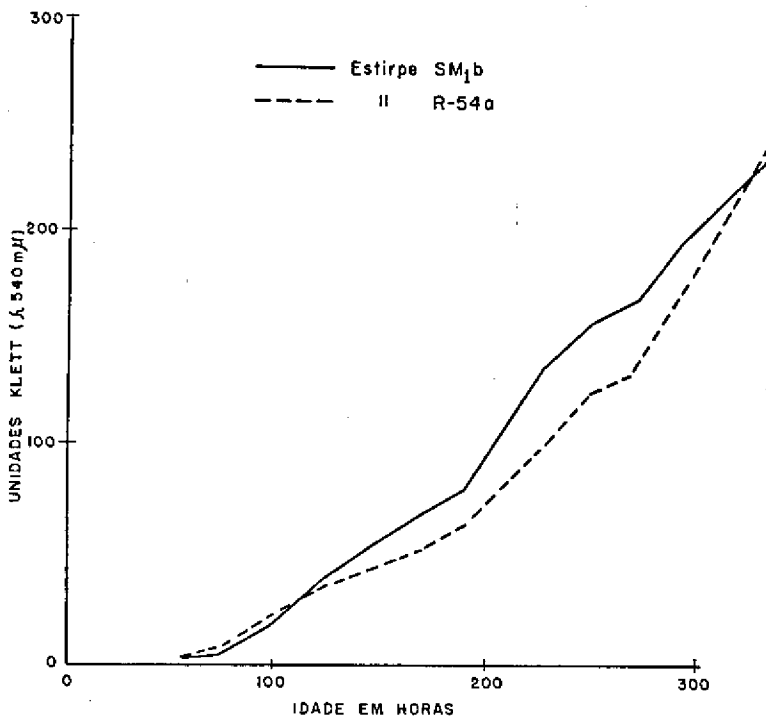


FIG. 7. Resultados do ensaio II (meio com 300 ppm de asparagina).

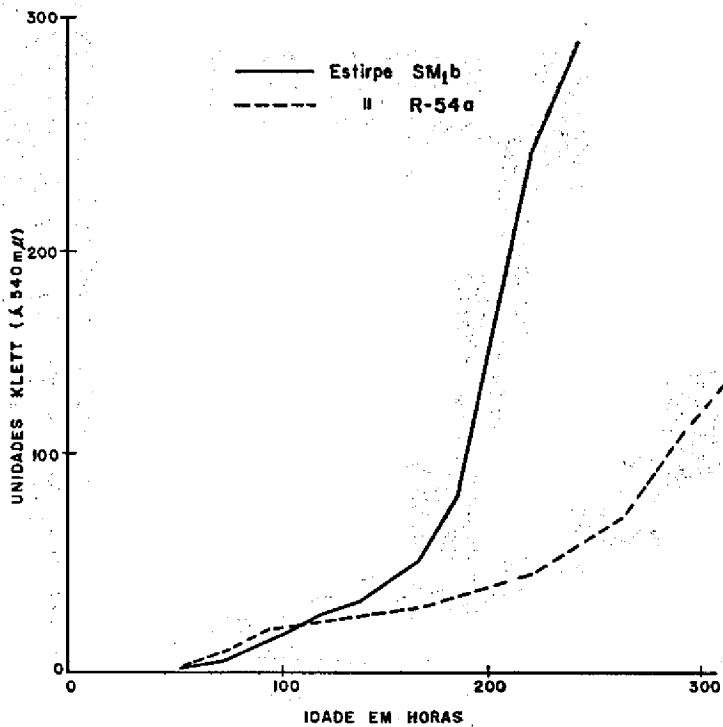


FIG. 8. Resultados do ensaio II (meio com 400 ppm de asparagina).

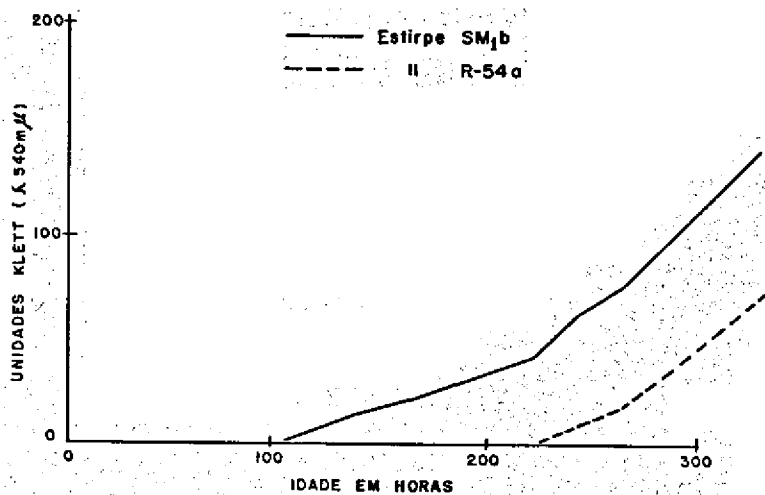


FIG. 9. Resultados do ensaio II (meio com 500 ppm de asparagina).

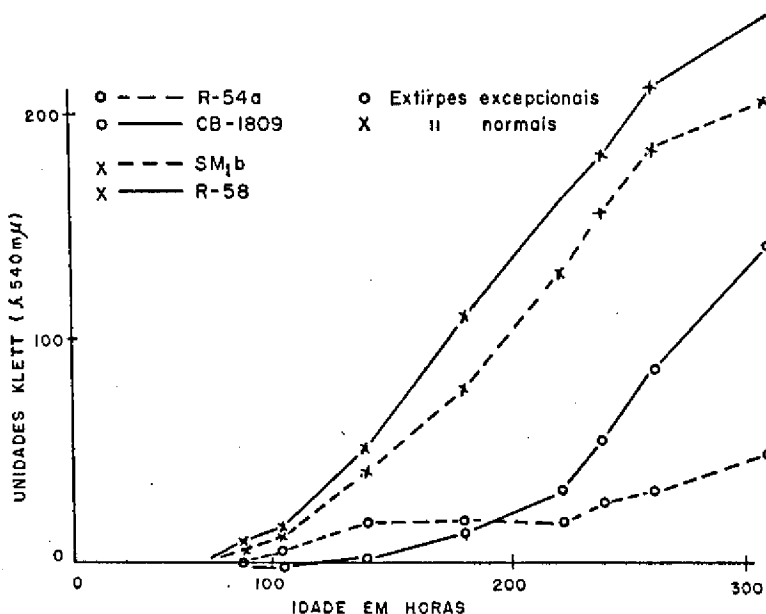


FIG. 10. Resultados do ensaio IV (curva de crescimento com 400 ppm de asparagina no meio).

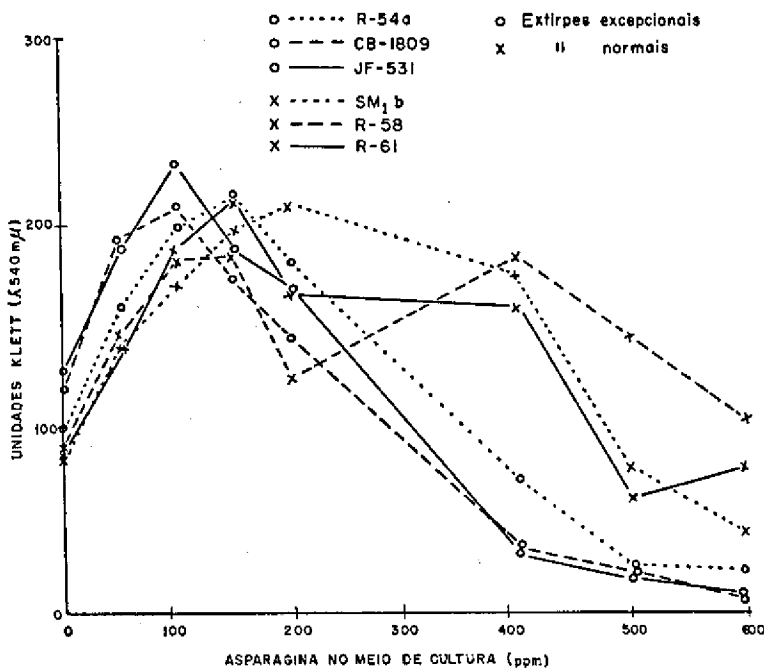


FIG. 11. Resultados do ensaio IV (concentrações crescentes de asparagina no meio).

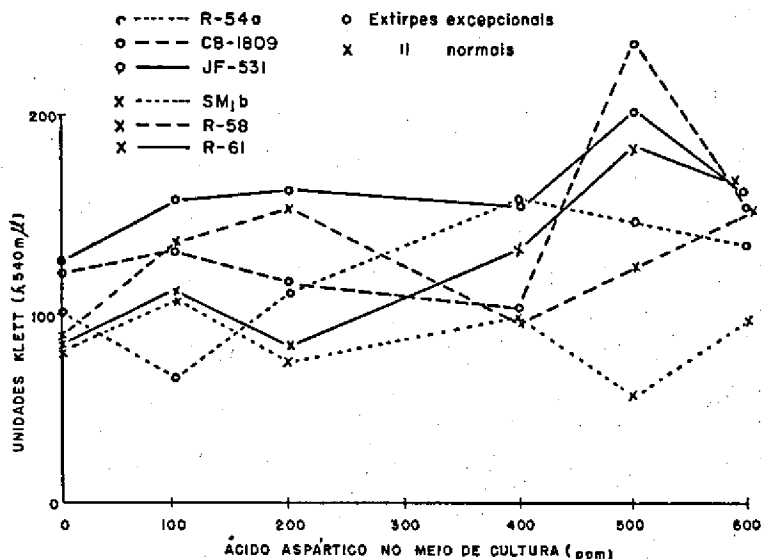


FIG. 12. Resultados do ensaio IV (concentrações crescentes de ácido aspártico, adicionado ao meio em forma de aspartato de sódio).

Em outros ensaios observou-se que L-asparagina não afetou o crescimento de nenhuma das estirpes, mesmo em concentrações de até 800 ppm.

No quinto ensaio, tentou-se finalmente comprovar as diferenças observadas em um maior número de estirpes. Encontram-se no Quadro 1 as leituras da densidade óptica de 34 estirpes com 100 e com 400 ppm de DL-asparagina. Verifica-se inibição mais pronunciada nas estirpes excepcionais, que sempre foi acima de 60%. Ocorreu uma exceção em um dos dois testes com a estirpe R5Aa, o que possivelmente se deve a uma mutação da cultura-estoque.

Entre as estirpes excepcionais encontramos as já diferenciadas em trabalho anterior (Döbereiner *et al.* 1968) R-54, R-11 e CB-1809, além de um grupo de estirpes da SARGS, JF-526, JF-531 e JF-543, que em outro experimento (Galletti *et al.* 1969) foram identificadas como de eficiência nodular excepcional. As estirpes R-13a e R-15, entretanto, foram inibidas pela DL-asparagina apesar de, em trabalho anterior, baseado em resultados de um só experimento, terem sido classificadas como normais. A estirpe CB-1786 nunca foi usada nos experimentos de competição de vasos, mas num experimento de campo se colocou em 4.º lugar em relação à fixação de N, com peso de nódulos relativamente baixo.

No Quadro 2 são apresentados os resultados dos testes sorológicos com anti-soro de 4 estirpes excepcionais. Justificam estes resultados a classificação como excepcionais das estirpes R-13 e R-15 e ainda da CB-1786. Todas as estirpes excepcionais até o presente encontradas por estes resultados, parecem se originar de apenas duas fontes, sendo uma delas a Austrália, de onde provêm as estirpes CB-1786 e CB-1809; a outra fonte é comum às estirpes restantes. No Quadro 3 podem ser observadas ainda melhor as reações sorológicas, com os seus títulos, dos dois grupos de estirpes excepcionais. Fica aparente que, com exceção da CB-1809 e CB-1786, as restantes, apesar de não serem idênticas, apresentam certo parentesco. Isto fica até certo ponto explicado se observar-

QUADRO 1. Aumento ou inibição percentual do desenvolvimento de estirpes normais e excepcionais de *Rhizobium japonicum* em meio de cultura com 400 ppm de asparagina em comparação ao mesmo meio com 100 ppm de asparagina^a (leituras após 7 dias de incubação a 30°C)

Estirpes normais	% aumento ou inibição (UK) ^b	Estirpes excepcionais	% inibição (UK) ^b
SM1b	0, - 17 ^c	R54a	- 62, - 73
A1a	- 21	R54b	- 27, - 69
RT2a	- 36	R54c	- 60, - 68
NG1a	- 19	JF526	- 69
R2a	- 19	JF531	- 85
R3a	- 51		
R4a	+ 57	JF543	- 94
R5b	- 40	R11a	- 76, - 93
R6b	+ 40	R13ad	- 80, - 100
R18	- 5	R15d	- 86, - 94
R20	0	CB1786	- 100
R55	+ 25, + 39	CB1809	- 75
R57	- 10		
R58	- 12, + 7		
R59	- 43, + 11		
R60	- 25, - 6		
R61	- 8, + 9, - 16		
R62	- 38, - 4		
R63	- 0		
R64	- 3		
R66	+ 22, + 22		
R267	- 37		
CB1786	- 5, - 27		

^a 16 culturas foram testadas usando-se um tubo com 100 ppm e 3 tubos com 400 ppm de DL-asparagina; as restantes, usando-se dois tubos para cada uma das concentrações.

$$^b \text{ \% inibição} = \frac{\text{UK } 100 \text{ ppm} - \text{UK } 400 \text{ ppm}}{\text{UK } 100 \text{ ppm asparagina}} \times 100.$$

^c Mais de um dado para uma estirpe significa mais de uma determinação com culturas estoque diferentes.

^d As estirpes R13a e R15, segundo um experimento de vasos, foram enquadradas anteriormente como normais (Döbereiner *et al.* 1968).

mos no Quadro 4 a origem e procedência das diferentes estirpes. As estirpes R-54a, b e c, foram isoladas de plantas inoculadas com inoculantes da Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul (SARGS) e, portanto, aparentemente provêm da mesma fonte. As estirpes R-13 e R-15 têm a mesma procedência (U.S.A.) que a R-11, mas parece estranho que tôdas as três apresentem reação sorológica, com as estirpes provenientes da SARGS. É possível que no programa de produção de inoculantes na SARGS tenham sido usados originalmente inoculantes dos U.S.A., dos quais, a partir de sucessivos reisolamentos de estirpes adaptadas à região, se tenham originado as estirpes atualmente recomendadas pela SARGS.

QUADRO 2. Reação sorológica usando anti-sôro de 4 estirpes excepcionais e antigêno das mesmas e das demais estirpes excepcionais e normais*

Antígeno	Anti-sôro 1809	R54a	JF531Re	R11a
R54a	—	+	+	+
R54b	—	+	+	+
R54c	—	+	+	+
JF-528	—	+	+	+
JF-531	—	+	+	+
JF-543	—	+	+	+
R-11a	—	+	+	+
R-13a	—	+	+	+
R-15	—	+	+	+
CB-1786	+	—	—	—
CB-1809	+	—	—	—
SM ₁ b	—	—	—	—
Ala	—	—	—	—
RT ₂ a	—	—	—	—
NG ₁ a	—	—	—	—
R ₂ a	—	—	—	—
R ₃ a	—	—	—	—
R ₄ a	—	—	—	—
R ₅ b	—	—	—	—
R ₆ b	—	—	—	—
R ₁₈	—	—	—	—
R ₂₀	—	—	—	—
R ₅₅	—	—	—	—
R ₅₇	—	—	0	—
R ₅₈	—	—	—	±
R ₅₉	—	—	0	±
R ₆₀	—	—	—	—
R ₆₁	—	—	—	—
R ₆₂	—	—	—	—
R ₆₃	—	—	—	—
R ₆₄	—	—	0	—
R ₂₆₇	—	—	—	—
CB-1795	—	—	—	—

* (+) = reação positiva, (—) = reação negativa, (±) = só deu positivo na diluição 1:50, e (0) = não foi feito o teste.

QUADRO 3. Reação de aglutinação cruzada de 4 estirpes de *Rhizobium* excepcionais

Antígeno	1809	R54a	JF531Re	R11a
1809	1/3200	—	—	—
R54a	—	1/3200	1/1600	1/1600
JR531Re	—	1/400	1/1600	1/1600
R11a	—	1/200	1/200	1/6400

QUADRO 4. Procedência e origem das estirpes de *Rhizobium japonicum* usadas

Identificação	Ano*	Procedência e origem
R-2a, R-3a, R-4a, R-5a e R-6b	1960	Estirpes isoladas de 5 variedades de soja sem inoculação em campo de multiplicação do IPEACS, Km 47, RJ
R-54a, R-54b e R-54c	1963	Estirpes isoladas de plantas inoculadas com inoculante comercial da SARGS, em casa de vegetação
SM ₁ b, A ₁ a, RT ₂ e NG ₁ a	1963	Estirpes isoladas de 4 diferentes variedades de soja sem inoculação em campo de multiplicação do IPEACS, Km 47, RJ
R-11a, R-13a e R-15	1964	Estirpes isoladas de 3 variedades de soja inoculada com um inoculante comercial importado dos U.S.A. crescendo em campo de multiplicação de Viçosa, MG
R-18	1964	Estirpe isolada de planta crescendo em solo com toxidez de manganês, sem indicação de inoculação
CB-1786, CB-1809, CB-1795	1966	Estirpes enviadas pelo Dr. D.O. Norris, de C.S.I.R.O., classificadas entre as 4 melhores da Austrália
R-267a	1966	Isolada de soja espontânea, crescendo em terreno onde já havia sido plantada, no ano anterior, soja inoculada com inoculante da S.M.S.
JF-528, JF-531 e JF-543	1968	Estirpes enviadas pelo Dr. João R. Jardim Freire indicadas como as melhores da SARGS
R-55, R-57, R-63 e R-66	1968	Estirpes isoladas de variedades de soja sem identificação quanto à inoculação ou não, crescendo em Rio Pomba, MG
R-58, R-64 e R-59	1968	Estirpes isoladas de variedades de soja inoculadas, com inoculante comercial enviado de Viçosa, MG, crescendo em Rio Pomba, MG
R-20	1964	Estirpe isolada da variedade de soja "Mamouth" inoculada com uma mistura das seguintes estirpes: A ₁ a, R-17, SM ₁ b, AP-20, R-13 e R-54a e b
R-60, R-61 e R-62	1968	Estirpes isoladas da variedade de soja "Pelican" sem inoculação, em Rio Pomba, MG

* O ano refere-se ao ano de isolamento ou de entrada no laboratório, conforme o caso.

DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho mostram que diferenças fisiológicas no metabolismo da DL-asparagina, detectáveis em meio de cultura, podem estar associadas com a eficiência nodular.

Como os ensaios foram feitos com o intuito principal de obter um método prático de diferenciar estirpes excepcionais, os seus dados não permitem conclusões definitivas sobre o mecanismo da inibição do crescimento das estirpes excepcionais pela DL-asparagina. Wierenga (1958) observou na seiva de ervilha inoculada com estirpes altamente eficazes a presença de asparagina, enquanto ácido aspártico foi encontrado na seiva tanto de plantas inoculadas com estirpes eficazes como com ineficazes, ou em plantas não inoculadas. O mesmo autor propôs um método de selecionar estirpes de *Rhizobium* através da identificação de asparagina na seiva, 5 semanas após a inoculação (Wierenga & Bakhuys 1957). Leiderman (1969), tentando aplicar este método na seleção de estirpes de *R. japonicum*, não obteve resultados devido ao fato de ter usado plantas com 21 dias, época em que a planta ainda tem reservas da semente e quando a fixação de N ainda não começou. Segundo Pliskovska (1967), o teor de asparagina no suco radicular

de plantas de soja inoculadas e não inoculadas decresceu até quase zero no primeiro mês, quando as reservas das sementes se esgotaram. Após 30 dias, o teor de asparagina aumentou novamente mas apenas nas plantas inoculadas.

Observações preliminares obtidas com cromatografia de papel, em nódulos de soja com 25 dias após o plantio, mostraram traços de asparagina, enquanto outros aminoácidos nesta época já foram encontrados em concentrações semelhantes às de nódulos que fixam N. Após o início da fixação de N (30 dias), nódulos formados pelas estirpes excepcionais apresentaram maior concentração de asparagina que nódulos formados pelas estirpes normais, mas com ambos os grupos de estirpes a concentração de asparagina foi consideravelmente maior do que aos 25 dias (Pedrosa & Döbereiner 1969, dados não publicados).

Pelo exposto acima, possivelmente o sistema enzimático responsável pela síntese de asparagina nos nódulos estará relacionado com o mecanismo pelo qual são liberadas substâncias inibidoras do desenvolvimento das estirpes excepcionais em meio de cultura com DL-asparagina.

Além do interesse pelo lado teórico, a diferenciação de estirpes de *Rhizobium* com eficiência excepcional na soja tem aplicação prática eminente. Se observarmos as estirpes caracterizadas pelo teste de DL-asparagina como excepcionais (Quadro 1), encontraremos entre elas quase todas as estirpes selecionadas como as melhores em laboriosos experimentos de vasos e de campo, no Rio Grande do Sul, na Austrália e em nosso laboratório. Portanto, maior eficiência nodular para estirpes a serem usadas na prática pode ser mais importante que a capacidade de formar grandes quantidades de nódulos. Isto é compreensível, pois, como foi visto em trabalhos anteriores (Döbereiner *et al.* 1966), a formação do tecido nodular é mais sensível a fatores adversos do solo ou da planta que a eficiência nodular. Assim, com variedades que produzem poucos nódulos em solos ácidos e deficientes, as estirpes de *Rhizobium* excepcionais, que fixam o dobro de nitrogênio no mesmo volume nodular, poderão suprir o N necessário através da simbiose. Por outro lado, variedades de fácil nodulação, e principalmente em solos melhores, seriam menos favorecidas pelas estirpes excepcionais, podendo uma estirpe de eficiência normal, mas que tenha elevada capacidade de formar nódulos, fixar quantidades equivalentes.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente trabalho, o seguinte método pode ser proposto para selecionar estirpes de *Rhizobium japonicum* com eficiência nodular excepcional:

1) repicar as culturas-estoque para tubos contendo 10 ml do meio 79 modificado (KH₂PO₄, 0,1 g; KH₂PO₄, 0,4 g; MgSO₄. 7H₂O, 0,2 g; sacarose, 10,0 g; NaCl, 0,1 g; extrato levedura, 100 ml; agar-agar, 2,0 g; azul de bromotimol, 5 ml (sol. alc. 0,5%); H₂O, completar 1 litro); estes tubos, incubados com culturas puras de *R. japonicum*, deverão apresentar aspecto característico com máximo desenvolvimento na profundidade de 3 a 5 mm, formando-se um disco esbranquiçado; acima deste disco, o meio de cultura se torna azul intenso;

2) preparar, para cada estirpe, 4 tubos contendo 10 ml do mesmo meio, mas sem agar e sem azul de bromotimol e com conteúdo de extrato de levedura reduzido para 25 ml/l, dois dos quais contendo 100 ppm de DL-asparagina e os dois outros, 400 ppm de DL-asparagina;

3) inocular os tubos descritos no n.º 2 com as culturas desenvolvidas nos tubos descritos no n.º 1; incubar os tubos inclinados, em estufa a 30°C, durante 7 dias, agitando diariamente; medir as unidades Klett com filtro de 540µ e calcular a % de inibição no meio com 400 ppm de asparagina.

REFERÊNCIAS

- Döbereiner, J., Arruda, N.B. & Penteado, A.F. 1966. Avaliação da fixação de nitrogênio em leguminosas pela regressão do nitrogênio total das plantas sobre o peso dos nódulos. *Pesq. agropec. bras.* 1:233-237.
- Döbereiner, J., Franco, A.A. & Guzmán, I. 1970. Estirpes de *Rhizobium japonicum* de eficiência excepcional. *Pesq. agropec. bras.* 5:155-161.
- Dorosinsky, L.M., Sagorie, I.V. & Busiashvilli, D.M. 1966. Assay of nitrogen fixing ability of nodule bacteria by an enzymatic test. *Microbiologia* 35:319-322.
- Fottrell, P.F. & Mooney, P. 1969. The regulation of some enzymes involved in ammonia assimilation by *Rhizobium japonicum*. *J. gen. Microbiol.* 59:211-214.
- Galletti, P.L., Franco, A.A., Azevedo, H. & Döbereiner, J. 1971. Efeito da temperatura do solo na simbiose da soja anual. *Pesq. agropec. bras. Sér. Agron.* 6:1-8.
- Greenwood, R. & Bathurst, N.O. 1968. The effect of *Rhizobium* strain on the amino acids of *Lotus* root nodules. *N.Z. J. Sci.* 11: 280-283.
- Gupta, K.G. & Sen, A. 1965. The relationship between glucose consumption by *Rhizobium* sp. from some common cultivated legumes and their efficiencies. *Pl. Soil* 22:229-239.
- Hubbel, D.H. & Elkan, G.H. 1967. Correlation of physiological characteristics with nodulating ability in *Rhizobium japonicum*. *Can. J. Microbiol.* 13:233-241.
- Katznelson, H. & Zagallo, A.C. 1957. Metabolism of *Rhizobium* in relation to effectiveness. *Can. J. Microbiol.* 3:879-887.
- Kennedy, I.R. 1966. Primary products of symbiotic nitrogen fixation. Short term exposures of seradella nodules to Na²⁵. *Biochim. biophys. Acta* 130:285-294.
- Leiderman, J. 1969. Aplicación de la técnica de Wierenga e Bakhui en selección de cepas de *Rhizobium japonicum*. *Revta ind. agric. Tucumán* 46:73-79.
- Moustafa, E. & Greenwood, G.M. 1967. Esterase and phosphatase isoenzymes in rhizobia and rhizobial bacteroids in relation to strain effectiveness and proportion of nodule tissue in *Lotus*. *N.Z. J. Sci.* 10:548-555.
- Pate, J.S., Gunning, B.E.S. & Briarty, L.G. 1969. Ultrastructure and functioning of the transport system of the leguminous root nodule. *Planta* 85:11-34.
- Pedrosa, F.O., Nascimento, A.J., Alvahydo, R. & Döbereiner, J. 1970. Teores de leg-hemoglobina e de molibdênio nos nódulos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) inoculada com estirpes de *Rhizobium japonicum* de eficiência normal e excepcional. *Pesq. agropec. bras.* 5:373-379.
- Pliskovska, M. 1967. Chromatographic analysis of the bleeding sap of inoculated and non-inoculated soya plants. *Acta microbiol. pol.* 16:137-144.
- Schwingammer, E.A. 1967. Effectiveness of *Rhizobium* as modified by mutation for resistance to antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek* 33:121-136.
- Vincent, J.M. 1941. Serological studies of the root-nodule bacteria. I. Strains of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Linn. Soc. N.S. W.* 66:145-154.
- Wierenga, K.T. 1958. Transport of amino acids in leguminous plants, p. 256-265. In: Hallsworth, E.G. (ed.), *Nutrition of the legumes*. Academic Press, New York.
- Wierenga, K.T. & Bakhui, J.A. 1957. Chromatography as a means of selecting effective strains of rhizobia. *Pl. Soil* 8: 254-262.

ABSTRACT.- Pedrosa, F. de O., Franco, A.A. & Döbereiner, J. 1972. *Selection of strains of Rhizobium japonicum with exceptional nodule efficiency grown in culture medium with asparagine*. Pesq. agropec. bras., Sér. Agron., 7:153-163. (Inst. Pesq. Agropec. Centro-Sul, Km 47, Rio de Janeiro, GB, ZC-26, Brazil)

Five laboratory experiments were conducted with *Rhizobium japonicum* to elaborate a laboratory test for selecting strains with exceptional nodule efficiency.

Exceptional strains grown at 30°C, during 7 to 8 days in liquid medium containing 400 of DL-asparagine were inhibited by more than 60% when compared with the same strain grown in medium containing 100 ppm of DL-asparagine. Normal strains were inhibited much less or not at all in the presence of 400 ppm of DL-asparagine.

Thirty four strains were tested and of these 11 were classified as exceptional by the asparagine test. Nine of these strains were known before to produce exceptionally efficient nodules. All strains classified as normal were known as such from greenhouse tests. Sorological tests demonstrated that the 11 exceptional strains originated from only 2 sources. Two strains, originally from Australia, seemed sorologically identical, and the remaining 9, although with varying titers, all gave at least some cross agglutination indicating their relationship with inoculants originally imported from the U.S.A.