

Na Figura 26, pode-se observar que a utilização do fragmento de DNA Ψ -ZM5 marcado com nucleotídeo contendo biotina (Biotina-11-dUTP) via "Nick-Translation" apresentou resolução que permitiu a visualização de 100 picogramas do fragmento alvo, imobilizado em membranas.

Na Figura 27 é apresentado o exemplo de um gel de agarose com oito padrões de DNA de alto peso molecular e de concentração conhecida, que foram utilizados para quantificar DNA genômico extraído de diferentes cultivares de milho e de cepas de *Rhizobium*. Estes e outros resultados já conhecidos mostram que as sondas de DNA marcadas com nucleotídeos não radiativos podem ser utilizadas com precisão como marcadores moleculares e que a metodologia para sua utilização é hoje uma realidade na EMBRAPA/CNPMS. - Manoel Teixeira Souza Júnior, Edilson Paiva.

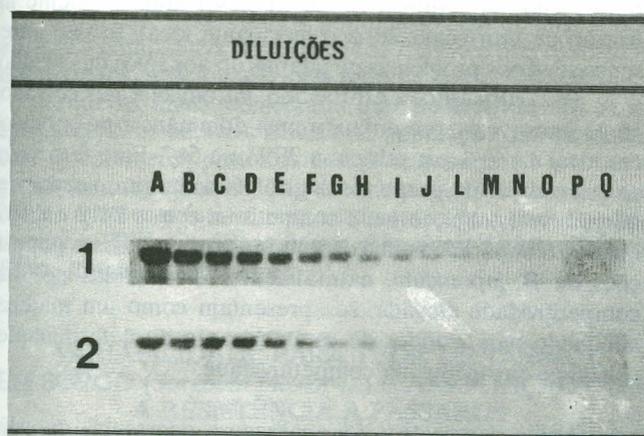


FIGURA 26. Grau de resolução obtido com o uso do fragmento ZM5 marcado com Biotina-11-dUTP via "Nick-translation" (10; e com o uso de M13mp18 - ZM5 marcado com Biotina-11-dUTP via polimerização da fita sense 92). A a Q representam concentrações de ZM5 variando de 250 ng até 0,75 pg, obtidas por diluição em série. CNPMS, Sete Lagoas, MG, 1992.



FIGURA 27. Padrões de DNA de alto peso molecular utilizados para quantificação de DNA genômico por comparação visual. No alto, da direita para a esquerda, DNA de CMS 450, CMS 451, Dentado Composto F12, CMS 453, CMS 454, DNA de *Rhizobium* sp estirpes CIAT, SEMIA e CENA. CNPMS, Sete Lagoas, MG, 1992.

SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE *Rhizobium* spp. ESTÁVEIS E EFICIENTES NA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.)

As estirpes de *Rhizobium* indicadas na inoculação do feijão não mantêm suas características originais relacionadas com a efetividade na fixação de N_2 . Esta instabilidade genética é decorrente de perdas ou alterações dos plasmídeos (P sym) que carregam os gens da fixação de N_2 e é agravada pelas temperaturas elevadas que normalmente ocorrem nos solos tropicais.

Visando selecionar estirpes de *Rhizobium* eficientes e estáveis na fixação de N_2 em feijão, foram desenvolvidos experimentos para determinar a variabilidade de efetividade de fixação de N_2 , bem como caracterizar o material protéico e DNA das estirpes de *Rhizobium* capazes de nodular feijão antes e após exposição a temperaturas elevadas.

Os resultados evidenciaram variabilidade na efetividade de fixação de nitrogênio, através de testes de redução de acetileno, em nódulos individuais dentro de uma mesma estirpe de *Rhizobium*, assim como diferenças nos níveis de tolerância a temperatura (35 a 39 °C) entre 21 estirpes testadas (*R. leguminosarum* bv. *phaseoli* - tipo I e *R. tropici* - tipo II). As estirpes mais tolerantes a temperatura (CIAT 899, CENA CO₅ II, CPAC H₂O, CPAC H₁₄, CPAC H₃₅ e Semia 476) após crescimento, duas vezes, até o final da fase logarítmica, em sua temperatura específica máxima de crescimento (38 ou 39 °C), foram inoculadas em feijão e comparadas com seus pares originais. Aparentemente não ocorreram alterações

significativas nas características simbióticas dessas estirpes, submetidas à ação da temperatura avaliada através da atividade da nitrogenase, peso seco da planta e nitrogênio total fixado.

A caracterização protéica usando separação eletroforética em gel de poliacrilamida mostrou que o padrão de proteínas pode ser usado para separar estirpes entre e dentro das espécies (Figura 28). Porém, não se evidenciaram modificações nos padrões das estirpes das duas espécies submetidas à ação da temperatura, em relação aos seus pares originais.

A caracterização do material genômico, realizada através da hibridização do DNA total, usando "nif probe" marcada via "nick translation" (biotina 14 dATP), quando a digestão foi efetuada com *Eco RI*, diferenciou a espécie de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* - tipo I (uma cópia gen nif) de *R. tropici* - tipo II (multicópias gen nif). Quando o DNA total foi digerido com *Bam HI* o DNA das estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (tipo I) apresentou polimorfismo não evidenciado com *Eco RI* e padrões homólogos entre as estirpes de *R. tropici* (tipo II). Já quando a digestão foi efetuada com *Hind III* o polimorfismo foi mais bem evidenciado, diferenciando inclusive as estirpes de *R. tropici* (tipo II), (Figura 29). Esses resultados indicam uma diversificação genética mais evidente nas estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (tipo I). Não se detectaram alterações nos padrões genômicos de uma estirpe antes e após exposição a temperatura nas duas espécies de *Rhizobium*, indicando que os plasmídeos Sym dessas estirpes foram mantidos e que essas estirpes mais tolerantes a altas temperaturas são provavelmente mais estáveis. - *Nadja Maria Horta de Sá Carneiro, Edilson Paiva, Avílio Antônio Franco.*

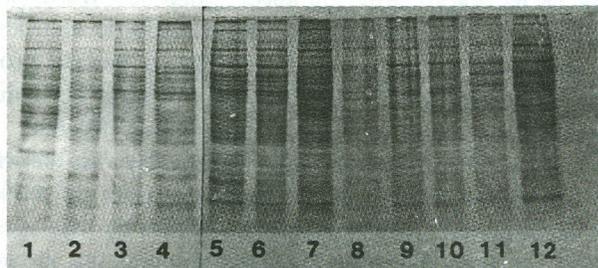


FIGURA 28. Eletroforese SDS-PAGE. Padrão de proteínas totais de estirpes parentais *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (tipo I): (1) Semia 476, (2) CPAC H₃₅, (3) CPAC H₁₄, (4) BR 365 e de *R. tropici* (tipo II). (5) CIAT 899, (6) CFNA CO₅ II, (7) CPAC H₂₀, (8) Car 22, (9) BR 814, (10) BR 818, (11) BR 817, (12) Na 82. CNPMS, Sete Lagoas, MG, 1992.

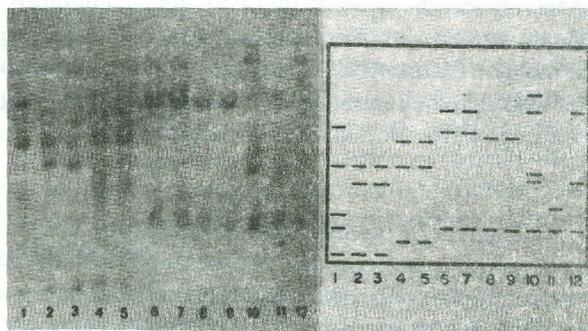


FIGURA 29. Southern blot hibridização, "nif probe" marcado com biotina através de "nick translation". DNA total digerido com *Hind III* das estirpes parentais de *R. leg.* bv. *phaseoli* (tipo I) (1) Semia 476, (2) BR 365, (3) CPAC H₁₄, (4) CPAC H₃₅, (5) CPAC H₂₃, e de *R. tropici* (tipo II) (6) CIAT 899, (7) CFNA CO₅ II, (8) CPAC H₂₀, (9) Na 82, (10) BR 812, (12) BR 818. CNPMS, Sete Lagoas, MG, 1992.

ESTUDO COMPARATIVO DE ESTIRPES DE *Bradyrhizobium japonicum* ISOLADAS DOS CERRADOS, ATRAVÉS DE SUAS CARACTERÍSTICAS PROTÉICAS ANTIGÊNICAS E DE COMPETITIVIDADE

Na década de setenta, a soja foi introduzida nos cerrados brasileiros e estirpes de vários sorogrupos (965, R54a, 566, CB-1809, 29W e 587) foram preparadas como inoculante. Somente as estirpes 29W e 587 persistiram e dominaram nesses solos. A estirpe CB 1809, por ser muito eficiente na fixação de nitrogênio, seria o inoculante ideal, se não apresentasse sérios problemas de adaptação aos solos de cerrado.

Por outro lado, a estirpe 566, introduzida nos cerrados há 15 anos, vem apresentando uma dominância nos nódulos em nível de 60% em relação à 29W e à 587. Esse fato sugere que estirpes do grupo sorológico 566 adquiriram capacidade para se estabelecerem e competirem com a 29W e a 587, quando comparada com a estirpe 566 parental. Essas populações de *B. japonicum*, naturalmente selecionadas por sua competitividade elevada, se apresentam como um material adequado para estudos de caracterização de determinantes celulares, envolvidos na competitividade.

Nessa perspectiva, foi analisada a ocorrência da estirpe 566 em nódulos de soja de 5 diferentes tipos de solo de cerrado, confirmando a dominância dessas estirpes na ordem de 60%. Essas estirpes do sorogrupo 566, adaptadas aos cerrados, foram isoladas e testadas quanto à sua capacidade competitiva, em relação à 29W, em condições assépticas de jarro de Leonard. Após identificação sorológica (imunoadesão) dos nódulos, foi possível selecionar um pequeno grupo de 5 estirpes altamente competitivas, em relação à 29W. Essas estirpes foram comparadas com a estirpe 566 paren-