

Estudo ao microscópio eletrônico de nódulos em *Phaseolus vulgaris* L. causados por uma estirpe inefetiva de *Rhizobium*.*

NEUSA DE LIMA NOGUEIRA**, DARCY MARTINS DA SILVA**, SIU MUI TSAI SAITO***

ABSTRACT

A bean (Phaseolus vulgaris L.) nodule ineffective strain of Rhizobium was isolated in a soil in the North of Paraná where a rotation of wheat/beans is practised.

This is the first N₂-fixation ineffective strain isolated in Brasil and it was of interest to examine the morphology and fine structure of the Rhizobium and of the host tissue with the Electron Microscope, as well as to compare them with an effective strain of Rhizobium of the same cultivar.

The ineffective bacteria, although nodulating on the host, did not show nitrogenase activity (reduction of C₂H₂) in the nodules. Also, the bacteria of the ineffective association were smaller, lesser in number per envelope (1-2) containing less poly-beta-hydroxybutyric acid in the cells and were more frequently located in the intercellular walls. Starch granules were observed in the cells of ineffective nodules.

Introdução

A PRESENÇA de *Rhizobium* inefetivo em solo ou nódulos de leguminosas tem importância agrônômica, uma vez que esta bactéria não fixa nitrogênio quando associada à planta hospedeira e consome energia da planta.

Variações na capacidade de fixação e nodulação tem sido descritas há tempo em estirpes de *Rhizobium*. Em condições adversas de sobrevivência para a bactéria, pode-se esperar o aparecimento de variantes não infectivos ou inefetivos em fixação de N₂ (11), sem no entanto implicar em alterações nas características serológicas (2, 14). Em alguns casos a ineficiência está associada à perda da capacidade de sintetizar altos níveis de riboflavina e cobalamina (12).

Bergersen (1) descreve ao nível de microscopia eletrônica a estrutura de nódulos inefetivos em *Trifolium subterraneum*, determinando que a falha no estabelecimento da simbiose era devido ao processo incompleto de formação de nódulos. No caso, a permanência da bactéria no cordão de infecção, portanto, a não formação de bacteróides no citoplasma de células dissomáticas

da planta hospedeira foi o fator preponderante para não ocorrer fixação de N₂. Ishizawa e Toyoda (8) observaram a presença de maior quantidade de grãos de amido em tecidos nodulares inefetivos de *Glycine max*, *Pisum sativum* e *Astragalus sinicus*.

Muitas simbioses eficientes tem sido descritas ao nível de microscopia eletrônica. Estudos em nódulos de *Glycine max* (7, 3), *Vigna sinensis*, *Acacia longifolia*, *Viminaria juncea*, *Lupinus angustifolius* (5) demonstraram a existência de passos vitais comuns a todas as espécies de nódulos citados, que permitem a formação e funcionamento dos mesmos. Em *Phaseolus vulgaris* já foram estudadas algumas estirpes inefetivas de *Rhizobium phaseoli* apenas sob aspectos nutricionais e de fixação de N₂ (4).

Os solos brasileiros, quando apresentam boas condições físico-químicas e com pH entre 6,0 - 6,5, contêm muitas vezes alto número de estirpes de *Rhizobium* uma vez que o feijoeiro é uma cultura largamente cultivada no país.

Materiais e métodos

Sementes de feijão cultivar 'Venezuela-350' foram esterilizadas superficialmente com 0,2% de HgCl₂ acidificado e cultivadas em tubos de ensaio de 35 mm de

* Recebido para publicação em 3 de outubro de 1978.

** Seção de Fitopatologia e Microscopia Eletrônica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CNEN/ESALQ/USP, Cx Postal 96, 13.400 Piracicaba, S. P., Brasil.

*** Seção de Microbiologia do Solo do Centro de Energia Nuclear na Agricultura CNEN/ESALQ/USP, 13.400 Piracicaba, São Paulo.

diâmetro \times 300 mm de comprimento (13), contendo vermiculita e solução isenta de nitrogênio (9). Estes tubos eram previamente esterilizados a 121°C (1 atm) por 60 minutos.

Após a germinação do feijão, subdividiram-se as plantas em dois lotes e procedeu-se à inoculação de solo contendo a bactéria inefetiva e a estirpe de *R. phaseoli* 127-K17 (Nitragin Co, EUA) em cultura líquida pura, pelo método de diluição e infecção em plantas (6). Os inóculos foram obtidos a partir de 1 g de solo contendo a estirpe inefetiva e suspenso em 9 ml de solução esterilizada de sais (diluição 10^1). Um ml de cada suspensão de solo diluída a 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , e 10^5 foi colocado nos diversos tubos de cada lote, com duas repetições para cada diluição.

Após 33 dias, os nódulos de cada estirpe foram coletados. As plantas inoculadas com o solo mostravam aspecto típico de deficiência de nitrogênio, enquanto os controles, inoculados com *R. phaseoli* 127-K17 estavam normais. Os materiais selecionados apresentavam diferenças na nodulação: os nódulos efetivos eram arredondados, ricos em leghemoglobina e bem distribuídos ao longo das raízes secundárias. Os nódulos formados pelo *Rhizobium* inefetivo eram esbranquiçados, mal formados, de tamanhos variados, com parede externa enrugada e distribuídos irregularmente pelas raízes.

Determinou-se a atividade da nitrogenase dos nódulos das duas bactérias, utilizando-se a técnica de redução do acetileno e medindo-se o etileno formado através de cromatógrafo de gás Beckman, modelo GC-65, usando coluna Porapak N a 105°C e detector de ionização de chama de H_2 . Posteriormente, alguns nódulos foram separados e preparados para microscopia eletrônica. De maneira geral, esta preparação foi feita cortando-se os nódulos e submetendo a parte central dos mesmos à fixação com glutaraldeído a 6,5% em tampão de cacodilato a 0,125 M e pH 7,0 durante 2 horas, lavagens em tampão, fixação com ácido ósmico 2% e pre coloração com acetato de uranila a 2% em solução de acetona-água a 75% durante 16 horas. Seguiram-se desidratações em acetona-água a 90 e 100%. As inclusões foram feitas em Epon e Spurr. Os blocos de Blum e colocados nas grades para exames e obtenção de eletrofotomicrografias ao microscópio eletrônico Siemens, Elmiskop IA. Através das fotomicrografias determinaram-se as dimensões das duas estirpes, e o número de bactérias dentro do envelope.

Resultados e discussões

Os exames ao microscópio eletrônico e das fotomicrografias obtidas revelaram marcantes diferenças entre as duas estirpes, que podem ser resumidas nos seguintes itens:

a) a estirpe inefetiva, cuja atividade da nitrogenase foi nula, não exibe no seu interior grande número de glóbulos eletrolucos caracterizados como ácido polibeta-hidroxi-búterico. Nas mesmas condições experimentais, observam-se inúmeros grânulos eletrolucos nos bacteroides da estirpe 127-K17, eficientes

quanto à fixação de N_2 (160 μ mol C_2H_4/g nod. h).

Nas bactérias inefetivas pode-se observar grânulos intracelulares eletrodensos, dividindo-se, às vezes, filamentos escuros

b) o número de bactérias inefetivas dentro de cada envelope é bem menor, em geral ao redor de 1 a 2, enquanto na estirpe 127-K17 observam-se de 4 a 8

c) no interior das bactérias inefetivas com cerca de 33 dias observaram-se comumente grandes áreas claras, aparentemente vazias.

d) outro aspecto de interesse é que a estirpe inefetiva foi encontrada bem mais frequentemente nos espaços intercelulares

Tabela 1 — Comparações pelo teste "t" dos valores de comprimento e largura do *Rhizobium* efetivo (127-K17) e inefetivo, presentes em nódulos de raiz de feijoeiro Venezuela-350*.

Rhizobium efetivo		Rhizobium inefetivo	
Comprimento μm	largura μm	Comprimento μm	largura μm
3,78	0,60	1,97	0,50
3,78	0,68	1,47	0,46
3,26	0,69	1,69	0,69
2,75	0,77	2,70	0,80
2,50	0,86	1,69	0,69
2,50	0,60	2,47	0,69
3,52	0,69	2,02	0,55
2,83	0,71	1,92	0,78
2,92	0,86	1,74	0,87
2,49	0,60	2,22	0,69
2,40	0,57	2,75	0,62
2,86	0,74	2,35	0,57
3,24	0,76	3,44	0,63
3,05	0,60	2,29	0,57
3,21	0,57	2,29	0,64

$x_1=3,01$

$y_1=0,69$

$x_2=2,20$

$y_2=0,65$

*O valor do teste "t" para os comprimentos é 4,47, mostrando haver diferença significativa entre os comprimentos das duas bactérias a nível de 0,1% de probabilidade. Com respeito à comparação das larguras entre as mesmas o teste "t" não revela diferenças significativas

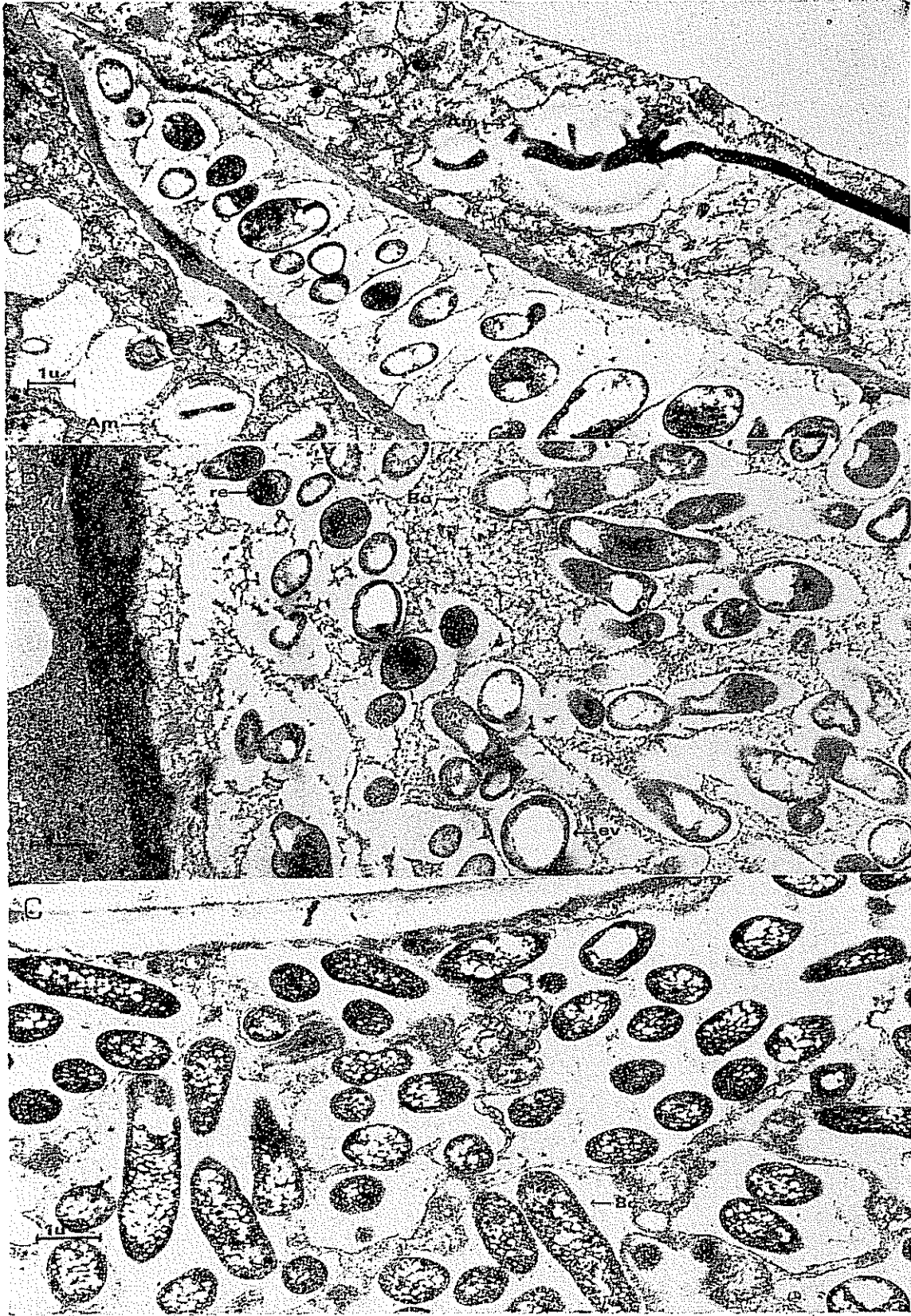


Fig. 1—Electrofotomicrografias de cortes de nódulos de feijoeiro produzidos por *Rhizobium* inefetivo e efetivo com respeito a fixação de N_2 : A-Bacteroides (Bc) inefetivos entre células egras de amido (Am). B- Bacteroides inefetivos como regiões escuras (re), espaços vazios (cv). C-Bacteroides da estirpe 127-K-17 efetivos, mostrando grânulos de ácido poli-beta hidroxibutírico.

e) cortes ultrafinos dos nódulos formados pela estirpe inefetiva após 33 dias da inoculação mostram ainda a presença de grãos de amido, fato esse não observado na estirpe efetiva 127-K17.

f) comparações do comprimento e largura entre os dois *Rhizobium* encontrados nos nódulos de feijoeiro cultivar 'Venezuela-350', revelam diferenças significativas ao nível de 0,1% de probabilidade, com relação ao comprimento das mesmas (Tabela 1).

Pelo exposto, pode-se dizer que a relação do *Rhizobium* inefetivo com o tecido nodular tinha características de parasitismo, conforme indicações das medidas da atividade de nitrogenase pelo método do acetileno, fato esse que parece refletido também na coloração amarela das folhas de plantas inoculadas e cultivadas em meio sem nitrogênio.

A ocorrência de granulações escuras no interior das bactérias inefetivas, em contraposição com os grânulos brancos dos bacterioides efetivos, deve representar diferenças nos processos metabólicos entre os dois. Se os glóbulos brancos encontrados no interior da estirpe 127-K17 resultam de um acúmulo de ácido beta-hidroxibutírico correlacionado com a atividade da nitrogenase, então, a ausência ou baixo nível dos mesmos seria de se esperar de uma bactéria cuja nitrogenase apresenta atividade baixa ou nula.

A observação de grãos de amido no tecido nodular após 33 dias, em contraposição com os tecidos com bacterioides efetivos, já era conhecido e, Ishizawa e Toyoda (8) mencionam o mesmo fato estudando nódulos de leguminosas com estirpes inefetivas do Japão.

O fato de se encontrar maior número de bactérias inefetivas entre as paredes celulares contiguas leva a crer que as mesmas devem possuir uma maior atividade pectolítica do que as bactérias efetivas.

Em resumo, a julgar pelas observações ao microscópio eletrônico (Fig. 1) as bactérias inefetivas apresentam alguns aspectos citológicos diferentes das efetivas. Além disso, a presença de amido, a facilidade de separar as paredes celulares, a ausência da atividade da nitrogenase (redução de C_2H_2) podem indicar diferenças fisiológicas que as distanciam consideravelmente dos padrões da estirpe efetiva 127-K17, que serviu de controle no presente experimento.

Resumo

Uma estirpe de *Rhizobium* inefetiva em nódulos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) foi isolada em solo do norte do Paraná, onde se pratica rotação de cultura entre feijoeiro e trigo.

Tratando-se do primeiro isolado de estirpe inefetiva com respeito à fixação de N_2 em nossas culturas, tornou-se interessante examinar a morfologia e estrutura do *Rhizobium* e do tecido hospedeiro ao microscópio eletrônico, bem como compará-las com as de um *Rhizobium* eficiente em nódulos do mesmo cultivar de feijoeiro.

A bactéria inefetiva apesar de nodular bem a planta, não apresentou atividade da nitrogenase (redução

de C_2H_2) nos nódulos. Além disso, as bactérias nos nódulos inefetivos eram menores, em número mais reduzido (1-2) por envelope continham menor quantidade de ácido poli-beta-hidroxibutírico, em suas células e localizavam-se mais frequentemente entre espaços intercelulares. Foi observada a presença de grãos de amido em células de nódulos inefetivos.

Literatura citada

1. BERGERSEN, F. J. The structure of ineffective root nodules of legumes: an unusual new type of ineffectiveness, and an appraisal of present knowledge, Australian Journal of Biological Sciences 10 (3): 233-242. 1957.
2. BROCKWELL, J. Non-infective nodule bacteria in pea cultures. Journal of the Australian Institute of Agricultural Science 20: 243-246. 1954.
3. BURNS, R. C. e HARDY, R.W.S. Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. New York; Springer-Verlag, 1975 189 p.
4. BURTON, J.C., ALLEN, O.N. e BERGER, K. C. Response of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to inoculation with mixtures of effective and ineffective rhizobia. Soil Science Society of America Proceeding 18: 156-159. 1954.
5. DART, P. J. e MERCER, F.V. Fine structure of bacterioids in root nodules of *Vigna sinensis*, *Acacia longifolia*, *Virminaria juncea* and *Lupinus angustifolius* Journal of Bacteriology 91(3): 1314-1319. 1966.
6. DATE, R. A. e VINCENT, J.M. Determination of the number of root-nodule bacteria in the presence of other organisms. Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry 2:5-7. 1962.
7. GOODCHILD, D. J. e BERGERSEN, F.J. Electron microscopy of the infection and subsequent development of soy-bean nodule cells. Journal of Bacteriology 92(1): 204-213. 1966.
8. ISHIZAWA, S. e TOYODA, H. Comparative study on effective and ineffective nodules of leguminous plants. Soils and Plant Food 1: 47-48. 1955.
9. MCKNIGHT, T. Efficiency of isolates of *Rhizobium* in the cowpeas group with proposed additions to this group. Queensland Agricultural Journal 6: 61-76. 1949.
10. MOSSE, B. Electron-microscope studies of nodule development in some clover species. Journal of General Microbiology 36: 49-66. 1964.
11. NUTMAN, P.S. Variation within strains of clover nodule bacteria in the size of the nodule produced and in the "effectivity" of the symbiosis. Journal of Bacteriology 51: 411-432. 1946.
12. PANKHURST, C. E.; SCHWINGHAMER, E.A. e BERGERSEN, F.J. The structures and acetylene-reducing activity of root nodules formed by a riboflavin-requiring mutant of *Rhizobium trifolii*. Journal of General Microbiology 70: 161-177. 1972.
13. SAITO, S.M.T. e RUSCHEL, A.P. Use of a modified Gibson's tube method for assessment of nodulation in beans. Bean Improvement Cooperative 21: 10-12. 1978.
14. VINCENT, J.M. The control of the quality of legume seed. Journal of the Australian Institute of Agricultural Science 20:247-249. 1954.