

# Produção de AIA e Diversidade Fenotípica de Estirpes Elite de Rizóbio Isoladas de Feijoeiro

## IAA Production and Phenotypic Diversity of Rhizobial Elite Strains Isolated from Common Bean

Giuliana Castello Coatti<sup>a\*</sup>; Diva de Souza Andrade<sup>b</sup>; Juscélio Donizete Cardoso<sup>c</sup>; Maria Aparecida de Matos<sup>d</sup>

### Resumo

Neste trabalho o objetivo foi avaliar a diversidade fenotípica de estirpes de rizóbios isoladas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). Foram avaliadas 31 estirpes provenientes da Coleção de Microrganismos Fixadores de Nitrogênio do Laboratório de Microbiologia de Solos do IAPAR. Essas estirpes foram pré-selecionadas para eficiência em simbiose com feijoeiro. A concentração de AIA foi determinada em meio Tris extrato de levedura manitol triptofano e quantificada (Tris-YMRT) pelo método colorimétrico. Todas as estirpes produziram AIA e a quantidade variou de 23 a 300 µM. As características morfológicas de colônias predominantes foram: tamanho maior que 2 mm, forma circular, textura não viscosa, absorção de corantes do meio de cultura, produção de goma, colônias elevadas, com bordas e estruturas lisas e opacas. A maioria das estirpes acidificou o meio de cultura e não produziu melanina. Esse grupo de estirpes “elite” apresentou alta diversidade fenotípica.

**Palavras-chave:** Características morfofisiológicas. *Phaseolus vulgaris*. *Rhizobium*.

### Abstract

In this work, the objective was to assess the phenotypic diversity of rhizobia isolated from common bean (*Phaseolus vulgaris*). It was evaluated a group of thirty-one strains belonging to Collection of Microorganisms Nitrogen fixers of the Laboratory of Microbiology of Soils IAPAR. These strains were pre selected for efficiency in symbiosis with common bean. The IAA concentration was determined using Tris yeast extract mannitol tryptophan (Tris-YMRT) and quantified by colorimetric method. All strains produced IAA and the amount ranged from 23 to 300 mM. The predominant characteristics were: size greater than 2 mm, circular, non-sticky texture, absorption dye in the culture medium, production of gummy, high colonies, with smooth edges and opaque. Most of the strains acidified the culture media and did not produce melanin. Although this group of strains tested has been pre selected for efficiency, it was observed high phenotypic diversity.

**Key words:** Morpho-physiological. *Phaseolus vulgaris*. *Rhizobium*.

<sup>a</sup> Graduanda em Ciências Biológicas - Universidade Estadual de Londrina (UEL). E-mail: giulianacastello\_bio@yahoo.com.br.

<sup>b</sup> Doutora em Ciências Biológicas - London University Wye College. Pesquisadora do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), E-mail: diva@iapar.br.

<sup>c</sup> Doutorando em Microbiologia - Universidade Estadual de Londrina (UEL). E-mail: juscelio.cardoso@yahoo.com.br

<sup>d</sup> Mestre em Recursos Naturais - Universidade Estadual de Londrina (UEL). Assistente de pesquisa no laboratório de microbiologia do solo - IAPAR. E-mail: mariamatos@iapar.br.

\* Endereço para correspondência: Rodovia Celso Garcia Cid, km 375. CEP 86047-902. Cx. Postal 481. Londrina – PR.

### 1 Introdução

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L) é a espécie mais cultivada entre as demais do gênero *Phaseolus*<sup>1</sup>. O Brasil tradicionalmente cultiva o feijoeiro e está entre os maiores produtores e consumidores dessa leguminosa, com uma área plantada de cerca de 4,2 milhões de hectares. Entretanto, a produtividade dessa cultura é baixa devido a uma série de fatores, especialmente, a deficiência do nitrogênio nos solos.

Bactérias conhecidas coletivamente como rizóbios são capazes de estabelecer simbiose com leguminosas e realizarem o processo da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) que pode contribuir para a redução no uso de fertilizantes nitrogenados. Antes do estabelecimento da simbiose, o rizóbio é quimiotaticamente atraído para a rizosfera por compostos (aminoácidos, compostos

indólicos ou açúcares) exsudados pela planta<sup>2,3</sup>. A partir daí, ocorre a interação química específica entre o rizóbio e a planta hospedeira, mediada pela produção de flavonóides (flavonas, flavanonas e isoflavonas) pelas raízes<sup>3</sup>. A principal auxina, o ácido indolacético (AIA), atua principalmente na formação de raízes laterais e de pêlos radiculares, que aumentam a absorção de nutrientes pela planta<sup>4</sup>. A produção de hormônios, principalmente o ácido indolacético e a fixação biológica de nitrogênio por bactérias diazotróficas desempenham papel essencial na promoção do crescimento de plantas leguminosas e não-leguminosas<sup>5,6,7</sup>.

No processo de seleção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio, a caracterização fenotípica é uma etapa essencial e envolve diversas avaliações morfológicas e fisiológicas. Essas variáveis podem ser utilizadas para caracterizar fenotipicamente bactérias. A caracterização fenotípica de rizóbios baseia-se em métodos de coloração, produção de pigmentos, morfologia colonial, acidificação de meios específicos de cultura. Entretanto, outras características fisiológicas são importantes, por exemplo, a produção de compostos indólicos, como o ácido indolacético. Sendo assim, nesse trabalho o objetivo foi determinar concentrações do (AIA) produzidos por rizóbios e utilizar essa característica para juntamente com outras morfológicas e fisiológicas para verificar dissimilaridade entre estirpes isoladas da mesma planta hospedeira (feijoeiro).

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Origem das bactérias

Neste estudo foram utilizadas 31 estirpes elites de rizóbio armazenadas na Coleção de Microrganismos Fixadores de Nitrogênio do Laboratório de Microbiologia de Solos do IAPAR (tabela 1). Na coleção de microrganismos IPR-IAPAR, as bactérias estavam preservadas por criopreservação (glicerol 65%, mantidos a -80°C) e por liofilização (mantidas à temperatura ambiente).

Tabela 1: Local de origem das 32 estirpes de rizóbio utilizadas neste estudo.

Local	Identificação estirpes
Wenceslau Brás PR	IPR Pv-348; -446; -453; -497; -506; -515; -517; -524
Londrina, PR	-591; -611; -615; -889; -2604; -2608
Prado Ferreira, PR	-195; -1045; -367
Palmital, PR	-680
Pitanga, PR	-1249; -1326; -1362
Rio Branco do Sul, PR	-1252
São Paulo, SP	-583; -2234; -2248;
Serrinha, MG	-580; -589; -593; -652; -689; -692
Distrito Federal	*SEMIA4088 (H12)

\*Seção de Microbiologia Agrícola da Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul.

As estirpes elite IPRPv- e a estirpe SEMIA4088=H12 foram recuperadas em condições assépticas, a partir de culturas liofilizadas, pela quebra da ampola seguida da adição de 100 µL de meio líquido de extrato-de-levedura e manitol (ELM) sobre as culturas. Durante período de 20 minutos, as bactérias eram assim mantidas para que ocorresse a reidratação das células. Posteriormente, transferiu-se a suspensão das bactérias para placas de Petri contendo meio de cultura, extrato-de-levedura, manitol e ágar<sup>8</sup> (ELMA), repicadas para tubos com o mesmo meio e mantidas em temperatura de 4 a 6 °C.

Como controle comparativo nos testes morfofisiológicos, foram utilizados meios sem inoculação e inoculados com a estirpe de *Rhizobium tropici* SEMIA 4088=H12 (Seção de Microbiologia Agrícola da Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul) obtida na FEPAGRO.

### 2.2 Produção de AIA

Na avaliação da produção de ácido indolacético (AIA), as estirpes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 5 ml de meio de cultura TY (triptona; extrato de levedura; cloreto de cálcio). Os tubos foram mantidos em incubadora por 2 dias a 28 °C e 120 rpm. Após esse período, foi realizada a leitura da densidade óptica (D.O.) em espectrofotômetro a 625nm. Após padronizar a D.O. para retirar e lavar as células, transferindo-se 1,5 ml de cada suspensão bacteriana para eppendorfs e centrifugados a 12000 rpm por 1 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi suspenso em 1 ml de solução salina e esse processo foi repetido.

As células bacterianas foram re-suspendidas em 1 ml de meio Tris-YMRT (Manitol; Cloreto de Cálcio; Sulfato de Magnésio; Tris Hidroximetil Aminometano; Extrato de Levedura e Ácido casamino). A suspensão foi transferida para tubos de ensaio contendo 10 ml de meio Tris-YMRT, suplementado com triptofano<sup>12</sup> e incubadas por 4 dias a 28 °C, 120 rpm e no escuro, para evitar a oxidação do AIA. O AIA foi quantificado colorimetricamente, segundo o método de Gordon e Weber (1951)<sup>13</sup>, modificado por Minamisawa *et al* (1992)<sup>14</sup>, com a adição de duas partes de FeCl<sub>3</sub> 0,01M em 35% de HClO<sub>4</sub> em tubo de ensaio e adição de 1ml da suspensão de bactérias crescidas em meio Tris-YMRT. Os tubos foram mantidos no escuro por 25 min e a leitura da densidade óptica (D.O) foi realizada a 530nm. Os valores obtidos foram comparados com os obtidos a partir da curva de calibração do ácido indolacético que foi preparada a partir de uma solução de 5000 µM de AIA.

### 2.3 Características de colônias

As colônias das estirpes de rizóbios foram caracterizadas quanto ao tamanho (maior ou menor que 2 mm), forma (circular ou não circular), elevação (convexa ou plana), bordos (lisos ou ondulados), estrutura (lisa ou granulosa), brilho (transparente ou opaca), textura (viscosa ou não viscosa), absorção de corante (absorve ou não corante) e produção de goma (produz ou não goma) através de crescimento em placas contendo meio de cultura sólido, seguindo as metodologias descritas em Vincent (1970)<sup>8</sup> e Araújo (1994)<sup>9</sup>.

### 2.4 Produção de melanina

A produção de melanina pelas estirpes de rizóbio foi avaliada em meio de cultura TYA (triptona; extrato de levedura; cloreto de cálcio; Agar e suplementado com L-tirosina e sulfato de cobre). O pH foi ajustado para 6,8. As bactérias foram inoculadas e após crescimento por 7 dias à 28 °C no escuro, a produção de melanina foi avaliada com a adição de SDS 10% (p/v) sobre as colônias, cuja função é romper a parede celular. Decorridas 6 h em 25 °C verificou-se a alteração de coloração das colônias. As colônias que não apresentaram pigmentação não são produtoras de melanina já aquelas que apresentaram coloração marrom ou preta são produtoras de melanina<sup>10,11</sup>.

### 2.5 Produção de ácido

As estirpes foram repicadas para meio de cultura ELMA contendo azul de bromotimol (0,25%) e incubadas em temperatura de 28 °C por 7 dias. A cor azul do meio representa produção alcalina, amarela (ácido) e verde (sem alteração).

### 2.6 Análise dos dados

Para cada característica morfofisiológica das 31 estirpes elite de rizóbio (IPRPv- (Coleção IAPAR) e da estirpe referência e tipo (H12) foi atribuído valor 1 (presente) ou 0 (ausente) e com base nesses dados foi construída uma matriz binária. A análise de agrupamento de similaridade e as diferenças foram estimadas pela distância euclidiana com a opção UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean).

Os resultados foram representados graficamente através de um dendrograma construído a partir do programa NTSYS-pc (Numerical Taxonomic and Multivariate Analysis System, versão 2.1, Exeter Software, USA).

### 3 Resultados

Todas as 31 estirpes IPR-Pv e a estirpe padrão tipo de *Rhizobium tropici* (SEMIA 4088=H12) produziram AIA em meio de cultura. A concentração de AIA variou entre os isolados de 20 µM a 301 µM (gráfico 1). A menor produção de AIA foi da estirpe IPR-Pv 2248 isolada de São Paulo. Já a maior produção de AIA foi pelo grupo formado com as estirpes IPR-Pv 2234 e 2208 isoladas de São Paulo e Londrina-PR, respectivamente. Com a produção média de 183 µM de AIA, 11 estirpes elites IPR-Pv e a estirpe de *Rhizobium tropici* (SEMIA 4088=H12) formaram o maior grupo.

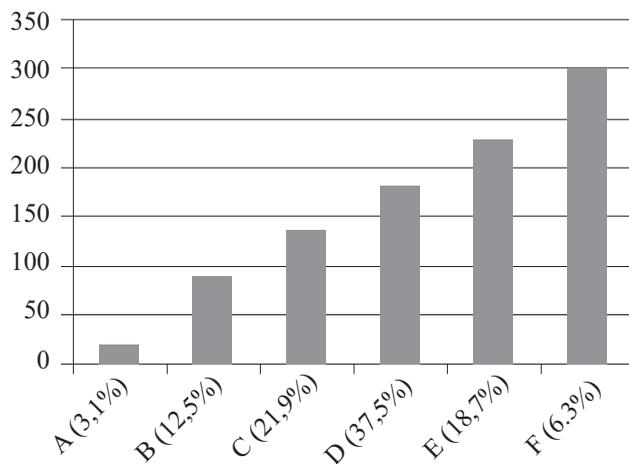


Gráfico 1: Distribuição percentual de estirpes IPR Pv- de rizóbio de acordo com a produção média de AIA de cada grupo

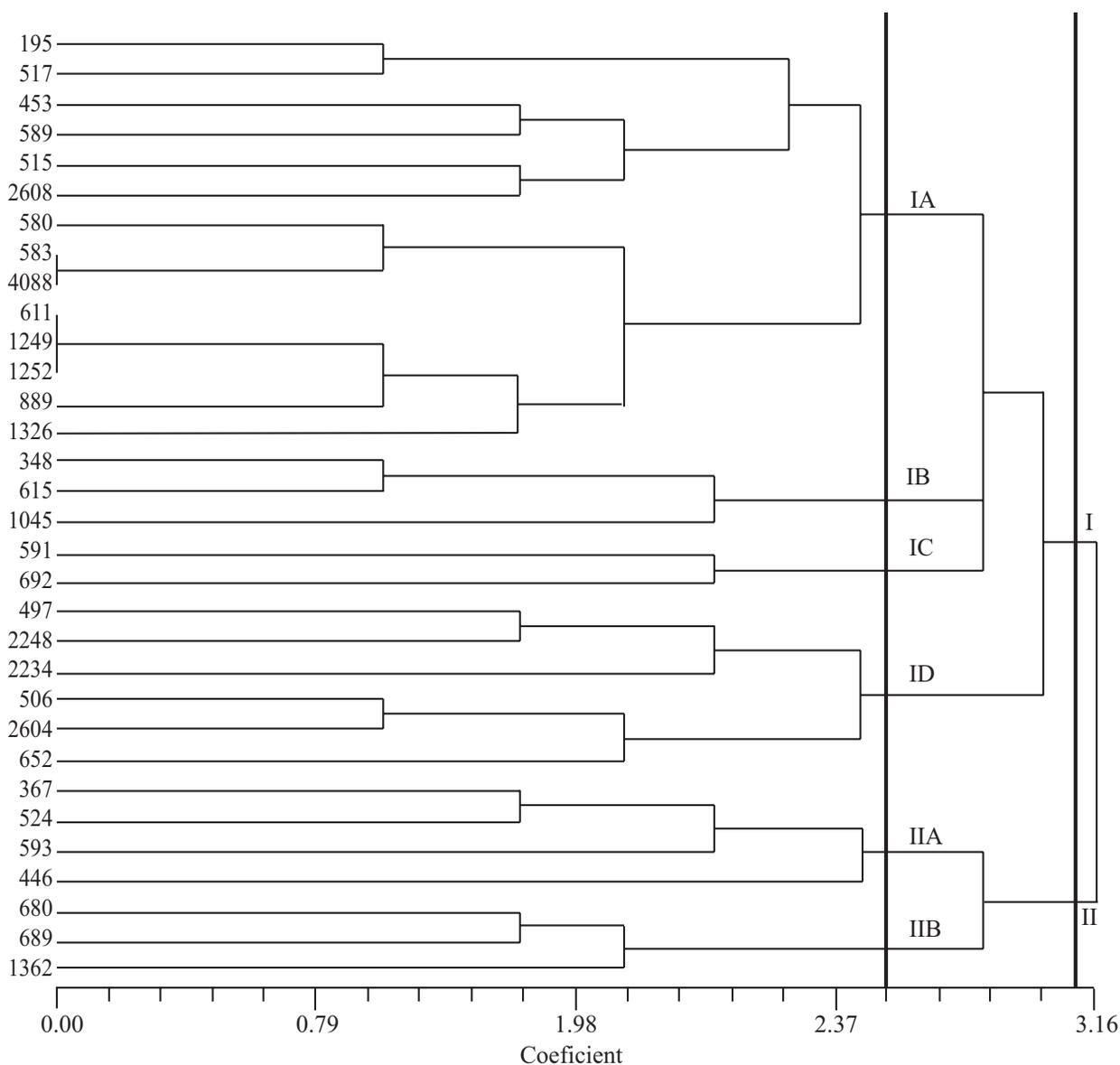


Gráfico 2: Agrupamento das estirpes IPR Pv- de rizóbio-Phaseolus analisadas com base na distância Euclidiana em função das características morfofisiológicas avaliadas

A caracterização morfológica das estirpes avaliadas em maio ELMA, mostrou que, 84,4% possuem tamanho da colônia maior do que 2 mm; 90,6% forma circular da colônia; 81,2% textura não viscosa; 81,2% absorvem corante; 75% produzem goma, 71,9% possuem elevação na colônia (convexa); 90,6% possuem colônias com bordos lisos, 71,9% com a superfície lisa, 53,1% são opacas. Na avaliação fisiológica, onde as bactérias foram crescidas em meio TYA suplementado observou-se que 71,9% não produziram melanina e 95% acidifica o meio de cultura com manitol como fonte de carbono.

Os dados obtidos das características morfológicas e fisiológicas foram agrupados e os resultados foram representados graficamente através de um dendrograma. Houve a distribuição das estirpes em dois grandes grupos: o grupo I, que contém 77% das estirpes e o grupo II com 23% (gráfico 2).

Utilizando um corte no coeficiente 10, as estirpes do grupo I foram distribuídas em 7 subgrupos (IA, IB, IC, ID, IE, IF e IG). No subgrupo IA, foram posicionadas apenas 2 estirpes isoladas do Paraná. O grupo IB engloba estirpes de Minas Gerais e do Paraná. O subgrupo IC foi formado por 23% das estirpes desse estudo. Dentro deste subgrupo, dois distintos agrupamentos foram formados com 100% de similaridade. O primeiro destes agrupamentos incluiu a estirpe IPR-Pv 583, isolada de sementes comercializadas no estado de São Paulo e a estirpe de *Rhizobium tropici* (SEMIA4088=H12) utilizada neste trabalho como referência. O segundo agrupamento com 100% de similaridade inclui as estirpes IPR-Pv 611, 1249 e 1252 isoladas de Londrina, Pitanga e Rio Branco do Sul, respectivamente. O subgrupo ID contém estirpes isoladas do Paraná, no subgrupo IE contém estirpes do Paraná e também de São Paulo. Os subgrupos IF e IG foram formados por três estirpes cada sendo originárias de São Paulo, Paraná e Minas Gerais. O grupo II também apresentou alta diversidade, no entanto, agrupou uma menor quantidade de estirpes (23%). Nos subgrupos IIA e IIC, as estirpes foram isoladas do Paraná e de Minas Gerais. Apenas a estirpe IPR-Pv446, isolada do município de Wenceslau Brás, Paraná, formou o subgrupo IIB.

#### 4 Discussão

Neste estudo, as estirpes de rizóbio produziram valores médios de AIA similares aos observados por vários autores com microrganismos fixadores de N<sub>2</sub> do gênero *Azospirillum*. Em estudo<sup>18</sup>, trabalhando com *A. lipoferum* isolados de plantas cactáceas no México, observaram as quantidades de ácido 3-indol acético (AIA) variando de 28,5 a 97,0μM<sup>19</sup>, também trabalhando com isolados de *A. lipoferum*, de raízes de milho, obtiveram valores variando de 0,0 a 85,9μM de AIA. Por outro lado, avaliando a produção de AIA por isolados de *A. brasilense*, os valores apresentados por estes mesmos autores foram maiores, variando de 8,0 a 148,9μM<sup>19</sup> e de 205 a 428μM<sup>18</sup>. Isolados de *Azospirillum amazonense* em

meio de cultura, produziram uma quantidade de AIA entre 35 e 110μM<sup>20</sup>.

Os resultados obtidos neste trabalho também são similares aos obtidos por Andrade *et al.* (2007)<sup>21</sup> com estirpes de Frankia (microrganismo capaz de fixar N<sub>2</sub> quando em simbiose com espécies arbóreas), isoladas de nódulos de casuarina, que obtiveram uma produção de AIA variando da 5,9 a 98,8μM em meio de cultura contendo L-triptofano.

Essas estirpes foram previamente selecionadas de uma população de aproximadamente 1.500 isolados, com base em variáveis e eficácia simbiótica (N total, massa seca da parte aérea e nodulação) quando inoculadas em feijoeiro em solução nutritiva (dados não mostrados). Essas mesmas estirpes elites selecionadas foram caracterizadas geneticamente<sup>15</sup>.

Por muitas décadas, a caracterização de espécies de rizóbio foi baseada na habilidade específica da bactéria em nodular a planta hospedeira. Apesar de hoje possuir várias técnicas refinadas baseadas na biologia molecular. A classificação morfofisiológica ainda é uma técnica importantíssima na classificação de microrganismos<sup>16,17</sup>.

A detecção da produção de melanina por estirpes de rizóbio foi previamente descrita por autores<sup>11,10</sup>. Estudo trabalhou com esta característica, utilizando-a para analisar o agrupamento de estirpes de rizóbio simbiotes de feijoeiro<sup>10</sup>.

Segundo estudos<sup>22,23</sup> a análise taxonômica numérica com base em testes morfo-fisiológicos tem sido uma ferramenta importante para caracterizar e agrupar estirpes de rizóbio.

#### 5 Conclusão

Todas as estirpes de rizóbio avaliadas produziram AIA que variou de 20 a 301μM e algumas se mostraram melhores produtoras em relação à estirpe padrão SEMIA4088. Através da análise morfofisiológica verifica-se que essas 31 IPR-Pv, embora pré selecionadas para eficácia simbiótica com feijoeiro, apresentam alta diversidade sem relação com o histórico de origem.

#### Referências

- Costa JGC, Vieira NRA. Qualidade, classificação comercial e manejo pós-colheita. Cultura do feijoeiro no Brasil: características e produção. Londrina: IAPAR; 2000.
- Aguilar JMM, Ashby AM, Richards AJM, Loake GJ, Watson MD, Shaw CH Chemotaxis of *R. leguminosarum* bv. Phaseoli towards flavonoids inducers of the symbiotic nodulation genes. *Journal of General Microbiology*. 1988;34:2741-6.
- Kape R, Parniske M, Werner D. Chemotaxis and *nod* gene activity of *Bradyrhizobium japonicum* in response to hydroxycinnamic acids and isoflavonoids. *Applied Environmental Microbiology*. 1991;57: 316-9.
- Biswas J, Ladha JK, Dazzo FB, Yanni YG, Rolf BG. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. *Agronomy Journal*, Madison. 2000;92(5):880-6.
- Biswas JC, Ladha JK, Dazzo FB. Rhizobia inoculation

- improves nutrient uptake and growth of lowland rice. *Soil Science Society American Journal*. 2000; 64:1644-50.
6. Thakuria D, Talukdar NC, Goswami C, Hazarika S, Boro RC, Khan MR. Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. *Current Science*. 2004;86:978-85.
  7. Chagas Junior AF, Oliveira LA, Oliveira AN. Produção de ácido indolacético por rizóbios isolados de caupi. *Ver. Ceres, Viçosa*. 2009;56:812-7.
  8. Vincent, JM *A manual for the practical study of root-nodule bacteria*. Oxford: Blackwell; 1970.
  9. Araújo RS. Fixação biológica do nitrogênio em feijão In: Araújo RS, Hungria M. *Microrganismos de importância agrícola*. Brasília: Embrapa; 1994.
  10. Andrade DS, Murphy PJ, Giller KE. The Diversity of phaseolus-nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with phaseolus vulgaris L. in Brazil. *Applied and Environmental microbiology*. 2002;68(8):4025-34.
  11. Cubo T, Romero F, Vinardell J, Ruiz-Sainz JE. Expression of the rhizobium leguminosarum biovar phaseoli melA gene in other rhizobia does not require the presence of the nifA gene. *Australian Journal of the Plant Physiology*. 1997;24:195-203.
  12. Owens LD, Wright DA. Rhizobial-induced chlorosis in soybean: isolation, production in nodules and varietal specificity of the toxin. *Plant Physiol*. 1964;40:27.
  13. Gordon, SA, Weber PR. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology*. 1951;26:192-5.
  14. Minisawa K, Seki T, Onodera S, Kubota M, Asami T. Genetic relatedness of Bradyrhizobium japonicum field isolates as revealed by repeated sequences and various other characteristics. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992;58: 2832-9.
  15. Cardoso JD. Caracterização inter e intra-específica de 45 estirpes elite de rizóbios microssimbiontes do feijoeiro baseada em análise polifásica. Londrina: UEL; 2009.
  16. Jordan DC. Family III. Rhizobiaceae conn 1938. In: Krieg NR, Holt JG. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: London & Wilkins; 1984.
  17. Graham Ph, Sadowsky Mj, Keyser Hh, Barnet Ym, Bradley Rs, Cooper Je et al. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root and stem nodulating bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1991;41(4):582-7.
  18. Mascarua-Esparza MA, Villa-Gonzalez R, Caballero-Melado J. Acetylene reduction and indolacetic acid production by Azospirillum isolates from Cactaceous plants. *Plant and Soil, The Hague*. 1988;106:91-5.
  19. Crozier A, Arruda P, Jasmim JM, Monteiro AM, Sandberg G. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from Azospirillum lipoferum and Azospirillum brasilense. *Applied and Environmental Microbiology*. 1988; 54(11):2833-7.
  20. Reis Junior FB, Silva MF, Teixeira KRS, Urquiaga S, Reis VM. Identificação de isolados de Azospirillum amazonense associados a Brachiaria spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 2004; 28(1):103-13.
  21. Andrade DS, Ataíde LT, Souza JRP, Goes KCGP, Moritz P. Caracterização morfológica, fisiológica e infectividade em planta de estirpes de Frankia isoladas de nódulos de Casuarina. *Semina*. 2007;28:597-608.
  22. Grange L, Hungria M. genetic diversity of indigenous common bean (Phaseolus vulgaris) rhizobia in two Brazilian ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*. 2004;36:1389-98.
  23. Pinto FGS, Hungria M, Mercante FM. Poliphasic characterization of Brazilian Rhizobium tropici strains effective in fixing N<sub>2</sub> with common bean (Phaseolus vulgaris L.) *Soil Biology & Biochemistry*. 2007;39:1851-64.

