



Isolamento e caracterização fenotípica de rizóbios nativos simbiotes em *Desmodium incanum*⁽¹⁾.

Franquiele Bonilha da Silva⁽²⁾; Clarissa de Souza Borges⁽³⁾; Franciane Lemes dos Santos⁽³⁾; Victor Lucas Bassani⁽⁴⁾; Taís Backes⁽⁵⁾; Enilson Luiz Saccol de Sá⁽⁶⁾.

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos da Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES)

⁽²⁾ Estudante de mestrado do PPG em Microbiologia Agrícola e do Ambiente; Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Porto Alegre, RS; franquiele_bonilha@yahoo.com.br;

⁽³⁾ Estudante de doutorado do PPG em Ciência do Solo; Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

⁽⁴⁾ Estudante de mestrado do PPG em Microbiologia Agrícola e do Ambiente; Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

⁽⁵⁾ Estudante de mestrado do PPG em Ciência do Solo; Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

⁽⁶⁾ Professor/pesquisador; Departamento de Solos - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

RESUMO: *Desmodium incanum* é uma leguminosa forrageira, nativa do sul da América do Sul, capaz de realizar simbiose com rizobactérias. O objetivo desse trabalho é realizar a caracterização morfológica e fenotípica de rizóbios isolados de nódulos de *D. incanum*. Foram isoladas bactérias de nódulos de *D. incanum*, realizada a caracterização morfológica das colônias, avaliação da capacidade de nodular plantas da mesma espécie e caracterização fenotípica dos isolados bacterianos, onde foi avaliada a capacidade de solubilizar fosfato e produção de melanina. Foram obtidos 26 isolados bacterianos com colônias de características rizobianas dos nódulos de *D. incanum*, dos quais 25 apresentaram capacidade de nodular plantas da mesma espécie. Destes, 11 apresentaram capacidade de solubilizar fosfato em meio de cultura com diferentes fontes de fosfato de cálcio, sendo que o tempo variou entre os isolados. Nenhum isolado foi capaz de produzir melanina em meio de cultura.

Termos de indexação: Rizobactérias, fixação de nitrogênio

INTRODUÇÃO

O bioma pampa é caracterizado pela grande diversidade de espécies com potencial forrageiro. Porém, muitas espécies ainda são desconhecidas ou são pouco estudadas.

Uma delas é o *Desmodium incanum* (pega-pega), que é uma leguminosa nativa da região sul, de grande potencial forrageiro. Se adapta a situações de stress, crescendo em solos ácidos e de baixa fertilidade, assim como em solos pedregosos (Silva et al., 2001). Além disso, suas raízes são colonizadas por bactérias fixadoras de nitrogênio, os rizóbios. Essa colonização se dá de forma simbiótica, onde se formam nódulos radiculares. Durante essa simbiose, a bactéria fixa nitrogênio atmosférico, tornando-o disponível para a planta,

que por sua vez, disponibiliza fotoassimilados para a bactéria.

São poucos os estudos sobre rizóbios simbiotes em leguminosas nativas, logo, o objetivo desse trabalho é fazer uma caracterização morfológica e fenotípica de rizóbios isolados de nódulos de *D. incanum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados nódulos de plantas de *Desmodium incanum* coletadas em área de campo nativo da Estação Experimental Agrônômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA – UFRGS), localizada em Eldorado do Sul - RS.

Os nódulos foram desinfestados por imersão em álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio (2,0%) por 60 segundos e sete lavagens sucessivas em água destilada esterilizada. Cada nódulo foi macerado com pinça esterilizada, em placa de Petri contendo meio levedura-manitol (Vincent, 1970) com vermelho congo (LMV). Em seguida o macerado foi distribuído sobre placa utilizando-se a técnica de esgotamento por estriamento. As placas foram incubadas a 28°C e acompanhadas diariamente. Colônias homogêneas e com características morfológicas de rizóbio foram isoladas e inoculadas em placas com meio LMV sucessivamente até que se obtivessem colônias puras e isoladas. As colônias dos isolados bacterianos foram caracterizadas quanto à morfologia colonial, sendo avaliados o formato, bordos, elevação, textura e densidade ótica, com auxílio de lupa estereoscópica.

Para se avaliar a capacidade de nodular plantas de *Desmodium incanum*, em casa de vegetação foi instalado um experimento em copos descartáveis de 300 mL com substrato areia e vermiculita (1:2) esterilizado, onde foram colocadas sementes pré-germinadas de *Desmodium incanum*. Após, foi feita a aplicação de 1 mL de inóculo dos isolados que foram suspensos em solução salina (0,85%)



esterilizada por copo. As plantas receberam 5 mL de solução nutritiva (Sarruge, 1975) 25% isenta de nitrogênio a cada dois dias. Cada isolado bacteriano foi inoculado em quatro repetições. Após 45 dias, as plantas foram colhidas e avaliadas visualmente, onde se observou a formação de nódulos radiculares e a coloração avermelhada do nódulo e verde intensa das folhas da planta. Os isolados que não foram capazes de realizar simbiose com o hospedeiro foram descartados.

A capacidade de solubilização de fosfato foi avaliada em placas de petri contendo o meio com 10 g/L glicose, 5 g/L de NH_4Cl , 1 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 g/L de Agar (Verma et al., 2001). Foram testadas duas fontes de fosfato, o fosfato de cálcio bibásico dihidratado (4 g/L de $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Santos et al., 2012) e fosfato tricálcico [1 g/L de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$], em pH 6,8. Para a inoculação das placas, todos os isolados foram crescidos em frascos contendo 15 mL de meio levedura manitol e mantidos sob agitação constante a 120 rpm, a 28°C durante 72 horas. A inoculação nas placas foi realizada com gotas de 20 μL , com três repetições por isolado. As placas foram mantidas em incubador a 28°C por sete dias. Após o período de incubação, observou-se a formação de um halo transparente em torno da colônia, indicando a capacidade de solubilização do fosfato. Após, foram medidos os diâmetros dos halos e das colônias de crescimento para a obtenção do índice de solubilização de fosfato (ISF) que é a razão do diâmetro do halo pelo diâmetro da colônia. Para controle positivo, foi utilizado o isolado UFRGS-VP16, já testado como solubilizador de fosfato, e como controle negativo o isolado UFRGS-VP5 que não apresenta a capacidade de solubilizar fosfato, ambos da coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (Alves, 2005).

A capacidade de produção de melanina foi avaliada conforme metodologia de Cubo et al. (1988). Todos os isolados foram inoculados em frascos contendo 15 mL meio tripton-levedura (TY) (Somasegaran & Hoben, 1994) e mantidos sob agitação constante a 120 rpm, a 28°C durante 48 horas. Foi realizada a inoculação das culturas em placas de petri contendo o meio TY sólido, suplementado com L-tirosina (600 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e sulfato de cobre (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$), utilizando-se alíquotas de 20 μL do caldo e, após, as placas foram incubadas durante sete dias a 28°C. Após esse período, as colônias foram tratadas com 50 μL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% (peso/volume) em tampão TBE (tris, boro e EDTA) para facilitar a detecção da produção de melanina (pigmento de cor escura). Como controle positivo foi utilizado o isolado

UFRGS-LG111, conhecida como produtora de melanina (Fontoura, 2007) e controle negativo o isolado UFRGS-Lu14 (Martins, 2010), ambos da coleção de cultura do laboratório de Microbiologia do Solo da UFRGS. Para esse ensaio foram realizadas duas repetições por isolado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 26 isolados dos nódulos radiculares de *D. incanum*, que passaram por caracterização morfológica como descrito na **tabela 1**. Além disso, todas as colônias apresentaram um lento crescimento, de aproximadamente sete dias, característica conferida ao gênero *Bradyrhizobium* (Gu et al., 2007; Granada, 2010).

Na autenticação, dos 26 isolados testados, 25 tiveram capacidade de nodular e fixar nitrogênio em *D. incanum*, exceto o isolado Dinc3-8 e o tratamento testemunha sem inoculação (**tabela 1**).

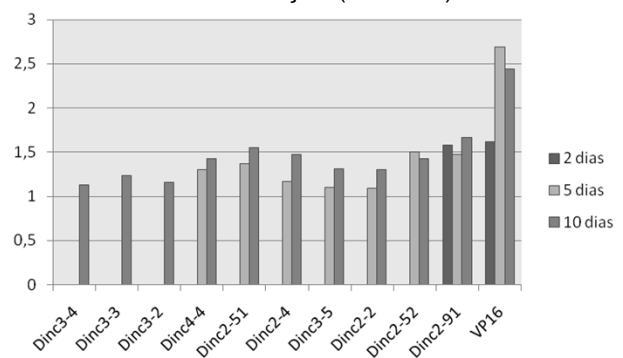


Figura 1 - Índice de solubilização de fosfato (ISF) dos isolados em relação ao tempo, usando $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ como fonte de fosfato

Quando a capacidade de solubilizar fosfato, apenas 10 tiveram capacidade de solubilizar $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Dinc2-91, Dinc2-52, Dinc2-2, Dinc3-5, Dinc-2-4, Din2-51, Dinc4-4, Dinc3-2, Dinc3-3, Dinc3-4) além do controle positivo UFRGS-VP16, onde os valores variaram de 1,09 a 1,67 (**figura 1**). Os mesmos isolados tiveram capacidade de solubilizar $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, e também o isolado Dinc 2-1, com valores de 1,08 a 2,7 (**figura 2**). Em ambas fontes de fosfato, houveram solubilizadores precoces (dois dias), de tempo mediano (cinco dias) e tardios (dez dias). Alguns trabalhos têm mostrado o efeito positivo da inoculação de plantas com bactérias solubilizadoras de fosfato em cultivos agrícolas. Chabot et al. (1988) observaram um incremento no rendimento da matéria seca do milho, assim como Mikanova & Kubát (1999) e Piex et al. (2001) verificaram aumento na produtividade de soja, cevada e grão-de-bico, respectivamente, quando inoculados com rizóbios solubilizadores de fosfato de cálcio.

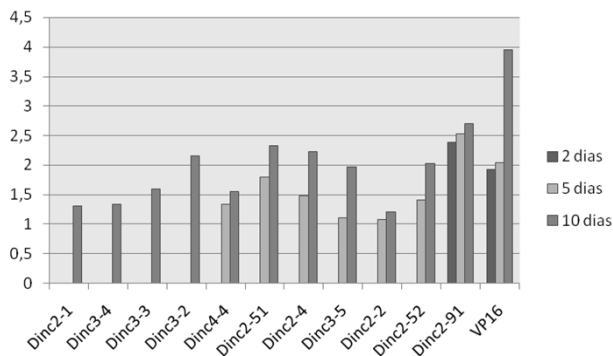


Figura 2 - Índice de solubilização de fosfato (ISF) dos isolados em relação ao tempo, usando $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ como fonte de fosfato

Quanto à produção de melanina, nenhum dos isolados além do controle positivo apresentou resultado. Giongo (2003) e Martins (2010) também observaram tal característica em isolados de feijão e cornichão, respectivamente. Provavelmente estes rizóbios não apresentam o gene *mel*, ou falharam na expressão do mesmo (Cubo et al., 1997).

CONCLUSÕES

Alguns rizóbios isolados de *D. incanum* apresentam capacidade de solubilizar fosfato, em tempo variável de isolado para isolado.

Os rizóbios isolados não produzem melanina.

REFERÊNCIAS

ALVES, J. B. Seleção de rizóbios para trevo branco. 2005. 78f. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

CHABOT, R.; BEAUCHAMP, C. J.; KLOPPER, J. W.; et al. Effect of phosphorus on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*. *Soil Biology & Biochemistry*, 30:1615-1618.

CUBO, M. T.; ROMERO, F.; VINARDELL J. M.; et al. Expression of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli melA* gene in other rhizobia does not require the presence of the *nifA* gene. *Australian Journal of Plant Physiology*, 24:195-203, 1997.

FONTOURA, R. A. Seleção de rizóbios nativos, de solos do Rio Grande do Sul, para *Lotus Glaber* e *Lotus subbiflorus*. 2007. 94f. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

GIONGO, A. Diversidade de rizóbios nativos que nodulam feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) isolados de áreas de campo nativo sob diferentes adubações. 2003. 83f. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

GRANADA, C. E. Seleção de rizóbios e estudo da compatibilidade simbiótica em *Desmodium incanum* e *Lotus* spp. 2010. 84f. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

GU, J.; WANG, E. T.; CHEN, W. X. Genetic diversity of rhizobia associated with *Desmodium* species grown in China. *Applied Microbiology*, 44:286-292, 2007.

MARTINS, A. F. Rizóbios, para *Lotus* spp, resistentes à acidez e salinidade do solo. 2010. 92f. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

MIKANOVA, O.; KÚBAT, J. Practical use of P-solubilization a activity of *Rhizobium* species strains. *Rostlinná Vyroba*, 45(9):407-409.

PIEX, A.; RIVAS-BOYERO, A. A.; MATEOS, P. F.; et al. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biology & Biochemistry*, 33(1):103-110.

SANTOS, I. B. dos; LIMA, D. R. M. de; BARBOSA J. B; et al. Bactérias diazotróficas associadas a raízes de cana-de-açúcar: solubilização de fosfato inorgânico e tolerância à salinidade. *Bioscience Journal*, 28:142-149, 2012.

SARRUGE, J. R. Soluções nutritivas. *Summa Phitopathologica*, Piracicaba, 1:231-234, 1975.

SILVA, N. C.; FRANKE, L. B.; NABINGER, C.; BARRETO, R. Produção e partição da biomassa de *Desmodium incanum* em resposta à aplicação de fósforo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 36:541-548, 2001.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, J. H. Handbook for Rhizobia: methods in legume *Rhizobium* technology. Springer-Verlag: New York, 1994.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of Biotechnology*, 91:127-141, 2001.

VINCENT, J. M. Manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164p.



Tabela 1 - Caracterização morfológica e autenticação dos isolados de *D. Incanum*

| Isolado | elevação | textura | formato | bordo | densidade ótica | nod | fix |
|------------|-----------|----------|----------|-------|-----------------|-----|-----|
| Dinc 2-1 | convexa | gomosa | circular | liso | translúcida | + | + |
| Dinc 2-2 | convexa | gomosa | circular | liso | translúcida | + | + |
| Dinc 2-4 | convexa | gomosa | circular | liso | translúcida | + | + |
| Dinc 2-51 | convexa | gomosa | circular | liso | translúcida | + | + |
| Dinc 2-52 | convexa | gomosa | circular | liso | translúcida | + | + |
| Dinc 2-8 | convexa | gomosa | circular | liso | translúcida | + | + |
| Dinc 2-91 | convexa | gomosa | circular | liso | translúcida | + | + |
| Dinc 2-92 | pulvinada | butirosa | circular | liso | opaca | + | + |
| Dinc 2-101 | convexa | gomosa | circular | liso | translúcida | + | + |
| Dinc 2-102 | convexa | gomosa | circular | liso | translúcida | + | + |
| Dinc 3-2 | convexa | gomosa | circular | liso | translúcida | + | + |
| Dinc 3-3 | convexa | gomosa | circular | liso | translúcida | + | + |
| Dinc 3-4 | convexa | gomosa | circular | liso | translúcida | + | + |
| Dinc 3-5 | convexa | gomosa | circular | liso | translúcida | + | + |
| Dinc 3-8 | convexa | gomosa | circular | liso | opaca | - | - |
| Dinc 4-2 | convexa | gomosa | circular | liso | translúcida | + | + |
| Dinc 4-3 | convexa | gomosa | circular | liso | translúcida | + | + |
| Dinc 4-4 | convexa | gomosa | circular | liso | translúcida | + | + |
| Dinc 4-5 | convexa | gomosa | circular | liso | translúcida | + | + |
| Dinc 4-61 | convexa | gomosa | circular | liso | translúcida | + | + |
| Dinc 4-62 | convexa | butirosa | circular | liso | translúcida | + | + |
| Dinc 4-71 | convexa | viscosa | circular | liso | opaca | + | + |
| Dinc 4-72 | convexa | viscosa | circular | liso | opaca | + | + |
| Dinc 4-8 | convexa | gomosa | circular | liso | translúcida | + | + |
| Dinc 4-9 | convexa | gomosa | circular | liso | translúcida | + | + |
| Dinc 4-101 | convexa | viscosa | circular | liso | opaca | + | + |

nod= + apresentou estruturas nodulares e - não apresentou, fix= + apresentou coloração avermelhada e/ou parte aérea bem desenvolvida e folhas verde escuras, e - não apresentou