

Caracterização fenotípica de isolados de *Frankia* sp. de Casuarinaceas
Phenotypic characterization *Frankia* sp. of Casuarinaceas

GÓES, Kelly C. G. P. de; ANDRADE, Diva, S.; AMARAL, Higo, F.; RIGONATO, Janaina
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Cornélio Procópio, k.goes@yahoo.com.br

Resumo: Microrganismos do gênero *Frankia* associam-se com arbóreas da família *Casuarinaceae*, formando nódulos nas raízes e promovendo a fixação biológica do nitrogênio. Realizou-se este trabalho com o objetivo de caracterizar fenotipicamente estirpes de microrganismos fixadores de nitrogênio do gênero *Frankia* sp. As estirpes IPRF 001, 002, 003 apresentaram maior produção de Ácido Indolacético e 81% das 16 estirpes de estirpes estudadas, alcalinizaram o meio de cultura.

Palavras-chave: Ácido Indolacético, planta actinorrízica, fixação biológica do nitrogênio, pH.

Abstract: Microorganisms of genera *Frankia*, establishes symbiosis with Casuarinaceae tree form nitrogen-fixing root nodule. The aim of this work was characterize phenotypic strains of *Frankia* sp. The strains IPRF 001, 002, 003 presented more Indol acetic acid production and 81%, of 16 strains studied, alkalized the culture medium.

Keywords: Indol acetic acid, actinorizical plant, biological nitrogen fixation, pH.

Introdução

Nos sistemas produtivos agroecológicos a suplementação do nitrogênio é fundamental para o crescimento das plantas via fixação biológica do nitrogênio (FBN). Esse processo biológico evita a contaminação do meio ambiente pela perda (lixiviação e volatilização) do nitrogênio mineral contidos em adubos de alta solubilização, dessa forma, o suprimento de nitrogênio pode ser realizado por microrganismos do solo em simbiose com plantas leguminosas e não leguminosas.

A exploração adequada dos recursos naturais pode ajudar na melhoria agrícola no sentido de diminuir gastos e aumentar sustentabilidade dos sistemas. O estudo de microrganismos, além de indicativos de qualidade ambiental, pode ser alternativa viável para a agricultura conservacionista, exemplo disso, é o uso de bactérias do gênero *Rhizobium* como inoculantes na produção de soja e feijão.

Os microrganismos do gênero *Frankia*, formam simbiose com espécies arbóreas não leguminosas promovendo a FBN pelos nódulos radiculares. Estas plantas são recomendadas para recuperar áreas degradadas com solos de baixa fertilidade, devido sua boa adaptação e crescimento rápido (EMBRAPA, 1986) e boa utilização para madeira e lenha. Podendo assim, ser exploradas para estes fins, além de reduzir a exploração de espécies nativas, contudo, por ser pouco estudados, há necessidade de aprofundamento no estudo desses microrganismos. A caracterização fenotípica, como, métodos de coloração, alteração do pH do meio de cultura, produção de pigmentos e

tolerância a baixo pH, produção de compostos indólicos, entre outros, são úteis para distinguir grupos morfo-fisiológicos (ANDRADE et al., 2002). O objetivo deste trabalho foi caracterizar e selecionar estirpes mais eficientes de microrganismos fixadores de nitrogênio do gênero *Frankia sp* para espécies arbóreas da família *Casuarinacea*.

Material e métodos

Para os estudos de caracterização foram utilizadas estirpes depositadas na “Coleção de Microrganismos Fixadores de Nitrogênio do Laboratório de Microbiologia dos Solos do IAPAR”. Os isolados: IPRF-001, IPRF-002, IPRF-003, IPRF-004, IPRF-005, IPRF-006, IPRF-007, IPRF-008, IPRF-009, IPRF-010, IPRF-011 e IPRF-012, foram obtidos de plantas de *Casuarina spp.* (ANDRADE et al 2007, submetido). Para verificar a síntese de ácido indol acético as estirpes e isolados foram crescidas em meio de cultura líquido e específico para *Frankia* MCM por 15 dias. Após esse período, alíquota de 1 mL dessas suspensões microbianas foram inoculadas em tubos de ensaio com tampa, contendo 5 mL do MCM, suplementado com: ácido casamino, TRIS, extrato de levedura, manitol e triptofano. Foram preparados meios de cultura (MCM) para *Frankia*, suplementado com, manitol, ácido casamino, TRIS, extrato de levedura e suplementado com triptofano, e o meio Tris-YMRT. Incubadas por 10 dias, a 28°C no escuro. Em um tubo de ensaio contendo 2 mL da solução de FeCl_3 0,01 M, em 35% de HClO_4 foi adicionado 1 mL da suspensão de *Frankia* crescida em meio, após incubar por 25' a concentração de AIA foi determinada colorimetricamente por espectrofotometria a 530 nm. Para observar alterações no pH do meio, que verifica a velocidade de crescimento (lento ou rápido), as estirpes e isolados de *Frankia* foram crescidos por 19 dias, em 5 mL de meio de cultura mineral para *Frankia* contendo corante azul de bromotimol 0,5%. Após o período de incubação foi verificada a mudança de coloração do meio, onde, se houve acidificação o meio apresentando coloração amarela ou alacalinizaram apresentando coloração azul. Utilizou-se software estatístico SAS INSTITUTE (1998) para aplicar o teste Duncan (5%) para comparação das médias.

Resultados e discussão

Das estirpes avaliadas, IPRF 001, 002, 003, demonstraram maior produção de AIA comparado com as demais, aproximadamente 40 μM de AIA (Fig. 1). As estirpes

IPRF 011 e 012 apresentaram resultados 70% menor do que as anteriores e as estirpes IPRF 005, JCT – 297 e HFPC – 13, demonstraram as menores produções de AIA: 7, 31, 4,63 e 9, 73 μM de AIA, respectivamente. O ácido idol-acético é um importante fitohormônio, atuante no crescimento vegetal. Estirpes que produzam mais AIA podem promover o melhor desenvolvimento da planta. Portanto os isolados IPRF 001, 002, 003 potencialmente podem contribuir além da FBN, para o crescimento rápido de arbóreas (Fig. 1).

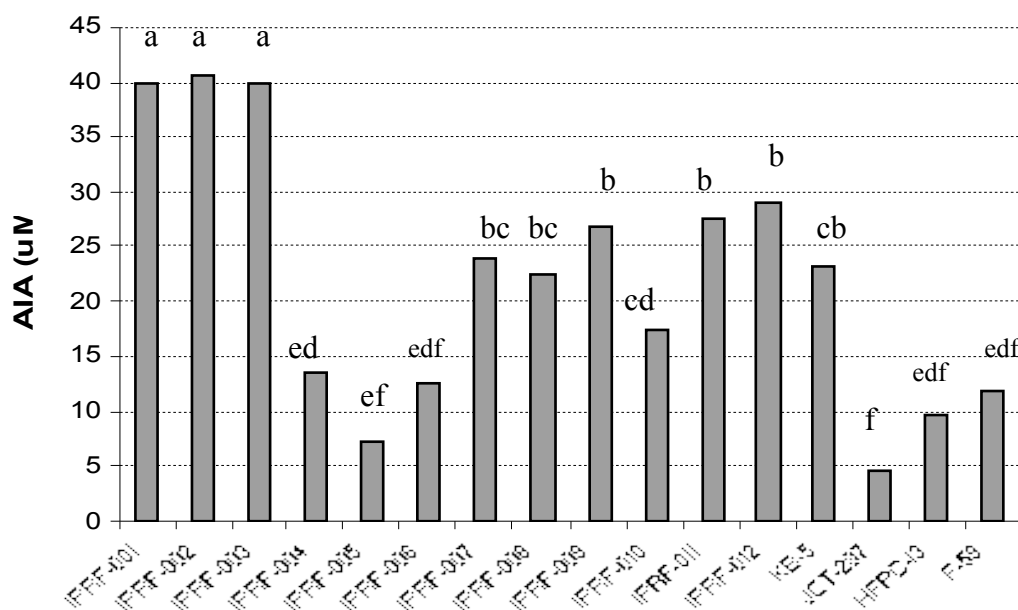


Figura 1. Produção de Ácido Idol Acético (μM) de diferentes estirpes e Isolados de microrganismos do gênero *Frankia*. Letras iguais não diferem pelo teste Duncan (5%). Médias de 3 repetições.

Do total das estirpes estudadas, 81% apresentaram a capacidade de alcalinizar o meio de cultura após 19 dias de incubação, demonstrando assim, característica de microrganismos de metabolismo lento. Nenhuma das estirpes acidificou o meio, portanto, diferentes dos rizóbios, não demonstraram crescimento rápido. Apenas três estirpes não alteraram o pH do meio não correlacionando sua velocidade metabólica ou demandariam mais tempo para degradar os aminoácidos contidos no meio de cultura (Tab. I). De modo geral, a alteração do pH do meio de cultura em microrganismos, está relacionada com as rotas de degradação de aminoácidos contidos no meio. Microrganismos que acidificam o meio, indiretamente, estão relacionados com rotas metabólicas mais aceleradas do que os que alcalinizam no mesmo período de incubação.

Tabela I. Modificação do pH do meio de cultura pelas estirpes e isolados de *Frankia*.

Estirpes/Isolados	Alcalinizaram	Acidificaram	Não alteraram o meio
KB 5	+	-	-
JCT 287	+	-	-
HFPC I3	+	-	-
F 59	+	-	-
IPRF-001	+	-	-
IPRF-002	+	-	-
IPRF-003	+	-	-
IPRF-004	+	-	-
IPRF-005	+	-	-
IPRF-006	-	-	+
IPRF-007	+	-	-
IPRF-008	-	-	+
IPRF-009	+	-	-
IPRF-010	-	-	+
IPRF-011	+	-	-
IPRF-012	+	-	-

(+) positivo e (-) negativo para característica apresentada na tabela.

Agradecimentos ao Instituto Agrônomo do Paraná pelo financiamento do projeto e ao CNPq concessão da bolsa de iniciação científica PIBIC-CNPq/IAPAR da primeira autora.

Referências Bibliográficas

ANDRADE, D. S.; MURPHY, P. J.; GILLER, K. E. The diversity of *Phaseolus*-nodulating rhizobial populations is altered by liming in acid soil planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. *Applied and Environmental Microbiology*, New York, v.68, .4025-4034, 2002.

ANDRADE, D. S.; ATAÍDE, L.T.; SOUZA, J. R.; GOES, K. C.G.P.; MORITZ, P. Caracterização morfológica, fisiológica e infectividade em planta de isolados de frankia de nódulos de *casuarina* spp. Submetido 2007, SEMINA.

EMBRAPA Zoneamento ecológico para plantios florestais no Estado do Paraná. ; EMBRAPA-CNPq: Brasília, 1986; pp 89.

SAS INSTITUTE (1998), SAS/ STAT User's Guide. Release 6.12 ed. Cary, N. C, USA. SAS Institute Inc.