

**PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIA REGULADORA DE CRESCIMENTO POR ISOLADOS DE NÓDULOS DE LEGUMINOSAS ARBÓREAS**

ANALUIZA TORRES DA SILVA<sup>1</sup>, SILVIA MARIA DE OLIVEIRA<sup>2</sup>, LIGIANE APARECIDA FLORENTINO<sup>3</sup>, FATIMA MARIA DE SOUZA MOREIRA<sup>4</sup>

**RESUMO**

Este trabalho foi realizado com o objetivo de quantificar a produção de substância reguladora de crescimento – auxina (AIA) – por 27 estirpes isoladas de nódulos de duas espécies de leguminosas: *Eritrina falcata* Benth. e *Enterolobium contortisiliquum* (Vell) Morong, em meio de cultura YM na ausência e presença do aminoácido triptofano, precursor da síntese do AIA. Os valores de produção de auxina variaram de 0 a 50,25 µg.mL<sup>-1</sup> pelas estirpes cultivadas na presença do triptofano, e de 0 a 0,59 µg.mL<sup>-1</sup> na ausência do aminoácido. A estirpe EA4, isolada de *E. contortisiliquum*, se destacou pelo alto nível de AIA produzido, apresentando um potencial para ser utilizada em inoculação nesta leguminosa arbórea ou em plantas de outras espécies.

**Palavras-chaves:** AIA, bactéria fixadora de nitrogênio, *Eritrina falcata* Benth., *Enterolobium contortisiliquum* (Vell) Morong.

**INTRODUÇÃO**

As bactérias nodulíferas em leguminosas (BNL) apresentam alta diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética, podendo ser encontradas em diversos gêneros das subclasses  $\alpha$ -proteobacteria e  $\beta$ -proteobacteria. Essas bactérias contribuem efetivamente para o desenvolvimento das plantas, pelo fornecimento de nitrogênio (N), o qual é utilizado para a formação de vários aminoácidos, ácidos nucleicos e clorofila.

Além da contribuição do N para a leguminosa, alguns estudos têm mostrado que as BNL podem ainda contribuir para o crescimento das plantas por meio da produção de hormônios (ANTOUN et al., 1998) e solubilização de fosfato inorgânico (PEIX et al., 2001), entre outros.

Nesse mesmo contexto, os estudos de diversidade de BNL têm mostrado que nos nódulos, além dessas bactérias nodulíferas, também são encontradas outras bactérias, denominadas bactérias endofíticas de nódulos, as quais podem contribuir para o crescimento das plantas por meio de controle de fitopatógenos (TAGHAVI et al., 2005), e ainda estimular o desenvolvimento do sistema radicular, aumentando a taxa de absorção de nutrientes pelas plantas (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004).

Uma das importantes funções destas bactérias, que podem contribuir para o crescimento vegetal, é a produção de hormônios como: auxinas, citocininas e etileno. Destes, a síntese de auxinas, representada, principalmente pelo ácido 3-indol-acético (AIA), tem sido bastante estudada para diversos grupos de microrganismos do solo (ANTOUN et al., 1998; BISWAS et al., 2000; RADWAN et al., 2002; THAKURIA et al., 2004).

O objetivo deste estudo foi quantificar a síntese do ácido 3-indol-acético (AIA) por bactérias isoladas de nódulos de *Eritrina falcata* Benth. e *Enterolobium contortisiliquum* (Vell) Morong.

**MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizadas neste estudo a estirpe *Azospirillum brasilense* (BR11001<sup>T</sup>) (RADWAN et al., 2002), como controle positivo, e 27 estirpes isoladas de nódulos de duas leguminosas *Eritrina*

<sup>1</sup> Mestranda em Ciência do Solo, DCS/UFLA, bolsista CNPq, analutorres@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Doutoranda em Microbiologia Agrícola, BDI/UFLA, bolsista CAPES, sylmarya@yahoo.com.br

<sup>3</sup> Pós-doutoranda, Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, DBI/UFLA, bolsista CAPES/PNPD, ligiflorentino@yahoo.com.br

<sup>4</sup> Professora associada, DCS/UFLA, bolsista produtividade do CNPq, fmoreira@dcs.ufla.br

**XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA**  
**27 de setembro a 01 de outubro de 2010**

*falcata* Benth. e *Enterolobium contortisiliquum* (Vell) Morong (Tabela 1), cultivadas com solos coletados em três áreas distintas, no campus da UFLA (ASSIS, 2008) (Tabela 2).

<sup>1</sup> Mestranda em Ciência do Solo, DCS/ UFLA, bolsista CNPq, analutorres@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Doutoranda em Microbiologia Agrícola, BDI/UFLA, bolsista CAPES, sylmarya@yahoo.com.br

<sup>3</sup> Pós-doutoranda, Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, DBI/UFLA, bolsista CAPES/PNPD, ligiflorentino@yahoo.com.br

<sup>4</sup> Professora associada, DCS/UFLA, bolsista produtividade do CNPq, fmoreira@dcs.ufla.br

**XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA**  
**27 de setembro a 01 de outubro de 2010**

**Tabela 1.** Distribuição e características culturais, em meio YMA, das 27 estirpes bacterianas isoladas de nódulos de *Eritrina falcata* Benth. e *Enterolobium contortisiliquum* (Vell) Morong, cultivadas com três tipos de solo.

Estirpes	Solo	Características morfológicas					
		<sup>1</sup> T (dias)	<sup>2</sup> pH	Cor colônia	<sup>3</sup> Abs. ind.	<sup>4</sup> Ø (mm)	
<i>E. falcata</i>							
FA2	3	2	Ácido	Amarela	Sim	3	
FA15	3	2	Neutro	Amarela	Sim	1	
FL7	1	2	Ácido	Amarela	Sim	2	
FL8	1	2	Alcalino	Amarela	Sim	1	
FL13	1	2	Alcalino	Creme	Não	1	
FC15	2	2	Alcalino	Creme	Não	2	
FC24	2	2	Neutro	Creme	Não	1	
FC28	2	2	Alcalino	Incolor	Não	>1	
FC31	2	2	Ácido	Amarela	Não	5	
FC32	2	2	Neutro	Amarela	Sim	1	
FC34	2	2	Neutro	Creme	Sim	3	
FC37	2	2	Alcalino	Creme	Não	>1	
FC38	2	2	Neutro	Creme	Sim	2	
FC44	2	2	Alcalino	Creme	Não	2	
FC45	2	2	Ácido	Amarela	Sim	1	
<i>E. contortisiliquum</i>							
EA2	3	2	Alcalino	Amarela	Sim	2	
EA4	3	2	Alcalino	Incolor	Não	>1	
EA7	3	2	Alcalino	Creme	Não	1	
EA19	3	2	Ácido	Creme	Não	3	
EA20	3	2	Neutro	Amarela	Sim	>1	
EA30	3	2	Alcalino	Amarela	Sim	1	
EA51	3	2	Neutro	Creme	Não	2	
EA66	3	2	Neutro	Amarela	Sim	2	
EA71	3	2	Neutro	Creme	Sim	1	
EA72	3	2	Neutro	Creme	Sim	2	
EA77	3	2	Neutro	Amarela	Não	2	
EA81	3	2	Alcalino	Creme	Não	1,5	
EA83	3	2	Alcalino	Amarela	Sim	1,5	
EA88	3	2	Neutro/ Alcalino	Amarela	Sim	1,5	
EA97	3	2	Neutro/ Alcalino	Amarela	Sim	1	

<sup>(1)</sup> Tempo de aparecimento de colônias isoladas; <sup>(2)</sup> Reação do pH do meio após crescimento da estirpe avaliado pela mudança de cor do indicador; <sup>(3)</sup> Absorção de indicador; <sup>(4)</sup> Diâmetro da colônia.

**Tabela 2.** Classificação e cobertura vegetal dos respectivos solos utilizados

Solos	Classificação	Cobertura vegetal
Solo 1	Latossolo Vermelho (LV)	Mata secundária (nativa)
Solo 2	Cambissolo Háplico (CX)	Floresta de Pinus

**XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA**  
**27 de setembro a 01 de outubro de 2010**

---

Solo 3	Argissolo Vermelho- Amarelo (PVA)	Floresta de Angico ( <i>Anadenanthera</i> sp.)
--------	--------------------------------------	---

---

### Teste de quantificação de auxina

Para verificar o potencial dos 27 isolados testados na produção de ácido indol-acético (AIA), assim como o padrão positivo *Azospirillum brasilense* (BR11001<sup>T</sup>) (RADWAN et al., 2002), estes foram crescidos em meio YM (Vincent, 1970) – específico para cultivo de rizóbios – modificado pela exclusão de ágar e do Azul de Bromotimol, contendo (g.L<sup>-1</sup>): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,1); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,4); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,2); NaCl (0,1); manitol (10); extrato de levedura (0,4). Após o crescimento, ajustou-se a DO para 0,5 com a escala Mc Farland n° 2, utilizando solução salina (0,85%). Desta padronização alíquotas de 500 µL de solução bacteriana foram inoculadas em 20 mL de meio YM (sem triptofano e com 100 mg.L<sup>-1</sup> de triptofano). Foram incubadas por 72 horas sob agitação constante.

A concentração de AIA foi estimada no sobrenadante das culturas após a incubação. As células foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 min, em seguida, retirou-se 3 mL do sobrenadante e adicionou-se 2 mL do Reagente de Salkowski (SARWAR & KREMER, 1995), reservando o material por 30 minutos no escuro para o desenvolvimento da coloração rósea, indicativo da produção de AIA.

A intensidade da cor foi determinada em espectrofotômetro a 535 nm, segundo Asghar et al. (2002). A concentração do ácido indolacético foi estimada utilizando uma curva padrão previamente obtida pela adição de quantidades conhecidas de AIA (Sigma) 0, 25, 50, 100, 150, 200 e 300 µM, de acordo com a equação  $y = 0,0053x + 0,675$  (R<sup>2</sup> = 0,97).

### Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o programa SISVAR versão 4.0 (FERREIRA, 2000) utilizando o teste Scott-Knott (5%). Todos os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com três repetições.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maioria dos isolados não apresentou produção de ácido indol-acético quando cultivados em meio sem adição de triptofano. Isto pode ser devido ao fato de não possuírem a via biossintética de AIA independente do triptofano: a via do indole-3-piruvato (IpyA). São conhecidas três vias de biossíntese de AIA utilizadas pelas bactérias nodulíferas: índole-3-piruvato (IpyA), índole-3-acetamida (IAM) e triptamina (TAM) (SPAEPEN et al., 2007), sendo o triptofano um aminoácido precursor para as duas últimas vias.

A produção do AIA variou de 0 a 0,59 µg.mL<sup>-1</sup> (Tabela 4) em meio não suplementado com triptofano, e de 0 a 50,25 µg.mL<sup>-1</sup> (Tabela 3) em meio com 100 mg de triptofano por litro de meio de cultivo, sendo neste meio o nível mais alto produzido pela estirpe EA4. Radwan et al. (2004), observaram que as estirpes de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* apresentaram um aumento na produção de indóis com o aumento de triptofano no meio de cultivo e Oliveira (2009), estudando estirpes simbióticas de feijão comum, caupi e siratro, obteve variação de 0,23 a 12,35 µg.mL<sup>-1</sup> em meio não suplementado com triptofano, e a estirpe UFLA04-0321 com produção estatisticamente superior ao padrão positivo *Azospirillum brasilense* (BR 11001<sup>T</sup>). No presente estudo, o padrão positivo *A. brasilense* não apresentou produção de AIA, o que pode ser atribuído ao fato desta estirpe ter sido cultivada em meio não específico para o gênero *Azospirillum*.

**Tabela 3.** Produção de auxina (AIA) pelas estirpes crescidas em meio YM na presença de 100mg/L de triptofano.

**XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA**  
27 de setembro a 01 de outubro de 2010

<b>Estirpes</b>	<b>AIA (<math>\mu\text{g/mL}</math>)<sup>1</sup></b>
EA4	50,25 (a)
FA2	13,72 (b)
FC15	10,63 (c)
EA19	6,03 (d)
FA15, FC31	4,69 – 4,71 (e)
FC32, FL8	3,54 - 3,78 (f)
EA7, FC34, EA88, EA30	0,36 - 0,87 (g)
BR11001*, EA77, EA81, FC24, EA71, EA97, FC37, EA83, FC38, EA2, EA20, FL7, EA51, EA66, FL13, FC45	0 (h)

\*Estirpe padrão *Azospirillum brasilense*. <sup>(1)</sup> Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. CV (%): 9,01.

**Tabela 4.** Produção de auxina (AIA) pelas estirpes crescidas em meio YM na ausência de triptofano.

<b>Estirpes</b>	<b>AIA (<math>\mu\text{g/mL}</math>)<sup>1</sup></b>
FC32	0,59 (a)
EA88	0,41 (b)
FA15	0,29 (c)
BR11001*, FC15, FC24, FC31, FL8, EA97, FA2, FC38, FC45, FL13, FL7, FC34, FC37, EA83, EA20, EA30, EA4, EA19, EA2, EA51, EA77, EA81, EA71, EA66, EA7	0 (d)

\*Estirpe padrão *Azospirillum brasilense*. <sup>(1)</sup> Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. CV (%): 1,68.

## CONCLUSÃO

Houve grande variação na produção de AIA pelos isolados, recebendo destaque a estirpe EA4, isolada de nódulo de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell) Morong, com produção em torno de  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , apresentando grande potencial para ser utilizada em inoculação para esta espécie.

## REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO

- ASSIS, M. R. Diversidade de bactérias que nodulam leguminosas florestais em solos do sul de Minas Gerais. 2009. 30p. **Monografia** (Graduação) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- ASGHAR, H.N.; ZAHIR, Z.A.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, v.35, p.231-237, 2002.
- AUTOUN, H.; BEAUCHAMP, C.J.; GOUSSARD, N.; CHABOT, R.; LALANDE, R. Potencial of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacterian on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, The Hague, v.204, p.57-67, 1998.
- BISWAS, J.C.; LADHA, J.K.; DAZZO, F.B.; YANNI, Y.G.; ROLFE, B.G. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, Madison, v.92, p.880-886, 2000.

**XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFPA**  
**27 de setembro a 01 de outubro de 2010**

FERREIRA, D. F. **Sistema de análises de variância para dados balanceados**. Lavras: UFPA, 2000. (SISVAR 4.0. pacote computacional).

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAUJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology** 6, 1244–1251, 2004.

OLIVEIRA, S. M. Processos promotores de crescimento vegetal por bactérias diazotróficas de vida livre ou simbióticas de feijão comum, caupi e siratro. 2009. 77p. **Dissertação** (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PEIX, A.; RIVAS-BOYERO, A.A.; MATEOS, P.F.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; VELAZQUEZ, E. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.33, p.103-110, 2001.

RADWAN, T.; MOHAMED, Z.K.; REIS, V.M. Production of indole-3-acetic acid by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. **Symbiosis**, Philadelphia, v.32, p.39-54, 2002.

RADWAN, T.; MOHAMED, Z.K.; REIS, V.M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.3, p.987-994, 2004.

SARWAR, M.; KREMER, R.J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil**, The Hague, v. 172, p.261-269, 1995.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, 31:425-448, 2007.

TAGHAVI, S.; BARAC, T.; GREENBERG, B.; BORREMANS, B.; VANGRONSVELD, J.; VANDER LELIE, D. Horizontal gene transfer to endogenous endophytic bacteria from poplar improves phytoremediation of toluene. **Applied and Environmental Microbiology** 71, 8500–8505, 2005.

THAKURIA, D.; TALUKDAR, N.C.; GOSWAMI, C.; HAZARIKA, S.; BORO, R.C.; KHAN, M.R. Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. **Current Science**, v.86, p.978-985, 2004.

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