

# Caracterização morfológica, fisiológica e infectividade em planta de estirpes de Frankia isoladas de nódulos de Casuarina

## Morphological, physiological and plant infectivity characterization of Frankia strains isolated from Casuarina's nodules

Diva Souza Andrade<sup>1\*</sup>; Letícia Trindade Ataíde<sup>2</sup>; José Roberto P. de Souza<sup>3</sup>; Kelly Campos Guerra P. de Goes<sup>4</sup>; Patrick Moritz<sup>5</sup>

### Resumo

Frankia são microrganismos capazes de fixar N<sub>2</sub> quando em simbiose com espécies arbóreas, denominadas plantas actinorrízicas. Este estudo foi conduzido para caracterizar morfológicamente, fisiologicamente e avaliar a nodulação de quatro estirpes referência de Frankia (HFPCcI3, JCT287, KB5 e F59) e 12 estirpes (IPRF) isoladas de nódulos de Casuarina. Todas as estirpes (Referência e IPRF) foram Gram-positivas e 50% foram "acid-fast". As estirpes de Frankia alcalinizaram o meio de cultura, exceto IPRF006, IPRF008 e IPRF010. As colônias das estirpes F59, IPRF002, IPRF004, IPRF005 e IPRF011, produziram melanina. Entre as estirpes referência, apenas a JCT287 cresceu no meio de cultura com pH 5,5, enquanto no meio com pH 6,0 as duas, JCT287 e KB5, apresentaram crescimento. A análise de regressão mostrou uma relação linear ( $Y = 67,56 + 3,88X$  e  $R^2 = 0,5862$ ,  $p < 0,05$ ) e coeficiente de correlação de Pearson ( $r = 0,766$ ,  $p < 0,05$ ) entre número de esporos e hifas (120 a 480 UFC mL<sup>-1</sup>) e proteína total (18 a 145 µg mL<sup>-1</sup>). Foi observado que a estirpe F59 apresentou uma maior proporção de proteína total (50%) do que a JCT287 (7,0%) e, que as estirpes IPRF mostraram valores entre 17,5 e 29,3%. Todas as estirpes produziram compostos indólicos com valores variando de 5,9 a 98,8 µM.

**Palavras-chave:** Actinomicetos, plantas actinorrízicas, fixação biológica de nitrogênio, AIA, melanina

### Abstract

Frankia are soil microorganisms that form symbiosis with roots of tree species called actinorhizal plants and are capable of fixing atmospheric N<sub>2</sub>. This study was carried out to characterize morphologically, physiologically and to assess the nodulation of four Frankia reference strains (HFPCcI3, JCT287, KB5 and F59) and 12 (IPRF) isolated from root nodules of Casuarina plants. All strains (Reference and IPRF) were characterized as Gram-positive and 50% as acid-fast. The Frankia strains produced alkali in the culture medium, except the IPRF006, IPRF008 and IPRF010. The colonies of strains F59, IPRF002, IPRF004, IPRF005, and IPRF011 produced melanin. Among reference strains, only JCT287 grew in culture media with pH 5.5, while with pH 6.0 both strains JCT287 and KB5 presented growth. The regression analysis

<sup>1</sup> Eng. Agrônoma, Pesquisadora, Ph.D., Microbiologia do solo, Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), Cx. Postal 481, CEP-86001-970 – Londrina (PR). \*Autor para correspondência: diva@iapar.br Fone: (43) 3376 2467; FAX: (43) 3376 2101

<sup>2</sup> Eng. Agrônoma, Mestranda em Agronomia, Depto. de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias (CCA), Bolsista da FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA, Universidade Estadual de Londrina (UEL), C.P. 6001, 86.051-990 Londrina (PR). E-mail: leticia\_trindade@yahoo.com.br

<sup>3</sup> Professor Dr., Depto. de Agronomia, CCA, UEL. E-mail: jose@uel.br

<sup>4</sup> Estudante de biologia FAFICOP, bolsista iniciação científica do ProICI CNPq/IAPAR.

<sup>5</sup> Estudante biologia UNIFIL, bolsista iniciação científica da FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA/IAPAR.

\* Autor para correspondência

showed a linear relationship ( $Y = 67.56 + 3.88X$  and  $R^2 = 0.5862$ ,  $p < 0.05$ ) and Pearson's correlation coefficient ( $r = 0.766$ ,  $p < 0.05$ ) between number of spores and hyphae ( $120$  to  $480$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) and total protein ( $18$  to  $145$   $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). It was observed that the strains F59 had a higher proportion of total protein  $50.0\%$  than JCT287 with  $7.0\%$  and that the IPRF strains showed values between  $17.5$  and  $29.3\%$ . All strains presented ability to produce indolic compounds in growth media with values ranging from  $5.9$  to  $98.8$   $\mu\text{M}$ .

**Key words:** Actinomycetes, actinorrhizal plants, biological nitrogen fixation, IAA, melanin

## Introdução

Actinomicetos ou bactérias filamentosas da família Frankiaceae, do gênero *Frankia* são capazes de se associarem simbioticamente às raízes de espécies arbóreas angiospermas denominadas plantas actinorrízicas, conduzindo à formação de estruturas nodulares onde ocorre a fixação biológica do nitrogênio (ROUVIER et al., 1996; RAMÍREZ-SAAD; JANSE; AKKERMANS, 1998; HUGUET et al., 2001). Em 1983, foi descrito o primeiro isolamento bem sucedido de *Frankia* a partir de nódulos de raízes de plantas da família Casuarinaceae. No Brasil, foram introduzidas espécies arbóreas actinorrízicas desta família, provenientes da Austrália, Malásia e Polinésia. Após estudos de adaptação edafoclimática, *Casuarina equisetifolia* e *C. cunninghamiana*, foram recomendadas para recuperar áreas degradadas com solos de baixa fertilidade, por apresentarem boa adaptação, crescimento rápido e capacidade de fixação biológica de nitrogênio em simbiose com *Frankia* (CARPANEZZI et al., 1986). No norte do Paraná, um bom desempenho dessa arbórea como quebra-vento de lavoura de cafeeiros foi observado por Leal (2004).

A Casuarina, por ser uma planta exótica, exige a inoculação com *Frankia*, uma vez que o microsimbionte não é de ocorrência generalizada nos solos brasileiros. A inoculação com estirpes selecionadas de *Frankia* mostrou resposta diferenciada entre as espécies de *C. equisetifolia* e *C. cunninghamiana*, testadas em casa de vegetação (ANDRADE et al., 2005). Entretanto, a obtenção de isolados purificados ainda apresenta algumas dificuldades devido ao seu crescimento lento em meio líquido ou sólido, facilitando a contaminação com outros microrganismos (ROSBROOK; REDDELL, 1995).

Na caracterização fenotípica de microrganismos, métodos de coloração, alteração do pH do meio de cultura, produção de pigmentos, tolerância a baixo pH e produção de compostos indólicos são úteis para distinguir grupos morfofisiológicos (ANDRADE; MURPHY; GILLER, 2002; REIS JUNIOR et al., 2004). Segundo Doetsch (1981), as técnicas de coloração de "Gram" e o método de Ziehl-Neelsen, denominada de "acid fast" que, utilizam substâncias que promovem ou não uma rápida descoloração, permite diferenciar dois tipos de microrganismos: Gram-positivos ou Gram-negativos e "acid-fast" resistentes e os não "acid-fast" resistentes, respectivamente.

Em geral, os microrganismos fixadores de  $\text{N}_2$  desempenham papel essencial na promoção do crescimento de plantas. Bashan e Holguin (1997) relatam que os fitormônios, principalmente o ácido indol-acético (AIA) excretado por bactérias do gênero *Azospirillum*, apresentam esta função. A caracterização fenotípica de estirpes de *Frankia*, obtidas de plantas de *Casuarina* spp., servirá de base para o processo de identificação e seleção de estirpes efetivas e eficientes para a produção de inoculantes microbianos para plantas actinorrízicas. O objetivo desse trabalho foi estudar características morfológicas, fisiológicas e a infectividade em plantas de estirpes de *Frankia* obtidos de nódulos de raízes de *Casuarina* spp.

## Material e Métodos

### *Obtenção das estirpes de Frankia e teste de infectividade em plantas de Casuarina*

As estirpes isoladas de *Frankia* foram obtidas de nódulos de raízes de plantas de *Casuarina* spp. cultivadas em tubetes ou campo por 3 ou 5 anos, respectivamente. Os nódulos foram desinfestados

superficialmente com uma solução comercial de hipoclorito de sódio a 6% (v/v) por 15 min. e lavados várias vezes em água esterilizada. Após maceração, a suspensão celular foi inoculada em meio de cultura definido para Frankia (MCDF) agarizado e contendo ( $\text{g L}^{-1}$ ): ácido propiônico (0,5 mL);  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,1);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2);  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0,1);  $\text{FeNaEDTA}$ , (0,01); solução de micronutrientes (1 mL) e pH ajustado para 6,8. Após esterilização do meio foi adicionado  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $0,076 \text{ g L}^{-1}$ ) esterilizados, de acordo com Burggraaf e Shipton (1983). As estirpes foram purificadas, checadas sob microscopia óptica e rotineiramente subcultivadas em MCDF líquido a  $28^\circ\text{C}$  no escuro. Para averiguar a infectividade (formação de nódulos), após o crescimento as estirpes e uma suspensão homogeneizada (hifas e esporos) foi inoculada nas raízes de plântulas de *Casuarina* spp. pré-germinadas em areia esterilizada. As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação por nove meses sendo observada a presença ou ausência de nódulos. As estirpes isoladas foram designadas com a sigla IPRF e depositadas na Coleção de Microrganismos de Interesse do Agronegócio do Laboratório de Microbiologia do Solo do IAPAR (Tabela 1). As estirpes de Frankia isoladas de *C. equisetifolia* e *C. cunninghamiana* (KB5, HFPCc13, JCT287 e F59), utilizadas neste estudo como referência, e as IPRF foram mantidas em meio MCDF líquido em temperatura de  $4-8^\circ\text{C}$ .

#### Testes de coloração “Gram” e “acid-fast” resistente

Para as colorações de “Gram” e “acid-fast” foi utilizado material celular das colônias das estirpes com 15 dias de desenvolvimento em meio MCDF agarizado. O esfregaço foi feito em lâminas de microscópio óptico, de acordo com o procedimento descrito por Doetsch (1981) e após os procedimentos de coloração, as células foram observadas sob microscópio óptico com objetiva de 400X. As estirpes que apresentaram coloração violeta foram

classificadas como Gram-positivas e as com coloração vermelha como Gram-negativas.

Para a coloração “acid-fast” resistente, após os procedimentos de coloração, o esfregaço foi examinado em microscopia óptica com resolução de 400X. As estirpes com células de coloração vermelha foram classificadas como “acid-fast” resistente e as de coloração azul como não “acid-fast” resistente.

#### Alterações do pH do meio de cultura

Para observar alterações do pH do meio de cultura, as estirpes foram inoculadas em tubos contendo 5 mL de meio de cultura definido e específico para Frankia (MCDF) líquido adicionado do corante azul de bromotimol (0,5%) e incubados a  $28^\circ\text{C}$  no escuro por 20 dias sob agitação a 100 rpm. Diariamente, os tubos foram avaliados visualmente e anotadas as alterações na coloração do meio: cor amarela indicando acidificação e cor azul alcalinização.

#### Produção de melanina

A produção de melanina (pigmento escuro) pelas colônias de Frankia foi avaliada conforme procedimento adaptado da metodologia utilizada por Cubo et al. (1997) e Andrade; Murphy e Giller (2002) para estirpes de rizóbio. Após 10 dias de crescimento em meio de cultura contendo ( $\text{g L}^{-1}$ ): tryptona (5,0); extrato de levedura (3,0); L-tyrosine (0,60);  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (1,3);  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,04); agar (15,0) e pH 6,8. Para facilitar sua observação, 2 a 3 mL de uma solução de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 10% foi adicionada sobre o crescimento nas placas de Petri e, após 2 a 6 h, a produção de pigmentos de coloração marrom escuros (melanina) nas colônias foi verificada e anotada. As estirpes que apresentaram e não apresentaram pigmentação escura foram classificadas como produtoras e não produtoras de melanina, respectivamente.

### *Efeito do pH do meio de cultura líquido sobre o número de esporos e hifas*

As hifas e os esporos das estirpes de Frankia KB5, HFPCcI3, JCT287 e F59 foram avaliadas quanto ao crescimento em meio MCDF líquido tamponado (5 mL em cada tubo de ensaio) com diferentes ajustes de pH: 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 e 6,8. Após a incubação (28 °C no escuro, a 100 rpm por 12 dias), a avaliação foi realizada pela contagem (esporos e hifas) sob microscópio estereoscópico através do método da interseção de quadrantes, descrito por Giovannetti e Mosse (1980).

### *Quantificação da proteína total*

O teor de proteína total foi determinado colorimetricamente por análise espectrofotométrica, conforme descrito por Lowry et al. (1951), após 15 dias de incubação, dos esporos e hifas das estirpes de Frankia, em 5 mL meio de MCDF líquido. A concentração protéica foi estimada pela curva padrão com quantidades conhecidas de uma solução de albumina de soro bovina: 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 e 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , após leitura em espectrofotômetro (660 nm).

### *Produção de compostos indólicos (CI) em meio de cultura*

Segundo Crozier et al. (1988), o método colorimétrico empregado na avaliação da quantidade de ácido 3-indol acético (AIA) inclui vários outros compostos indólicos, além do AIA. Portanto, o termo mais correto são “compostos indólicos”, referindo-se às auxinas desse grupo e não somente ao AIA.

Após o período de incubação (28 °C no escuro por 10 dias), a produção de CI foi estimada no sobrenadante das culturas de estirpes de Frankia, após centrifugação (10.000 rpm por 15 min. a 4 °C).

Para obter o sobrenadante, as estirpes foram inoculadas em meio de cultura com a seguinte composição ( $\text{g L}^{-1}$ ): manitol (10,0);  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,15);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,25); Tris (1,21); extrato de levedura (0,2); casamino ácido (1,0) e pH ajustado a 6,8. O meio de cultura foi suplementado com 0,3 mM de L-triptofano e esterilizado por filtração (0,22  $\mu\text{m}$ ) para incrementar a produção de CI. A concentração de CI foi determinada segundo os procedimentos descritos por Gordon e Weber (1951) e Minamisawa et al. (1992), com as seguintes modificações: para uma parte do sobrenadante das estirpes (v/v) foram adicionadas duas partes de  $\text{FeCl}_3$  (0,01 M), em 35% de  $\text{HClO}_4$ . Após 25 min. de incubação a 25 °C, a presença dos CI foi indicada pela produção de coloração rósea que foi medida colorimetricamente (660 nm) pelas leituras de absorbância. A concentração dos CI foi quantificada utilizando uma curva padrão preparada com 0, 25, 50, 100, 150 e 200  $\mu\text{M}$  de AIA puro.

Todos os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente ao acaso, com três repetições. Os dados de contagem em microscópio e o teor de proteína total foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey ou Duncan a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2003).

## **Resultados e Discussão**

A origem das estirpes de Frankia, sua planta hospedeira, dados de nodulação, e resultados dos testes de coloração de “Gram” e “acid-fast”, alteração do pH do meio de cultura e a produção de melanina encontram-se na Tabela 1. A presença de nódulos, de forma lobular, com coloração externa avermelhada, tamanho variado foi observada em plantas de *Casuarina* spp. inoculadas com estirpes de Frankia (dados não apresentados).

**Tabela 1.** Designação/referência das estirpes de *Frankia* spp., suas plantas hospedeiras, nodulação (formação de nódulos), testes de “Gram” e “acid-fast”, alteração do pH e produção de melanina em meio de cultura líquido e agarizado, respectivamente.

Designação /Referência	Hospedeiro	Nodulação	“Gram”	“acid-fast”	Alcaliniza	Melanina
KB5 <sup>(1)</sup>	<i>Casuarina equisetifolia</i>	+	+	+	+	-
JCT287 <sup>(2)</sup>	<i>C. equisetifolia</i>	+	+	+	+	-
HFPCcI3 <sup>(3)</sup>	<i>C. cunninghamiana</i>	+	+	+	+	+
F59 <sup>(2)</sup>	<i>C. equisetifolia</i>	+	+	-	+	+
IPRF001 <sup>(4)</sup>	<i>Casuarina</i> spp.	+	+	-	+	-
IPRF002 <sup>(4)</sup>	“	+	+	-	+	+
IPRF003 <sup>(4)</sup>	“	+	+	-	+	-
IPRF004 <sup>(4)</sup>	“	+	+	-	+	+
IPRF005 <sup>(4)</sup>	“	+	+	+	+	+
IPRF006 <sup>(4)</sup>	“	+	+	+	-	-
IPRF007 <sup>(4)</sup>	“	-	+	+	+	-
IPRF008 <sup>(4)</sup>	“	+	+	-	-	-
IPRF009 <sup>(4)</sup>	“	ND	+	+	+	-
IPRF010 <sup>(4)</sup>	“	ND	+	-	-	-
IPRF011 <sup>(4)</sup>	“	ND	+	-	+	+
IPRF012 <sup>(4)</sup>	“	ND	+	-	+	-
PRF81 <sup>(5)</sup>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	ND	-	-	Acidifica	+

<sup>(1)</sup>A. Sellstedt (1998) Umeå University, Dept. Plant and Physiology, Suécia; <sup>(2)</sup>P. Reddell (1999) University of Queensland, Dept. of Agriculture, Austrália; <sup>(3)</sup>Zhang, Lopez e Torrey (1984); <sup>(4)</sup>neste estudo; <sup>(5)</sup>Hungria et al. (2000), PRF81 = *Rhizobium tropici*; (+) = presença ou positiva; (-) = ausência ou negativa; ND = não determinado.

Algumas espécies de Frankia possuem especificidade hospedeira. Por exemplo, Carú et al. (2003) relatam ausência de nodulação em *C. cunninghamiana* inoculada com estirpes isoladas de plantas da família Rhamnaceae. Neste estudo, as estirpes (IPRF), obtidas de nódulos de Casuarina, apresentaram características comuns a outras estirpes de Frankia, incluindo morfologia celular com habilidade de produzir hifas septadas (filamentos), vesículas e esporos.

Em relação à coloração “acid-fast”, as estirpes JCT287, KB5 e HFPCcI3 mostraram características de acid-fast (Tabela 1), apresentando coloração avermelhada por reterem o corante carbofucsina em sua parede celular. Por outro lado, a estirpe F59 foi não “acid-fast” resistente, apresentando coloração azulada devido à retenção de azul de metileno em sua parede.

Quanto ao teste de Gram, as estirpes foram caracterizadas como positivas apresentando coloração violeta escura. A estirpe PRF81 de

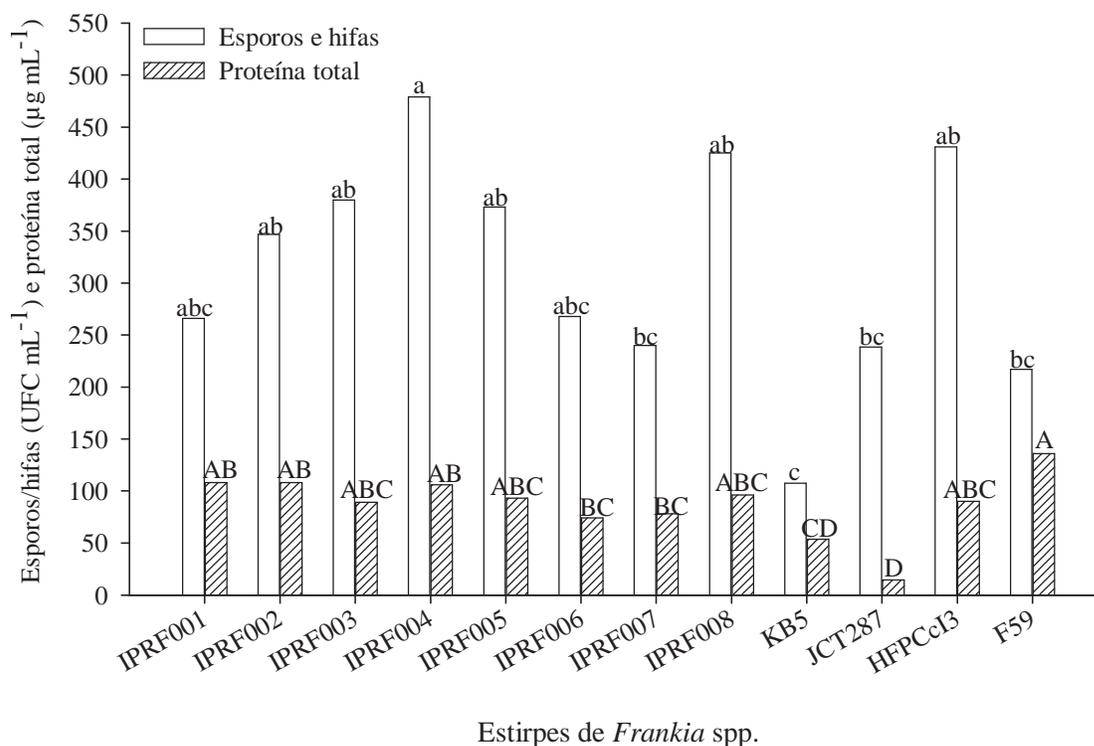
*Rhizobium tropici* fixadora de N<sub>2</sub>, Gram-negativa e isolada de feijoeiro (HUNGRIA et al., 2000), foi utilizada como controle e, devido à sua parede celular ser composta por lipopolissacarídeos, lipopoliproteínas e fosfolipídeos reteve o corante de contraste apresentando coloração vermelha.

Avaliando a alteração do pH do meio após 4 dias de incubação, as estirpes HFPCcI3, F59, IPRF001, IPRF002, IPRF003, IPRF004, IPRF005, IPRF007, IPRF009, IPRF011 e IPRF012 alcalinizaram o meio de cultura, revelado pela coloração azul do indicador de pH, caracterizando crescimento lento, assim como rizóbios de crescimento lento. Nesse mesmo período as estirpes KB5 e JCT287 apresentaram coloração amarela indicando acidificação do meio, características estas de crescimento rápido, assim como rizóbios de crescimento rápido. Porém, após 19 dias de incubação, todas as estirpes, exceto IPRF006, IPRF008 e IPRF010, apresentaram coloração azul indicando alcalinização do meio de cultura (Tabela 1).

Das estirpes de *Frankia* avaliadas, observou-se que a IPRF002, IPRF004, IPRF005, IPRF0011, HFPCcI3 e a F59 produzem melanina (Tabela 1). A produção de melanina por fungos e bactérias em um trabalho de revisão foi atribuída a uma forma de resistência a algum fator de estresse como, por exemplo, altas temperaturas e/ou deficiência hídrica (BUTLER; DAY, 1998). No caso de *Frankia*, essa característica também poderia estar associada à algum fator resistência.

Quanto aos teores de proteínas totais das estirpes de *Frankia* foi verificada uma variação entre 18 e

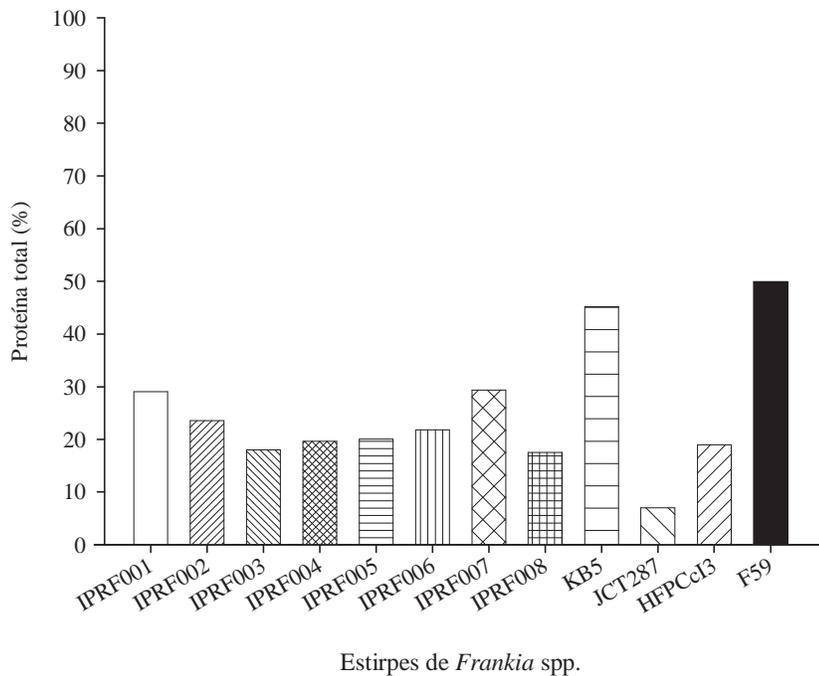
145  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 1). Observou-se que as estirpes KB5 e JCT287 apresentaram menores concentrações de proteína total, provavelmente devido ao seu menor crescimento. Após um período de 20 dias, observou-se que as estirpes de *Frankia* apresentaram relativa heterogeneidade na multiplicação de seus esporos e hifas, variando de 120 a 480 UFC  $\text{mL}^{-1}$  de meio. A estirpe KB5 apresentou multiplicação mais lenta enquanto que HFPCcI3, IPRF004 e IPRF008 apresentaram maior número de esporos e hifas em comparação às demais (Figura 1).



**Figura 1.** Número de esporos e hifas em Unidades Formadoras de Colônias (UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) e teor de proteína total das estirpes de *Frankia* spp., em meio de cultura líquido. Médias seguidas da mesma letra, minúscula para contagem e maiúscula para teor de proteína, não apresentam diferenças significativas pelo teste Tukey (5%).

Na Figura 2 observa-se que os dados médios de porcentagem de proteína total nos esporos e hifas de estirpes de *Frankia* pela razão de sua contagem, em meio de cultura líquido foram variados conforme a estirpe. Foi observado que a estirpe F59 apresentou

uma maior proporção de proteína total (50%) do que a JCT287 (7,0%) e que as estirpes IPRF mostraram valores com menor variação (17,5 a 29,3%). Esses percentuais podem ser característicos de espécies de *Frankia*.

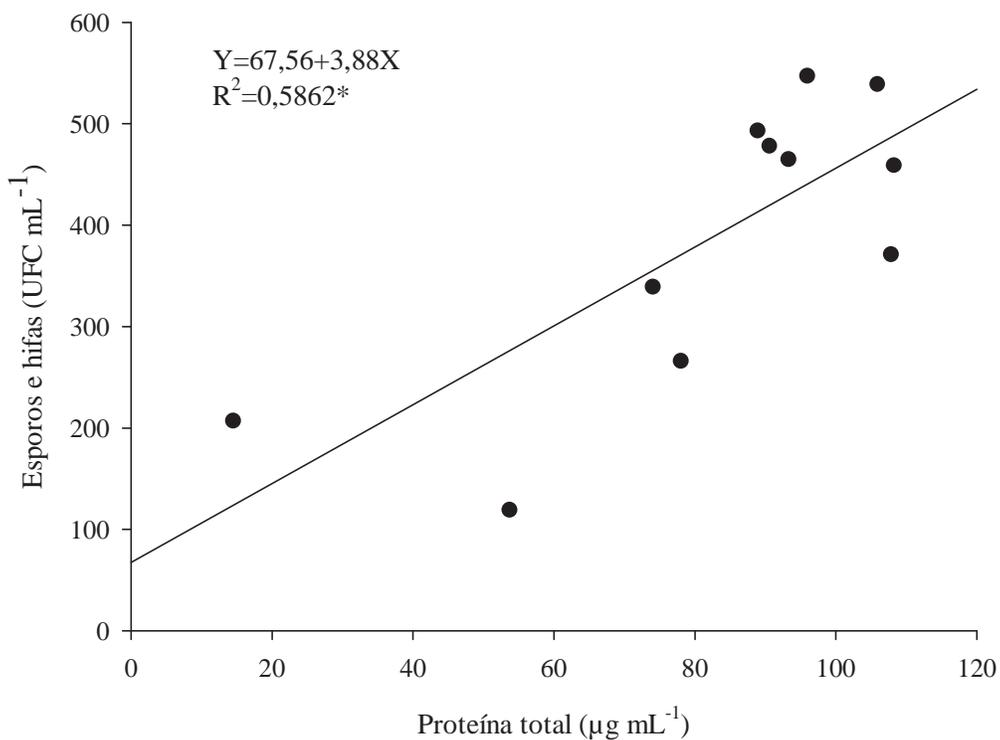


Estirpes de *Frankia* spp.

**Figura 2.** Porcentagem de proteína total nos esporos e hifas de estirpes de *Frankia* spp., em meio de cultura líquido.

Na Figura 3 a análise de regressão linear entre o teor de proteína total e o número de hifas e esporos das estirpes de *Frankia*, em meio de cultura líquido pH 6,8 mostrou uma relação linear ( $Y = 67,56 + 3,88X$

e  $R^2 = 0,5862$ ,  $p < 0,05$ ) e coeficiente de correlação de Pearson ( $r = 0,766$ ,  $p < 0,05$ ) entre número de esporos e hifas (120 a 480 UFC mL<sup>-1</sup>) e proteína total (18 a 145 µg mL<sup>-1</sup>).



**Figura 3.** Regressão linear entre o teor de proteína total e o número de hifas e esporos das estirpes de *Frankia* spp., em meio de cultura líquido pH 6,8.

Através da observação do efeito da acidez do meio MCDF líquido, verificou-se que a maioria das estirpes não apresentou crescimento a pH 4,5 e 5,5 (Tabela 2). A variabilidade no crescimento das estirpes em meio de cultura ainda não está bem definida neste grupo de microrganismos. Igual, Rodríguez-Barrueco e Cervantes (1997) determinando os efeitos deletérios dos altos teores de alumínio sobre a simbiose Frankia e *C. cunninghamiana*, observaram que a nodulação

decreceu nas plantas cultivadas em solução com níveis acima de 220  $\mu\text{M}$  de Al e pH 4,0.

A estirpe JCT287 foi a única que cresceu em pH 5,5, enquanto no meio com pH 6,0, além da JCT287, a KB5 também apresentou crescimento. Por outro lado, todas as estirpes de Frankia apresentaram crescimento em pH 6,8 (Tabela 2). De acordo com Carú (1993), estirpes de Frankia apresentam esporos e hifas visíveis em meio de cultura contendo sais minerais após duas semanas de incubação.

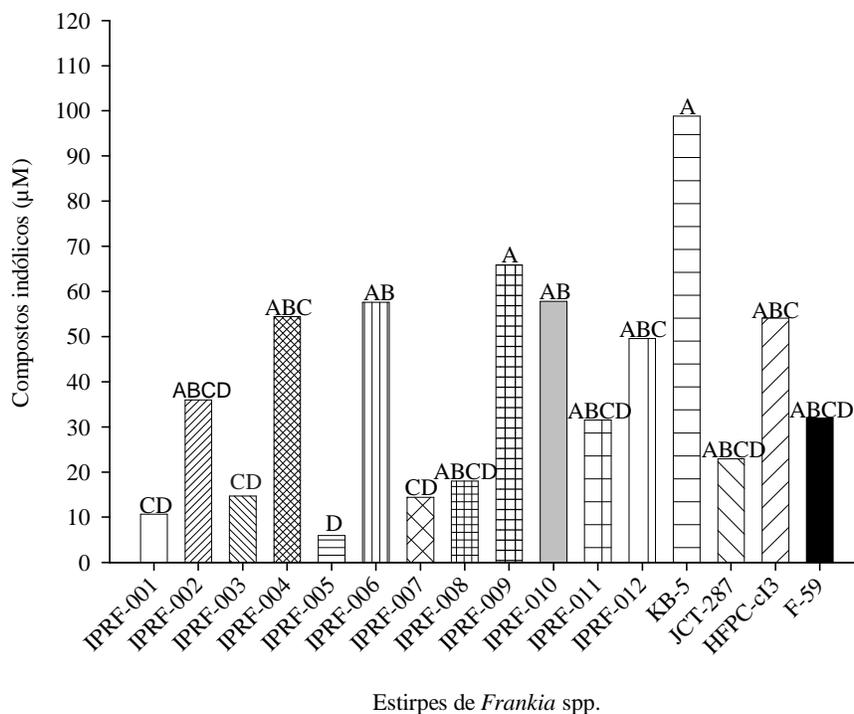
**Tabela 2.** Efeito do pH do Meio de Cultura Definido para Frankia (MCDF) líquido no crescimento de hifas e esporos das estirpes de *Frankia* spp. obtidas de nódulos de *Casuarina* spp.

pH do MCDF	Estirpes de <i>Frankia</i> spp.			
	KB5	HFPCcI3	JCT287	F59
	-----UFC*-----			
4,5	-	-	-	-
5,0	-	-	-	-
5,5	-	-	44	-
6,0	89	-	104	-
6,8	119	478	207	272

\*UFC= unidades formadoras de colônias (hifas e esporos); (-) = ausência de crescimento.

Avaliando-se a capacidade de produção de CI, todas as estirpes de Frankia testadas foram capazes de produzir estes compostos, com valores variando de 5,9 a 98,8  $\mu\text{M}$  em meio de cultura contendo L-triptofano (Figura 4). Neste estudo, as estirpes de Frankia produziram valores médios de CI similares aos observados por vários autores com fixadores de  $\text{N}_2$  associativos do gênero *Azospirillum*. Mascarua-Esparza; Villa-Gonzalez e Caballero-Melado (1988) trabalhando com *A. lipoferum* isolados de plantas cactáceas no México, observaram as quantidades de ácido 3-indol acético (AIA) variando de 28,5 a 97,0  $\mu\text{M}$ . Crozier et al. (1988), também trabalhando

com isolados de *A. lipoferum*, de raízes de milho, obtiveram uma produção de AIA variando de 0,0 a 85,9  $\mu\text{M}$  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 148,9  $\mu\text{M}$  (CROZIER et al., 1988) e de 205 a 428  $\mu\text{M}$  (MASCARUA-ESPARZA; VILLA-GONZALEZ; CABALLERO-MELADO, 1988). Isolados de *Azospirillum amazonense* em meio de cultura, produziram uma quantidade de AIA entre 35 e 110  $\mu\text{M}$  (REIS JUNIOR et al., 2004).



**Figura 4.** Produção de compostos indólicos por estirpes de *Frankia* spp. de nódulos de *Casuarina* spp., em meio de cultura líquido com pH 6,8. Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferenças significativas pelo teste Duncan (5%).

Em geral, os fitormônios excretados por microrganismos, principalmente o AIA, desempenham papel essencial na promoção do crescimento de plantas. Existem evidências crescentes de que, parte da contribuição às plantas por bactérias do gênero *Azospirillum* deve-se à produção de hormônios (BASHAN; HOLGUIN, 1997).

Este foi o primeiro relato da produção de CI por estirpes de *Frankia*. A simbiose actinorrízica é geralmente realizada por plantas pioneiras que se adaptam a solos de baixa fertilidade. Assim, a seleção de estirpes de *Frankia* com capacidade de produzir CI poderá contribuir para a recuperação de áreas degradadas, por aumentar a possibilidade do estabelecimento de plantas nesses ambientes.

## Conclusões

A maioria das estirpes de *Frankia* testadas mostrou infectividade em plantas de *Casuarina* spp. e alcalinizou o meio de cultura.

A estirpe JCT287 demonstrou a maior tolerância a pH ácido em meio de cultura.

Existe uma relação linear significativa entre hifas e esporos com a proteína total no tecido das estirpes de *Frankia*.

Estirpes de *Frankia* são capazes de produzir compostos indólicos.

Com base nos dados de caracterizações observou-se que a infectividade (formação de nódulos em *Casuarina* spp.) em solo exige um período relativamente longo e, que embora ocorram similaridades entre as estirpes de *Frankia* (Referência e IPRF), existem diversidades entre essas.

## Agradecimentos

À Fundação Araucária, pelo apoio financeiro Processo Edital 05/2003 – Apoio à Infra-estrutura de CT & I Convênio nº: 019/2004, Protocolo Nº: 5223. À Dra Anita Sellstedt e ao Dr. Paul Redell pelo envio

das estirpes (HFPCc13 e KB5) e (JCT287 e F59), respectivamente. Ao Osvaldo Machineski e à Msc. Maria A. de Matos pelo auxílio nas avaliações laboratoriais.

## Referências

- ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A.; MACHINESKI, O.; RAMOS, A. L. M.; LEAL, A. C.; MORITZ, P. Resposta de Casuarinas a inoculação com frankia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 23, 2005, Santos. *Anais...* São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2005. p.23.
- 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, n.8, p.4025-4034, Aug. 2002.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal of Microbiology*, Toronto, v.43, p.103-121, 1997.
- BURGGRAAF, A. J. P.; SHIPTON, W. A. Studies on the growth of *Frankia* isolates in relation to infectivity and nitrogen fixation (acetylene reduction). *Canadian Journal of Botanical*, Ottawa, v.61, n.11, p.2774-2782, 1983.
- BUTLER, M. J.; DAY, A. W. Fungal Melanins: a review. *Canadian Journal of Microbiology*, Toronto, v.44, n.12, p.1115-1136, 1998.
- CARPANEZZI, A. A.; FERREIRA, C. A.; ROTTA, E.; NAMIKAWA, I. S.; STURION, J. A.; PEREIRA, J. C. D.; MONTAGNER, L. H.; RAUEN, M. de J.; CARVALHO, P. E. R.; SILVEIRA, R. A.; ALVES, S. T. *Zoneamento ecológico para plantios florestais no Estado do Paraná*. Brasília, DF: EMBRAPA-CNPq, 1986.
- CARÚ, M. Characterization of native *Frankia* strains isolated from chilean shrubs (Rhamnaceae). *Plant and Soil*, The Hague, v.157, p.137-145, 1993.
- CARÚ, M.; MOSQUERA, G.; BRAVO, L.; GUEVARA, R.; SEPÚLVEDA, D.; CABELLO, A. Infectivity and effectivity of *Frankia* strains from the Rhamnaceae family on different actinorhizal plants. *Plant and Soil*, The Hague, v.251, p.219-225, 2003.
- CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J. M.; MONTEIRO, A. M.; SANDBERG, G. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*, New York, v.54, n.11, p.2833-2837, nov. 1988.
- CUBO, T.; ROMERO, F.; VINARDELL, J. M.; RUIZ-SAINZ, J. E. 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*, Adelaide, v.24, n.2, p.195-203, 1997.
- DOETSCH, R. N. Determinative methods of light microscopy. In: GERHARDT, P. *Manual of methods for general bacteriology*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1981. p.26-27.
- FERREIRA, D. F. *SISVAR*. Lavras, 2003. Disponível em: <<http://www.dex.ufla.br>>. Acesso em: 30 out. 2005.
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, Oxford, v.84, n.3, p.489-500, Mar. 1980.
- GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indolacetic acid. *Plant Physiology*, Cambridge, v.26, p.192-195, 1951.
- HUGUET, V.; BATZLI, J. M.; ZIMPFER, J. F.; NORMAND, P.; DAWSON, J. O.; FERNANDEZ, M. P. Diversity and specificity of *Frankia* strains in nodules of sympatric *Myrica gale*, *Alnus incana*, and *Shepherdia canadensis* determined by *rrs* gene polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology*, New York, v.67, n.5, p.2116-2122, May 2001.
- HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CHUERIE, L. M. d. O.; PROBANZA, A.; GUTTIERREZ-MANERO, F. J.; MEGAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.32, n.11, p.1515-1528, Oct. 2000.
- IGUAL, J. M.; RODRÍGUES-BARRUECO, C.; CERVANTES, E. The effects of aluminium on nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Casuarina cunninghamiana* Miq. *Plant and Soil*, The Hague, v.190, n.1, p.41-46, Mar. 1997.
- LEAL, A. C. *Avaliação de espécies florestais para arborização de cafeeiros no norte do Paraná: efeitos na produtividade e na proteção contra geadas de radiação*. 2004. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, London, v.193, n.1, p.265-275, 1951.
- MASCARUA-ESPARZA, M. A.; VILLA-GONZALEZ, R.; CABALLERO-MELADO, J. Acetylene reduction and indolacetic acid production by *Azospirillum* isolates from Cactaceous plants. *Plant and Soil*, The Hague, v.106, p.91-95, 1988.

- MINAMISAWA, 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*, New York, v.58, n.9, p.2832-2839, 1992.
- RAMÍREZ-SAAD, H.; JANSE, J. D.; AKKERMANS, A. D. L. Root nodules of *Ceanothus caeruleus* contain both the N<sub>2</sub>-fixing Frankia endophyte and a phylogenetically related Nod-/Fix- actinomycete. *Canadian Journal of Microbiology*, Toronto, v.44, n.2, p.140-148, 1998.
- REIS JUNIOR, F. B.; SILVA, M. F.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. 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*, Viçosa, v.28, n.1, p.103-113, Jan./Feb. 2004.
- ROSBROOK, P. A.; REDDELL, P. Isolation of *Frankia* from root nodules of tree species of Casuarina. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, v.27, n.4-5, p.427-429, 1995.
- ROUVIER, C.; PRIN, Y.; REDDELL, P.; NORMAND, P.; SIMONET, P. Genetic diversity among Frankia strains nodulating members of the Family Casuarinaceae in Australia revealed by PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism analysis with crushed root nodules. *Applied and Environmental Microbiology*, New York, v.62, n.3, p.979-985, Mar. 1996.
- ZHANG, Z.; LOPEZ, M. F.; TORREY, J. G. A comparison of cultural characteristics and infectivity of *Frankia* isolates from root nodules of *Casuarina* species. *Plant and Soil*, The Hague, v.78, n.1-2, p.79-90, Feb. 1984.