

Notas Científicas

Composição de exopolissacarídeos produzidos por estirpes de rizóbios cultivados em diferentes fontes de carbono

Tereza Cristina Luque Castellane⁽¹⁾ e Eliana Gertrudes de Macedo Lemos⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Estadual Paulista, Fac. de Ciências Agrárias e Veterinárias, Dep. de Tecnologia, Via de Acesso Prof. Dr. Paulo Donato Castellane, s/nº, CEP 14884-900 Jaboticabal, SP. E-mail: teluque@yahoo.com.br, egerle@fcav.unesp.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes fontes de carbono na composição dos exopolissacarídeos produzidos por *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 e SEMIA 4080, e o efeito da inoculação dessas estirpes na nodulação em feijoeiro. As fontes de carbono utilizadas interferiram nas concentrações de galactose e glicose dos exopolissacarídeos, que foram maior na SEMIA 4080 em meio com sacarose. Embora a SEMIA 4080 tenha liberado grande quantidade de exopolissacarídeos na cultura, não houve diferença entre as estirpes quanto ao número de nódulos do feijoeiro, independentemente da fonte de carbono utilizada no preparo do inóculo. No parâmetro matéria seca de nódulos, houve diferença entre as estirpes, independentemente da fonte de carbono utilizada no preparo do inóculo.

Termos para indexação: *Phaseolus vulgaris*, *Rhizobium tropici*, polissacarídeo extracelular, nodulação.

Exopolysaccharides composition produced by rhizobia under different carbon sources

Abstract – The objective of this work was to evaluate the effect of different carbon sources on the exopolysaccharides composition produced by *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 and SEMIA 4080, and the effect of these strains inoculation on the nodulation in common bean. The carbon sources used interfered on the concentrations of the galactose and glucose of exopolysaccharides, being higher in SEMIA 4080 strain when cultivated in sucrose medium. Even though SEMIA 4080 strain produced a large quantity of exopolysaccharides in culture, there was no difference between strains regarding the number of nodules, independently of the carbon source used for inoculum preparation. However, in the parameter dry weight of nodules there was significant difference between the strains, independently of the carbon sources used for inoculum preparation.

Index terms: *Phaseolus vulgaris*, *Rhizobium tropici*, extracellular polysaccharide, nodulation.

Rhizobium tropici e outras bactérias pertencentes à família Rhizobiaceae são produtores de polissacarídeos extracelulares (EPS) na cultura (Becker & Pühler, 1998). Esses EPS rizobianos são heteropolissacarídeos espécie ou estirpe-específicos, compostos de diferentes tipos de monossacarídeos (Becker & Pühler, 1998). Existem evidências de que a composição de EPS varia, não só entre os diversos gêneros, mas também com mudanças no meio ambiente bacteriano (Karr et al., 2000), e alterações na constituição das unidades repetitivas podem afetar a habilidade simbiótica do bacterióide (Wielbo et al., 2004). Porém, os mecanismos de desenvolvimento simbiótico e de infecção ainda não estão claros e, por isso, existe contínuo interesse em se elucidar a genética,

a biologia molecular e a bioquímica de polissacarídeos extracelulares e de superfície de origem bacteriana.

O trabalho teve por objetivo avaliar a composição dos EPS, produzidos pelas estirpes de *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 e SEMIA 4080, com diferentes fontes de carbono em meio líquido definido para rizóbio (RDM), e a influência dessas bactérias cultivadas nessas fontes de carbono na nodulação do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.).

As bactérias foram adquiridas no banco de estirpes de rizóbio da Fepagro (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, Porto Alegre, RS). A cultura pura, obtida em meio YMA (Vincent, 1970), foi repicada em meio RDM com elementos-traço, vitaminas e glicerol (Bishop

et al., 1976). Para estudar a influência de diferentes fontes de carbono, na composição do EPS das estirpes, foram preparados meios RDM com diferentes fontes de carbono: galactose, glicose e sacarose, na concentração de 10 g L⁻¹. As bactérias foram colocadas em erlenmeyer, com o meio de cultura RDM, e incubadas em agitador rotatório por 144 horas a 140 rpm e 28°C.

Após a incubação, as culturas foram submetidas à centrifugação (10.000 g, a 4°C, por 30 min), e as células foram separadas do sobrenadante. O EPS foi precipitado, tendo-se adicionado dois volumes de álcool etílico 96° gelado. O precipitado foi recuperado por centrifugação, lavado várias vezes com álcool etílico, liofilizado e armazenado em dessecador à temperatura ambiente. Para a composição em monossacarídeo do EPS das estirpes, o EPS bruto foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com o uso da química de marcação dos monômeros com 1-fenil-3-metil-5-pirazolone (Fu & O'Neill, 1995).

O experimento de nodulação foi realizado em casa de vegetação. Sementes de feijão, do cultivar IAC-Carioca, foram desinfetadas e semeadas em vasos de plástico, com capacidade de 1,5 L, com vermiculita esterilizada como substrato de plantio. Após sete dias, foi feito o desbaste, tendo-se deixado uma planta por vaso. Em seguida ao desbaste, realizou-se a inoculação com as estirpes de *R. tropici*, cultivadas nas diferentes fontes de carbono em meio RDM, na concentração de 10⁸ cel mL⁻¹. A inoculação foi realizada, tendo-se adicionado 1 mL da suspensão bacteriana próximo ao colo das plantas.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com os tratamentos no esquema fatorial 2x4, duas estirpes (SEMIA 4077 e SEMIA 4080), quatro fontes de carbono (glicerol, galactose, glicose e sacarose), com quatro repetições. As plantas foram colhidas 31 dias após o plantio, e seus nódulos, depois

de separados, foram contados e secados em estufa com ventilação forçada a 65°C, até atingir massa constante. Os dados de nodulação, bem como os obtidos da composição em monossacarídeos do EPS, foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Os EPS produzidos pelas estirpes de SEMIA 4077 e SEMIA 4080, cultivadas em diferentes fontes de carbono, consistiram predominantemente de galactose e glicose (Tabela 1). Os quatro tipos de meio de cultura tiveram efeitos diferentes (p<0,01), na concentração destes monossacarídeos na composição dos EPS, que foi maior para SEMIA 4080 cultivada em meio com sacarose. Entretanto, SEMIA 4080 cultivada em meio com glicose, apresentou as menores concentrações dos monossacarídeos galactose e glicose, em relação aos demais tratamentos. Também foram observados traços de manose, ramnose, ácido glucurônico e ácido galacturônico, na composição do EPS das estirpes.

Na nodulação do feijoeiro, não se observaram diferenças (p>0,01) entre as estirpes no número de nódulos por planta (Tabela 2). Apesar da grande quantidade de EPS, liberados no meio de cultura pela estirpe SEMIA 4080, não houve diferença significativa entre as estirpes quanto ao número de nódulos nas raízes das plantas de feijoeiro. O fato de as plantas de feijoeiro não terem apresentado diferença no número de nódulos, na presença das duas estirpes, pode estar relacionado à adesão das bactérias às raízes. Em diversos estudos, foi constatado que apenas uma pequena proporção das bactérias presentes no inóculo é capaz de aderir às raízes, embora os sítios de adesão permaneçam insaturados, mesmo em concentrações de 10⁸ cel mL⁻¹ (Pueppke, 1983). Diversos fatores estão envolvidos nessa adesão:

Tabela 1. Composição, em monossacarídeos, dos exopolissacarídeos produzidos pelas duas estirpes de *Rhizobium tropici*, SEMIA 4077 e SEMIA 4080, cultivadas em meio definido com diferentes fontes de carbono, sob agitação por 144 horas a 140 rpm, a 28°C⁽¹⁾.

Estirpe	Fonte de carbono	Manose	Ramnose	Ácido glucurônico		Glicose	Galactose
				(mg L ⁻¹)			
SEMIA 4077	Glicerol	0,2f	0,3d	11,5b	0,2a	96,6g	52,4g
SEMIA 4077	Galactose	1,0c	0,4c	12,4b	0,3a	139,5d	81,5c
SEMIA 4077	Glicose	1,0c	0,3d	11,5b	0,3a	146,5c	78,5d
SEMIA 4077	Sacarose	2,0b	1,0b	12,4b	0,2a	168,0b	89,5b
SEMIA 4080	Glicerol	1,0c	1,0b	12,0b	0,3a	122,5e	62,0e
SEMIA 4080	Galactose	0,3e	0,4c	12,0b	0,3a	113,5f	58,0f
SEMIA 4080	Glicose	0,4f	0,4c	18,0a	0,2a	80,5h	41,0h
SEMIA 4080	Sacarose	4,0a	2,0a	13,0b	0,2a	191,5a	119,0a

⁽¹⁾Médias na coluna seguidas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

a fase de desenvolvimento da cultura bacteriana (Smith & Wollum, 1991); a existência de zonas radiculares mais suscetíveis à nodulação, cuja maior capacidade de aderência ocorre somente por algumas horas (Smith & Wollum, 1989).

A ausência de efeito das estirpes no número de nódulos justifica os valores baixos obtidos para os coeficientes de variação (Tabela 2), porém a nodulação foi adequada, uma vez que a espécie *R. tropici* é considerada referencial e utilizada na maioria das pesquisas; também é recomendada para a produção de inoculante rizobiano em feijão no Brasil (Chueire et al., 2000).

Entretanto, no parâmetro matéria seca de nódulos, foram observadas diferenças significativas entre as estirpes SEMIA 4077 e SEMIA 4080, independentemente da fonte de carbono utilizada para o preparo do inóculo ($p < 0,01$). A cultivar estudada, IAC-Carioca, apresentou maior massa de matéria seca nodular com a estirpe SEMIA 4080 (Tabela 2). A estirpe SEMIA 4077 apresentou pior desempenho quanto à matéria seca dos nódulos, considerando-se qualquer fonte de carbono utilizada no cultivo. Franco et al. (2002) determinaram a capacidade de nodulação e a especificidade de feijão dos conjuntos gênicos andino e meso-americano, submetidos à inoculação com *Rhizobium*, e verificaram que em nenhuma cultivar houve destaque da estirpe

R. tropici CIAT 899 (=SEMIA 4077), em relação à produção de massa nodular. Andriolo et al. (1994) observaram que há correlação positiva entre número e massa de nódulos. Entretanto, neste trabalho com a cultivar IAC-Carioca, detectaram-se apenas efeitos das estirpes, independentemente da forma de preparo do inóculo, em relação à matéria seca dos nódulos.

De acordo com os resultados observados, ocorrem variações apenas nas proporções dos monossacarídeos, encontrados na composição dos EPS das estirpes avaliadas, em consequência das alterações na fonte de carbono presente no meio de cultura. Portanto, não ocorrem alterações na constituição das unidades repetitivas dos EPS dessas estirpes. Neste trabalho, também se observou que ocorre uma nodulação efetiva das plantas de feijoeiro, induzidas pelos rizóbios estudados.

Agradecimentos

À Fapesp, pela concessão de bolsa.

Referências

- ANDRIOLO, J.; PEREIRA, P.A.A.; HENSON, R.A. Variabilidade entre linhas de formas silvestres quanto a características relacionadas com a fixação biológica de N_2 . **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, p.831-837, 1994.
- BECKER, A.; PÜHLER, A. Production of exopolysaccharides. In: SPAINK, H.P.; KONDOROSI, A.; HOOYKAAS, J.J. (Ed.). **The Rhizobiaceae**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p.97-118.
- BISHOP, P.E.; GUEVARA, J.G.; ENGELKE, J.A.; EVANS, J.H. Relation between glutamine synthetase and nitrogenase activities in the symbiotic association between *Rhizobium japonicum* and *Glycine max*. **Plant Physiology**, v.57, p.542-546, 1976.
- CHUEIRE, L.M. de O.; BANGEL, E.; FERREIRA, M.C.; GRANGE, L.; CAMPO, R.J.; MOSTASSO, F.L.; ANDRADE, D. de S.; PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M. **Classificação taxonômica, baseada na caracterização molecular das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas de soja e do feijoeiro**. Londrina: Embrapa Soja, 2000. 32p.
- FRANCO, M.C.; CASSINI, S.T.A.; OLIVEIRA, V.R.; VIEIRA, C.; TSAI, S.M. Nodulação em cultivares de feijão dos conjuntos gênicos andino e meso-americano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.1145-1150, 2002.
- FU, D.; O'NEILL, R.A. Monosaccharide composition analysis of oligosaccharides and glycoproteins by high performance liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, v.227, p.377-384, 1995.

Tabela 2. Número de nódulos e matéria seca de nódulos em cultivar de feijão IAC Carioca, submetida à inoculação das estirpes de *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 e SEMIA 4080 (médias de quatro repetições)⁽¹⁾.

Tratamento ⁽²⁾	Fonte de carbono	Nº de nódulos por planta	Matéria seca de nódulos (mg planta ⁻¹)
Test. s/inoc. ⁽³⁾		-	-
SEMIA 4077	Glicerol	162a	33b
SEMIA 4077	Galactose	181a	33b
SEMIA 4077	Glicose	162a	41b
SEMIA 4077	Sacarose	150a	41b
SEMIA 4080	Glicerol	162a	55a
SEMIA 4080	Galactose	166a	59a
SEMIA 4080	Glicose	174a	60a
SEMIA 4080	Sacarose	173a	56a
CV (%)		14,05	33,37
Média		166	47

⁽¹⁾Médias na coluna seguidas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. ⁽²⁾Inoculante preparado com estirpes cultivadas, multiplicadas separadamente em meio definido com diferentes fontes de carbono, a 28°C, sob agitação constante de 140 rpm, até serem obtidas 10^8 células mL⁻¹. ⁽³⁾Não considerado na análise estatística.

KARR, D.B.; LIANG, R.T.; REUHS, B.L.; EMERICH, D.W. Altered exopolysaccharides of *Bradyrhizobium japonicum* mutants correlate with impaired soybean lectin binding, but not with effective nodule formation. **Planta**, v.211, p.218-226, 2000.

PUEPPKE, S.G. *Rhizobium* infection threads in root hairs of *Glycine max* (L.) Merr., *Glycine soja* Sieb. and Zucc., and *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Canadian Journal of Microbiology**, v.29, p.69-76, 1983.

SMITH, G.B.; WOLLUM, A.G. Bacterial culture history affects the attachment of *Bradyrhizobium japonicum* to host *Glycine max* roots. **Canadian journal of microbiology**, v.37, p.730-736, 1991.

SMITH, G.B.; WOLLUM, A.G. Nodulation of *Glycine max* by six *Bradyrhizobium japonicum* strains with different competitive abilities. **Applied Environmental Microbiology**, v.55, p.1957-1962, 1989.

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

WIELBO, J.; MAZUR, A.; KROL, J.; MARCZAK, M.; KUTKOWSKA, J.; SKORUPSKA, A. Complexity of phenotypes and symbiotic behaviour of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* exopolysaccharide mutants. **Archives of Microbiology**, v.182, p.331-336, 2004.

Recebido em 25 de maio de 2007 e aprovado em 19 de setembro de 2007