



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

AMANDA KAROLINE FIORI

**MUTAGÊNESE E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE MUTANTES  
DE *Rhizobium tropici* RESISTENTES A AZIDA**

---

Londrina  
2018

AMANDA KAROLINE FIORI

**MUTAGÊNESE E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE MUTANTES  
DE *Rhizobium tropici* RESISTENTES A AZIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisete Pains Rodrigues.

Londrina  
2018

AMANDA KAROLINE FIORI

**MUTAGÊNESE E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE MUTANTES  
DE *Rhizobium tropici* RESISTENTES A AZIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisete Pains Rodrigues  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Simões de Almeida  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniele Sartori  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 26de Setembrade 2018.

Dedico este trabalho a toda minha  
família e amigos.

## AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual de Londrina, ao Departamento de Ciências Biológicas e ao programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM), por todo suporte ao desenvolvimento deste trabalho que possibilitaram meu crescimento profissional e pessoal, bem como ao Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) e seus respectivos professores, alunos e funcionários que se mostraram sempre à disposição em colaborar;

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro;

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisete Pains Rodrigues pela excelente orientação, ensinamentos, diretrizes, incentivo, amizade, se tornando um exemplo ético e profissional, meu muitíssimo obrigada.

À banca examinadora, pela disponibilidade e pelas sugestões que contribuíram para melhoria deste manuscrito.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Diva de Souza Andrade, pela disponibilidade de seus laboratórios, muito útil para o desenvolvimento do meu trabalho, bem como aos seus alunos Alisson Wilson dos Santos Sanzovo e Kelly Goes por todo auxílio.

Aos meus queridos pais, José Odair e Aurea, por todo amor e carinho que não me deixaram desanimar diante dos problemas, à minha irmã Ana Paula e aos meus sobrinhos Arthur e Felipe pela colaboração, ajuda e paciência que tiveram ao longo desta caminhada, sendo muito importante para mim.

Ao meu namorado Cássio Henrique Bragante, que em tão pouco tempo soube me esperar e mostrou ser uma pessoa espetacular, nunca negando ajuda e contribuindo muito com seu conhecimento.

Aos ICs Jéssica, Giovana, Ariane e Emanuely pela amizade e contribuição significativa à realização deste trabalho. Aos meus amigos do PPGBM Luana, Cátia, Ilmara, Ana Camila, Dorival, Gilberto pelo auxílio nas atividades laboratoriais, pela amizade, companheirismo, pelos bons momentos vividos; ao técnico de laboratório Ideval Azarias.

À muitos outros amigos conquistados de outros laboratórios que tornaram esse tempo de pesquisa prazeroso e descontraído.

À Deus pelo dom da vida e oportunidade de viver cada momento dessa trajetória.

Serei eternamente grata.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

José de Alencar

FIORI, Amanda Karoline. **Mutagênese e eficiência simbiótica de mutantes de *Rhizobium tropici* resistentes a azida**, 2018. 72f. Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

Os rizóbios são bactérias simbióticas muito conhecidas e estudadas devido à sua capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) quando em simbiose com plantas leguminosas, como o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). O nitrogênio (N) é um nutriente essencial para o crescimento e produtividade dos organismos vivos e as plantas demandam grandes quantidades deste nutriente para seu desenvolvimento e produtividade. A simbiose entre rizóbio e plantas leguminosas é manifestada pela formação de nódulos radiculares, nas quais essas bactérias fixam o nitrogênio atmosférico em benefício da planta recebendo em troca, nutrientes e proteção contra estresses bióticos e abióticos. O feijão é reconhecidamente uma importante fonte de proteína na dieta da população brasileira, sendo o Brasil um dos principais produtores e consumidores deste grão. A eficiência de fixação biológica de nitrogênio (FBN) em feijão tem suas limitações e estas podem ser atribuídas ao melhoramento da planta sob fertilização nitrogenada, à elevada competitividade e baixa eficiência de FBN de estirpes presentes do solo e a suscetibilidade do feijoeiro à doenças e estresses ambientais. Melhorias na simbiose *Rhizobium*-feijão necessitam ser implementadas para aumentar a eficiência simbiótica e a FBN, visando elevar a produtividade desta cultura e diminuir os custos com fertilizantes. Uma das abordagens que pode ser utilizada é o melhoramento de estirpes de rizóbio para aumento da eficiência simbiótica, nodulação e FBN por meio da mutagênese e seleção de estirpes melhoradas. A azida sódica ( $NaN_3$ ) é um dos mais potentes agentes mutagênicos utilizados em plantas e em bactérias e seu uso, como agente de seleção em bactérias, principalmente rizóbios, tem possibilitado a obtenção de mutantes resistentes com maior eficiência simbiótica e capacidade de FBN. Devido à importância de se melhorar as relações simbióticas entre rizóbios e leguminosas, o presente trabalho teve como objetivo obter mutantes de *Rhizobium tropici* CIAT 889 resistentes a azida sódica e avaliar características fisiológicas importantes para simbiose e a eficiência simbiótica em plantas de feijão. Como resultado desse processo, obteve-se seis mutantes (AzR14, AzR15, AzR16, AzR17, AzR18 e AzR19) que foram caracterizados com relação à formação de biofilme, produção de polissacarídeo, motilidade (*Swarming*) e produção de auxina e tiveram a eficiência simbiótica avaliada em três experimentos de inoculação, revelando que as plantas inoculadas com os mutantes AzR17, 18 e 19 obtiveram resultados superiores ou semelhantes à estirpe selvagem CIAT 899. Estes resultados mostram que a resistência a azida sódica em *Rhizobium tropici* possibilita a seleção de mutantes com maior eficiência simbiótica e pode ser aplicada para melhorias da simbiose *Rhizobium tropici*-feijão visando o desenvolvimento de biofertilizantes mais eficientes para a cultura do feijoeiro e a redução do custo e dos danos relacionados ao uso de fertilizantes nitrogenados na agricultura.

**Palavras-chave:** Simbiose. Leguminosa. FBN. Agricultura sustentável. Melhoramento genético.

FIORI, Amanda Karoline. **Mutagenesis and symbiotic efficiency of *Rhizobium tropici* mutants resistant to azide**. 2018. 72f. Dissertation of the Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology - Londrina State University, Londrina, 2018.

## ABSTRACT

Rhizobia are symbiotic bacteria that are well known and studied because of their ability to fix atmospheric nitrogen ( $N_2$ ) when in symbiosis with leguminous plants, such as common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Nitrogen (N) is an essential nutrient for the growth and productivity of living organisms and plants require large amounts of this nutrient for their development and productivity. The symbiosis between rhizobia and leguminous plants is manifested by the formation of root nodules, in which these bacteria fix the atmospheric nitrogen to the benefit of the plant receiving in return, nutrients and protection against biotic and abiotic stresses. Bean is an important source of protein in the diet of the Brazilian population, Brazil being one of the main producers and consumers of this grain. The efficiency of biological fixation nitrogen (BFN) in beans has its limitations and these can be attributed to the improvement of the plant under nitrogen fertilization, to the high competitiveness and low efficiency of BFN of present soil strains and the susceptibility of common bean to diseases and stresses environmental impacts. Improvements in Rhizobium-bean symbiosis need to be implemented to increase symbiotic efficiency and BNF, in order to raise crop productivity and lower fertilizer costs. One of the approaches that can be used is the improvement of rhizobia strains for increased symbiotic efficiency, nodulation and BFN by mutagenesis and selection of improved strains. Sodium azide ( $NaN_3$ ) is one of the most potent mutagenic agents used in plants and bacteria and its use as a bacterial selection agent, mainly rhizobia, has made it possible to obtain resistant mutants with higher symbiotic efficiency and BFN capacity. Due to the importance of improving the symbiotic relationships between rhizobia and legumes, the present work aimed to obtain mutants of *Rhizobium tropici* CIAT 889 resistant to sodium azide and to evaluate important physiological characteristics for symbiosis and symbiotic efficiency in bean plants. As a result of this process, six mutants (AzR14, AzR15, AzR16, AzR17, AzR18 and AzR19) were obtained which were characterized with respect to biofilm formation, production of polysaccharide, swarming and auxin production and had the symbiotic efficiency evaluated in three experiments of inoculation, revealing that the plants inoculated with the AzR17, 18 and 19 mutants obtained superior or similar results to the wild-type CIAT 899 strain. These results show that resistance to sodium azide in *Rhizobium tropici* makes it possible to select mutants with greater symbiotic efficiency and may be applied for *Rhizobium tropici*-bean symbiosis improvements aiming at the development of more efficient biofertilizers for the bean crop and the reduction of costs and damages related to the use of nitrogen fertilizers in agriculture.

**Key words:** Symbiosis. Leguminous. BFN. Sustainable agriculture. Genetic improvement.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b>	Tolerância dos mutantes resistentes AzR de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 à azida sódica .....	47
<b>Tabela 2:</b>	Produção de auxina por CIAT 899 e mutantes AzR, crescimento a DO <sub>600nm</sub> e produção de AIA .....	51
<b>Tabela 3:</b>	Características simbióticas de CIAT 899 e mutantes AzR do experimento 1 .....	53
<b>Tabela 4:</b>	Características simbióticas de CIAT 899 e mutantes AzR do experimento 2 .....	55
<b>Tabela 5:</b>	Características simbióticas de CIAT 899 e mutantes AzR do experimento 3 .....	57

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO

<b>Figura 1:</b>	Estabelecimento da simbiose rizóbio-leguminosa.....	16
<b>Figura 2:</b>	Representação esquemática das etapas realizadas no processo de evolução dirigida.. .....	23

### ARTIGO

<b>Figura 1:</b>	Crescimento de CIAT 899 em diferentes concentrações de azida sódica (0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 µg/mL).....	45
<b>Figura 2:</b>	Mutantes de CIAT 899 resistentes a azida sódica obtidos em meio de cultivo YM com 15 ou 20 µg/mL de azida sódica. ....	46
<b>Figura 3:</b>	Formação de biofilme de CIAT 899 e das estirpes resistentes à azida (colunas azuis) e crescimento de CIAT899 e das estirpes resistentes à azida (colunas vermelhas) .....	48
<b>Figura 4:</b>	Teste de motilidade de Swarming realizado em meio Ym com 0,7% de ágar da estirpe CIAT 899 e os mutantes AzR .....	49
<b>Figura 5:</b>	Atividade de locomoção (Swarming) de mutantes resistentes a azida e CIAT 899.....	49
<b>Figura 6:</b>	Produção de auxina no intervalo de 48 h de cultivo em DO <sub>600nm</sub> de CIAT899 e AzR .....	50
<b>Figura 7:</b>	Curva de crescimento de CIAT 899 e mutantes AzR em DO <sub>600nm</sub> .....	50
<b>Figura 8:</b>	Análise de produção de polissacarídeo. Crescimento da cultura em meio YM a 28°C em 48horas .....	52
<b>Figura 9:</b>	Análise de PCA de variáveis de crescimento de planta de feijão inoculadas com mutantes de CIAT899 resistentes a azida sódica experimento 1 .....	54
<b>Figura 10:</b>	Análise de PCA de variáveis de crescimento de planta de feijão inoculadas com mutantes de CIAT899 resistentes a azida sódica experimento 2 .....	56
<b>Figura 11:</b>	Análise de PCA de variáveis de crescimento de planta de feijão inoculadas com mutantes de CIAT899 resistentes a azida sódica experimento 3 .....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIA	Ácido indol-3- acético
ANDA	Associação Nacional para Difusão de Adubos
BPCV	Bactérias promotoras do crescimento vegetal
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DO	Densidade Ótica
EFIFBN	Eficiência da fixação de nitrogênio
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
Fe	Ferro
GS	Glutamina Sintetase
K	Potássio
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
MMS	Metil metano sulfonato
Mo	Molibdênio
MSN	massa seca de nódulo
MSPA	Massa seca da parte aérea
MSR	Massa seca da raiz
N	Nitrogênio
NAC	Nitrogênio acumulado
NACrelativo	Nitrogênio acumulado relativo
NN	Número de nódulos
NTOTAL	Nitrogênio Total
OGM	Microrganismo Geneticamente Modificado
P	Fósforo
PCA	Análise de componente principal
rpm	Rotações por minuto
S	Enxofre

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>REVISÃO TEÓRICA</b> .....	11
1.1.	Cultura do feijoeiro ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) .....	11
1.2.	Fixação Biológica de Nitrogênio .....	12
1.3.	Simbiose e FBN em leguminosas.....	15
1.4.	Inoculação de bactérias simbióticas ( <i>Rhizobium tropici</i> e <i>Rhizobium freirei</i> ) na cultura do feijoeiro ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	18
1.5.	Melhoramento genético por mutação para melhorar a capacidade de FBN.....	20
1.6.	FBN e resistência a azida.....	23
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	25
2.1.	Objetivo geral .....	25
2.2.	Objetivos específicos.....	25
<b>3.</b>	<b>ARTIGO</b> .....	33

## 1. REVISÃO TEÓRICA

### 1.1. Cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*L.)

As plantas leguminosas (Fabaceae; Leguminosae) estão entre as maiores famílias botânicas e são caracterizadas pela ocorrência de seus frutos do tipo legume, amplamente utilizados na alimentação humana. Essas leguminosas são componentes importantes dos sistemas agrícolas em todo o mundo e fornecem alimentos ricos em proteínas, como os grãos de soja [*Glycine max* (L.) Merrill], feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e forrageiras, importantes na alimentação humana e animal, além de serem utilizados na produção de madeira, na melhoria da fertilidade do solo, na proteção da cobertura do solo contra a erosão e como adubos verdes (HOWIESON & DILWORTH, 2016).

No Brasil, uma leguminosa que se destaca não só no aspecto econômico, mas também por ser um fator de segurança alimentar e nutricional para a população, é o feijoeiro (BARBOSA, et al., 2012). O feijão é um dos principais constituintes da dieta do brasileiro sendo uma excelente fonte proteica e um produto agrícola de grande importância econômico-social (SOARES, 2006).

Segundo a CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento 2018), o consumo nacional estimado de feijão para a safra 2017/18 é de cerca de 3,3 milhões de toneladas que é abastecido pela produção nacional obtida de diferentes regiões brasileiras, principalmente dos estados do Paraná (PR) e Minas Gerais (MG).

Assim como outras culturas agrícolas, um dos fatores limitantes para a produtividade do feijoeiro é a baixa disponibilidade de alguns nutrientes no solo, principalmente o nitrogênio (N) (BARBOSA et al.,2006). As leguminosas, por acumularem bastante proteína em seus grãos, necessitam de grandes quantidades de N para se desenvolverem. Para o seu desenvolvimento e produtividade, o feijoeiro necessita de grandes quantidades de fertilizantes nitrogenados que pode variar de 60 a 150 kg ha<sup>-1</sup> dependendo da época de plantio, da quantidade e do tipo de resíduo deixado na superfície do solo pela cultura anterior e da expectativa de produtividade de grãos (CARVALHO, 2008). Devido às exigências nutricionais e para manter os elevados níveis de produtividade das culturas agrícolas, o fornecimento de N é feito usualmente via fertilizantes nitrogenados (PELEGRIN, et

al., 2009). Segundo a Associação Nacional para Difusão de Adubos (ANDA), no ano de 2017 foram entregues ao mercado cerca de 34 toneladas de fertilizantes nos estados brasileiros. Na cultura do feijão, as análises dos custos de produção indicam que os componentes de maior peso no cultivo no Brasil são os fertilizantes, agrotóxicos, operações com máquinas e sementes, que variam de 55 a 74%, conforme o estado produtor (CONAB, 2016).

## **1.2. Fixação Biológica de Nitrogênio**

O nitrogênio (N), apesar de ser o nutriente mais abundante na atmosfera (cerca de 80%), encontra-se sob a forma de gás  $N_2$ , o qual não pode ser diretamente assimilado sendo, portanto, indisponível para o metabolismo, crescimento e reprodução das plantas (DÖBEREINER, 1997). A entrada de N nos sistemas biológicos depende da conversão do  $N_2$  em formas assimiláveis pelas plantas, as quais podem ocorrer por processos naturais como as descargas elétricas (GRUBER & GALLOWAY, 2008) e a fixação biológica de nitrogênio (FBN) (MCGLYNN, et al., 2013), ou por processos industriais (Haber-Bosch) utilizados na fabricação de fertilizantes químicos (HABER, 1922; HABER, 1923).

Na fixação via descargas elétricas, os gases oxigênio e nitrogênio podem ser combinados pelo calor gerado pelas descargas elétricas, dando origem ao óxido de nitrogênio, que ao reagir com água da chuva produz ácido nítrico. Essa é uma forma natural de produção de nitrato, que é absorvível pelos seres vivos (HOBBS, 2000).

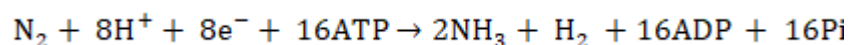
O processo industrial utilizado na produção de fertilizantes nitrogenados tem um custo elevado, já que o processo Haber-Bosch requer hidrogênio derivado de gás de petróleo, emprega ferro metálico como catalisador e depende de altas temperaturas ( $\sim 500^\circ\text{C}$ ) e pressões (200-600 atm) para combinar  $N_2$  e  $H_2$  e produzir amônia em grande escala (HABER, 1922; HABER, 1923). As condições drásticas e a necessidade de um catalisador no processo Haber-Bosch são exigidas devido à alta estabilidade da molécula de  $N_2$  em condições ambientes. Apesar de a reação envolvida ser exotérmica e termodinamicamente favorecida, a quebra da tripla ligação entre as moléculas de N requer uma energia de ativação bastante alta (1035 kJ/mol) (NUNES, et al, 2003).

A adição de N na forma de fertilizante químico tem elevado custo para o agricultor e seu uso é, muitas vezes, pouco eficiente, uma vez que grande parte dos

fertilizantes acaba não sendo absorvido de maneira apropriada pelas plantas devido a perdas por processos de lixiviação, desnitrificação e, sobretudo, em decorrência de perdas desse elemento causadas por práticas inadequadas, como a perda de NH<sub>3</sub> por volatilização quando este adubo é aplicado superficialmente (HUNGRIA et al., 2007).

Uma forma alternativa para substituir os fertilizantes nitrogenados é por meio da fixação biológica de nitrogênio (FBN), um processo que converte nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>) em uma forma assimilável (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), a qual pode ser assimilada pelas plantas (HAAG et al., 2013; SHIN, 2016). A FBN é realizada pelo complexo enzimático nitrogenase, presente apenas em algumas bactérias denominadas diazotróficas. Dada a sua importância, este processo é amplamente distribuído entre as diversas classes de bactérias, sendo a maquinaria genética e bioquímica que possibilita a FBN é altamente conservada entre as bactérias diazotróficas.

A nitrogenase consiste em duas proteínas distintas, a dinitrogenase e a dinitrogenase redutase (HUNGRIA et al., 2001; RUMJANEK et al., 2005), as quais contêm em sua estrutura ferro (ambas possuem) e molibdênio (dinitrogenase redutase) que constituem o cofator denominado FeMo-Co onde ocorre redução do N<sub>2</sub> (TAIZ & ZIEGER, 2004). A reação catalisada pelo complexo da nitrogenase pode ser resumida da seguinte forma:



Como demonstrado na equação, a FBN é um processo muito dispendioso, pois para cada elétron transferido da Fe-proteína para a MoFe-proteína são consumidos 2 ATPs. Assim, para reduzir uma molécula de N<sub>2</sub> são necessários oito elétrons e, portanto, 16 ATPs (TAIZ & ZIEGER, 2004). A amônia resultante da redução do N<sub>2</sub> é posteriormente incorporada à compostos orgânicos, na forma de glutamina, sendo essa reação catalisada pela enzima glutamina sintetase (GS), que atua na síntese de aminoácidos (HAYWARD et al., 2009). Segundo estimativas feitas por Galloway e colaboradores (2004) a FBN em sistemas terrestres naturais adicionará até o ano de 2050, 98 Teragrama de N por ano. A FBN é, portanto, um processo crucial do ponto de vista ambiental e agrícola, sendo o segundo processo biológico mais importante do planeta, logo após a fotossíntese (OLIVARES, et al., 2013). No cenário agrônômico, a FBN é de extrema importância, pois reduz a

necessidade de aplicação de fertilizantes nitrogenados e a poluição ambiental causada por esses insumos, tendo, portanto, efeito direto na economia e na saúde humana e ambiental (BARBOSA et al., 2012).

A capacidade de fixar  $N_2$  confere uma vantagem ecológica significativa às plantas capazes de fazer associações simbióticas, como as leguminosas (TAIZ & ZIEGER, 2004). Condições, tais como, baixos níveis de energia disponível, altos níveis de  $O_2$  no local de fixação (nitrogenase é sensível ao  $O_2$ ), altos níveis de N reativo no meio e baixa disponibilidade de outros recursos, especialmente fósforo (P), ferro (Fe), potássio (K) e molibdênio (Mo), podem afetar a FBN direta ou indiretamente e, conseqüentemente, o crescimento da planta hospedeira (VITOUSEK, 2013). Devido aos altos requerimentos de ATP para a função da nitrogenase, a disponibilidade de P é crucial para a atividade do nódulo e desempenha um papel na transdução de sinal, na biossíntese de membranas e no desenvolvimento e função dos nódulos. Assim como o K que está relacionado ao crescimento e função dos nódulos e a atividade de enzimas envolvidas na assimilação de amônia, suprimento de carbono e transdução de energia. A oferta de enxofre (S) relaciona-se ao teor de nitrogenase e leghemoglobina em nódulos. Como a leghemoglobina mantém uma baixa concentração de  $O_2$  livre dentro do nódulo, baixas concentrações dessa proteína podem resultar em maior concentração de  $O_2$  que é tóxico para a nitrogenase (SCHERER et al., 2008; VARIN et al., 2009; DIVITO & SADRAS, 2014).

A FBN é um processo multigênico e regulada por vários fatores. A síntese de cofator FeMo da nitrogenase é codificada pelos genes *nif* (do inglês *nitrogen fixation*), homólogos àqueles originalmente descritos em *Klebsiella pneumoniae* (ARNOLD, 1988), uma bactéria fixadora de vida livre amplamente estudada que foi a primeira diazotrófica com genes *nif* identificada e caracterizada (SOFT, 2007; ANDREWS et al., 2009). Outra classe de genes são os genes *fix*. Os genes *nif* e *fix* estão localizados em clusters distintos, cuja ordem e localização precisas são espécies específicas (ANDREWS, et al., 2009). Os genes *fixABCX* codificam os componentes de uma cadeia de transporte de elétrons, genes *fixNOQP* e *fixGHIS* são necessários para a produção e montagem de ccb3 (citocromo oxidase ligada à membrana) (FISCHER, 1994; ANDREWS, et al., 2009; DE MEYER, 2016).

### 1.3. Simbiose e FBN em leguminosas

A simbiose entre leguminosas e rizóbios é um exemplo de interação biológica intensamente estudada, cujos benefícios para a sustentabilidade agrícola são reconhecidos devido ao processo de FBN (XAVIER, 2006).

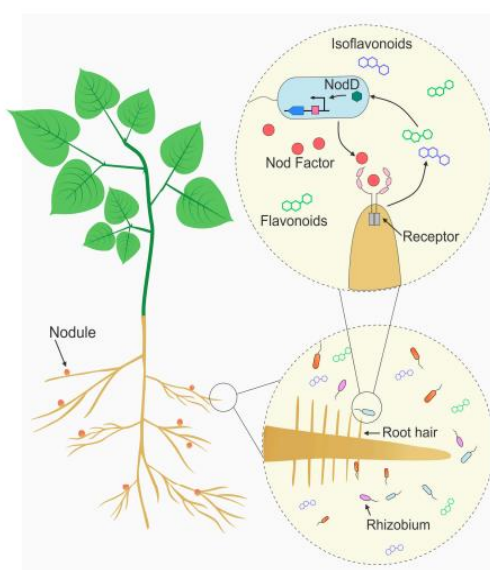
A FBN simbiótica envolve diferentes hospedeiros (leguminosas) e bactérias popularmente denominadas de rizóbios que compreendem espécies de  $\alpha$ -proteobactérias dos gêneros *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Neorhizobium*, *Rhizobium*, '*Pararhizobium*', *Shinellae* *Sinorhizobium* (= *Ensifer*), e espécies de  $\beta$ -proteobactérias dos gêneros *Paraburkholderia* e *Cupriavidus* (NISTE, 2013; HOWIESON & DILWORTH, 2016).

Para que haja a interação simbiótica entre a leguminosa hospedeira e a bactéria é preciso compatibilidade entre eles e um ambiente do solo apropriado para a troca de sinais, um diálogo molecular entre os dois parceiros simbióticos que precede a infecção das raízes (HERRIDGE, 2008). Isso porque tanto fatores bióticos e os abióticos podem atuar sobre a bactéria e/ou sobre o hospedeiro afetando o processo e o estabelecimento da simbiose (HOWIESON & DILWORTH, 2016). Entre as interações simbióticas mais bem estudadas podem-se citar aquelas que ocorrem entre as espécies de *Bradyrhizobium* e a soja (ARAÚJO & HUNGRIA, 1999) e aquelas entre as espécies de *Rhizobium* que nodulam o feijoeiro (MARTÍNEZ-ROMERO, et al., 1991).

A simbiose rizóbio-leguminosa leva ao desenvolvimento de nódulos radiculares, órgãos especializados onde os rizóbios se diferenciam em bacteroides e fixam o  $N_2$  atmosférico. Em troca, a planta supre a bactéria com fontes de energia e carbono para sua sobrevivência e a protege de estresses bióticos e abióticos (MERCANTE et al, 2002; JONES et al., 2007). No processo inicial de estabelecimento da simbiose, os rizóbios respondem aos exsudatos radiculares, em especial aos compostos flavonóides e isoflavonóides, secretados por raízes de leguminosas, com a síntese de outros sinais moleculares, como o exopolissacarídeo (EPS), lipopolissacarídeo (LPS), o lipo-oligossacarídeo (LOS) ou oligossacarídeos lipoquitínicos (LCOs), denominados de Fatores Nod, polissacarídeo capsular (CPS), polissacarídeo nodular (NPS) e a  $\beta$ -glucana cíclica 2 entre outros, que têm sido considerados prováveis biomoléculas responsáveis pelo reconhecimento e interação

célula/célula permitindo uma simbiose com células de plantas da família Leguminosae (FRAYSSE et al., 2003).

Esses compostos ativam o fator de transcrição da proteína de nodulação D (NodD) em rizóbios específicos e compatíveis, induzindo a transcrição de genes *nod*, que são necessários para a síntese de fatores Nod, ou lipoquitiligosacarídeos (LCOs). Estes desencadeiam na planta hospedeira uma via de sinalização que é necessária para a infecção e o desenvolvimento do nódulo, local onde as bactérias serão alocadas e realizarão a FBN (BROUGHTON, et al. 2006; CLÚA, et al., 2018) (Figura 1).



**Figura 1:** Estabelecimento da simbiose rizóbio-leguminosa. Fonte: CLUA, et al., 2018.

As diferentes fases do estabelecimento da simbiose, ou seja, a colonização da rizosfera, entrada nas raízes, organogênese dos nódulos, infecção de células nodulares e, por fim, a fixação de nitrogênio, dependem da troca de muitos sinais moleculares e metabólitos que envolvem muitos genes (REMIGI, et al., 2016). O ácido indol-3- acético (AIA) é a auxina mais efetiva nos fenômenos fisiológicos, incluindo na nodulação de leguminosas, sendo relatado sua atuação durante os estágios iniciais do processo de infecção, no encurvamento do pelo radicular, no desenvolvimento do cordão de infecção, iniciação e diferenciação de nódulos (PII et al., 2007; MATHESIUS, 2008).

Tanto os genes de bactérias como os da planta hospedeira são necessários para o estabelecimento de uma simbiose eficaz entre esses organismos. No entanto, toda a informação genética (genes *nif*, *fix* e *nod*) necessária para a formação de um

complexo funcional da enzima nitrogenase para reduzir  $N_2$  em amônia e aqueles envolvidos na simbiose, estão localizados no genoma bacteriano frequentemente, dentro de plasmídeos (SHARMA, 1997; GALIBERT et al., 2001). Em *Sinorhizobium meliloti*, por exemplo, os genes envolvidos na biossíntese de fatores de nodulação (*nod*, *nol*, *noe*) e na fixação de nitrogênio (*nif* e *fix*) estão localizados no plasmídeo pSymA, enquanto outros genes necessários para a biossíntese de exopolissacarídeo, fator importante no processo simbiótico, estão localizadas no plasmídeo pSymB (GALIBERT et al., 2001). A transferência horizontal desses elementos genômicos pode ser observada entre bactérias presentes na rizosfera, contribuindo para a distribuição da capacidade simbiótica, convertendo bactérias não simbióticas por meio de um único evento de transferência (BARCELLOS et al., 2007).

Para que a FBN ocorra de forma eficiente é preciso que ocorra colonização de raízes de forma eficiente pelos rizóbios, para isso é preciso motilidade bacteriana e quimiotaxia (POOLE, et al., 2018). A motilidade de *swarming* refere-se ao movimento coordenado de grupos de células bacterianas em superfícies semi-sólidas em que esse movimento pode desempenhar um papel importante na colonização de ambientes naturais por bactérias (TAMBALO et al., 2010). O biofilme é uma associação complexa de células bacterianas ligadas a substrato biótico ou abiótico que podem reter a umidade e proteger as raízes das plantas de vários patógenos. A formação de biofilme e a produção de exopolissacarídeos por linhagens bacterianas contribuem significativamente para a fertilidade do solo e melhoram o crescimento das plantas (QURASHI & SABRI, 2012), pois permite que a bactéria do solo colonize o hospedeiro e sobreviva a estresses ambientais e com a limitação de nutrientes e está relacionado ao processo da nodulação (RINAUDI & GIORDANO, 2010).

Desse modo, pode-se dizer que a simbiose entre rizóbio e leguminosa é um processo complexo e que requer a interação de vários fatores para que ocorra de forma eficiente.

#### **1.4. Inoculação de bactérias simbióticas (*Rhizobium tropici* e *Rhizobium freirei*) na cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**

Em termos econômicos, o exemplo clássico de vantagens obtido com o uso de inoculantes fixadores de nitrogênio é o caso da inoculação da soja brasileira, cujas sementes são inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium* selecionadas, o que substitui totalmente a adubação nitrogenada. Essa prática proporcionou na safra 2006/2007 uma economia de 3,3 bilhões de dólares (SOUSA & MOREIRA, 2011). Quando comparada à soja, a eficiência da FBN em feijão é menor. O feijão é considerado um hospedeiro promíscuo e pode ser nodulado por diferentes espécies existentes no solo levando, muitas vezes, a respostas inconsistentes da inoculação com rizóbio nesta cultura, comum em condições de campo (BRITO et al., 2015).

As espécies de rizóbios recomendadas comercialmente para inoculação em feijão é o *Rhizobium tropici* estirpe comercial SEMIA 4077 (CIAT899) e *Rhizobium freirei*, estirpe comercial SEMIA 4080 (PRF81) (HUNGRIA et al., 2000).

A estirpe PRF81 foi inicialmente classificada como *R. tropici* com base em análises do rRNA 16S e a grande similaridade com a estirpe tipo da espécie, CIAT899 (HUNGRIA et al., 2000). Em 2009, Ribeiro e colaboradores (2009) por meio de análises de MLST (*Multilocus sequence typing*) observaram uma grande diferença entre os genomas PRF81 e CIAT899 o que levou a reclassificação como uma nova espécie, *Rhizobium freirei*, em homenagem a João Ruy Jardim Freire, um rizobiologista brasileiro (DALL'AGNOL et al., 2013).

Além do feijoeiro, estas bactérias estabelecem simbiose e fixam nitrogênio com uma gama de plantas leguminosas de regiões da América do Sul e África. Ambas as estirpes exibem resistência intrínseca a várias condições de estresse abióticos, como baixo pH do solo e altas temperaturas, que são comuns em ambientes tropicais e apresentam resistência à vários agentes antimicrobianos e pesticidas, por isso o interesse no conhecimento desses microrganismos (ORMEÑO-ORRILLO, 2012).

Os benefícios providos pela inoculação de feijoeiro comum com as estirpes CIAT 899 e PRF 81 têm sido evidenciados em vários estudos realizados no Brasil e em outros países. Em geral, estes estudos reportam ganhos em produtividade e rendimento dos grãos principalmente com o uso associado da inoculação com doses baixas de N fertilizante e reforçam que o fertilizante pode ser parcialmente

substituído sem perdas de produtividade (HUNGRIA, et al., 2003; MERCANTE, et al. 2006; PELEGRIN, et al., 2009; DE OLIVEIRA, 2017).

Hungria e colaboradores (2003) mostraram que a inoculação das sementes do feijoeiro com as estirpes CIAT 899 E PRF 81, associada à aplicação de  $15 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$  de N na semeadura e no início do florescimento, forneceu rendimento de grãos superior a todos os diferentes tratamentos com a aplicação de N na semeadura e em cobertura. Em 2012, Pacheco e colaboradores, relatam que uma estratégia para maximizar os resultados obtidos com a inoculação de rizóbio no feijoeiro comum consiste na combinação com a aplicação de N mineral em que com a aplicação de  $40 \text{ kg ha}^{-1}$  de N em cobertura. Esta estratégia possibilitou um rendimento de grãos e acumulação de N nos grãos similares à aplicação de  $60 \text{ kg ha}^{-1}$  de N.

Mercante e colaboradores (2006) relataram em seu trabalho que o uso de inoculante de CIAT 899 promoveu aumentos significativos na nodulação e no rendimento de grãos das cultivares de feijoeiro avaliado, mesmo em solos com populações elevadas de rizóbios nativos, que competem no estabelecimento da simbiose e nodulação da planta. A produtividade obtida foi superior à obtida com aplicação de até  $80 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$  de N, demonstrando a possibilidade de obtenção de incrementos significativos nos rendimentos médios desta cultura com o uso de inoculantes com CIAT 899, a baixos custos econômico e ambiental, pela redução na utilização de fertilizantes químicos nitrogenados.

Pelegrin e colaboradores (2009) observaram reportaram que a adubação com  $20 \text{ kg ha}^{-1}$  de N acrescida de inoculante com a estirpe de *R. tropici* CIAT 899 possibilitou a obtenção de rendimento de grãos na cultura do feijoeiro equivalente à aplicação de até  $160 \text{ kg ha}^{-1}$  de N, com rendimento de grãos superior ao tratamento com a adubação de  $20 \text{ kg ha}^{-1}$  de N, sem o uso do inoculante, evidenciando a sua importância para obtenção de maior rentabilidade na cultura do feijoeiro.

De Oliveira e colaboradores (2017) reportaram que o uso associado da adubação foliar de molibdênio e inoculante com *R. tropici* aumentou o teor de N nas folhas, o acúmulo de biomassa vegetal, o número de vagens por planta, o peso de 1000 grãos e a produtividade do feijão comum e sugeriram que a adubação nitrogenada, comumente utilizada na cultura do feijoeiro, pode ser substituída na sua totalidade pela inoculação com a bactéria *R. tropici* e pela adubação foliar com molibdênio.

Dada a importância econômica destas bactérias para a cultura do feijoeiro, os genomas destas espécies têm sido estudados nos últimos anos. Desde então, diversos estudos têm sido realizados por diferentes grupos de pesquisa buscando uma melhor compreensão destas bactérias, especialmente das características importantes para o processo simbiótico. O sequenciamento do genoma revelou que CIAT899 e PRF81 compartilham uma região altamente conservada em um plasmídeo (pSym) que está presente também em *Rhizobium leucaenae* (CFN 299), um rizóbio exibindo uma gama de hospedeiros semelhantes. Este plasmídeo pSym parece ter surgido por um evento de co-integração entre dois replicons. Três genes *nodA* distintos foram encontrados no pSym, uma característica que pode contribuir para a colonização destas espécies de *Rhizobium* (CIAT 899 e PRF 81). Os genes para a biossíntese e a modulação dos níveis de fitohormônios de plantas também foram identificados no pSym. Análise de genes envolvidos na resposta ao estresse mostraram que CIAT899 e PRF81 estão bem equipados para lidar com baixo pH, altas temperaturas e com estresses oxidativos e osmóticos. A análise do genoma também revelou uma grande variedade de características que permite que estas estirpes colonizem a rizosfera com sucesso, incluindo polissacarídeos de superfície, transportadores de captação e enzimas catabólicas para nutrientes (ORMEÑO-ORRILLO, 2012).

### **1.5. Melhoramento genético por mutação para melhorar a capacidade de FBN**

Os primeiros geneticistas identificaram e estudaram muitas mutações naturais. No entanto, a ciência da genética modificou-se radicalmente em 1927, quando Hermann J. Muller descobriu que os raios X induziam mutações em *Drosophila*. A capacidade de induzir mutações propiciou uma técnica totalmente nova de análise genética (LEWIN, 2009).

A mutação tem sido uma ferramenta muito utilizada por pesquisadores para se obter microrganismos melhorados. Essas mutações podem ocorrer naturalmente nas células sendo referidas como mutações espontâneas, que podem ocorrer por: (1) erros de pareamento durante a replicação, (2) depurinação do DNA, (3) deleções, (4) sequências de inserção e (5) mecanismo de reparo de DNA propensos a erros (SAXENA, 2015).

No âmbito da agricultura, a principal vantagem desta tecnologia é que a nova estirpe desenvolvida por mutação não é considerada um microrganismo geneticamente modificado (OGM), o que não limita a sua aplicabilidade na indústria alimentar. Visto que no artigo 4º, Inciso I, da lei vigente (2005), é permitido o melhoramento genético através da mutagênese, bem como formação e utilização de células somáticas de hibridoma animal; fusão celular, inclusive a de protoplasma, de células vegetais, que possa ser produzida mediante métodos tradicionais de cultivo; autoclonagem de organismos não-patogênicos que se processe de maneira natural (BRASIL, 2005).

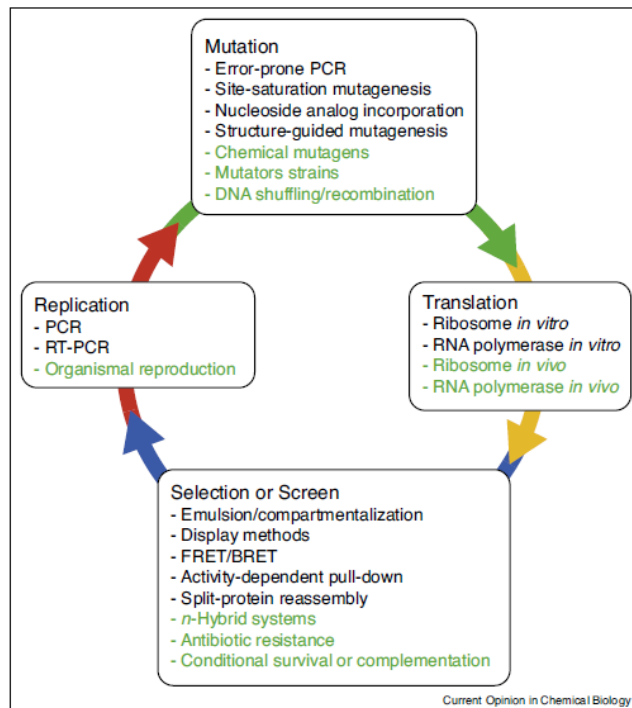
Além das mutações espontâneas que podem ocorrer no material genético, a mutação induzida, que utiliza algum agente mutagênico, vem sendo utilizada em vários trabalhos visando a obtenção organismos com alguma característica melhorada e a caracterização funcional de genes de interesse (LEWIN, 2009). Mutantes são a base da variação genética e, portanto, têm atraído o interesse dos melhoristas de plantas (KOORNNEEF, 2002) e de microrganismos, principalmente, daqueles de interesse industrial. A mutagênese clássica envolve geralmente a utilização de agentes físicos e químicos que podem trazer alterações aleatórias na estrutura genética do microrganismo a fim de melhorar as características desejadas (SAXENA, 2015). Por ser um processo aleatório, não é possível prever qual o tipo de mutação que produzirá melhoria em uma estirpe particular. O procedimento geral de mutagênese é dividido em três grandes etapas: (a) expor a estirpe parental a um agente mutagênico para induzir variabilidade genética, (b) seleção aleatória e *screening* da população sobrevivente e (c) ensaios com os produtos melhorados, bem como testes de estatística das linhagens melhoradas (SAXENA, 2015).

Entre os agentes físicos utilizados para induzir a mutação no material genético temos as radiações ionizantes, que fragmentam e alteram a estrutura o DNA levando a deleções, e a radiação ultravioleta, que provoca dimerização das bases de timina adjacentes e deforma a estrutura do DNA, bloqueando a transcrição e a replicação e, conseqüentemente, leva a interrupção do processo de tradução (IKEHATA, 2011; SAXENA, 2015).

Já os agentes químicos podem induzir mutações pontuais e são úteis, pois proporcionam taxas de mutação elevadas. Os agentes mutagênicos químicos mais utilizados para a indução de mutação pertencem à classe dos agentes alquilantes, como: etil metano sulfonato; sulfato de dimetila e as azidas (que é utilizado para

produzir altos efeitos mutagênicos em várias culturas, dependendo das condições de tratamento) (JAIN, et al. 2010; WANI, 2014). Da mesma forma, o metil metano sulfonato (MMS) também é um agente alquilante e sua reação com o genoma causa metilação na base nitrogenada guanina induzindo o pareamento desta base com adenina, resultando na indução de transições G/C para A/T (ANTONIO, 2012). Outro agente químico mutagênico é o ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), uma vez que faz com que ocorra a desaminação oxidativa de bases nitrogenadas. A adenina é convertida em hipoxantina, citosina em uracila e a guanina é convertida em xantina levando a codificação errada e mutações (SAXENA, 2015). A mutagenicidade com azida sódica é conhecida desde 1948 (OWAIS & KLEINHOF, 1988) e até hoje é bastante aplicada no melhoramento genético, principalmente de plantas (KHAN, et al., 2009). A azida sódica é um mutagênico químico, que cria mutações pontuais, com alteração de AT para CG (AL-QURAINY, 2009), com capacidade de inibir a citocromo oxidase, que é um agente nitretante e um inibidor da oxidação terminal (MIRANDA, et al. 1996).

Uma alternativa para a obtenção de novos microrganismos com alguma característica melhorada é a combinação de técnicas de mutagênese aleatória de genes, expressão das enzimas mutantes e triagem das propriedades funcionais desejadas, um processo que é conhecido como evolução dirigida. O gene do melhor variante da biblioteca inicial de mutantes é então, usado como molde para outros ciclos de mutagênese/expressão/triagem e o processo é repetido quantas vezes forem necessárias até que seja atingido o nível de melhoramento desejado (Figura 2) (OLIVEIRA & MANTOVANI, 2009). Recentemente, métodos de evolução dirigida mais gerais têm sido desenvolvidos *in vivo* utilizando diferentes organismos, que varia de vírus, bactérias e até eucariotos superiores (BADRAN & LIU, 2015).



**Figura 2:** Representação esquemática das etapas realizadas no processo de evolução dirigida.  
 Fonte: (BADRAN; LIU, 2015).

## 1.6. FBN e resistência a azida

No contexto da FBN, a mutação química vem sendo empregada para se obter estirpes melhoradas em diferentes características importante para o estabelecimento da simbiose e para melhorias na capacidade de FBN visando uma simbiose mais eficiente. Sharma & Vasudeva (2005), em seu trabalho induziram a mutação e resistência a azida sódica em *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Azospirillum brasilense* para aumentar o rendimento e teor de nitrogênio em plantas de algodoeiro (*Gossypium* L.). Como resultado dessa mutação obtiveram estirpes mutadas com aumento da atividade da nitrogenase com relação à estirpe selvagem, bem como aumento na produção de ácido-3-indol acético (AIA) e maior eficiência na fixação do N. O nível de nitrogênio nas raízes, caules e folhas de plantas de algodoeiro inoculadas com bactérias mutantes apresentaram uma porcentagem maior de nitrogênio com relação as plantas tratadas com as bactérias selvagens. Estes resultados indicaram que os mutantes resistentes à azida são superiores comparado às estirpes parentais.

Saini e colaboradores (2001) em seu experimento com *Azorhizobium caulinodans*, obteve mutantes resistentes à azida com nodulação melhorada e maior

eficiência simbiótica em diferentes espécies de leguminosas, indicando que a resistência à azida sódica pode ser usada como uma técnica para melhorar a eficiência simbiótica em populações de mutantes. Em 2004, Bhaskaret al, em seu trabalho sobre *Rhizobium ciceri*, examinaram a função da resistência à azida em relação a FBN, levando em consideração que a expressão da resistência à azida foi descrita como dependente dos genes *fixABC* descrito em *Sinorhizobium meliloti* e que outras descobertas apoiaram o envolvimento dos genes *fixNOQP* que codificam a oxidase terminal *cbb3* em *R. etli*. Eles concluíram que existe uma correlação entre resistência à azida e maior fixação de nitrogênio simbiótico quando há reiteração funcional e/ou a indução da expressão desreprimida de genes de fixação *fixNOQP* que codificam oxidases simbióticas terminais.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Obter mutantes de *Rhizobium tropici* CIAT 889 resistentes a azida e avaliar a eficiência simbiótica dos mutantes em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L).

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar a tolerância da estirpe CIAT 889 ao composto químico metil metano sulfonato (MMS) e ao agente de seleção azida sódica ( $\text{NaN}_3$ );
- Gerar mutantes por mutagênese química com MMS e selecionar mutantes resistente à azida sódica;
- Avaliar o crescimento dos mutantes obtidos em meio de cultivo;
- Avaliar a produção de biofilme, locomoção e produção de auxinas dos mutantes obtidos.
- Inocular os mutantes obtidos e avaliar a capacidade de promoção do crescimento e eficiência simbiótica em plantas de feijoeiro;

## REFERÊNCIAS

AL-QURAINY, Fahad et al. Effects of sodium azide on growth and yield traits of *Eruca sativa* (L.). **World Applied Sciences Journal**, v. 7, n. 2, p. 220-226, 2009

ANDA - ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS. **PRINCIPAIS INDICADORES DO SETOR DE FERTILIZANTES**. Disponível em <<http://anda.org.br/index.php?mpg=03.00.00>> acesso em 11. jul.18

ANDREWS, M. et al. Nitrogen use efficiency. 3. Nitrogen fixation: genes and costs. **Annals of Applied Biology**, v. 155, n. 1, p. 1-13, 2009.

ANTONIO, T. **Obtenção de mutantes de *Streptomyces clavuligerus* e avaliação de condições de cultivo para a melhoria de produção de cefamicina**. 2012. 62 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. Araraquara. SP.

ARAÚJO, FF de; HUNGRIA, Mariangela. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum*/*Bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 34, n. 9, p. 1633-1643, 1999.

ARNOLD, Walter, et al. Nucleotide sequence of a 24,206-base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of molecular biology** 203.3 (1988): 715-738.

BADRAN, Ahmed H.; LIU, David R. In vivo continuous directed evolution. **Current opinion in chemical biology**, v. 24, p. 1-10, 2015.

BARBOSA, E.A.; PERIN, L.; REIS, V.M. Uso de diferentes fontes de carbono por estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isoladas de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p. 827-833, 2006.

BARBOSA, Flávia Rabelo; GONZAGA, AC de O. Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014. **Embrapa Arroz e Feijão-Documents (INFOTECA-E)**, 2012

BARCELLOS, F.G.; MENNA, P.; DA SILVA BATISTA, J. S.; HUNGRIA, M. Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium* (Ensifer) *fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Savannah soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 8, p. 2635-2643, 2007

BHASKAR, V. Vijay; KASHYAP, L. R. Azide resistance in *Rhizobium ciceri* linked with superior symbiotic nitrogen fixation. 2004

BRASIL. (2005). Decreto nº 11.105 do Ministério da Saúde, de 24 de março de 2005. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Brasília, DF: Congresso Nacional.

BRITO, Luciana Fernandes de et al. Resposta do feijoeiro comum à inoculação com rizóbio e suplementação com nitrogênio mineral em dois biomas brasileiros. 2015.

BROUGHTON, W. J. et al. Flavonoid-inducible modifications to rhamnan O antigens are necessary for *Rhizobium* sp. strain NGR234-legume symbioses. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 10, p. 3654-3663, 2006

CARVALHO, M. C. S. Árvore do conhecimento: feijão. 2008. Disponível em <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/feijao/arvore/CONTAG01\\_81\\_1311200215104.html#](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/feijao/arvore/CONTAG01_81_1311200215104.html#)> com acesso em 16. Jul. 2018

CLÚA, Joaquín et al. Compatibility between legumes and rhizobia for the establishment of a successful nitrogen-fixing symbiosis. **Genes**, v. 9, n. 3, p. 125, 2018.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: grãos. Quinto levantamento, FEVEREIRO 2018, V. 5 - SAFRA 2017/18- N. 5

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. (2016). Evolução dos custos de produção de feijão no Brasil e sua rentabilidade safra 2010/11 a 2015/16. **Compêndio de estudos Conab** – V. 1, 2016

DALL'AGNOL, R. F.; RIBEIRO, R. A.; ORMENO-ORRILLO, E.; ROGEL, M. A.; DELAMUTA, J. R. M.; ANDRADE, D. S.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. *Rhizobium freirei*, a symbiont of *Phaseolus vulgaris* very effective in fixing nitrogen. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, p. 1–21, 14 jun. 2013

DE MEYER, Sofie E. et al. Symbiotic Burkholderia species show diverse arrangements of nif/fix and nod genes and lack typical high-affinity cytochrome cbb3 oxidase genes. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 29, n. 8, p. 609-619, 2016

DE OLIVEIRA, Carlos Alberto Bispo; DE MELLO PELÁ, Gláucia; PELÁ, Adilson. Inoculação com *Rhizobium tropici* e adubação foliar com molibdênio na cultura do feijão comum. **REVISTA DE AGRICULTURA NEOTROPICAL**, v. 4, n. 5, p. 43-50, 2017

DIVITO, Guillermo A.; SADRAS, Victor O. How do phosphorus, potassium and sulphur affect plant growth and biological nitrogen fixation in crop and pasture legumes? A meta-analysis. **Field Crops Research**, v. 156, p. 161-171, 2014.

DÖBEREINER, Johanna. A importância da fixação biológica de nitrogênio para a agricultura sustentável. **Biotecnologia Ciência**, p. 2-3, 1997.

FISCHER, Hans-Martin. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. **Microbiological reviews**, v. 58, n. 3, p. 352-386, 1994.

FRAYSSE, N.; COUDERC, F.; POINSOT, V. Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. **Eur. J. Biochem.**, v.270, p.1365-1380, 2003.

GALIBERT, F.; FINAN, T. M.; LONG, S. R.; PÜHLER, A.; ABOLA, P.; AMPE, F.; BOTHE, G. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. **Science**, v. 293, n. 5530, p. 668-672, 2001.

GALLOWAY, James N. et al. Nitrogen cycles: past, present, and future. **Biogeochemistry**, v. 70, n. 2, p. 153-226, 2004.

GRUBER, N.; GALLOWAY, J.N. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. **Nature**, v. 451, n. 7176, p. 293-296, 2008.

HAAG, A. F.; ARNOLD, M. F. F.; MYKA, K. K.; KERSCHER, B.; DALL'ANGELO, S.; ZANDA, M.; MERGAERT, P.; FERGUSON, G. P. Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*-legume symbiosis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 3, p. 364-383, 2013.

HABER, F. Bemerkung zu Vorstehender Notiz. **Naturwissenschaften**, v. 11, n. 18, p. 339-340, 1923.

HABER, F. Über die Darstellung des Ammoniaks aus Stickstoff und Wasserstoff. **Naturwissenschaften**, v. 10, n. 49, p. 1041-1049, 1922.

HAYWARD, D.; HELDEN, P. D. VAN; WIID, I. J. F. Glutamine synthetase sequence evolution in the mycobacteria and their use as molecular markers for Actinobacteria speciation. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, n. 48, p. 1-13, 2009.

HERRIDGE, D. F. Inoculation technology for legumes. In: **Nitrogen-fixing leguminous symbioses**. Springer Netherlands, 2008. p. 77-115.

HOBBS, P.V. Introduction to atmospheric chemistry. Cambridge Univ. Press, 2000. 263p.

HOWIESON, J. G.; DILWORTH, M. J. **Working with rhizobia**. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 2016.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica de nitrogênio para a cultura da soja**: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80 p.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.; CHUEIRE, L.; GRANGE, L.; MEGÍAS, M. Symbiotic effectiveness of fast-growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.33, n.5, p.387-394, 2001.

HUNGRIA, Mariangela et al. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, n. 11, p. 1515-1528, 2000

HUNGRIA, Mariangela; CAMPO, Rubens José; MENDES, Iêda Carvalho. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Soils**, v. 39, n. 2, p. 88-93, 2003

IKEHATA, Hironobu; ONO, Tetsuya. The mechanisms of UV mutagenesis. **Journal of radiation research**, v. 52, n. 2, p. 115-125, 2011.

ISSN 2318-6852 Acomp. safra bras. grãos, v. 4 Safra 2016/17 - Décimo segundo levantamento, Brasília, p. 1-158 setembro 2017

JAIN, S. Mohan et al. Mutagenesis in crop improvement under the climate change. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 15, n. 2, p. 88-106, 2010.

JONES, K. M.; KOBAYASHI, H.; DAVIES, B. W.; TAGA, M. E.; WALKER, G. C. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium*–*Medicago* model. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 8, p. 619-633, 2007.

KHAN, Salim; AL-QURAINY, Fahad; ANWAR, Firoz. Sodium azide: a chemical mutagen for enhancement of agronomic traits of crop plants. **Environ. Int. J. Sci. Tech**, v. 4, p. 1-21, 2009.

KOORNNEEF, Maarten. Classical mutagenesis in higher plants. **Molecular plant biology**, v. 1, p. 1-11, 2002.

LEWIN, Benjamim. Genes IX. 9ª edição. **Porto Alegre/Artmed**, 2009.

MARTÍNEZ-ROMERO, Esperanza et al. Rhizobium tropici, a novel species nodulating Phaseolus vulgaris L. beans and Leucaena sp. Trees. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 417-426, 1991

MATHESIUS, U. Goldacre paper: Auxin: at the root of nodule development?. **Functional Plant Biology**, v. 35, n. 8, p. 651-668, 2008.

MCGLYNN, S. E.; BOYD, E. S.; PETERS, J. W.; ORPHAN, V. J. Classifying the metal dependence of uncharacterized nitrogenases. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 419, 2013.

MERCANTE, FÁBIO MARTINS; GOI, SÍLVIA REGINA; FRANCO, AVÍLIO ANTONIO. Importância dos compostos fenólicos nas interações entre espécies leguminosas e rizóbio. **Revista. Universidade. Rural, Série. Ciências da Vida**, v. 22, n. 1, p. 65-81, 2002.

MERCANTE, Fábio Martins; OTSUBO, Auro Akio; LAMAS, Fernando Mendes. Inoculação de Rhizobium tropici e aplicação de adubo nitrogenado na cultura do feijoeiro. **REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DE SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS**, v. 27, 2006.

MIRANDA, J. et al. Rhizobium etli cytochrome mutants with derepressed expression of cytochrome terminal oxidases and enhanced symbiotic nitrogen accumulation. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 45, n. 1-2, p. 182-188, 1996

NISTE, Monica et al. Stress factors affecting symbiosis activity and nitrogen fixation by *Rhizobium* cultured in vitro. **Pro Environment/ Pro Mediu**, v. 6, n. 13, 2013

NUNES, Fábio Souza; RAIMONDI, Angela Cristina; NIEDWIESKI, Antonio Carlos. Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 872-879, 2003.

OLIVARES, José; BEDMAR, Eulogio J.; SANJUÁN, Juan. Biological nitrogen fixation in the context of global change. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 26, n. 5, p. 486-494, 2013.

OLIVEIRA, Luciana Gonzaga de; MANTOVANI, Simone Moraes. Biological transformations: contributions and perspectives. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 742-756, 2009.

ORMEÑO-ORRILLO, Ernesto et al. Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 1, 2012

OWAIS, W. M.; KLEINHOF, A. Metabolic activation of the mutagen azide in biological systems. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 197, n. 2, p. 313-323, 1988

PACHECO, Rafael Sanches et al. Seeds enriched with phosphorus and molybdenum as a strategy for improving grain yield of common bean crop. **Field Crops Research**, v. 136, p. 97-106, 2012

PELEGRIN, Rodrigo de et al. Resposta da cultura do feijoeiro à adubação nitrogenada e à inoculação com rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, v. 33, n. 1, 2009

PII, Y.; CRIMI, M.; CREMONESE, G.; SPENA, A.; PANDOLFINI, T. Auxin and nitric oxide control indeterminate nodule formation. **BMC Plant Biology**, v. 7, n. 1, p. 21, 2007.

POOLE, Philip; RAMACHANDRAN, Vinoy; TERPOLILLI, Jason. Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 291, 2018

REMIGI, Philippe et al. Symbiosis within symbiosis: evolving nitrogen-fixing legume symbionts. **Trends in microbiology**, v. 24, n. 1, p. 63-75, 2016.

RUFINI, Márcia et al. Simbiose de bactérias fixadoras de nitrogênio com feijoeiro-comum em diferentes valores de pH. **Pesq Agropec Bras**, v. 46, p. 81-88, 2011.

RUMJANEK, N. G. et al. Fixação biológica de nitrogênio. **feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação tecnológica, p. 279-335, 2005.

SAINI, S.S. SINDHU, K.R. DADARWAL. Azide-Resistant Mutants of *Azorhizobium caulinodans* with Enhanced Symbiotic Effectiveness. **Folia Microbiol.** 46 (3), 217-222, 2001.

SAXENA, Sanjai. Strategies of Strain Improvement of Industrial Microbes. In: **Applied Microbiology**. Springer India, 2015. p. 155-171

SCHERER, Heinrich W. et al. Low levels of ferredoxin, ATP and leghemoglobin contribute to limited N<sub>2</sub> fixation of peas (*Pisum sativum* L.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.) under S deficiency conditions. **Biology and Fertility of Soils**, v. 44, n. 7, p. 909-916, 2008.

SHARMA, Shashi B., SAKADEVAN, K. and SHARMA, Sunila. Mutations conferring azide resistance enhance symbiotic nitrogen fixation in *Rhizobium loti*. **Plant and Soil** 189: 221–229, 1997.

SHIN, Wansik et al. Role of Diazotrophic Bacteria in Biological Nitrogen Fixation and Plant Growth Improvement. **Korean Journal of Soil Science and Fertilizer**, v. 49, n. 1, p. 17-29, 2016.

SOARES, André Luis de Lima et al. Agronomic efficiency of selected rhizobia strains and diversity of native nodulating populations in Perdões (MG-Brazil): II-beans. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, n. 5, p. 803-811, 2006.

SOFT, Parvez; WANI, Shafiq. Prospects of nitrogen fixation in rice. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 6, n. 1, p. 203-213, 2007.

SOUSA, P.M.; MOREIRA, F. M. S. Potencial econômico da inoculação de rizóbios em feijão-caupi na agricultura familiar: um estudo de caso. Uberlândia, v. 10, n. 2, p.37-54, 2011

TAIZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. (Trad.). SANTAREM E.R. et al. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p

TAMBALO, Dinah D.; YOST, Christopher K.; HYNES, Michael F. Characterization of swarming motility in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. **FEMS microbiology letters**, v. 307, n. 2, p. 165-174, 2010

VARIN, Sébastien et al. How does sulphur availability modify N acquisition of white clover (*Trifolium repens* L.)?. **Journal of experimental botany**, v. 61, n. 1, p. 225-234, 2009.

VITOUSEK, Peter M. et al. Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 368, n. 1621, p. 20130119, 2013.

WANI, Mohd Rafiq et al. Induced Mutagenesis for the Improvement of Pulse Crops with Special Reference to Mung Bean: A Review Update. In: **Improvement of Crops in the Era of Climatic Changes**. Springer New York, 2014. p. 247-288.

XAVIER, G. R, et al., Embrapa Meio Norte. Agencia Embrapa de Informação Tecnológica. Arvore do conhecimento. Feijão Caupi. Clima. 2012. Disponível em: [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/feijao-caupi/arvore/CONTAG01\\_2\\_2882007171552.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/feijao-caupi/arvore/CONTAG01_2_2882007171552.html). Acesso em 20 jul 2018

XAVIER, Gustavo Ribeiro et al. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. **Revista Caatinga**, v. 19, n. 1, 2006.

### **3. ARTIGO**

## **MUTAGÊNESE E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE MUTANTES DE *Rhizobium tropici* RESISTENTES A AZIDA**

**MANUSCRITO A SER SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO PLANT AND SOIL**

**MUTAGÊNESE E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE MUTANTES DE *Rhizobium tropici* RESISTENTES A AZIDA**

**Amanda Karoline Fiori<sup>a</sup>, Giovana de Oliveira Gutuzzo<sup>a</sup>, Diva de Souza Andrade<sup>b</sup>, André Luiz Martinez de Oliveira<sup>c</sup>, Elisete PainsRodrigues\***

**<sup>a</sup>Laboratório de Genética de Microrganismos, Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, PR-445, Km 380, Campus Universitário, PO Box 6001, CEP 86.051-970, Londrina, PR, Brasil**

**<sup>b</sup>Laboratório de Microbiologia do Solo, Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), Rod. Celso Garcia Cid, 375 - Conj. Ernani Moura Lima II, Londrina - PR, CEP 86.047-902, Londrina, PR, Brasil**

**<sup>c</sup>Laboratório de Bioquímica de Microrganismos, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, PR-445, Km 380, Campus Universitário, PO Box 6001, CEP 86.051-970, Londrina, PR, Brasil**

**\*Autora correspondente:**

**Elisete Pains Rodrigues, Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina, CP 6001, 86051-990, Londrina/PR, Brasil. Phone: +55 (43)3371-4417; e-mail: [elisete@uel.br](mailto:elisete@uel.br)**

## RESUMO

Rizóbios são bactérias simbióticas capazes de fixar o nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) em simbiose com plantas leguminosas, como o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). O nitrogênio (N) é um nutriente essencial para o crescimento e produtividade das plantas que demandam grandes quantidades deste nutriente para seu desenvolvimento. A simbiose entre rizóbio e plantas leguminosas é manifestada pela formação de nódulos radiculares, onde as bactérias fixam o  $N_2$ . O feijão é uma importante fonte de proteína na dieta do brasileiro, sendo o Brasil um dos principais produtores e consumidores deste grão. A eficiência de FBN em feijão tem limitações, sendo atribuídas ao melhoramento da planta sob fertilização nitrogenada, elevada competitividade e baixa eficiência de FBN de estirpes presentes do solo e suscetibilidade do feijoeiro à doenças e estresses ambientais. A implementação de melhorias na simbiose *Rhizobium*-feijão pode beneficiar a cultura do feijoeiro com ganhos de produtividade dos grãos e redução dos custos de produção com fertilizantes. Uma abordagem que pode ser utilizada para tornar esta simbiose mais eficiente é o melhoramento de estirpes com uso de técnicas de mutagenese e seleção de estirpes mutantes melhoradas, sendo a resistência a azida sódica ( $NaN_3$ ) uma estratégia que tem tido sucesso na obtenção de estirpes de rizóbios mais eficientes. Devido à importância de se melhorar as relações simbióticas entre rizóbios e leguminosas, o presente trabalho teve como objetivo, induzir a mutação em *Rhizobium tropici* CIAT 889 e obter mutantes resistentes a azida sódica e avaliar a eficiência simbiótica dos mutantes em plantas de feijão. Como resultado, obteve-se seis mutantes AzR14, AzR15, AzR16, AzR17, AzR18 e AzR19, que foram caracterizados quanto a formação de biofilme, motilidade e produção de auxina e avaliados em três experimentos de inoculação em plantas de feijoeiro. As plantas inoculadas com os mutantes AzR17, 18 e 19 obtiveram resultados semelhantes ou superiores à estirpe selvagem. Estes resultados mostram que a mutação e resistência a azida sódica com rizóbios pode aumentar a relação simbiótica e servir para formulação de bioinoculantes diminuindo os impactos ocasionados por fertilizantes nitrogenados e tornando a agricultura sustentável.

**Palavras-chave:** Rizóbio, leguminosa, FBN, Azida sódica e Simbiose

### 3.1. INTRODUÇÃO

Os rizóbios são bactérias simbióticas conhecidas devido à capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) quando em simbiose com plantas leguminosas, como o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*L.) e a soja (*Glycine max* L.). A capacidade de fixar N, característica das bactérias conhecidas como diazotróficas, não é restrita aos rizóbios podendo ser encontrada em diversas outras espécies de bactérias como *Rhodopseudomonas palustris*, *Azospirillum* sp. E *Azotobacter* sp. (WEIR, 2016), as quais podem ser de vida livre ou estar em associação com as plantas. As bactérias diazotróficas possuem o complexo enzimático nitrogenase que permite a estas bactérias reduzir o  $N_2$  em amônia a qual pode ser assimilada pelos organismos (HUNGRIA, et. al., 2013).

O nitrogênio (N) é um nutriente essencial para o crescimento e produtividade dos organismos vivos e as plantas demandam grandes quantidades deste nutriente para seu desenvolvimento. A fixação biológica de N (FBN) é de fundamental importância, pois apesar de abundante na atmosfera, o N não pode diretamente assimilado pelos organismos. Desse modo, as bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) podem fornecer o nitrogênio às plantas (SHIN, 2016) que é uma alternativa sustentável e economicamente viável, pois reduz custos e os impactos ambientais ocasionados pelo uso de fertilizantes (HUNGRIA et al., 2013), além de ajudar na recuperação de áreas degradadas, na melhoria da fertilidade e da qualidade do solo, contribuir para a redução da emissão de gases de efeito estufa e da contaminação dos mananciais hídricos (PADOVAN, et al., 2006).

A simbiose entre rizóbio e plantas leguminosas leva a formação de nódulos radiculares, onde o nitrogênio é fixado em benefício da planta e em troca a bactérias recebe nutrientes e proteção contra estresses bióticos e abióticos (HUNGRIA, et. al., 2007). Entre as interações mais estudadas estão aquelas que ocorrem entre as bactérias do gênero *Bradyrhizobium* e plantas de soja (*Glycine max* L.); *Rhizobium* e plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (HUNGRIA, 2011).

O feijão é uma importante fonte de proteína na dieta da população brasileira, sendo o Brasil um dos principais produtores e consumidores deste grão. Para o seu desenvolvimento e produtividade, o feijoeiro necessita de grandes quantidades de fertilizantes nitrogenados (CARVALHO, 2008) e parte do N necessário à produtividade do feijoeiro pode ser provida pela FBN que é capaz de reduzir em

mais de 50% a quantidade necessária de fertilizantes nitrogenados nas lavouras (HUNGRIA, et. al., 2003).

Entre as espécies capazes de nodular eficientemente o feijoeiro a espécie *Rhizobium tropici*. (MARTÍNEZ-ROMERO et. al., 1991; HOWIESON & DILWORTH, 2016) que foi isolada de nódulos feijão comum e das leguminosas arbustivas *Leucaena esculenta* e *Leucaena eucocephala* de regiões tropicais, sendo CIAT899 a estirpe tipo desta espécie. Estas bactérias são bastonetes flagelados aeróbicos gram-negativos, toleram altas temperaturas e condições de acidez, com pH ideal de crescimento entre 5 a 7, exibem resistência intrínseca à vários agentes antimicrobianos e pesticidas (ORMEÑO-ORRILLO, 2012). Estas características são comuns em ambientes tropicais e nos solos brasileiros e têm sido associadas à maior competitividade de estirpes pertencentes à esta espécie na nodulação do feijoeiro (MARTÍNEZ-ROMERO, 1991). Por esse motivo, CIAT 899 é preferencialmente utilizada como inoculante para a cultura do feijoeiro no Brasil (HUNGRIA, et. al. 2003).

A eficiência de FBN em feijão tem suas limitações quando comparada a soja. Isto pode ser atribuído ao melhoramento da planta sob fertilização nitrogenada, à elevada competitividade e baixa eficiência de FBN de estirpes presentes do solo e a suscetibilidade do feijoeiro à doenças e estresses ambientais (HUNGRIA et al., 2013). A implementação de melhorias na simbiose *Rhizobium*-feijão pode trazer benefícios para esta cultura que pode ser alcançada por meio da seleção de estirpes mais eficientes simbioticamente; uso associado de bactérias simbióticas e bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) (HUNGRIA, et.al., 2015); seleção de estirpes tolerantes a climas áridos e a outros fatores de estresse ambiental (ZHRAN,1999; HUNGRIA, et al., 2000; SERRAJ, 2004) e melhoramento genético de estirpes e plantas hospedeiras.

Além de outra abordagem que é a mutagênese. A mutação e seleção de estirpes mutantes permitem estudar a natureza e função dos genes bem como esclarecer como ocorre a relação simbiótica, crescimento e desenvolvimento das plantas, produzindo matérias-primas para o melhoramento genético de culturas economicamente rentáveis (AL-QURAINY, et al, 2009). A mutagênese clássica com uso de mutagênicos como os agentes alquilantes tem sido utilizada há bastante tempo no melhoramento de estirpes inclusive em estudos que visam obter estirpes de rizóbio mais eficientes na nodulação e FBN (SRIVASTAVA, 2011). A

mutagenicidade dos agentes químicos é resultante da interação com o DNA que leva a geração de mutações pontuais no genoma (YADAV, et al, 2009).A azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ) é um dos mais potentes agentes mutagênicos utilizados em plantas e bactérias, cujos estudos são relatados desde 1948 (OWAIS & KLEINHOF, 1988; KHAN, et al., 2009). Esse agente cria mutações pontuais, com alteração de AT para CG (AL-QURAINY, 2009) e é um potente inibidor da citocromo C oxidase, a oxidase terminal da respiração celular (MIRANDA, J. et al. 1996).

Além de ser um agente mutagênico, azida tem sido utilizado como agente de seleção, sendo a resistência a este composto uma das estratégias utilizadas no melhoramento de estirpes de bactérias. Em rizóbios, a seleção de estirpes resistentes à azida tem sido utilizada na obtenção de mutantes mais eficientes simbioticamente (MIRANDA et al., 1996; SHARMA, et. al, 1997; BHASKAR & KASHYAP, 2004). Como exemplo Shashi e colaboradores (1997) caracterizaram o fenótipo simbiótico de três mutantes de *Rhizobium loti* resistentes à azida e mostraram que esses mutantes apresentaram eficiência simbiótica similar ou superior a estirpe selvagem quando avaliados quanto a nodulação, atividade nitrogenase (FBN), massa seca e teor total de nitrogênio da parte aérea.

Neste trabalho, foram utilizadas técnicas clássicas de mutagênese para obtenção de mutantes de *Rhizobium tropici* CIAT 889 resistentes a azida visando obter estirpes com eficiência simbiótica e capacidade de FBN melhoradas com relação a estirpe selvagem, pois diante da importância do processo de FBN para todos os sistemas biológicos e da relevância que a simbiose entre feijão e *Rhizobium tropici* tem no contexto da agricultura brasileira, pesquisas que possam resultar em melhorias desta simbiose trazendo maior FBN, maior produtividade, com redução do custo de produção e danos ambientais relacionadas ao uso de fertilizantes nitrogenados são essenciais quando busca-se a sustentabilidade da agricultura e a saúde humana e ambiental.

## 3.2. MATERIAIS E METODOS

### 3.2.1. Estirpe utilizada e condições de cultivo

Para os experimentos de mutagênese e inoculação foi utilizada a estirpe de *Rhizobium tropici* CIAT899 (SEMIA 4077) obtida da coleção de cultura de bactérias diazotróficas e promotoras de crescimento vegetal da Embrapa Soja (CNPSo, Brasil) (MARTÍNEZ-ROMERO et al. 1991). A estirpe foi armazenada em glicerol 50% a -20 °C, mantida em meio YM sólido (0,4 g/L extrato de levedura; 5,0 g/L manitol; 0,5 g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 g/L de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,1 g/L NaCl e 15 g/L ágar, pH de 6,8-7,0) (VINCENT, 1970) e, quando necessário, cultivada em meio YM líquido sob agitação a 150 rpm e temperatura de 28 °C (HUNGRIA & ARAUJO, 1994).

### 3.2.2. Mutagênese e Seleção de mutantes de CIAT 899 resistentes à azida sódica

Para obtenção dos mutantes resistentes à azida sódica, foi feito a mutagênese de CIAT899 com metil metanossulfonato (MMS) e seleção dos mutantes resistentes à azida sódica (SAINI et al., 2001; GUPTA et al., 2012). O processo de mutagênese química gera mutações pontuais, no entanto, quando em concentrações inadequadas o agente químico pode gerar quebras cromossômicas (LEWIN, 2009). Para determinar a concentração adequada de MMS à mutagênese de CIAT899, a estirpe foi exposta a concentrações crescentes de MMS. Após este ensaio preliminar, alíquotas de 1 mL de uma suspensão celular ( $1 \times 10^{11}$  células/mL) foram transferidas para tubos de microcentrífuga e homogeneizadas sem MMS e com 3 mM de MMS. Após exposição ao MMS por 30 minutos a 20°C, as células foram centrifugadas (7000 rpm por 5 minutos a 4°C) e lavadas (2 vezes) com 1 mL de solução salina 0,9% para retirada do MMS. Alíquotas de 100 µL foram diluídas serialmente em solução salina (até  $10^{-7}$ ) e, em seguida, as diluições  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$  foram plaqueadas em meio sólido YM. Após 48 h a 28°C foi feita a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e determinação da taxa de sobrevivência (GUPTA et al., 2012).

Para avaliar a resistência à azida sódica, CIAT899 foi cultivada em meio sólido com diferentes concentrações de azida sódica (5 a 30 µg/mL), para avaliar quais

concentrações inibiam o crescimento de CIAT 899. Após esse teste, alíquotas de 100 µL de cultura mutada foi plaqueada em meio sólido YM (com concentração de 15 e 20µg/mL) para obtenção das colônias mutantes resistentes. As colônias obtidas foram posteriormente estocadas em glicerol 50% a -20°C para análises e caracterizações subsequentes.

### 3.2.3. Caracterização dos mutantes resistentes à azida sódica

Para avaliação do crescimento, CIAT899 e os mutantes obtidos foram cultivados em 50 mL de meio líquido YM a  $28 \pm 2$  °C sob agitação orbital de 120 rpm por 48 horas com amostragens (2 mL) durante o período de crescimento (12, 24, 36 e 48). O crescimento foi avaliado pela densidade ótica ( $DO_{600nm}$ ).

A formação de biofilme foi avaliada em ensaio com cristal violeta em microplacas (SHUKLA &RAO, 2017). As estirpes foram cultivadas em tubos de ensaio com 5 mL de meio YM por 24 horas a 120 rpm. Alíquotas de 10µL de suspensão celular com  $DO_{600nm}$  de 0,5 foram inoculadas em 190µL de meio YM em cada poço da microplaca de poliestireno, com seis repetições. Aos poços periféricos da microplaca, adicionou-se 200 µL de água destilada esterilizada para reduzir a perda de água. As bactérias foram cultivadas por 16h a 28°C e, em seguida, a cultura foi retirada com micropipeta. As células do biofilme aderido ao poço foram fixadas em metanol absoluto (99%). Após fixação, as células foram lavadas duas vezes com solução salina, secas ao ar e então, foram coradas com 200 µL de solução de cristal violeta (0,2%) por 5 min. O corante em excesso foi removido, seguido de lavagem 2x com água destilada e secagem ao ar. As células coradas foram removidas da parede do poço com solução de ácido acético 33% e a absorbância foi avaliada em um leitor de microplacas a  $570_{nm}$ .

A capacidade de locomoção sob superfície (*Swarming*) das bactérias foi determinada em meio sólido YM com 0,7% de ágar, conforme metodologia descrita por Kearns (2010) e Tambalo (et al, 2010). As placas de Petri foram preparadas com 30 mL de meio e secas em fluxo laminar com a tampa aberta por 3h. As estirpes foram cultivadas em meio líquido YM por 24 h a 120 rpm a 28°C. Alíquotas de 10µL da cultura ( $DO_{600nm} = 1.0$ ) foram inoculadas no centro da placa de Petri. As bactérias foram cultivadas a 28° C durante uma semana e após este período, a locomoção foi

avaliada qualitativamente. O *software* para medir o diâmetro do crescimento em superfície das estirpes, foi o ImageJ (DAERR & MOGNE, 2016).

Para os ensaios de quantificação de auxinas, 1 mL do pré-inóculo com ( $DO_{600nm}$  de 0,4) foi inoculado em 120 mL de meio líquido YM com ou sem suplementação de L-triptofano (100  $\mu\text{g/mL}$ ). As bactérias foram cultivadas a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  sob agitação orbital de 120 rpm por 48 horas. O crescimento e a produção de auxinas foram monitorados a intervalos regulares de 12 h por até 48 horas. A cada intervalo, uma alíquota de 2 mL de cultura foi coletada e o crescimento foi avaliado por absorvância ( $DO_{600nm}$ ). A cultura foi centrifugada (12000 g por 10 minutos) e o sobrenadante obtido foi homogeneizado com o reagente de Salkowski (30 mL de ácido sulfúrico; 50 mL de água destilada; 1 mL de cloreto de ferro 0,5 M) (GORDON & WEBER, 1951) na proporção 1: 4 (v/v) de sobrenadante/reagente. Após reação por 30 minutos no escuro, a absorvância foi avaliada a  $530_{nm}$ . Para estimativa da quantidade de auxinas foi construída uma curva de calibração com concentrações crescentes de AIA sintético (SIGMA) de 10, 20, 40, 60, 80 e 100  $\mu\text{g/mL}$ , o qual apresentou um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,99 (Anexo).

Todos os ensaios foram realizados com três repetições biológicas e as análises colorimétricas com três repetições técnicas. As análises estatísticas foram realizadas com o programa SASM-Agri (CANTERI et al., 2001) utilizando o teste de *Scott-Knott* e  $p \leq 0,05$ .

Para o ensaio de análise de polissacarídeo procedeu-se da seguinte maneira: riscou-se a placa com o inóculo ajustado para  $DO_{600nm} = 1,0$  (fazendo uma cruz) em meio YM sólido. Foram realizadas três repetições para cada bactéria. Incubou-se a  $28^\circ\text{C}$  por 48 horas e a avaliação seguiu o seguinte critério: (-) Não mucoide: nenhuma produção de EPS; (+) parcialmente mucoide: pouca produção de EPS; Mucoide: EPS evidente em todas as colônias; (++) crescimento sobre a área riscada; (+++) EPS cobre e ultrapassa a área riscada; (+++d) EPS cai na tampa da placa (ZLOSNIK, et al, 2008).

### 3.2.4. Avaliação da eficiência simbiótica dos mutantes resistentes à azida sódica em plantas de feijão comum (*P. vulgaris*)

Foram realizados três experimentos de inoculação em plantas de feijão comum (*P. vulgaris* L.), sendo um em condições *in vitro* e outros dois em casa de vegetação em vasos de Leonard (SOMASEGARAN & HOBEN, 1985). Para todos os experimentos foram utilizadas sementes de feijão carioca as quais foram desinfestadas, pré-germinadas e cultivadas em solução nutritiva livre de nitrogênio (BROUGHTON; DILWORTH, 1970) (Anexo A).

A desinfestação foi feita pela imersão das sementes em água destilada esterilizada por 5 minutos, seguido de tratamento com álcool (70%) por 60 segundos e hipoclorito de sódio (2%) por 2 minutos. Após desinfestação, as sementes foram lavadas 12 vezes com água destilada esterilizada, distribuídas sobre o papel de germinação umedecido (Germitest) e incubadas 28°C por 24-48 horas.

Os três experimentos foram realizados com 9 tratamentos, sendo um tratamento controle sem inoculação, um controle nitrogenado (10 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), um tratamento inoculado com a estirpe CIAT899 e seis tratamentos de inoculação com os mutantes resistentes à azida sódica (AzR14 a AzR19). Para o preparo do inoculante, as bactérias foram cultivadas em meio YM líquido por 24 horas e a  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  foi ajustada para 0,4, equivalente a  $10^8$  células/mL. Uma alíquota de 1 mL da suspensão celular foi inoculada na região da radícula um dia após a semeadura nos três experimentos.

O experimento *in vitro* (experimento 1) foi realizado em frascos de vidro 8 x 20 cm (L x A) contendo solução nutritiva e como suporte, uma folha de papel absorvente dobrada e com um furo central a qual foi fixado à borda do frasco (Anexo B). As sementes pré-germinadas foram dispostas no centro do suporte de papel entre as duas folhas de papel absorvente com auxílio da pinça esterilizada. As plântulas foram cultivadas por 20 dias em câmara de crescimento com temperatura controlada (25 °C) e 12 horas de luz. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com três repetições.

Foram realizados dois experimentos em vasos de Leonard (SOMASEGARAN; HOBEN, 1985; HUNGRIA & ARAUJO, 1994.) (Anexo C) contendo como substrato uma mistura de carvão, areia e vermiculita 0,5:1:2 (v/v) e solução nutritiva completa

sem nitrogênio (BROUGHTON & DELLWORTH, 1970). O experimento 2 foi realizado com 9 tratamentos (como descrito acima) com duas plantas por vaso de Leonard, em delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições por tratamento. O experimento 3 foi realizado em condições similares às descritas acima com 4 repetições por vaso de Leonard, contendo uma planta por vaso. Em ambos os experimentos, as plantas foram mantidas por 30 dias em casa de vegetação, sendo a solução nutritiva repostada semanalmente.

As plantas foram coletadas e separadas em raízes e parte aérea, por um corte cerca de 1 cm acima do substrato. As raízes foram lavadas na peneira para evitar perda de nódulos e estes foram destacados das raízes e contados para determinação do número de nódulos (NN). Para avaliação da massa seca de nódulos (MSN), raízes (MSR) e parte aérea (MSPA), as amostras foram colocadas na estufa a 65 °C até o atingir o peso constante (aproximadamente 7h) para posterior pesagem. O nitrogênio total (g/kg) da parte aérea foi analisado pelo método de Kjeldahl (1883), após digestão e titulação das amostras conforme metodologia descrita anteriormente (GALVANI; GAERTNER, 2006). Os dados obtidos foram utilizados para calcular a eficiência da fixação de nitrogênio  $[(MSPA_{tratamento}/MSPA_{controle\ N}) \times 100]$ , o nitrogênio acumulado (NAC)  $[(N_{total} \times MSPA)]$  em mg/g de parte aérea e o nitrogênio relativo  $[(NAC_{tratamento}/NAC_{controle}) \times 100]$ .

### 3.2.5. Análise dos dados

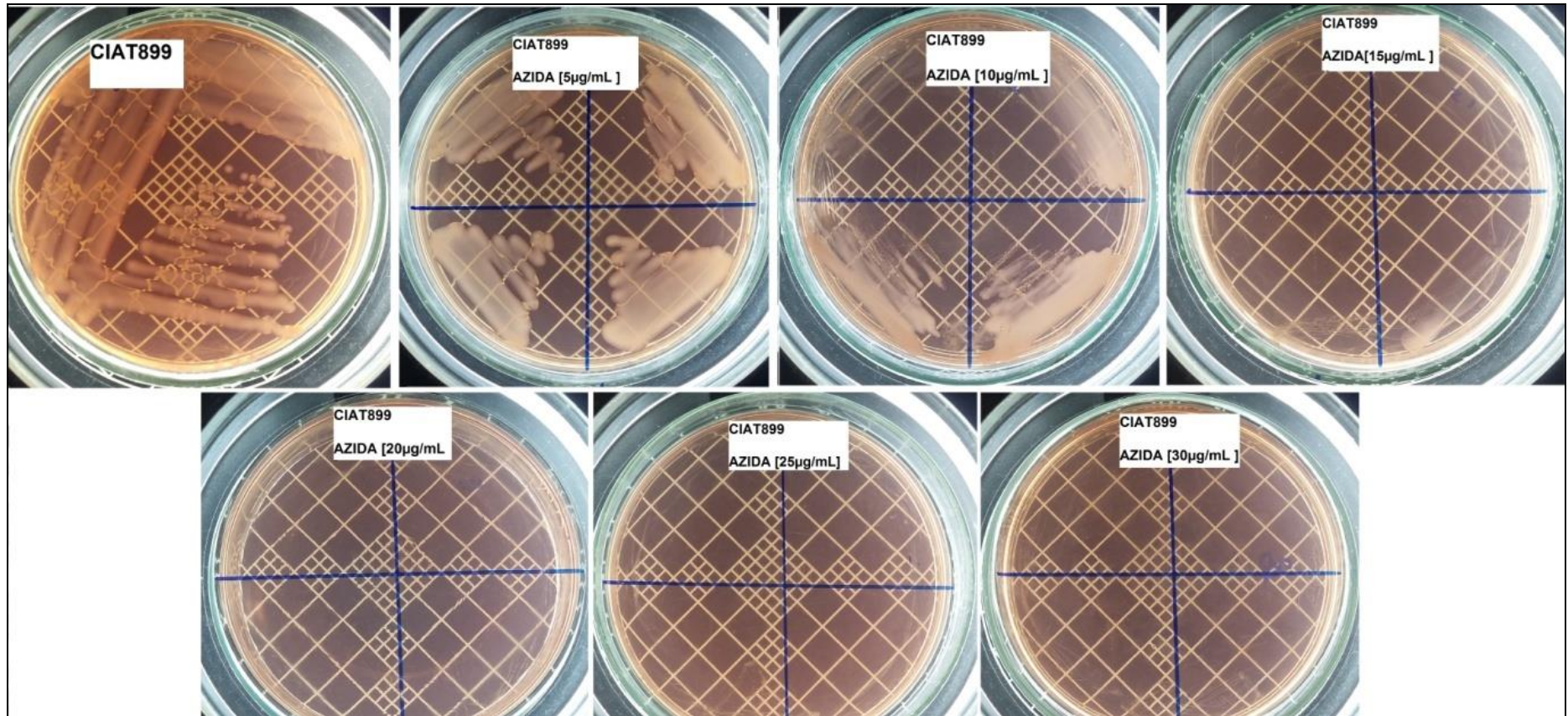
Os parâmetros avaliados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de médias (*Scottknot*) com nível de significância de 5% no programa SASM-Agri. As análises de componentes principais (PCA) foram realizadas com as médias dos parâmetros avaliados utilizando o programa R Studio (JOLLIFFE & CADIMA, 2016). (Anexo D)

### **3.3. RESULTADOS**

#### **3.3.1. Mutagênese**

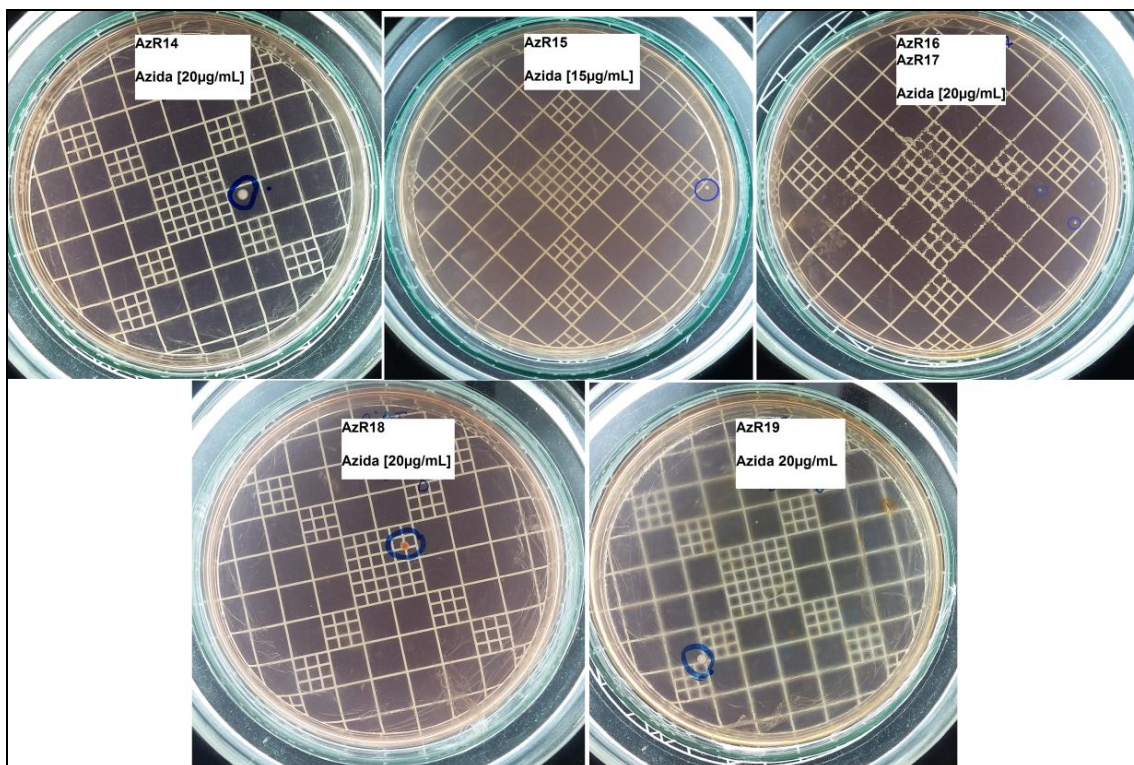
O teste preliminar para determinar a concentração de MMS necessária para seleção dos mutantes. A estirpe selvagem CIAT899 foi exposta às concentrações de 1 mM e 2 mM; contudo, não foi possível realizar a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) devido ao número elevado de células. Em um segundo ensaio, CIAT 899 foi exposta a 3 mM de MMS e comparada ao controle sem MMS. O número de UFC/mL foi de  $1,6 \times 10^{11}$  no tratamento controle e de  $3,2 \times 10^9$  no tratamento com 3 mM de MMS, uma quantidade equivalente a 2% daquela encontrada no controle. A partir deste ensaio, determinou-se o tratamento com 3 mM de MMS apropriado para os ensaios de mutagênese de CIAT 899.

Após, determinou-se a concentração de azida sódica necessária para inibir o crescimento de CIAT899, nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 e 30  $\mu\text{g/mL}$  de azida sódica (Figura 1). CIAT 899 cresceu nas concentrações de 5 e 10  $\mu\text{g/mL}$  de azida, sendo um pouco menor neste último e apresentou inibição do crescimento nas concentrações acima de 15  $\mu\text{g/mL}$ , sendo estabelecido as concentrações de 15 e 20  $\mu\text{g/mL}$  como adequadas para a seleção de mutantes resistentes.



**Figura 1:** Crescimento de CIAT 899 em diferentes concentrações de azida sódica (0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 µg/mL) em meio YM, a 28°C durante 7 dias.

Depois de estabelecida a concentração de MMS necessária para o processo de mutagênese (3mM) e de azida sódica adequada à seleção dos mutantes (15 e 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), os processos de mutagênese e seleção foram realizados. Foram obtidos 6 mutantes (AzR14, AzR15, AzR16, AzR17, AzR18 e AzR19) resistentes à azida (Figura 2).



**Figura 2:** Mutantes de CIAT 899 resistentes a azida sódica obtidos em meio de cultivo YM com 15 ou 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de azida sódica, a 28°C durante 7 dias.

A tolerância dos mutantes obtidos à azida foi avaliada e comparada aquela da estirpe CIAT 899 em concentrações de até 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de azida sódica. O crescimento dos mutantes foi reduzindo com o aumento da concentração de azida, sendo as estirpes mutantes capazes de crescer até a concentração de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , exceto o mutante AzR15 que cresceu até a concentração de 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Tabela 1) (Anexo E, F e G).

**Tabela 1:** Tolerância dos mutantes resistentes (AzR) à azida sódica de CIAT 899

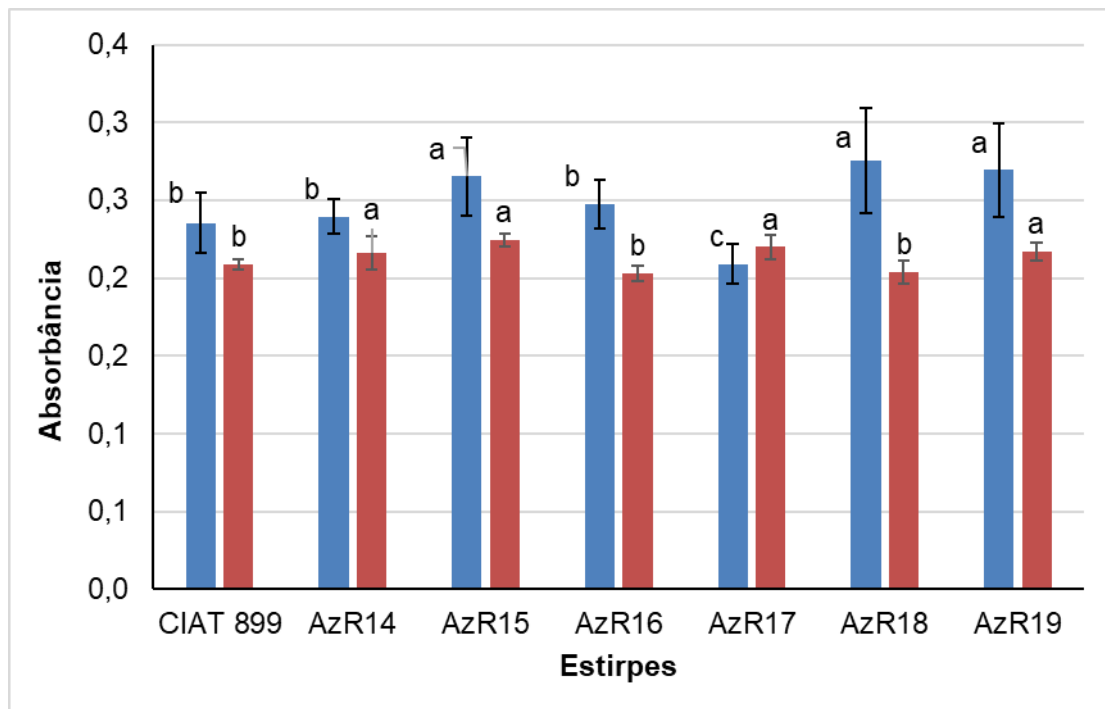
ESTIRPES	Azida sódica ( $\mu\text{g/ml}$ )						
	0*	5	10	15	20	25	30
CIAT 899	+++	+++	++	-	-	-	-
AzR14	+++	+++	+++	++	+	-	-
AzR15	+++	+++	++	+	-	-	-
AzR16	+++	+++	+++	++	+	-	-
AzR17	+++	+++	+++	++	+	-	-
AzR18	+++	+++	+++	++	+	-	-
AzR19	+++	+++	+++	++	+	-	-

\*Crescimento foi observado em meio sólido após 5 dias de cultivo a 28°C e avaliado qualitativamente pela presença e quantidade de colônias em meio sólido YM, como normal (+++), parcial (++ ou +) ou inibido (-).

### 3.3.2. Caracterização dos mutantes

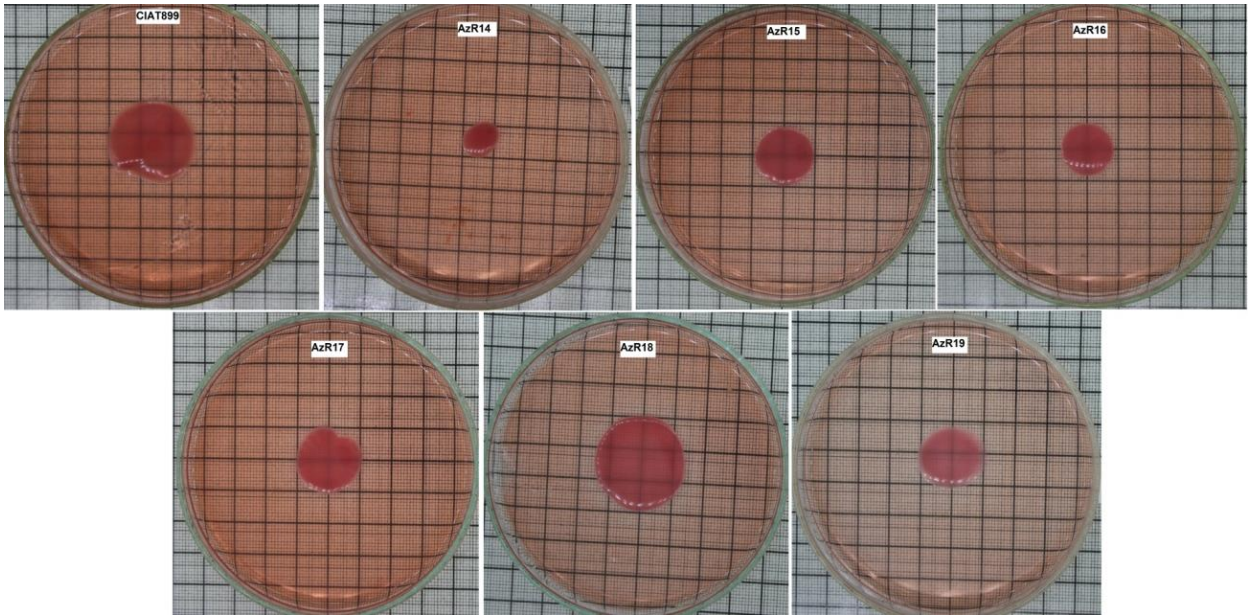
Foi realizado a caracterização dos mutantes AzR obtidos para quatro propriedades importantes presentes nas bactérias, as quais estão envolvidas em diferentes fases do estabelecimento da simbiose entre rizóbios e leguminosas com a finalidade de avaliar se estas propriedades foram afetadas pela mutação em comparação à estirpe CIAT 899. Foram avaliadas as propriedades de formação de biofilme, motilidade, produção do fitohormônio auxina e polissacarídeo, além do crescimento.

Com relação a capacidade de formação de biofilme, os mutantes AzR15, 18 e 19 apresentaram um resultado melhor que a estirpe selvagem (colunas em azul) e com relação a avaliação do crescimento, os mutantes não diferiram significativamente da estirpe selvagem (colunas em vermelho) (Figura 3).

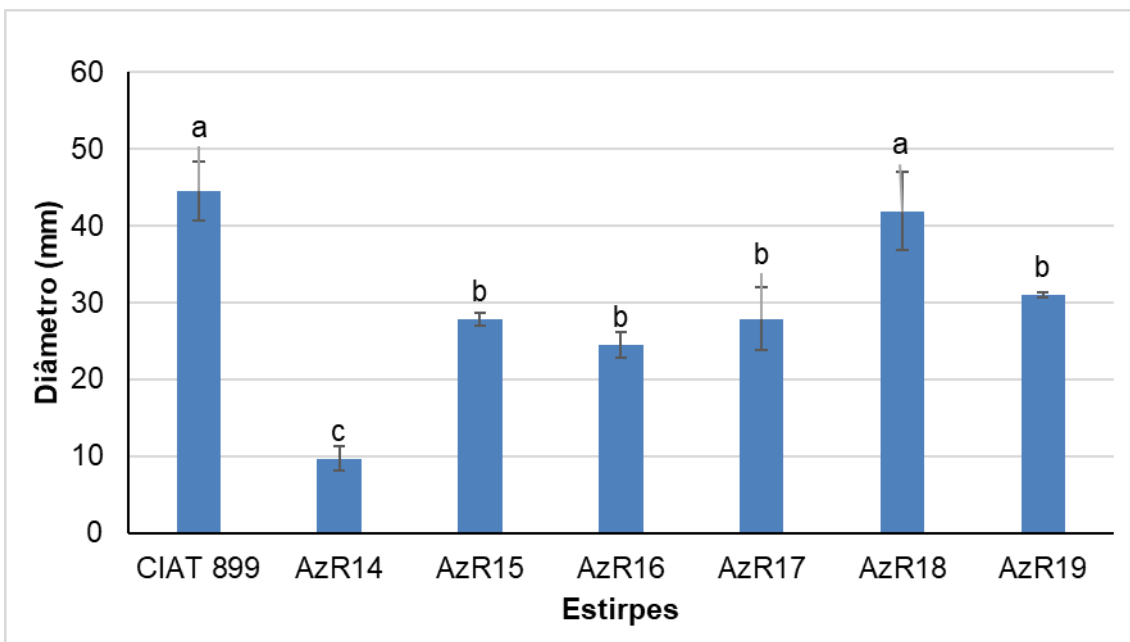


**Figura 3:** Formação de biofilme de CIAT 899 e das estirpes resistentes à azida (colunas azuis) e crescimento de CIAT899 e das estirpes resistentes à azida (colunas vermelhas). \*Dados são médias de 6 repetições técnicas e 2 repetições biológicas  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Skott Knott a  $p \leq 0,05$ . Biofilme avaliado pela absorbância a 570nm e crescimento absorbância a 600nm.

No que diz respeito a locomoção, o teste de *swarming* foi realizado para observar se havia diferença no padrão de locomoção entre os mutantes AzR quando comparados com a estirpe selvagem, porém, após a realização do teste em meio semi-sólido contendo 0,7% de ágar, foi possível observar que os mutantes AzR foram afetados na capacidade de locomoção sob superfície, exceto o mutante AzR18 que não diferiu significativamente de CIAT 899 (Figura 5). O mutante AzR14 apresentou o menor diâmetro entre os mutantes, revelando que a mutação teve efeitos marcantes à locomoção deste mutante.

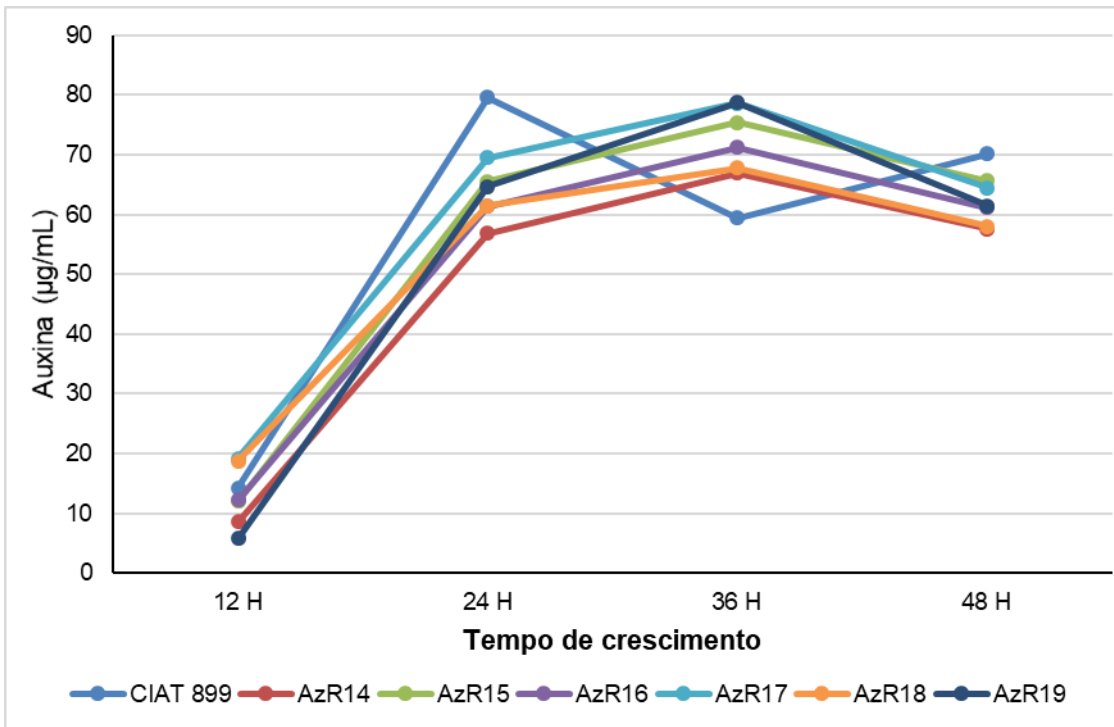


**Figura 4:** Teste de motilidade de Swarming realizado em meio YM com 0,7% de ágar da estirpe CIAT 899 e os mutantes AzR com cultivo a 28°C durante 7 dias.

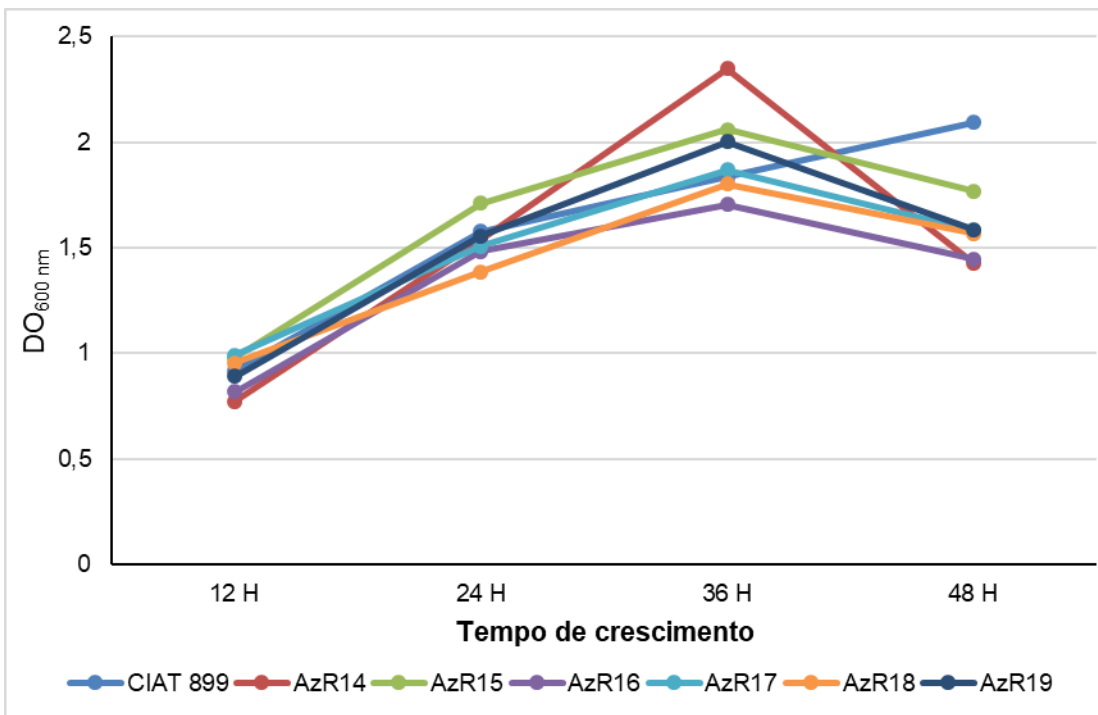


**Figura 5:** Atividade de locomoção (Swarming) de mutantes resistentes a azida e CIAT 899. \*Dados são médias de 2 repetições biológicas  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Skott Knott a  $p \leq 0,05$ .

Na avaliação do crescimento e a produção de auxinas, na presença de triptofano, de *R. tropici* CIAT899 e dos mutantes AzR. Com a realização desse ensaio, obteve-se o gráfico da produção de auxina (figura 6), em 48 horas de cultivo e a curva de crescimento de CIAT 899 e seus mutantes AzR em  $DO_{600nm}$  (em que pode-se ter uma comparação com relação ao comportamento de crescimento entre as estirpes em meio YM) (figura 7).



**Figura 6:** Produção de auxina no intervalo de 48 h de cultivo em  $DO_{600nm}$  de CIAT899 e AzR



**Figura 7:** Curva de crescimento de CIAT 899 e mutantes AzR em  $DO_{600nm}$

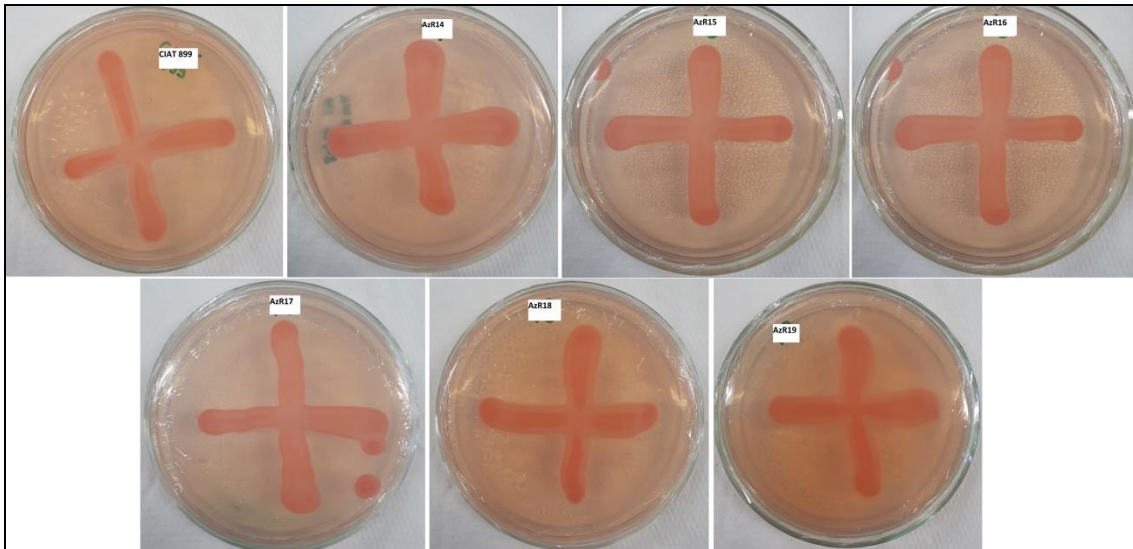
Pode-se também obter a estatística da produção de auxina e AIA da estirpe CIAT 899 e dos mutantes (Tabela 2) e assim ter uma análise comparativa dos mutantes em relação a estirpe selvagem para a produção desse fitohormônio essencial no crescimento vegetal.

**Tabela 2:** Produção de auxina por CIAT 899 e mutantes AzR, crescimento a DO<sub>600nm</sub> e produção de AIA

Tempo de crescimento	Estirpes	Auxina (µg/mL)	DO <sub>600 nm</sub>	AIA/DO
12 H	CIAT 899	14.22 b	0.92 b	15.5 B
	AzR14	8.60 d	0.77 d	11.1 C
	AzR15	12.00 c	0.98 a	12.2 C
	AzR16	12.24 c	0.82 c	14.9 B
	AzR17	19.21 a	0.99 a	19.3 A
	AzR18	18.72 a	0.96 a	19.6 A
	AzR19	5.79 d	0.89 b	6.5 D
	C.V. (%)	0.14	2.41	13.7
24 H	CIAT 899	79.54 a	1.58 a	50.6 A
	AzR14	56.81 e	1.54 a	37.1 B
	AzR15	65.51 c	1.71 a	38.7 B
	AzR16	61.38 d	1.48 a	41.5 B
	AzR17	69.53 b	1.51 a	46.5 A
	AzR18	61.45 d	1.39 a	44.5 A
	AzR19	64.64 c	1.56 a	41.6 B
	C.V. (%)	3.04	8.66	9.1
36 H	CIAT 899	59.37 c	1.84 c	32.3 B
	AzR14	66.89 b	2.35 a	28.5 B
	AzR15	75.35 a	2.06 b	36.6 A
	AzR16	71.23 a	1.71 d	41.8 A
	AzR17	78.64 a	1.87 c	42.1 A
	AzR18	67.83 b	1.80 c	37.6 A
	AzR19	78.71 a	2.00 b	39.3 A
	C.V. (%)	6.09	2.9	7.0
48 H	CIAT 899	70.15 a	2.09 a	33.5 B
	AzR14	57.64 b	1.43 d	40.4 A
	AzR15	65.68 a	1.77 b	37.1 B
	AzR16	61.14 b	1.45 d	42.3 A
	AzR17	64.47 a	1.58 c	40.8 A
	AzR18	58.06 b	1.57 c	37.0 B
	AzR19	61.42 b	1.59 c	38.8 A
	C.V. (%)	4.95	3.29	6.4

\*Dados representam a média de três repetições biológicas. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste Scott – Knott ( $p \leq 0,05$ )

Já com relação à análise de polissacarídeo obteve-se o seguinte resultado: todas as estirpes mutantes e a CIAT 899 apresentaram exopolissacarídeo que cobriu e ultrapassou a área riscada, sendo o resultado representado por (+++).



**Figura 1:** Análise de produção de polissacarídeo. Crescimento da cultura em meio YM a 28°C em 48 horas.

### 3.3.3. Ensaio de Inoculação

Foram realizados três experimentos de inoculação em plantas de feijão comum (*P. vulgaris* L.) obtendo-se os seguintes resultados:

#### 3.3.3.1. Experimento 1

No primeiro experimento de inoculação em feijão com a estirpe CIAT 899 e os mutantes AzR em vasos com solução nutritiva e desenvolvimento em câmara de crescimento (tendo início do plantio no dia 26 de Junho de 2017 e o desmonte dos vasos ocorreu no dia 14 de Julho de 2017), foram avaliados os seguintes parâmetros: massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), massa seca da planta (MSPL), número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN) e a eficiência da fixação de nitrogênio (EFIFN), obtendo-se o seguinte resultado (Tabela 3) :

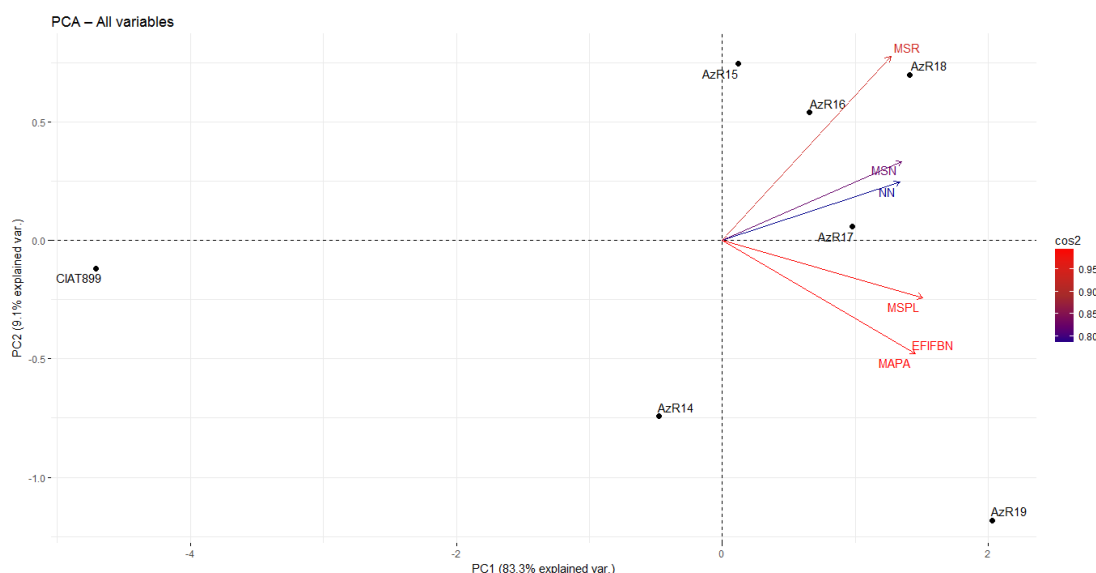
**Tabela 3:** Características simbióticas de CIAT 899 e mutantes AzR do experimento 1

Tratamentos	MSPA (g)	%	MSR (g)	%	MSPL (g)	%	NN	%	MSN (g)	%	EFIFN			
CONTROLE	0,268	91,1	0,220	a	237,6	0,488	138	0,000	b	0,000	c	191,01		
N- CONTROLE	0,330	135,7	0,081	b	23,9	0,411	100	0,000	b	0,000	c	235,71		
CIAT899	0,140	0,0	0,065	b	0,0	0,205	0	73,333	b	0,0	0,015	b	0,0	100,00
AzR14	0,253	80,4	0,088	b	35,5	0,341	66	92,000	a	25,5	0,023	b	55,9	180,36
AzR15	0,233	66,1	0,101	b	54,7	0,333	63	88,333	a	20,5	0,047	a	216,9	166,07
AzR16	0,247	76,1	0,101	b	54,6	0,347	69	103,667	a	41,4	0,041	a	171,0	176,14
AzR17	0,262	86,9	0,095	b	45,6	0,357	74	109,667	a	49,5	0,041	a	174,4	186,86
AzR18	0,257	83,3	0,102	b	57,1	0,359	75	116,333	a	58,6	0,045	a	197,3	183,29
AzR19	0,313	123,2	0,088	b	35,0	0,401	95	103,333	a	40,9	0,050	a	233,6	223,21
C.V.			26,98				34,16			35,2				

\*MSPA: massa seca da parte aérea; MSR: massa seca da raiz; MSPL: massa seca da planta; NN: número de nódulos; MSN: massa seca de nódulos; EFIFN: eficiência da fixação de nitrogênio.

No tratamento Controle e N-controle, não é possível analisar dados como o NN e MSN, já que esses dois tratamentos são livres da inoculação com bactérias simbióticas formadoras de nódulos capazes de fixar Nitrogênio. Com relação aos outros tratamentos, nesse experimento, pode-se dizer que os mutantes AzR tiveram resultados melhores ou similares com a estirpe selvagem utilizada como controle (CIAT899), como o mutante AzR18 que se destacou em MSR e NN e o mutante AzR19, mostrou-se melhor em MSPA, MSPL, MSN e EFIFBN, quando comparado aos demais tratamentos.

Na análise de componente principal (PCA) (Figura 8) fica claro que CIAT 899, AzR14 e 15 apresentaram resultados inferiores aos demais mutantes, além de ser possível fazer uma correlação entre o mutante AzR 16 e 18 e MSR, AzR17 e NN e MSN e o mutante AzR19 e MSPA, MSPL e EFFBN. .



**Figura 9:** Análise de PCA de variáveis de crescimento de planta de feijão inoculadas com mutantes de CIAT899 resistentes a azida sódica experimento 1.

### 3.3.3.2. Experimento 2

No segundo experimento de inoculação em feijão com a estirpe CIAT 899 e os mutantes AzR em vasos de Leonard e crescimento em casa de vegetação no IAPAR (tendo início do plantio no dia 15 de Setembro de 2017 e desmonte dos vasos no dia 15 de Outubro de 2017), foram analisados os seguintes dados: MSPA, MSR, MSPL, NN, MSN, NTOTAL, EFIFN, NAC e NAC RELATIVO, obtendo-se o seguinte resultado (Tabela 4):

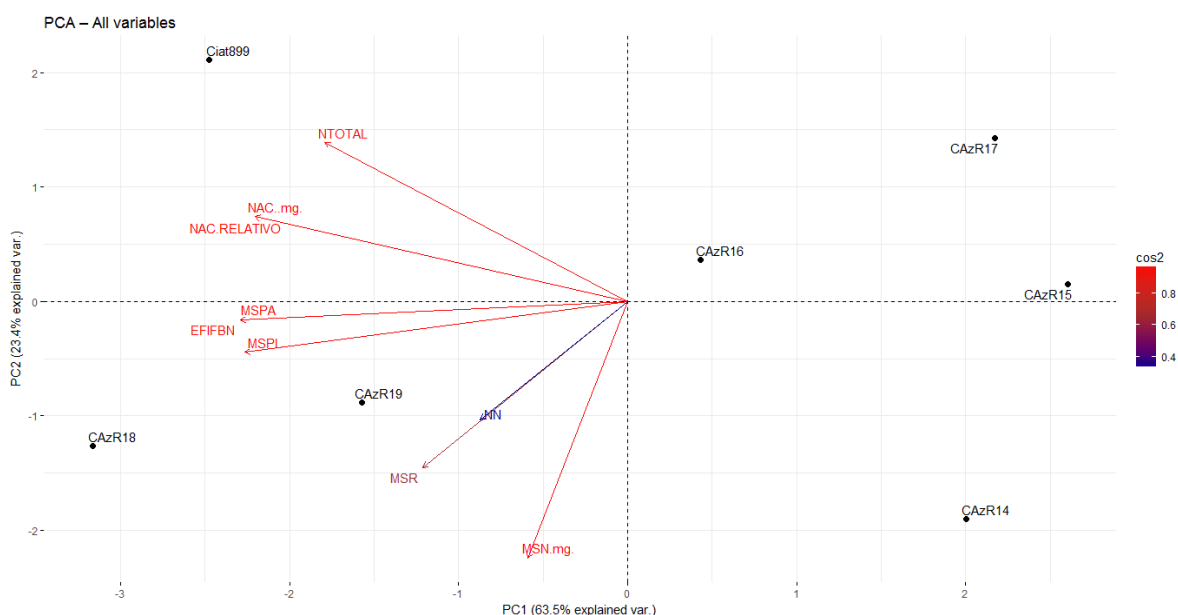
**Tabela 4:** Características simbióticas de CIAT 899 e mutantes AzR do experimento 2

Tratamentos	MSPA (g)	%	MSR (g)	%	MSPL (g)	%	NN	%	MSN	%	NTOTAL (g/kg <sup>-1</sup> )	EFIFN	NAC (mg)	NAC RELATIVO		
Controle	0,47	c -69	0,348	B -11	0,814	c -57	0	b	0	c	9,947	a	14,87	4,635	d	7,62
N-controle	3,13	a 109	1,009	A 159	4,14	a 119	0	b	0	c	19,43	a	100	60,81	a	100,0
Ciat899	1,50	b 0	0,389	B 0	1,888	b 0	139,5	a 0	0,075	b 0	30,9	a	47,86	46,07	b	75,75
CAzR14	1,18	b -22	0,413	B 6	1,589	b -16	147,8	a 6	0,107	a 42	18,68	a	37,55	22,23	c	36,55
CazR15	1,14	b -24	0,408	B 5	1,551	b -18	124,7	a 11	0,084	b 11	20,26	a	36,51	22,68	c	37,30
CazR16	1,32	b -12	0,417	B 7	1,735	b -8	127,5	a -9	0,087	b 16	23,67	a	42,08	30,97	c	50,92
CazR17	1,22	b -19	0,327	B -16	1,544	b -18	135,5	a -3	0,071	b -6	21,47	a	38,86	26,61	c	43,76
CazR18	1,64	b 9	0,485	B 25	2,125	b 13	138,8	a 0	0,105	a 40	24,65	a	52,37	40,55	b	66,68
CazR19	1,54	b 3	0,4	B 3	1,938	b 3	151,8	a 9	0,099	a 32	22,95	a	49,09	35,32	b	58,08
CV(%)	19,15%		16,99%		16,01%		16,12%		20,94%		20,20%		20,29%			

\*MSPA – Massa seca da parte aérea; MSR – Massa seca da raiz; MSPL- Massa seca da planta; NN- Número de nódulos; MSN- Massa seca de nódulos; NTOTAL- Nitrogênio total; EFIFN- Eficiência da fixação de nitrogênio; NAC- Nitrogênio acumulado; NAC RELATIVO- Nitrogênio acumulado relativo

Já no experimento 2, o mutante AzR18 mostrou-se eficiente em alguns parâmetros analisados como MSPA, MSR, MSPL, MSN, e EFIFN, assim como o mutante AzR19, apresentou um maior NN com relação as demais bactérias inoculadas, mas quando se tratou de conteúdo de nitrogênio total e nitrogênio acumulado, a estirpe CIAT899 apresentou melhor desempenho. Os demais mutantes analisados, não se mostraram tão eficientes quando a estirpe selvagem.

Na análise de PCA (Figura 9) os mutantes AzR14, 15, 16 e 17 não estão correlacionados com nenhum dos dados analisados quando comparados aos mutantes AzR18 e 19 que se correlacionam a bons resultados no que diz respeito a MSPA, MSPL, EFIFN, NN, MSN e MSR e CIAT 899 que apresenta-se correlação com resultados de NTOTAL, NAC e NACRELATIVO.



**Figura 10:** Análise de PCA de variáveis de crescimento de planta de feijão inoculadas com mutantes de CIAT899 resistentes a azida sódica experimento 2

### 3.3.3.3. Experimento 3

No terceiro experimento de inoculação com a estirpe CIAT899 e os mutantes AzR em vasos de Leonard e crescimento em casa de vegetação na UEL, com plantio no dia 21 de Maio de 2018 e desmonte dos vasos em 21 de Junho de 2018, foram analisados os seguintes dados: altura da planta, MSPA, MSR, MSPL, NN, MSN, NTOTAL, EFIFN, NAC e NAC RELATIVO, obtendo-se o seguinte resultado:

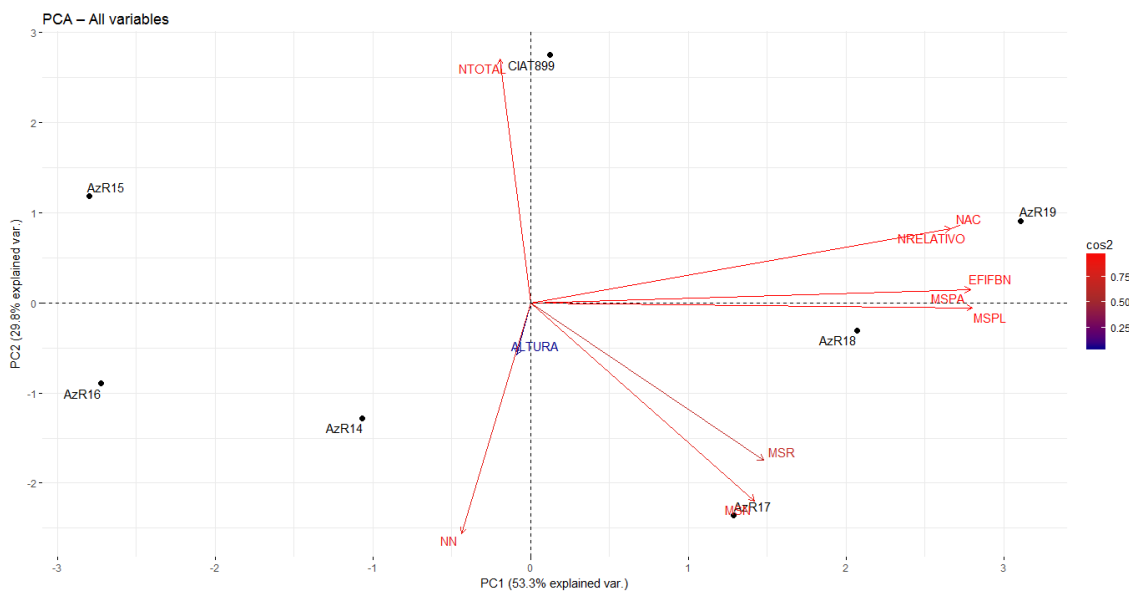
**Tabela 5:** Características simbióticas de CIAT 899 e mutantes AzR do experimento 3

	ALTURA (cm)	%	MSPA (g)	%	MSR (g)	%	MSPL (g)	%	NN	%	MSN (g)	%	NTOTAL (g/kg <sup>-1</sup> )	%	EFIFN	NAC (mg/planta)	%	NRELATIVO	
CONTROLE	23,000	d -20,7	0,529	c -36,3	0,212	b 4,5	0,740	c -28,3	0,0	C	0	c	24,362	b -38,9	17,4	13,214	c -60,2	17,6	
N-CONTROLE	35,500	a 22,4	3,033	a 265,1	0,562	a 177,4	3,595	a 247,9	0,0	C	0	c	24,682	b -38,1	100,0	74,919	a 125,5	100,0	
CIAT899	29,000	b 0,0	0,831	b 0,0	0,202	b 0,0	1,033	b 0,0	81,0	B	0,0	0,069	b 0,0	39,870	a 0,0	27,4	33,229	b 0,0	44,4
AzR14	28,000	b -3,4	0,731	c -12,0	0,231	b 13,9	0,962	c -6,9	100,3	A	23,8	0,084	b 21,1	34,797	a -12,7	24,1	25,300	c -23,9	33,8
AzR15	27,500	b -5,2	0,590	c -29,0	0,219	b 8,1	0,809	c -21,7	82,8	B	2,2	0,074	b 7,1	38,310	a -3,9	19,5	22,492	c -32,3	30,0
AzR16	28,000	b -3,4	0,618	c -25,7	0,222	b 9,5	0,839	c -18,8	100,5	A	24,1	0,075	b 8,1	35,164	a -11,8	20,4	21,739	c -34,6	29,0
AzR17	29,000	b 0,0	0,861	b 3,7	0,257	b 26,9	1,118	b 8,2	99,3	A	22,5	0,103	a 48,7	34,504	a -13,5	28,4	29,803	b -10,3	39,8
AzR18	29,750	b 2,6	0,965	b 16,1	0,224	b 10,5	1,189	b 15,1	95,5	A	17,9	0,091	a 30,8	36,148	a -9,3	31,8	35,139	b 5,7	46,9
AzR19	25,750	c -11,2	1,016	b 22,3	0,252	b 24,5	1,268	b 22,7	82,8	B	2,2	0,082	b 17,5	36,685	a -8,0	33,5	37,292	b 12,2	49,8
C.V.	5,89%		13,45%		10,44%		12,40%		14,24%		21,57%		10,99%			25,34%			

\*MSPA - Massa seca da parte aérea; MSR – Massa seca da raiz; MSPL- Massa seca da planta; NN- Número de nódulos ; MSN- Massa seca de nódulos; NTOTAL- Nitrogênio total; EFIFN- Eficiência da fixação de nitrogênio; NAC- Nitrogênio acumulado; NAC RELATIVO- Nitrogênio acumulado relativo

No experimento 3, os mutantes AzR 17, 18 e 19 mostraram-se eficientes em alguns parâmetros analisados como MSPA, MSR, MSPL, MSN, e EFIFBN, além disso, os mutantes AzR 18 e 19 também apresentaram melhor desempenho com relação ao NAC e NRELATIVO, porém quando se fala em nitrogênio total, a estirpe CIAT899 apresenta-se com melhor resultado. Os demais mutantes AzR não apresentaram bons resultados quando comparados com os demais tratamentos.

Na análise de PCA (Figura 10) os mutantes AzR14, 15 e 16 não estão correlacionados com nenhum dos dados analisados quando comparados aos mutantes AzR18 e 19 que se correlacionam a bons resultados no que diz respeito a NAC, NACRELATIVO, EFIFN, MSPA e MSPL, o mutante AzR 17 correlaciona-se a um bom resultado relacionado a MSR e MSN e CIAT899 apresenta-se correlação com resultado melhor de NTOTAL.



**Figura 21:** Análise de PCA de variáveis de crescimento de planta de feijão inoculadas com mutantes de CIAT899 resistentes a azida sódica experimento 3

### 3.4. DISCUSSÃO

Neste trabalho buscou-se fazer uma análise comparando os mutantes obtidos por meio da resistência à azida sódica com a estirpe CIAT 899 para melhorar a relação simbiótica com o feijão, bem como a fixação biológica do nitrogênio para que se obtenha inoculantes mais eficientes e diminua a utilização de fertilizantes nitrogenados, ocasionando, conseqüentemente, menor impacto ambiental e gastos para a agricultura.

Para os rizóbios, vários traços fenotípicos mostraram-se importantes para a sua competitividade em nodulação por isso a importância de se analisar a motilidade, produção de biofilme e polissacarídeo, bem como a produção de auxina (LARDI, et al., 2017), pois são parâmetros que estão intimamente relacionados ao sucesso da simbiose e fixação do nitrogênio.

Desse modo a caracterização dos seis mutantes obtidos, no teste do biofilme, se destacaram o AzR15, 18 e 19 quando comparados com CIAT 899. A formação de biofilme permite que bactérias do solo colonizem o hospedeiro e sobrevivam a estresses ambientais, como a limitação de nutrientes e outras condições desfavoráveis, por isso é fundamental entender o processo de formação do biofilme, visto que está relacionado ao processo da nodulação (RINAUDI & GIORDANO, 2010), esse resultado pode explicar o bom resultado dessa espécie de mutante no experimento 1 e 3, no que diz respeito a número de nódulos e massa seca nodular.

Avaliou-se também a motilidade das estirpes mutantes e selvagem através do teste de *Swarming*, pois o processo de mutação ocorreu de forma aleatória, assim genes relacionados a locomoção poderiam ter sofrido alterações. A locomoção por *Swarming* pode desempenhar um papel importante na colonização de ambientes naturais por bactérias (TAMBALO, et al., 2010), podendo aumentar a eficiência simbiótica existente entre rizóbio-leguminosa. Em nosso trabalho, porém, não foi realizado testes genéticos para saber o que poderia influenciar na motilidade, apenas um teste qualitativo mostrando que não houve diferença no padrão de locomoção entre a estirpe selvagem e os mutantes que mostraram resistência a azida sódica, onde observamos que todos cresceram de forma circular. Porém, os mutantes AzR

foram, de alguma forma afetados na capacidade de locomoção, com exceção do AzR18 que não diferiu significativamente de CIAT 899. O mutante AzR14 apresentou o menor diâmetro entre os mutantes, revelando que a mutação teve efeitos marcantes na locomoção deste mutante.

Buscou-se avaliar também, a produção de auxinas (compostos indólicos) de *R. tropici* CIAT899 e seus mutantes AzR, podendo dizer que nas primeiras 12 horas, os mutantes AzR17 e 18 apresentaram maior produção de auxina e AIA comparado com CIAT 899. Em análise de 24 horas, porém, CIAT 899 teve maior produção de auxina e AIA do que todos os outros mutantes. 36 horas após, todos os mutantes, exceto AzR14, foram melhores que a CIAT 899 tanto na produção de auxina quanto de AIA. E em última análise realizada em 48 horas, CIAT 899 apresentou melhor resultado em produção de auxina que as demais estirpes, porém em relação à produção de AIA, os mutantes tiveram melhor resultado, pode-se dizer então que os mutantes apresentaram resultados melhores ou similares a estirpe selvagem utilizada nesse experimento. A manutenção adequada de níveis de auxina nas células vegetais é importante para regular todos os aspectos do crescimento e desenvolvimento da planta (TAIZ & ZEIGER, 2009).

Mutações nos genes produtores de polissacarídeos podem afetar o processo de infecção de várias maneiras, como, por exemplo, incapacitando a formação dos cordões de infecção, que resultaria na formação de nódulos vazios, não fixadores de N<sub>2</sub> (GRAY & ROLFE, 1990), porém neste trabalho com os mutantes AzR obtidos não apresentaram diferença com a estirpe selvagem.

Nos ensaios de inoculação com os seis mutantes AzR e a estirpe CIAT 899, em diferentes condições de cultivo (experimento 1 em câmara de crescimento, experimento 2 em casa de vegetação no IAPAR e experimento 3 em casa de vegetação na UEL) foi observado que três mutantes (AzR17, AzR18 e Azr19) exibiram resultados melhores ou similares a estirpe selvagem em pelo menos algum parâmetro analisado. Como, por exemplo, no experimento 1, o AzR19 foi o mutante que apresentou melhor desempenho em MSPA, MSPL e EFIFN. Já no experimento 2, os mutantes AzR 18 e 19 foram melhores, porém quando se trata de conteúdo de nitrogênio total, a estirpe selvagem ainda é superior e no experimento 3, houve uma reprodutibilidade

dos resultados obtidos no experimento 2, em que o AzR17 também mostrou bom resultado.

Em 2005, SHARMA & VASUDEVA, avaliaram a produção do Ácido Indol Acético (AIA) em três mutantes de *Azospirillum brasilense* e um mutante de *Acetobacter diazotrophicus* resistentes à azida sódica inoculados em algodão, em que a produção de AIA foi maior em mutantes em comparação com suas respectivas linhagens parentais, porém o mecanismo pelo qual se obteve esse resultado ainda é desconhecido. Neste mesmo experimento, a porcentagem de nitrogênio e o teor de nitrogênio total com linhagens parentais e mutantes foram estimados em algodão. Houve um valor significativamente maior de conteúdo de nitrogênio nas plantas tratadas com mutantes em comparação com as plantas tratadas com suas respectivas linhagens parentais, não ocorrendo esse resultado em nosso experimento.

Com relação ao nitrogênio total, nos dois experimentos realizados em casa de vegetação, CIAT 899 apresentou resultado mais significativo que os seus respectivos mutantes.

SAINI, et al (2001), fizeram a identificação de mutantes resistentes à azida de rizóbios com maior nodulação e maior eficácia simbiótica em espécies de leguminosas indicando que a resistência à azida sódica pode ser usada como uma estratégia para enriquecer populações de mutantes com maior eficácia simbiótica, a massa dos nódulos, foi avaliada e em comparação com as estirpes do tipo selvagem, quatro mutantes resistentes à azida, mostraram um aumento significativo na nodulação e fixação de nitrogênio, bem como na massa seca da parte aérea das plantas inoculadas, resultado semelhante foi visto no experimento com a CIAT 899 e seus mutantes, em que pelo menos três (AzR17, 18 e 19) apresentaram-se com resultados melhores que a estirpe selvagem no que diz respeito a massa seca nodular e massa seca da parte aérea.

Mutantes resistentes a azida (AzR) da estirpe de *Rhizobium loti* foram isolados e nove mutantes AzR de *R. loti* foram caracterizados pela sua simbiose com plantas de *Lotus pedunculatus*, num experimento realizado por SHARMA, et al, (1997). Em comparação com a estirpe parental do tipo selvagem, os mutantes AzR exibiram ou eficácia simbiótica semelhante ou superior. As mutações melhoraram a fixação de nitrogênio, bem como

melhoraram a massa seca da parte aérea das plantas inoculadas e também aumentou a nodulação, semelhante ao resultado com CIAT 899 e seus mutantes.

Com esses resultados pode-se dizer que os mutantes AzR18 e 19 apresentam potencial para serem utilizados como futuros bioinoculantes em culturas de feijão comum e que mutação e posterior resistência a azida sódica, pode sim ser uma ferramenta utilizada para a criação de novas formulações de bioinoculantes com maior competitividade, aumentando a eficiência simbiótica e FBN, contribuindo de forma significativa para um aumento da produtividade das culturas e tornando a agricultura mais rentável de forma sustentável.

## REFERÊNCIAS

AL-QURAINY, Fahad et al. Effects of sodium azide on growth and yield traits of *Eruca sativa* (L.). **World Applied Sciences Journal**, v. 7, n. 2, p. 220-226, 2009

BHASKAR, V. Vijay; KASHYAP, L. R. Azide resistance in *Rhizobium ciceri* linked with superior symbiotic nitrogen fixation. 2004

BROUGHTON, W. J.; DILWORTH, M. J. Methods in legume-rhizobium technology: plant nutrient solutions. In: SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H.J. (Ed.). Handbook for Rhizobia. Hawaii: NifTAL Project and University of Hawaii, 1970, p. 245–249

CANTERI, Marcelo G. et al. SASM-Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v. 1, n. 2, p. 18-24, 2001.

CARVALHO, M. C. S. Árvore do conhecimento: feijão. 2008. Disponível em <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/feijao/arvore/CONTAG01\\_81\\_1311200215104.html#](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/feijao/arvore/CONTAG01_81_1311200215104.html#)> com acesso em 16. Jul. 2018

DAERR, Adrian; MOGNE, Adrien. Pendent\_drop: an imagej plugin to measure the surface tension from an image of a pendent drop. **Journal of Open Research Software**, v. 4, n. 1, 2016

GALVANI, F.; GAERTNER, E. Adequação da metodologia Kjeldahl para determinação de nitrogênio total e proteína bruta. **XI MET**, p. 34, 2006

GORDON, Solon A.; WEBER, Robert P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v. 26, n. 1, p. 192, 1951.

GRAY, J. X.; B. G. ROLFE. Exopolysaccharide production in *Rhizobium* and its role in invasion. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.4, p.1425-1431, 1990.

GUPTA, A.; DAS, S. K.; BANIK, A. K. Induced mutation and selection of a high yielding strain of *Micrococcus glutamicus* for L-lysine production. **International Journal of Pharma and Bio Science**, v. 3, n. 2, 2012.

HOWIESON, J. G.; DILWORTH, M. J. **Working with rhizobia**. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 2016

HUNGRIA, Marianagela; ARAUJO, Ricardo S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília, DF: Embrapa-Serviço de Produção e Informação, 1994

HUNGRIA, Mariangela. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011.

HUNGRIA, Mariangela; CAMPO, Rubens José; MENDES, IÊDA CARVALHO. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. **Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E)**, 2007

HUNGRIA, Mariangela; NOGUEIRA, Marco Antonio; ARAUJO, Ricardo Silva. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, n. 7, p. 791-801, 2013).

HUNGRIA, Mariangela; NOGUEIRA, Marco Antonio; ARAUJO, Ricardo Silva. Soybean seed co-inoculation with Bradyrhizobium spp. and Azospirillum brasilense: a new biotechnological tool to improve yield and sustainability. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, n. 06, p. 811, 2015.

HUNGRIA, Mariangela; VARGAS, Milton AT. Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field crops research**, v. 65, n. 2-3, p. 151-164, 2000.

HUNGRIA, Mariangela; CAMPO, Rubens José; MENDES, Iêda Carvalho. Benefícios da inoculação da cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) com linhagens eficientes e competitivas de *Rhizobium tropici*. **Biologia e Fertilidade dos Solos**, v. 39, n. 2, p. 88-93, 2003).

JOLLIFFE, Ian T.; CADIMA, Jorge. Principal component analysis: a review and recent developments. **Phil. Trans. R. Soc. A**, v. 374, n. 2065, p. 20150202, 2016.

KHAN, Salim; AL-QURAINY, Fahad; ANWAR, Firoz. Sodium azide: a chemical mutagen for enhancement of agronomic traits of crop plants. **Environ. Int. J. Sci. Tech**, v. 4, p. 1-21, 2009.

KEARNS, Daniel B. A field guide to bacterial swarming motility. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 634, 2010

LARDI, Martina et al. Competition experiments for legume infection identify *Burkholderia phymatum* as a highly competitive  $\beta$ -rhizobium. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1527, 2017.

LEWIN, Benjamim. Genes IX. 9ª edição. **Porto Alegre/Artmed**, 2009.

MARTÍNEZ-ROMERO, Esperanza et al. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 417-426, 1991

MIRANDA, J. et al. *Rhizobium etli* cytochrome mutants with derepressed expression of cytochrome terminal oxidases and enhanced symbiotic nitrogen accumulation. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 45, n. 1-2, p. 182-188, 1996

ORMEÑO-ORRILLO, Ernesto et al. Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 1, 2012

OWAIS, W. M.; KLEINHOF, A. Metabolic activation of the mutagen azide in biological systems. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 197, n. 2, p. 313-323, 1988

PADOVAN, Milton Parron et al. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN) PELA SOJA [GLYCINE MAX (L.)MERRILL], CULTIVADA SOB MANEJO ORGÂNICO, EM DIFERENTES ÉPOCAS DE SEMEADURA, PARA FINS DE ADUBAÇÃO VERDE. **Cadernos de Agroecologia**, v. 1, n. 1, 2006.

RINAUDI, Luciana V.; GIORDANO, Walter. An integrated view of biofilm formation in rhizobia. **FEMS microbiology letters**, v. 304, n. 1, p. 1-11, 2010.

SAINI, S.S. SINDHU, K.R. DADARWAL. Azide-Resistant Mutants of *Azorhizobium caulinodans* with Enhanced Symbiotic Effectiveness. **Folia Microbiol.** 46 (3), 217-222 (2001)

SRIVASTAVA, P. et al. Mutagenic effects of sodium azide on the growth and yield characteristics in wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.). **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 10, n. 3, p. 190, 2011)

SHARMA, Pankaj; VASUDEVA, Manjula. Azide resistant mutants of *Acetobacter diazotrophicus* and *Azospirillum brasilense* increase yield and nitrogen content of cotton. **Journal of Plant Interactions**, v. 1, n. 3, p. 145-149, 2005.

SHARMA, Shashi B.; SAKADEVAN, K.; SHARMA, Sunila. Mutations conferring azide resistance enhance symbiotic nitrogen fixation in *Rhizobium loti*. **Plant and soil**, v. 189, n. 2, p. 221-229, 1997

SERRAJ, Rachid. **Symbiotic nitrogen fixation: prospects for enhanced application in tropical agriculture**. Oxford & IBH, New Delhi, IN, 2004.

SHARMA, Shashi B.; SAKADEVAN, K.; SHARMA, Sunila. Mutations conferring azide resistance enhance symbiotic nitrogen fixation in *Rhizobium loti*. **Plant and soil**, v. 189, n. 2, p. 221-229, 1997.

SHUKLA, Sudhir K.; RAO, Toleti Subba. An Improved Crystal Violet Assay for Biofilm Quantification in 96-Well Microtitre Plate. **Biorxiv**, p. 100214, 2017

SHIN, Wansik et al. Role of Diazotrophic Bacteria in Biological Nitrogen Fixation and Plant Growth Improvement. **Korean Journal of Soil Science and Fertilizer**, v. 49, n. 1, p. 17-29, 2016.

SOMASEGARAN P, HOBEN, HJ. **Methods in legume-Rhizobium technology**. Hawai: Niftal Project, 367p. 1985.

SRIVASTAVA, P. et al. Mutagenic effects of sodium azide on the growth and yield characteristics in wheat (*Triticumaestivum* L. em. Thell.). **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 10, n. 3, p. 190, 2011

TAIZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. (Trad.). SANTAREM E.R. et al. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p

TAMBALO, Dinah D.; YOST, Christopher K.; HYNES, Michael F. Characterization of swarming motility in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. **FEMS microbiology letters**, v. 307, n. 2, p. 165-174, 2010

TRIPLETT, Eric W. Construction of a symbiotically effective strain of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with increased nodulation competitiveness. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 1, p. 98-103, 1990

VINCENT, James Matthew et al. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. **A manual for the practical study of the root-nodule bacteria.**, 1970

VITOUSEK, Peter M. et al. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. In: **The Nitrogen Cycle at Regional to Global Scales**. Springer, Dordrecht, 2002. p. 1-45

WEIR, B.S. (2016)The current taxonomy of rhizobia. **NZ Rhizobia website**. <https://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia> Last updated: X Jan, 2016

YADAV, A. S. et al. Isolation and symbiotic characterization of azide resistant mutants of different species of Rhizobia. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 95-100, 2009.

ZAHRAN, Hamdi Hussein. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 63, n. 4, p. 968-989, 1999.

ZLOSNIK, James EA et al. Differential mucoid exopolysaccharide production by members of the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1470-1473, 2008

## ANEXO

### Anexo A

Solução nutritiva Broughton and Dellworth, 1970

Solução Estoque	M	elementos	Sais	g/l	M
1	1000	Ca	CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	<b>294,1</b>	2,0
2	500	P	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<b>136,09</b>	1,0
3	10	Fé	Fe-EDTA	<b>4,47</b>	
	250	Mg	MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	<b>123,3</b>	0,5
	250	K	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	<b>87,0</b>	0,5
	1	Mn	MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	<b>0,206</b>	0,002
4	2	Micronutrientes	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	<b>0,247</b>	0,004
	0,5		ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	<b>0,288</b>	0,001
	0,2		CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	<b>0,100</b>	0,0004
	0,1		CoSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	<b>0,056</b>	0,0002
	0,1		NaMoO <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	<b>0,048</b>	0,0002

Ajustar o pH para 6,6 à 6,8 usando HCl ou NaOH

Diluição final nos vasos de Leonard:

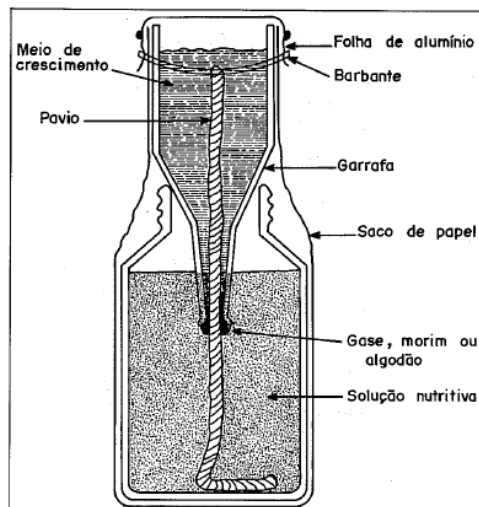
Usar 0,5 mL da solução estoque 01 – 02-03 e 04 e completar o volume para 1litro água destilada

## Anexo B



Anexo B: vasos esterilizados adaptados com frasco de vidro com solução nutritiva e papel absorvente como suporte para planta. Fonte: IAPAR

## Anexo C

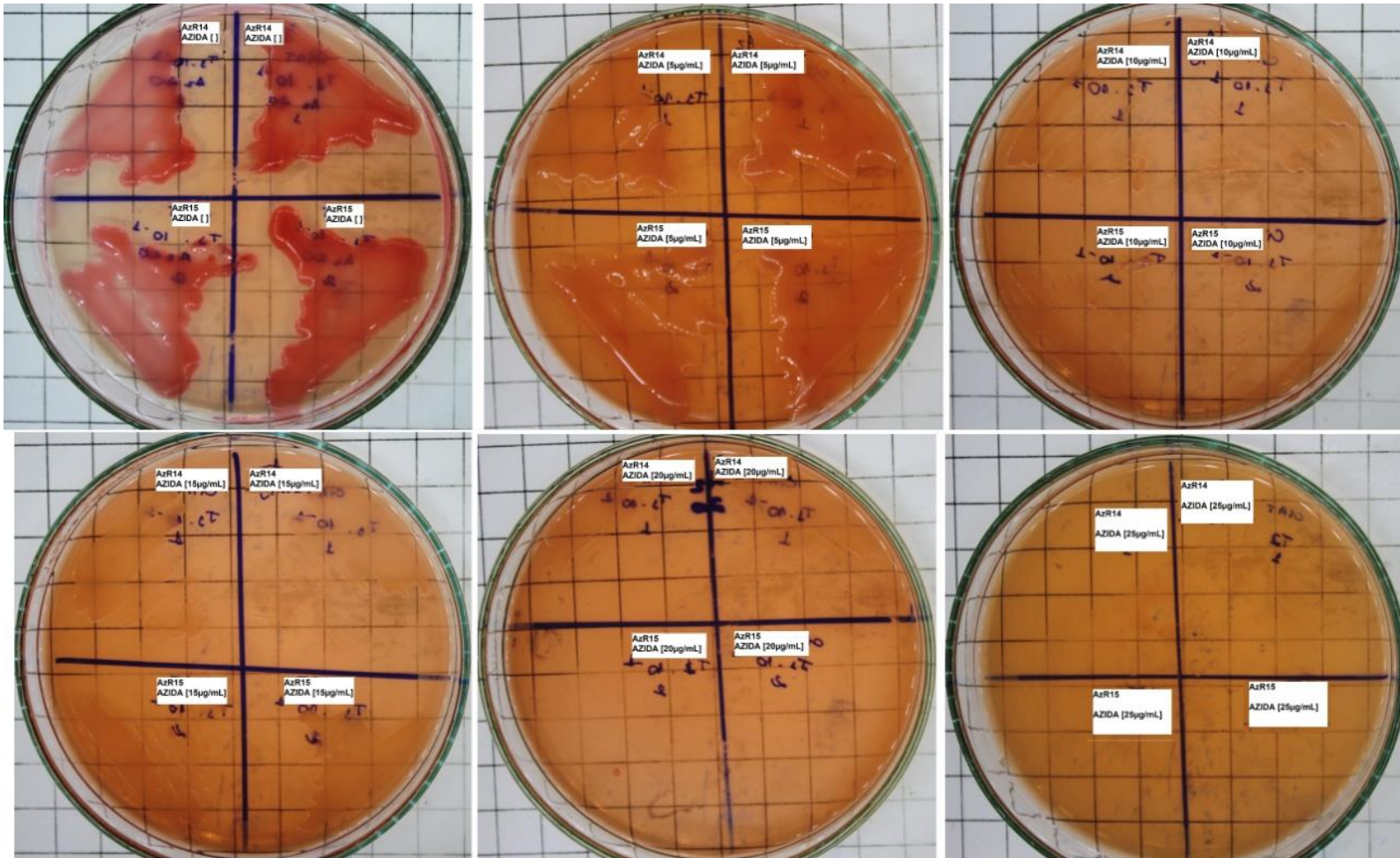


Esquema do vaso de Leonard modificado (SOMASEGARAN; HOBEN, 1985).



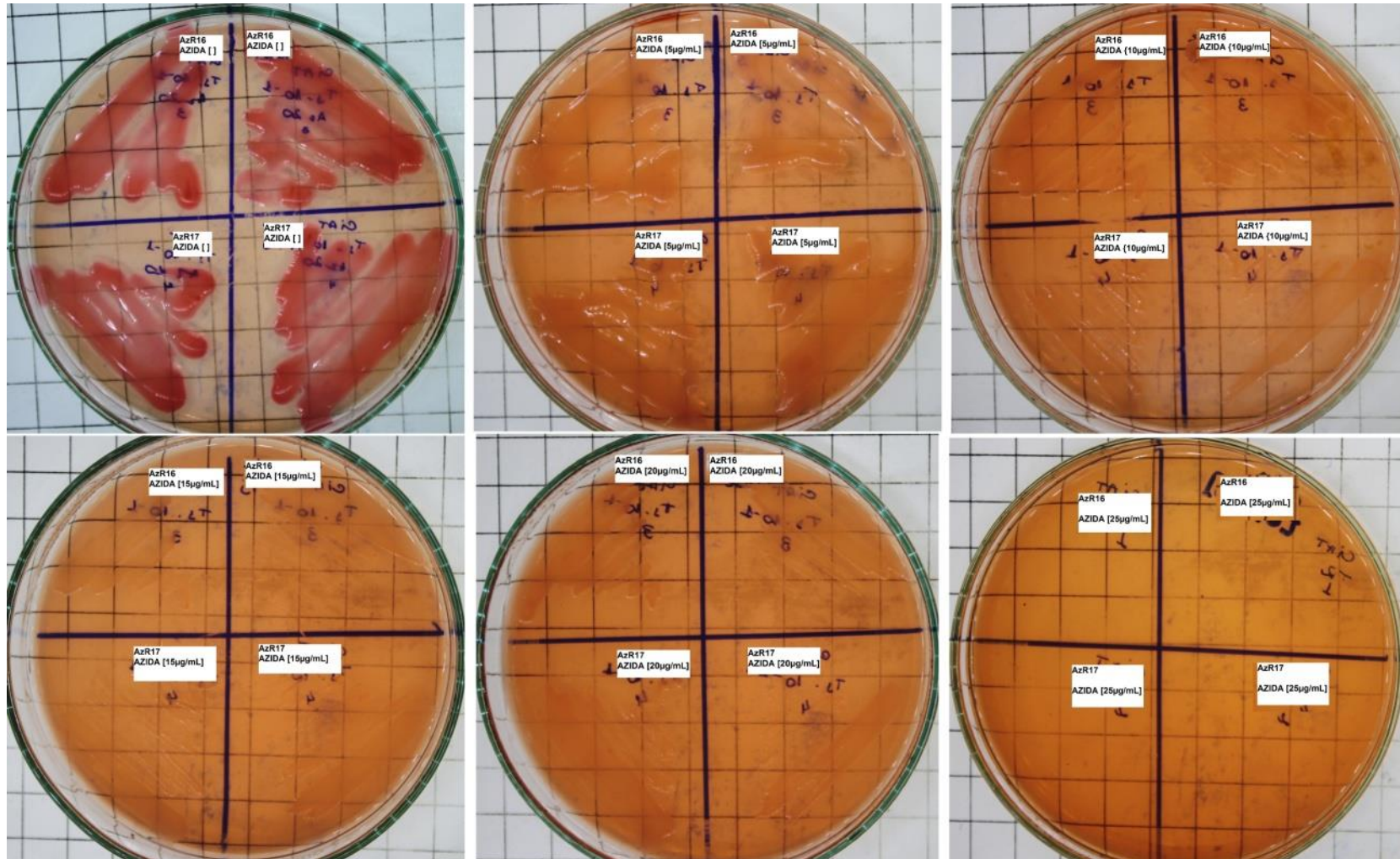
Vasos de Leonard com as plantas de feijão

ANEXO E



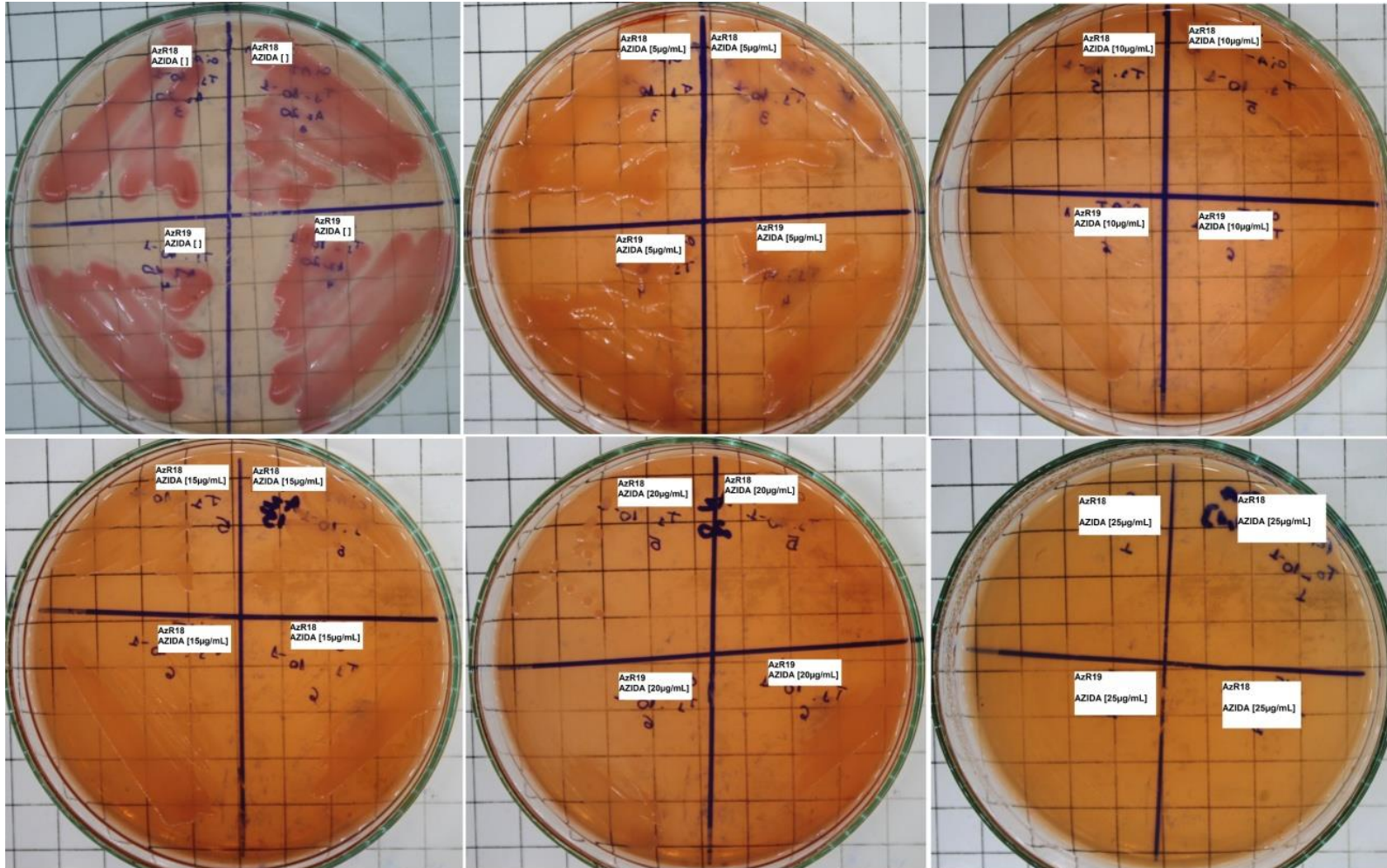
RESISTENCIA A AZIDA SÓDIA [0, 5, 10, 15, 20 E 25µg/mL] DO MUTANTE AzR14 E AzR15.

ANEXO F



RESISTENCIA A AZIDA SÓDIA [0, 5, 10, 15, 20 E 25µg/mL] DO MUTANTE AzR16 E AzR17.

ANEXO G



RESISTENCIA A AZIDA SÓDIA [0, 5, 10, 15, 20 E 25µg/mL] DO MUTANTE AzR18 E AzR1

