

Diversidade cultural de bactérias isoladas de nódulos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) cultivados em solos do Nordeste do Brasil ⁽¹⁾

Jussara Barboza de Alencar Cunha⁽²⁾; Islane Andrade Nunes⁽³⁾; Carlos Alberto Tuão Gava⁽⁴⁾; Roseane Cavalcanti dos Santos⁽⁵⁾; Lindete Míria Vieira Martins⁽⁶⁾; Paulo Ivan Fernandes Junior⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Parte da dissertação de mestrado da primeira autora desenvolvida no Programa de Pós-graduação em Horticultura Irrigada - Universidade do Estado da Bahia (UNEB);

⁽²⁾ Mestranda do Programa de Pós-graduação em Horticultura Irrigada; Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais (DTCS); Universidade do Estado da Bahia (UNEB). Av. Edgard Chastinet, s/n, São Geraldo, Juazeiro, BA, CEP 48900-000. E-mail: jussara_bac@hotmail.com; ⁽³⁾ Estudante de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco (UPE); ⁽⁴⁾ Pesquisador, Embrapa Semiárido, Petrolina, PE; ⁽⁵⁾ Pesquisadora, Embrapa Algodão, Campina Grande, PB; ⁽⁶⁾ Professora Adjunta do DTCS/UNEB.

RESUMO: A caracterização cultural de isolados de rizóbios é a primeira avaliação no trabalho de seleção desses micro-organismos. Este trabalho objetivou avaliar a diversidade cultural de bactérias isoladas de nódulos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) cultivado em solos do Semiárido, região Nordeste do Brasil. Para a obtenção dos nódulos foram utilizadas quatro amostras do horizonte superficial de solos de duas áreas de Petrolina, PE e duas áreas do município de Barbalha, CE e como planta isca a cultivar de amendoim BR 1 e a linhagem avançada LViPE-06, mais 10 linhagens obtidos a partir do cruzamento destes dois genótipos. Aos 40 dias após a emergência das plântulas, foram selecionados 10 nódulos por planta que foram desinfestados superficialmente e pressionados em meio YMA. Após a obtenção dos isolados, estes foram caracterizados pelo tempo de crescimento, alteração do pH do meio de cultura, tamanho e cor da colônia, quantidade e tipo de muco. Foram obtidos 574 isolados, havendo um predomínio de isolados de crescimento rápido, com produção de muito muco e acidificação do meio de cultura. Os isolados de amendoim foram agrupados pelo método UPGMA, com base no coeficiente de similaridade de Dice. Foram obtidos 44 grupos distintos em um coeficiente de similaridade de 100% e a formação de 25 grupos distintos, com apenas um isolado, demonstrando uma alta diversidade de grupos fenotípicos presentes em nódulos de amendoim em solos da região semiárida.

Termos de indexação: FBN, rizóbio, amendoim.

INTRODUÇÃO

A importância do amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é ressaltada pelo seu valor nutricional, pois possui praticamente mais calorias do que qualquer outro alimento, e as proteínas, ricas em aminoácidos essenciais à nutrição, podendo estas atingir até 36% do peso do grão (Freitas & Margarido, 2003). Além do consumo in natura, os grãos também podem ser

utilizados para a extração de óleo que pode ser empregado em diversos setores da indústria alimentícia, farmacêutica e química (Santos et al., 2010).

Como diversas outras leguminosas cultivadas, o amendoim é capaz de associar com bactérias fixadoras de nitrogênio (N) presentes no solo, denominadas genericamente de rizóbios. A exploração da fixação biológica de nitrogênio (FBN) na agricultura se dá através da produção de inoculantes contendo bactérias selecionadas e de eficiência agrônômica reconhecida. Na região Nordeste, a constante seleção de estirpes de rizóbio tem sido responsável pela obtenção de estirpes eficientes para as culturas como o feijão-caupi (Martins et al., 2003). Para o amendoim, bactérias promissoras também já foram isoladas da região (Santos et al., 2007; Lyra et al., 2013). Contudo, estudos com rizóbios nativos do Semiárido brasileiro ainda são escassos.

Deste modo, o presente trabalho objetivou avaliar a diversidade cultural de bactérias isoladas de nódulos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) em solos da região semiárida do Nordeste do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Quatro amostras compostas do horizonte superficial de solos, foram coletados a profundidade de 20 cm, nos municípios de Petrolina, PE e Barbalha, CE (Tabela 1). As amostras foram homogeneizadas e distribuídas em vasos de poliestireno com capacidade para 500 mL.

Para a obtenção dos isolados de rizóbio foram utilizadas como planta isca a cultivar de amendoim BR 1 e o genótipo avançado LViPE-06, mais 10 linhagens obtidos a partir do cruzamento desses dois genótipos (L. 408 - 2SV; L. 108 - 3SV; PL 46 - 2SB; PL 108 - 2SV; BR NA - 2SV; P 59 - 2SV; P 59 - 2 SB; 81 - 2SB; RUNNER 20 20 - 2SB e L 20 - 3SV). Antes da semeadura, as sementes foram previamente desinfestadas superficialmente em álcool (70%, por 30 segundos) e hipoclorito (3%, por

3 minutos), seguido de 10 lavagens sucessivas em água destilada e autoclavada (ADE), em seguida, sendo semeadas (duas por vaso).

Tabela 1 – Descrição dos solos amostrados.

Solo	Classe de Solo	Localidade	Utilização da área
1	Vertissolo	Barbalha – CE	Plantio de amendoim
2	Argissolo Vermelho	Barbalha – CE	Plantio de amendoim
3	Argissolo Vermelho-amarelo	Petrolina – PE	Pousio após cultivo de amendoim
4	Argissolo Vermelho-amarelo	Petrolina - PE	Pastagem de capim - buffel

Após 40 dias de germinação as plantas foram colhidas e os nódulos destacados. Foram selecionados 10 nódulos de cada planta para o isolamento, que foi realizado logo após a colheita. Os nódulos foram desinfestados em álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio 3% por 3 minutos e enxaguados em 10 lavagens sucessivas em ADE, para a remoção do excesso de hipoclorito. Após a desinfestação os nódulos foram macerados com o auxílio de uma pinça e riscados com alça de platina em placa de Petri com meio de cultura YMA (Vincent, 1970), com adição de vermelho congo como indicador. As placas foram incubadas a 28°C em estufa tipo BOD (Biochemistry Oxygen Demand) até o aparecimento de colônias. Repicagens sucessivas foram feitas em placas contendo meio de cultura YMA, com azul de bromotimol até a obtenção de colônias puras.

A caracterização dos isolados foi feita com base no tempo de crescimento, consistindo no aparecimento de colônias isoladas (rápida: até 3 dias; intermediária: 4 a 5 dias e lenta: acima de 6 dias); alteração do pH (ácido, neutro e alcalino); tamanho (puntiforme, 1 a 2 mm e > 2 mm); cor da colônia (amarela, branca e creme); quantidade (muito e pouco) e tipo de muco (viscoso, butírico e floculoso).

A partir da caracterização cultural foi construída uma matriz binária e os isolados foram agrupados pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method whit Arithmetic Mean) com base no coeficiente de similaridade de Dice, utilizando o programa Past (Hammer, et al., 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do isolamento dos nódulos de amendoim, foram obtidos 574 isolados que foram caracterizados culturalmente. Considerando toda a coleção, 553 (96,3%) dos isolados apresentaram crescimento rápido e apenas 8 (1,4%) isolados de crescimento lento e 13 (2,3%) de crescimento intermediário.

Com relação ao tamanho de colônias, houve um predomínio de isolados com o tamanho de colônia >2 mm (92%), seguido de colônias entre 1 a 2 mm (6%) e puntiforme (2%). Foram obtidas um maior percentual de bactérias de coloração amarela (64%), seguida de bactérias cremes (34%) e brancas (2%).

Quanto à produção de muco, houve um predomínio de produção de muito muco (94%), e quanto ao tipo de muco foram verificados isolados com muco viscoso (96%), butírico (3%) e floculoso (1%).

Para a característica de alteração de pH do meio de cultura, 85% dos isolados bacterianos foram capazes de acidificar o meio, enquanto os isolados que apresentaram reação de pH alcalina ou neutra foram de 1,7% e 13,3% respectivamente.

Estudos realizados com amendoim têm relatado tanto a presença de rizóbios de crescimento lento, com características similares às apresentadas pelo gênero *Bradyrhizobium* (Thies et al., 1991) quanto abundância de bactérias de crescimento rápido e capacidade de acidificar o meio de cultura, com características similares a *Rhizobium* spp., (Santos et al., 2007; Lyra et al., 2013).

Estudos com rizóbios isolados de amendoim em solos do Estado de Pernambuco também já demonstraram a abundância de rizóbios de crescimento rápido e capacidade de alcalinizar o meio em detrimento àqueles com características tradicionais de *Bradyrhizobium* (Santos et al., 2007; Lyra et al., 2013). Para outras culturas, como o feijão-caupi, a abundância de rizóbios de crescimento rápido em solos da região semiárida também tem sido encontrada e com a presença de elevada eficiência agrônômica (Fernandes Júnior et al., 2012).

Taurian et al. (2002), também avaliando a diversidade de população de rizóbio em solos da Argentina, verificaram que apenas 43% do total dos isolados obtidos eram de crescimento de crescimento lento.

Isolados de rizóbio de crescimento rápido e com capacidade de acidificar o meio de cultura, são geralmente pertencentes ao gênero *Rhizobium*, e nos últimos anos vêm sendo descritos na literatura como nodulantes na cultura do amendoim (Taurian et al., 2006; Marcondes et al., 2011; Ibañez et al., 2008).

De acordo com o agrupamento com base nas características avaliadas (tempo de crescimento, alteração de pH, tamanho e cor das colônias, quantidade e tipo de muco) observou-se que 44 grupos distintos foram formados em um coeficiente de similaridade de 100% (tabela 2). Os grupos 11 e

14 foram os mais abundantes, com 335 e 113 isolados respectivamente. Do total foram formados 25 grupos raros, com apenas um isolado.

As características que mais contribuíram para a separação em grupos foi o tempo de crescimento e o pH do meio de cultura e, aliado as outras características deram origem a diversos grupos. Este estudo demonstrou uma ampla diversidade de grupos fenotípicos de rizóbio associados ao amendoim nos solos avaliados.

Essa diversidade pode auxiliar na seleção de estirpes adaptadas, competitivas e aptas, nas condições semiáridas do nordeste brasileiro, proporcionando novos isolados para fins de recomendação para a produção de inoculantes.

CONCLUSÕES

Foi obtida alta diversidade de grupos fenotípicos presentes em nódulos de amendoim em solos da região semiárida, havendo predomínio das características de rápido crescimento, pH ácido e produção de muito muco, para a maioria dos isolados.

AGRADECIMENTOS

A UNEB, Embrapa Semiárido, Fapesb, CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

FERNADES JÚNIOR, P. I.; SILVA JÚNIOR, E. B.; SILVA JÚNIOR, S.; SANTOS, C. E. R. S.; OLIVIERA, P. J.; RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R. Performance of polymer compositions as carrier to cowpea rhizobial inoculant formulations: survival of rhizobia in pre-inoculated seeds and field efficiency. *African Journal of Biotechnology*, 11:2945-2951, 2012.

FREITAS, S. M. & MARGARIDO, M. A. Fatores que influenciam o cultivo de amendoim das águas no estado de São Paulo: uma análise ecométrica. *Revista Agricultura em São Paulo*, 50:29-40, 2003.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and data Analysis. *Paleontologia Eletrônica*, 2001. 4 n.p.

IBAÑEZ, F.; TAURIAN, T.; ANGELINI, J.; TONELLI, M.L.; FABRA, A. Rhizobia phylogenetically related to common bean symbionts *Rhizobium giardinii* and *Rhizobium tropici* isolated from peanut nodules in Central Argentina. *Soil Biology and Biochemistry*, 40:537-539, 2008.

LYRA, M. C. C. P.; FREITAS, A. D. S.; SILVA, T. A.; SANTOS, C. E. R. S. Phenotypic and molecular characteristics of rhizobia isolated from nodules of peanut

(*Arachis hypogaea* L.) grown in Brazilian Spodosols. *African Journal Biotechnology*, 12:2147-2156, 2013.

MARCONDES, J.; FERRAUDO, A. S.; SCAQUITTO, D. C.; ALVES, L. M. C.; LEMOS, E. G. M. Efetividade na fixação biológica de nitrogênio de bactérias nativas isoladas de plantas de amendoim. *Ciência & Tecnologia*, 1:21-32, 2010.

MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. *Soil Biology and Biochemistry*, 38:333-339, 2003.

SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G.; BORGES, W. L.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 2:249-256, 2007.

SANTOS, R. C.; RÊGO, G. M.; SILVA, A. P. G.; VASCONCELOS, J. O. L.; COUTINHO, J. L. B.; MELO FILHO, O. A. Produtividade de linhagens avançadas de amendoim em condições de sequeiro no Nordeste brasileiro. *Revista Brasileira de Engenharia Ambiental*, 14:589-593, 2010.

Taurian, T.; Aguilar, O. M.; Fabra, A. Characterization of nodulating peanut rhizobia isolated from a native soil population in Córdoba, Argentina. *Symbiosis* 25:49-53, 2002.

Taurian, T., Ibañez, F., Fabra, A., Aguilar, O. Genetic diversity of rhizobia nodulating *Arachis hypogaea* L. in central argentinean soils. *Plant and Soil* 282:41-52, 2006.

THIES, J. E.; BOHLOOL, B. B.; SINGLETON, P. W. Subgroups of the cowpea mescellany: symbiotic specificity within *Bradyrhizobium* spp. for *Vigna unguiculata*, *Phaseolus lunatus*, *Arachis hypogaea* and *Macroptilium atropurpureum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57:1540-1545, 1991.

VINCENT, J. M. A. Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1970. 164p. (IBP Handbook, 15).

Tabela 2 – Caracterização dos 44 grupos fenotípicos obtidos através do agrupamento dos rizóbios isolados de nódulos de amendoim (método de agrupamento UPGMA e Coeficiente de Dice).

Grupos / N ^o de isolados ¹	Características dos grupos isolados ²					
	TC	pH	TC	CC	QM	TM
Grupo 1 (2)	I	N	P	Cr	PM	V
Grupo 2 (2)	I	N	P	Cr	PM	Bu
Grupo 3 (2)	I	N	P	Br	PM	Bu
Grupo 4 (1)	I	N	1 a 2 mm	Cr	MM	Fl
Grupo 5 (1)	I	N	1 a 2 mm	Cr	PM	V
Grupo 6 (1)	I	N	1 a 2 mm	Cr	MM	V
Grupo 7 (1)	L	Alc	>2 mm	Cr	MM	V
Grupo 8 (30)	R	N	>2 mm	Cr	PM	V
Grupo 9 (7)	R	N	1 a 2 mm	Cr	MM	V
Grupo 10 (35)	R	N	>2 mm	Cr	MM	V
Grupo 11 (335)	R	Ác	>2 mm	Am	MM	V
Grupo 12 (14)	R	N	>2 mm	Am	MM	V
Grupo 13 (3)	R	Alc	>2 mm	Cr	MM	V
Grupo 14 (113)	R	Ác	>2 mm	Cr	MM	V
Grupo 15 (4)	R	Ác	>2 mm	Cr	MM	Bu
Grupo 16 (2)	R	Ác	>2 mm	Am	MM	Bu
Grupo 17 (2)	R	Ác	>2 mm	Br	MM	Bu
Grupo 18 (1)	R	Ác	>2 mm	Br	MM	V
Grupo 19 (1)	R	Ác	1 a 2 mm	Cr	MM	Bu
Grupo 20 (1)	R	Ác	1 a 2 mm	Am	MM	Bu
Grupo 21 (1)	R	Ác	1 a 2 mm	Br	MM	V
Grupo 22 (6)	R	Ác	1 a 2 mm	Cr	MM	V
Grupo 23 (7)	R	Ác	1 a 2 mm	Am	MM	V
Grupo 24 (1)	R	Ác	P	Cr	PM	Bu
Grupo 25 (1)	R	Ác	P	Am	PM	Bu
Grupo 26 (1)	R	Ác	1 a 2 mm	Cr	PM	Bu
Grupo 27 (1)	R	Ác	>2 mm	Cr	PM	Fl
Grupo 28 (1)	R	Ác	P	Cr	PM	V
Grupo 29 (1)	R	Ác	>2 mm	Cr	PM	V
Grupo 30 (1)	R	Ác	1 a 2 mm	Cr	PM	V
Grupo 31 (1)	R	Ác	P	Am	PM	V
Grupo 32 (2)	R	Ác	>2 mm	Am	PM	V
Grupo 33 (4)	R	Ác	1 a 2 mm	Am	PM	V
Grupo 34 (1)	I	N	P	Am	PM	V
Grupo 35 (1)	I	N	>2 mm	Am	MM	V
Grupo 36 (1)	R	N	1 a 2 mm	Am	PM	V
Grupo 37 (3)	R	N	>2 mm	Am	PM	V
Grupo 38 (1)	I	N	>2 mm	Br	MM	V
Grupo 39 (1)	L	N	>2 mm	Br	MM	V
Grupo 40 (3)	L	Alc	>2 mm	Cr	MM	Fl
Grupo 41 (1)	L	Alc	>2 mm	Cr	MM	V
Grupo 42 (1)	L	Alc	1 a 2 mm	Cr	MM	V
Grupo 43 (1)	L	Alc	P	Br	PM	V
Grupo 44 (1)	L	Alc	P	Am	PM	V

¹Grupo fenotípico dos isolados

²TC - tempo de crescimento (R: rápido ≤ 3 dias, I: Intermediário entre 4-5 dias, L: lento acima de 6 dias); pH do meio (Ác: ácido, N: neutro, Alc: alcalino); TC - tamanho da colônia (P: puntiforme, 1 a 2 mm e >2 mm); CC - cor da colônia (Am: amarela, Br: branca, Cr: creme); QM - quantidade de muco (MM: muito, PM: pouco); TM - tipo de muco (V: viscoso, Fl: floculoso, Bu: butirico).