

SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Bradyrhizobium* MAIS EFICIENTES EM NODULAR E FIXAR O NITROGÊNIO EM *Arachis hypogaeae* L. Eduardo Heber Gomide, Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, Lucia Carareto Alves, Eduardo Maniezzo Rodriguez, Guilherme Maniezzo Rodriguez, Rafael Mira Assumpção – Inter-áreas – Agronomia – Departamento de Tecnologia – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus Jaboticabal.

O amendoim (*Arachis hypogaeae* L.), que junto com a soja, o feijão e a ervilha, pertencem à família *Leguminosae*, é uma semente vegetal, do grupo das dicotiledôneas, originária da América Central e adaptada ao clima Tropical e Equatorial. É considerado um dos alimentos mais completos em nutrientes, pois é rico em proteínas, vitaminas (B1, B3, Ácido Pantotênico, Niacina, Tiamina), lipídios, carboidratos e sais minerais. O amendoim apesar do alto valor calórico, não contém colesterol, pois sendo de origem vegetal, seu óleo possui cerca de 80% de gordura insaturada, tornando-se ideal para dietas de baixo índice calórico.

A planta de amendoim é uma leguminosa capaz de associar-se com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* sp. formando nódulos nas raízes. Nos nódulos infectados por bactéria eficientes, o nitrogênio atmosférico (N) é reduzido e transferido para a planta a qual pode desenvolver-se independente da adição de adubo nitrogenado (Giardini, 1980).

Sobre a comercialização do amendoim, é importante dizer que a produção mundial no ano de 2005 ficou em 34.243 mil toneladas métricas, e no Brasil cerca de 1.641 mil toneladas métricas foram produzidas. A importação de amendoim durante o ano de 2005 foi de 1680 mil toneladas métricas, a exportação foi de 2.024 mil toneladas métricas e o consumo per capita foi registrado em 5,2 kg/hab/ano. No Brasil, observa-se a região Sudeste se mostrando com a maior produção e maior área plantada, com uma diferença significativa aparece a região Sul como a segunda maior em produção, e o Nordeste com a Segunda maior área plantada.

Atualmente, o termo rizóbio está sendo bastante utilizado para, indistintamente, referir-se a um grupo bastante heterogêneo de bactérias, de grande importância científica e agrônômica. Essas bactérias são importantes pelo fato de, em simbiose com leguminosas reduzem o nitrogênio atmosférico à amônia, que, transportada pela planta, é assimilada em aminoácidos e proteínas, sendo que tal simbiose pode suprir total ou parcialmente o nitrogênio necessário ao desenvolvimento e produtividade dessas plantas. Dentre as bactérias com capacidade de penetrar nas raízes ou caules de plantas pertencentes à família *Leguminosae* formando nódulos e fixando o nitrogênio atmosférico encontram-se as bactérias do gênero *Bradyrhizobium* sp.

Nos solos do Estado de São Paulo e em muitos solos tropicais onde o amendoim é cultivado, embora haja indicações que esta leguminosa apresenta certa especificidade à nodulação por alguns rizóbio, normalmente, existe população endógena de bactérias fixadoras simbióticas de nitrogênio que aparentemente supre as necessidades de Nitrogênio nessas plantas (Lopes et al., 1976).

A capacidade das espécies de leguminosas em formar relações simbióticas efetivas com rizóbios é desconhecida em aproximadamente 77% das espécies (11200 espécies) desta família, conseqüentemente, as características das espécies de rizóbios também são pouco conhecidas (Moreira et al., 1993).

A intensidade da fixação do nitrogênio nas raízes de plantas influencia a produtividade e a qualidade das sementes das leguminosas. Para que bactérias e plantas compatíveis iniciem a nodulação, é necessário que haja um adequado suprimento de energia na planta para que favoreça o desenvolvimento, crescimento e sustentação do nódulo (Osman et al., 1983). A fixação do Nitrogênio em nódulos de leguminosas é um processo altamente energético e, pode utilizar 10 a 30% do total de matéria fotossintetizada produzida pela planta hospedeira (Schubert & Ryle, 1980). Assim, qualquer fator que diminua a quantidade de matéria fotossintetizada disponível ao nódulo, diminui a fixação do N podendo prejudicar o rendimento de grãos.

Nos Estados Unidos, mais especificamente em dois condados da Carolina do Norte, a cultura do amendoim é recente, os cultivos de amendoins que foram inoculados, deram rendimentos entre duas e três vezes maiores na colheita que os não inoculados. Sem inoculantes, a planta sofre uma falta de nitrogênio, a inoculação fornece uma maneira relativamente barata de fornecer o poder de fixação

de Nitrogênio requerido para rendimentos elevados, do contrário, os agricultores teriam que fazer aplicação de Fertilizantes com Nitrogênio “este seria relativamente caro comparado aos inoculantes comerciais” e “os bons rendimentos no último ano, em áreas onde o amendoim era uma cultura recente, demonstraram o benefício da inoculação” diz David Jordan, especialista em amendoim da Universidade do estado da Carolina do Norte, nos EUA.

Sobre esta técnica, David Jordan acrescenta ainda, que os inoculantes são de fácil uso, e dispõe de condições apropriadas para as bactérias do solo, assim a planta pode reparar seu próprio Nitrogênio; o amendoim retém sozinho o Nitrogênio, porém o inoculante raramente está presente na natureza; inoculando bactérias no solo, os fazendeiros ajudam o processo de conversão do Nitrogênio e assim o amendoim pode crescer corretamente, mesmo que os fazendeiros não saibam, da presença ou não, de inoculantes naturais no solo, principalmente em rotações curtas, este pode fazer o uso de inoculantes comerciais.

A habilidade do amendoim de fazer a fixação do Nitrogênio tem uma grande variação dependendo do seu genótipo (Nambiar & Dart, 1983) e da linhagem do rizóbio (Wynne et al., 1980); esta habilidade é importante para o crescimento e para o rendimento das colheitas de leguminosas, especialmente em solos inférteis. O resíduo do amendoim que fica no solo após sua colheita também beneficia o cultivo posterior de arroz, mandioca, cana-de-açúcar, dentre outras culturas; além de promover certa sustentabilidade para colheita e produção nas regiões tropicais semi-áridas.

Nos solos do Estado de São Paulo e em muitos solos tropicais onde o amendoim é cultivado, embora haja indicações que esta leguminosa apresenta certa especificidade, normalmente, existe população endógena de rizóbio a qual aparentemente supre suas necessidades de N (Lopes et al., 1976). A necessidade de inoculação das sementes de amendoim em solos contendo população autóctone tem sido sempre matéria de controvérsia, entretanto, o Instituto Agrônomo de Campinas recomenda esta prática (Quaggio & Godoy, 1985).

O objetivo do presente trabalho foi o isolamento de rizóbios de nódulos de amendoim para seleção de bactérias com maior poder de nodulação e fixação do Nitrogênio. Para isso os isolados foram submetidos à caracterização microbiológica, bioquímica e molecular através da observação de morfologia e tempo de aparecimento das colônias, teste de produção ácido/base, curva de crescimento, análise de lipopolissacarídeos, PCR com o marcador molecular RP01, correspondente a uma região conservada no gene *nifHDK* e seqüenciamento parcial do gene *16S rRNA*.

Com a finalidade de comparação genotípica entre os isolados e bactérias da família *Rhizobiaceae* padrões foi utilizada a estirpe SEMIA 6144, recomendada para a inoculação de amendoim, mantida no LBMP e que foi obtida junto ao Instituto de Pesquisas Agronômicas da Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Rio Grande do Sul (IPAGRO), setor de Microbiologia. Além disso, outras estirpes padrões de rizóbio serão utilizadas como controle para a caracterização molecular (Tabela 1).

Foi realizada a coleta e a lavagem do sistema radicular das plantas, e a retirada de alguns nódulos de cada planta com o auxílio de uma tesoura de maneira a não feri-los. Esses nódulos foram lavados em água corrente, transferidos para tubos estéreis contendo etanol 95% em quantidade suficiente para cobrir os nódulos, sendo agitado vigorosamente no Vortex durante 1 minuto. O etanol foi dispensado e incubado com hipoclorito de sódio 2,5% com agitação em Vortex por 10 segundos e repouso por 5 minutos. Os nódulos foram lavados abundantemente em água estéril, macerados com pinças estéreis e as bactérias foram distribuídas em placas de petri com meio de cultura YMA (Yeast Manitol Agar, Vincent, 1970) com Vermelho Congo (Somasegaran & Hoben, 1984). As placas foram incubadas em BOD a 28°C por 3 a 7 dias.

Com o intuito de se observar a produção de ácido ou base pelas estirpes, estas foram semeadas em placas com meio YMA contendo Azul de Bromotimol na concentração final de 25 µg/mL do respectivo corante. O pH final do meio de cultura foi ajustado para 6,8 e o mesmo foi submetido à esterilização a 121° C por 20 minutos. As estirpes foram repicadas em duplicata nesses meios e mantidas a 28° C, durante 10 dias. Para as estirpes produtoras de ácidos, o meio se tornou amarelo e, para as produtoras de base, se tornou azul.

Para a extração do DNA genômico as estirpes isoladas foram cultivadas em placas de Petri contendo meio de cultura TY, por observação sabe-se que estas bactérias são grandes produtoras de goma, assim o cultivo neste meio teria por objetivo a diminuição da quantidade de goma produzida.

Após alguns repiques no meio de cultura TY sólido, as estirpes foram colocadas para crescer em erlenmeyers contendo meio de cultura TY sem Agar (líquido), a 28°C sob agitação durante 48 hs.

Para extração do DNA genômico das bactérias, seguiu-se o procedimento descrito por SAMBROOK et al. (1989).

TABELA 1 – ESTIRPES PADRÃO A SEREM UTILIZADAS

SIMBIONTE	ESTIRPE	HOSPEDEIRO
<i>Sinorhizobium arboris</i>	LMG 14919	<i>Prosopis chilensis</i>
<i>Sinorhizobium fredii</i>	LMG 6217	<i>Glycine max</i>
<i>Sinorhizobium kostiense</i>	LMG 19227	<i>Acacia Senegal</i>
<i>Sinorhizobium medicae</i>	LMG 18864	<i>Medicago truncatula</i>
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	LMG 6133	<i>Medicago sativa</i>
<i>Sinorhizobium teranga</i>	LMG 7834	<i>Acacia laeta</i>
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	LMG 6465	<i>Sesbania rostrata</i>
<i>Mesorhizobium amorphae</i>	LMG 18977	<i>Amorpha fruticosa</i>
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	LMG 14989	<i>Cicer arietinum L.</i>
<i>Mesorhizobium huakuii</i>	LMG14107	<i>Astragalus sinicus</i>
<i>Mesorhizobium loti</i>	LMG 6125	<i>Lotus corniculatus var. tenuifolium</i>
<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	LMG 17148	<i>Cicer arietinum L.</i>
<i>Mesorhizobium plurifarium</i>	LMG 11892	<i>Acacia senegal</i>
<i>Mesorhizobium tianshanense</i>	LMG 18976	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>
<i>Bradyrhizobium elkani</i>	LMG 6134	<i>Glycine max</i>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	LMG6138	<i>Glycine max</i>
<i>(Allo)Rhizobium undicola</i>	LMG 11875	<i>Neptunia natans</i>
<i>Rhizobium etli</i>	LMG17827	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Rhizobium huautlense</i>	LMG18254	<i>Sesbania herbacea</i>
<i>Rhizobium leguminosarum biovar .</i>	LMG8819	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Rhizobium leguminosarum biovar.</i>	LMG8820	<i>Trifolium</i>
<i>Rhizobium leguminosarum biovar.</i>	LMG14904	<i>Psium sativum and Vicia villosa</i>
<i>Rhizobium mongolense</i>	LMG 19141	<i>Medicago ruthenica</i>
<i>Rhizobium yanglingense</i>	LMG 19592	<i>Gueldenstaedita multiflora</i>
<i>R.gallicum bv.gallicum</i>	R602sp	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R.giardini bv.giardini</i>	H152	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Bradyrhizobium sp</i>	SEMIA 6144	<i>Arachis hipogea</i>

Para o cultivo das plantas algumas sementes de amendoim foram cultivadas em vasos com terra de três diferentes regiões próximas a Jaboticabal, sem uso de insumos ou inoculantes, as plantas

já emergidas e em aparente crescimento normal sofreu ataque por patógenos e apresentou algumas folhas que senesceram, no entanto isso não prejudicou o crescimento normal das plantas e o posterior isolamento das bactérias.

Outras sementes foram cultivadas em tubetes com vermiculita estéril, e inoculadas com a estirpe padrão indicada para o amendoim, SEMIA 6144, para posterior isolamento e recuperação destas bactérias nos nódulos.

Pode-se observar nítida diferença entre as raízes das plantas que foram semeadas em tubetes com vermiculita e das plantas semeadas em vasos com terra. As raízes das plantas que cresceram em tubetes com vermiculita são mais volumosas e mais finas, podendo se constatar a presença de maior número de nódulos, já nas plantas que cresceram nos vasos com terra constatou-se que suas raízes são menos volumosas e mais grossas do que as plantas que cresceram em vermiculita.

Após o cultivo das plantas nos vasos com terra e nos tubetes com vermiculita, procedeu-se a retirada dos nódulos, o isolamento e o cultivo das bactérias em meio de cultura YMA com vermelho congo. Este corante permite que se constate a presença de contaminante (aparece colorações mais escuras vermelhas e amarelas) e torna possível isolamento da bactéria.

Conseguiu-se isolar 11 bactérias e estas foram chamadas de 1A. (Raiz de amendoim sem inoculante) nesta mesma planta ainda foram isoladas outras bactérias chamadas de 1A, 2A, 1A', 1A''; 1B. (Raiz de amendoim com inoculante); 1C. (Nódulos de amendoim com inoculante); 1D. (Raiz de amendoim com inoculante) nesta planta também foi isolada outra bactéria chamada de 1D'; 1E. (Raiz de amendoim sem inoculante) e também nesta planta foi isolada outra bactéria chamada de 1E'; e 1F. (Nódulos de amendoim com inoculante).

Após o cultivo e isolamento das bactérias, estas foram inoculadas em meio de cultura YMA, só que agora com corante Azul de Bromotimol para que se verifique a produção de ácido ou base por essas bactérias, sabendo-se que quando há a produção de ácido o meio de cultura torna-se amarelo e quando há a produção de base o meio torna-se azul.

Observou-se através do cultivo das bactérias em placas de Petri com meio de cultura YMA com Azul de Bromotimol que todas as bactérias são produtoras de ácido.

Para a caracterização molecular dos isolados estes foram submetidos à extração de DNA. Em um primeiro ensaio observou-se no final da extração, mesmo com várias lavagens com a solução de Clorofórmio-Álcool Isoamílico, grande quantidade de goma impossibilitando a separação das duas soluções. Assim, será necessário repetir-se a fase de crescimento das bactérias, aumento o número de repiques das estirpes em meio de cultura TY sólido, visando diminuir a quantidade de goma para que se consiga uma eficiente Extração de DNA.

Conclui-se então que as bactérias formadoras de nódulos e fixadoras de Nitrogênio no Amendoim são produtoras de ácidos como constatado no teste de ácido/base e são produtoras de grande quantidade de lipopolissacarídeos, dificultando o trabalho molecular com essas estirpes.

Os isolados parcialmente caracterizados serão submetidos agora a estudos microbiológicos, moleculares e avaliados quanto à sua capacidade de aumentar a produtividade das plantas.

Referências Bibliográficas

- MOREIRA, F.M.S.; HAUKKA, K.; YOUNG, J.P.W. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. *Molecular Ecology*, v. 7, 889-895, 1993.
- VINCENT, J.M. A manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 200p. IBP (Hand Book, 15).
- SOMASEGARAN, P., HOBEN, H. J. Handbook for rhizobia: methods in legume *Rhizobium* technology. Paia: Niftal Project, 1984. 450 p.
- SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F. Molecular cloning: a laboratory manual, 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

Bolsa: CNPq