

SELEÇÃO DE ISOLADOS DE RIZÓBIO PARA NODULAÇÃO DE AMENDOIM

LUCIA VIEIRA HOFFMAN¹, JAIR MOISÉS DE SOUSA², ROSEANE GOMES JACOME³ e TAÍS DE MORAES FALEIRO SUASSUNA⁴

RESUMO: O processo de fixação de N₂ atmosférico realizado pela simbiose entre plantas de amendoim e bactérias do gênero *Bradyrhizobium* pode ser otimizado com a seleção de estirpes mais eficientes. Para verificar se existe variabilidade na capacidade de nodulação, foram isoladas bactérias a partir de nódulos de plantas de amendoim cultivadas no agreste paraibano. Para a inoculação, as bactérias foram cultivadas em meio líquido e transferidas para o solo, próximas à raiz de cada planta. Foram conduzidos dois ensaios. A eficiência da simbiose foi avaliada pelo número de nódulos e pelos pesos secos dos nódulos, da parte aérea e da raiz. Todas as plantas inoculadas apresentaram nódulos, o que não aconteceu com as não inoculadas. Isso demonstra que os isolados eram, realmente, rizóbios. O teste de Tukey mostrou, a 5% de probabilidade, que o número de nódulos diferiu entre isolados e foi maior para os isolados EAV1. Este isolado, especialmente selecionado em uma planta muito produtiva, pode ser um bom candidato como estirpe eficiente. O estudo sugere quão importante é dar continuidade à seleção de estirpes e à integração ao programa de melhoramento do amendoim.

Termos para indexação: *Bradyrhizobium*, Fixação Biológica de Nitrogênio, biodiversidade.

SELECTION OF RHIZOBIA STRAINS FOR NODULATION OF PEANUTS

ABSTRACT: Biological nitrogen fixation obtained by peanuts plants and *Bradyrhizobium* can be improved by the selection of the most efficient isolates. To verify whether there is or not variability on nodulation efficiency, bacteria were isolated from peanut plants nodules and cultivated in humid tropical climate in Northeast of Brazil. For inoculation, rhizobia was lead to grow in liquid media and transferred to soil, next to the roots of peanuts plantlets. Two assays were carried out. Symbiosis efficiency was evaluated by number of nodules, nodules dry weight, and dry weight of shoots and roots. All inoculated plants but not the non inoculated ones presented nodules, showing that inoculated bacteria were in fact rhizobia. Number of nodules differed among isolates, and was greater for the isolate EAV1. This isolate was obtained from a selected productive plant that can be used for nodulation. It is important look forward for the best strains for peanut inoculation in a joint effort with breeding programs.

Index terms: *Bradyrhizobium*, Biological Nitrogen Fixation, biodiversity.

INTRODUÇÃO

No Brasil, o amendoim é produzido principalmente no Estado de São Paulo, que é responsável por cerca de 82% de toda a produção nacional. No Nordeste, o principal

¹ Embrapa Algodão, CP 174, Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário, Campina Grande, PB. E-mail: hoff@cnpa.embrapa.br;

² Mestrando em Genética e Biologia Molecular pela UFRN, Biólogo pela UEPB, estagiário da Embrapa Algodão;

³ Bióloga pela UEPB, estagiária da Embrapa Algodão;

⁴ Embrapa Algodão. E-mail: tais@cnpa.embrapa.br

produtor é a Bahia, onde o cultivo do amendoim tem grande importância para a auto-sustentabilidade dos pequenos agricultores (SANTOS et al., 2005b). O interesse pela cultura do amendoim nas regiões Norte e Centro-Oeste cresce a cada ano, por ser uma cultura indicada para rotação de culturas e plantio em safrinha. Por possuir 45%, em média, de óleo na semente (KNAUFT; OZIAS-AKINS, 1995), é um dos produtos cogitados para compor o biodiesel.

O amendoim é capaz de participar do processo de fixação de N_2 através da simbiose com rizóbios, predominantemente do gênero *Bradyrhizobium* (QUANTRINI et al., 2001). Este processo ocorre nas raízes em estruturas típicas desta simbiose, os nódulos (HUNGRIA, 1994). A substituição de adubos químicos nitrogenados reduz custos e é favorável ao ambiente por reduzir liberação de nitratos nas águas superficiais e subterrâneas (ASSIS et al., 1992; COUTINHO, 1996).

Neste trabalho, procurou-se estabelecer o método de isolamento destas bactérias e identificar o(s) isolado(s) mais eficiente(s) na associação entre o amendoim e *Bradyrhizobium*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os nódulos foram coletados em raízes de plantas jovens de amendoim, provenientes de área experimental instalada na Estação Experimental de Lagoa Seca (EMEPA-PB), no Agreste Paraibano, e em casa de vegetação da Embrapa Algodão, em Campina Grande. Os nódulos coletados ficaram acondicionados em sacos de papel, por períodos de 2 a 48 horas, e conduzidos ao Laboratório para isolamento dos rizóbios. Foram então imersos, durante duas horas, em água em placas de Petri, para reidratação. A desinfecção foi feita em capela de fluxo laminar por imersão em álcool (90%) por 5 a 10 segundos e, consecutivamente, em solução de hipoclorito de sódio a 3%. A seguir, foi feita lavagem, por meio de transferências

sucessivas em cinco placas de Petri, com água destilada autoclavada. Cada nódulo foi transferido separadamente para microtubos de 1,5 mL esterilizado e triturado com bastão de vidro. O material foi então semeado com alça de platina em placas de Petri, contendo meio de cultura com 10 g/l de manitol, 0,5 g/l de K_2HPO_4 ; 0,2 g/l de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1 g/l de NaCl e 0,5 g/l de extrato de levedura, pH 6,8, adicionado de ágar 15 g/l para solidificação (HUNGRIA, 1994) e incubado a 28 °C por sete dias, até o aparecimento de colônias. Estas foram coletadas individualmente e repicadas em novas placas que continham o mesmo meio sólido e, novamente, incubadas a 28 °C até novo crescimento. Foram então isoladas colônias únicas para crescimento em meio líquido, tanto para manutenção como para inoculação, denominadas: EAL1, EAL2, EAL3, EAL4, e EAV

O inóculo foi preparado a partir da transferência da colônia isolada para 2/ml do meio de extrato de levedura-manitol (YM) líquido. Foi então feita a incubação a 28 °C sob agitação até crescimento exponencial, depois foi transferido 10 mL do mesmo meio e as colônias foram incubadas sob agitação até novo crescimento exponencial.

Em Campina Grande (PB), foram feitos dois ensaios em casa de vegetação, com temperatura controlada, delineamento inteiramente casualizado. Em cada ensaio, sementes de amendoim da cultivar BR-1 foram desinfestadas superficialmente por imersão e semeadas em sacos de 1,5 L, preenchido com mistura de solo e areia (1:1) autoclavados. Aos 17 dias após o plantio, foi transferido 1 ml do inóculo por planta, para a região radicular do amendoim.

No primeiro ensaio, foram feitas sete repetições por tratamento. Foram usados três isolados diferentes (três grupos tratados) que, com o grupo de vegetais não-inoculados (controle), perfazia um total de 35 plantas. As plantas foram colhidas 25 dias após inoculação.

No segundo ensaio, utilizaram-se cinco repetições por tratamento e inocularam-se seis diferentes isolados, além de um controle (sem inoculação). Uma das estirpes, Semia 6144, foi utilizada como controle positivo, por ser, sabidamente, um bom inoculante para o amendoim (DARDANELLI et al., 2003).

Aos 25 dias após a inoculação, no caso do primeiro ensaio, e aos 60 dias após a inoculação, no caso do segundo ensaio, as partes aéreas foram cortadas e as raízes separadas do solo e lavadas. Os nódulos foram retirados das raízes, contados e, em seguida, tanto as raízes como a parte aérea foram armazenadas em sacos de papel e levadas para secagem em estufa a 70 °C, por 24 horas. O peso seco foi medido em balança.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro ensaio, houve formação de nódulos em todas as plantas inoculadas com bactérias, mas as plantas sem inoculação não apresentaram nódulos, o que mostra que as bactérias isoladas são, efetivamente, rizóbios. Optou-se, então, por não usar os dados do grupo controle na análise de número de nódulos e peso de nódulos, uma vez que as plantas não inoculadas não nodularam. Pelo ensaio observou-se também que a cultivar BR1 é capaz de nodular com todos os isolados, diferentemente de resultados obtidos por outros autores (SANTOS et al., 2005a). Os dados foram submetidos a uma análise estatística prévia, para verificar o atendimento às pressuposições da análise de variância. De acordo com a análise dos coeficientes de variação e de normalidade pelo teste de Wilks (Tabela 1), constatou-se a necessidade de transformação dos dados. Foi utilizada a transformação raiz quadrada dos dados originais acrescidos de $1(\sqrt{x+1})$, que proporcionou maior aderência dos dados às pressuposições básicas da análise de variância. Após a transformação dos dados, procedeu-se ao teste *F* (análise de variância). As comparações múltiplas foram feitas pelo teste de Duncan ao nível de 5%.

TABELA 1. Coeficiente de variação e teste de normalidade (*p*-valor de Wilks) para número de nódulos, peso dos nódulos (mg), peso seco da parte aérea (g) e peso seco da raiz (g) de amendoim, em função da inoculação com os isolados de rizóbio, no primeiro ensaio, variáveis originais e transformadas ($\sqrt{x+1}$).

Partes da planta	Variável original		Variável transformada	
	CV	<i>p</i> - valor (Wilks)	CV	<i>p</i> - valor (Wilks)
Nº de nódulos	42,12	0,0050	18,84	0,0124
Peso seco dos nódulos	73,50	0,0510	27,36	0,0131
Peso seco da parte aérea	36,77	0,0329	10,85	0,0689
Peso seco da raiz	45,18	0,1123	4,82	0,1086

Não houve diferença significativa entre isolados, considerando o número de nódulos e o peso seco de nódulos (Tabela 2). Entretanto, fica clara a eficiência da simbiose porque, em média, os pesos secos da parte aérea diferem do isolado utilizado para a inoculação. As plantas inoculadas com o isolado EAL1 apresentaram, maior acúmulo de biomassa.

TABELA 2. Valores médios de número de nódulos, peso dos nódulos, peso seco da parte aérea e peso seco da raiz de amendoim em função da inoculação com os isolados de rizóbio, no primeiro ensaio, dados transformados ($\sqrt{x+1}$).

Partes da planta	Controle	EAL1	EAL2	EAL3
Nº de nódulos	-	5,881	5,241	4,328
Peso seco dos nódulos	-	2,207	2,025	1,446
Peso seco da parte aérea	1,177 b	1,609 a	1,144 ab	1,143 ab
Peso seco da raiz	0,400 b	0,613 a	0,476 b	0,578 b

Letras diferentes indicam que as médias diferem entre si segundo teste de Duncan ($p < 0,05$).

No segundo ensaio, as plantas não inoculadas apresentaram algum grau de nodulação. A explicação pode ser o fato de não ter sido sempre utilizada água destilada ou autoclavada para a irrigação das plantas. Os dados do segundo ensaio também foram submetidos a uma análise estatística prévia, onde verificou-se a necessidade de uma transformação dos dados (Tabela 3). Após a transformação das variáveis, ($\sqrt{x+1}$), as pressuposições da

análise de variância foram atendidas. As comparações múltiplas foram feitas pelo teste de Duncan ao nível de 5%. O número médio de nódulos foi significativamente maior para plantas inoculadas com os isolados EAL1, EAL2, EAL3 e EAV (Tabela 4), que não diferiram do isolado SEMIA 6144, um inoculante comprovadamente eficiente em amendoim (DARDANELLI et al., 2003). O maior peso de nódulos foi detectado nas plantas inoculadas com o isolado EAV, obtido de uma planta de amendoim de alta produtividade, com nódulos bastante grandes. Os pesos secos dos nódulos, da parte aérea da raiz não diferiram em função do isolado utilizado, segundo o teste *F*.

TABELA 3. Coeficiente de variação e teste de normalidade (*p*-valor de Wilks) para número de nódulos, peso dos nódulos (mg), peso seco da parte aérea (g) e peso seco da raiz (g) de amendoim, em função da inoculação com os isolados de rizóbio, no segundo ensaio, variáveis originais e transformadas ($\sqrt{(x+1)}$).

Partes da planta	Não transformados		Transformados	
	CV	<i>p</i> - valor (Wilks)	CV	<i>p</i> - valor (Wilks)
Nº. de nódulos	64,47	0,0520	32,43	0,9255
Peso seco de nódulos	45,90	0,6652	22,66	0,7874
Peso seco de parte aérea	30,79	0,7862	7,52	0,2945
Peso seco de raiz	34,00	0,0025	67,11	0,0185

A eficiência de cada cepa da bactéria varia em função da etapa do desenvolvimento do vegetal e dos parâmetros avaliados. Neste trabalho, foram analisadas fases bastante precoces do desenvolvimento. No experimento, feito na Embrapa Algodão, as plantas de amendoim foram colhidas aos 22 dias após a inoculação. Bolonhezi et al. (2002) acompanharam o número de nódulos em duas cultivares de amendoim em ensaios conduzidos em Ribeirão Preto SP e verificaram que, nas cultivares estudadas, o número máximo de nódulos ocorre entre 75 e 90 dias,

Como determinados isolados são mais eficientes que outros para nodular, fixar nitrogênio ou incrementar a produtividade da planta, a inoculação com as melhores cepas deve ser uma técnica importante para o melhor rendimento da simbiose e incremento de produção agrícola. Faz se necessário, entretanto, repetir o experimento em condições de campo, para que a competitividade dos isolados selecionados possa ser avaliada, também, frente a condições adversas e a outros microrganismos.

Todas as bactérias foram de crescimento lento, com aparecimento das primeiras colônias aos seis sete dias de cultura em placa, o que permite dizer que sejam possivelmente do gênero *Bradyrhizobium*, embora bactérias de crescimento rápido já tenham sido encontradas colonizando amendoim (SANTOS, 2001).

Tabela 4. Valores médios da variável transformada do número de nódulos, peso dos nódulos, peso seco da parte aérea e peso seco da raiz de amendoim em função da inoculação com os isolados de rizóbio, no segundo ensaio.

Partes da planta	Controle	EAL1	EAL2	EAL3	EAV	EAL4	Semia 6144
Nº de nódulos	2,62b	4,30a	4,85a	4,77a	5,67a	2,72b	4,33a
Peso seco de nódulos	2,65b	3,57ab	3,80a	3,68ab	3,87a	2,99ab	3,63ab
Peso seco de parte aérea	1,28	1,28	1,31	1,32	1,33	1,38	1,38
Peso seco de raiz	1,3	1,36	1,42	1,45	1,37	1,39	1,33

Letras diferentes indicam que as médias diferem entre si segundo teste de Duncan ($p < 0,05$).

CONCLUSÃO

Foram obtidos isolados eficientes para a nodulação do amendoim. Embora não seja ainda comum o uso de inoculantes em amendoim, é possível que, com a continuidade dos trabalhos de seleção de estirpes, preferencialmente associados a seleção de genótipos da planta eficientes para nodulação, consigam-se ganhos em produtividade decorrentes da inoculação com rizóbios.

REFERÊNCIAS

- ASSIS, R. L. de; SOUTO, S. M.; DUQUE, F. F.; ALMEIDA, D. L.; MUELLER, K. E. K. II Curso sobre a Biologia do Solo na Agricultura. Seropédica: EMBRAPA-CNPBS, 1992. 41p. (EMBRAPA-CNPBS. Documentos, 8).
- COUTINHO, H. L. C. Diversidade microbiana e desenvolvimento sustentável. In: WORKSHOP SOBRE BIODIVERSIDADE: PERSPECTIVAS E OPORTUNIDADES TECNOLÓGICAS, Campinas: [s.n.], 1996. 17 p. Trabalho apresentado no workshop.
- DARDANELLI, M.; ANGELINI, J. FABRA, A. A calcium-dependent bacterial surface protein is involved in the attachment of rhizobia to peanut roots. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 49, p. 399-405, 2003.
- HUNGRIA, M. Coleta de nódulos e isolamento de rizóbio. In: HUNGRIA, M; ARAUJO, R. S. (Ed.). Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI; Goiânia: EMBRAPA-CNPAP; Londrina: EMBRAPA-CNPBS, 1994. cap. 2, p. 45-59. (EMBRAPA-CNPAP. Documentos, 46).
- KNAUFT, D. A., OZIAS-AKINS, P. Recent methodologies for germplasm enhancement in peanut. In: PATTEE, H. E., STALKER, H. T. (Ed). *Advances in Peanut Science*. Stillwater: APRES, 1995. cap. 3, p. 54-94.
- QUATRINI, P.; SCAGLIONE, G.; CARDINALE, M.; CARADONNA, F.; PUGLIA, A. M. *Bradyrhizobium* sp. nodulating the Mediterranean shrub Spanish broom (*Spartium junceum* L.). Palermo: Università di Palermo, 2001.
- SANTOS, C. E. R. S. Diversidade de rizóbio nativo da região Nordeste do Brasil capaz de nodular amendoim (*Arachis hypogaea*), *Stylosanthes* e *Aeschynomene*. 2001. 178 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2001.
- SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; FREITAS, A.D.S.; VIEIRA, I. M. M. B.; SOUTO, S. M.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Efetividade de rizóbios isolados de solos da região Nordeste do Brasil na fixação do N₂ em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). *Acta Scientiarum Agronomy*, Maringá, v. 27, n. 2, p. 301-307, Apr./June, 2005a.
- SANTOS, R. C. dos; GODOY, J. I. de; FÁVERO, A. P. Melhoramento do amendoim. In: SANTOS, R. C. dos (Ed.). *Agronegócio do amendoim no Brasil*. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005b. cap. 4, p. 123-192.