

## Ocorrência e caracterização de bactérias isoladas de nódulos de amendoineiro (*Arachis hypogaea* L.) em solos paranaenses, Brasil.

Andrade, D.S.<sup>1\*</sup>, Cardoso, J.D.<sup>1</sup>, Pertinhez, G.N.<sup>1</sup>, Saturno, D.F., Lovato, G.M.<sup>1</sup>, Nomura, R.B.G.<sup>1</sup>, Hungria, M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Agronômico do Paraná, Londrina, PR, Brasil. <sup>2</sup>Embrapa Soja, Londrina, PR, Brasil.

\* diva@iapar.br

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência e caracterizar morfofisiologicamente e geneticamente bactérias isoladas de nódulos de amendoineiro (*Arachis hypogaea* L.), em solos paranaenses, Brasil. Em amostras de 36 municípios representativos do estado Paraná foi observada nodulação do amendoim em 84,4%, independente se em áreas cultivadas, ou em florestas. Nos testes de caracterização morfofisiológica de 44 estirpes autenticadas, 75% das estirpes apresentaram taxa de crescimento rápido em meio de cultura com manitol; 25 acidificaram o meio, cinco alcalinizaram e 14 não resultaram em modificação do pH. A capacidade de produzir sideróforos foi observada em 43% das estirpes e 16% foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio em meio de cultura. O sequenciamento do gene 16S rRNA mostrou a formação de três principais grupos, correspondentes a três filos: Alfaproteobacteria, Betaproteobacteria e Firmicutes. O gênero com maior ocorrência foi o *Bacillus*.

### INTRODUÇÃO

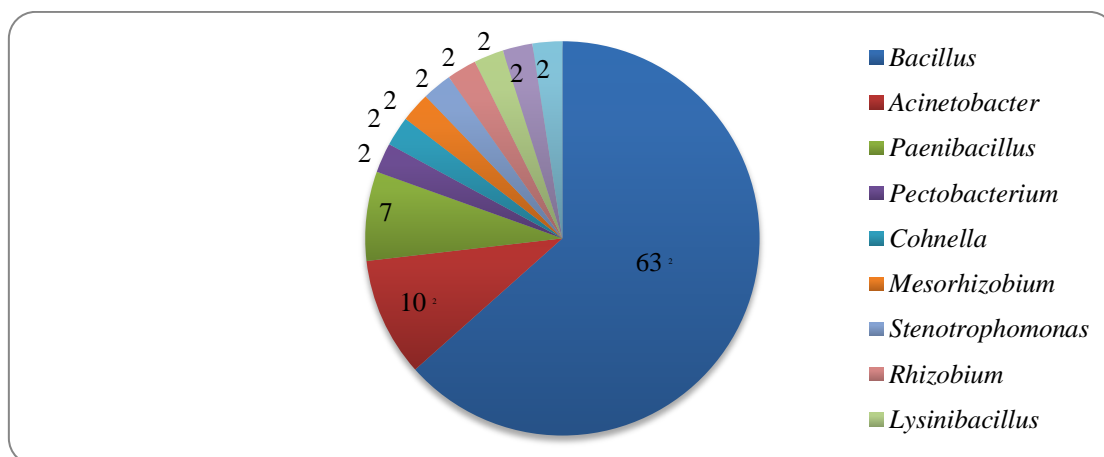
O amendoineiro (*Arachis hypogaea* L.) é uma leguminosa oleaginosa originária da América do Sul, ocorrendo em regiões tropicais e subtropicais. Na maioria dos sistemas de cultivo o amendoineiro consegue realizar a fixação biológica de nitrogênio em quantidades adequadas para suprir suas necessidades (Thies *et al.*, 1991). No Paraná, não se recomenda a aplicação de fertilizantes nitrogenados para a cultura. A avaliação da ocorrência de rizóbios em áreas cultivadas e sob floresta, bem como a caracterização destas estirpes pode fornecer informações sobre a filogenia de microrganismos simbióticos nativos simbioses do amendoineiro. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de rizóbios nodulantes do amendoineiro e analisar as características morfofisiológicas e genéticas destas bactérias simbióticas.

### MATERIAL E MÉTODOS

A ocorrência de rizóbio simbiote do amendoineiro (*Arachis hypogaea* L.) foi avaliada pela presença de nódulos em plantas semeadas em amostras de solos coletadas de 36 municípios do Paraná, em áreas sob cultivos de milho (*Zea mays* L.), pastagens e solos de mata, do Estado do Paraná, na camada 0–10 cm. Para o estudo da caracterização morfofisiológica e genética, também foram obtidas estirpes bacterianas de nódulos de plantas de amendoineiro de um experimento de campo, onde foram coletados nódulos de maneira aleatória e realizado o isolamento. Os isolados obtidos foram autenticados duas vezes para certificar a capacidade simbiótica no amendoineiro. As estirpes foram autenticadas em vasos Leonard com areia e vermiculita contendo solução nutritiva sem N mineral e a cultivar de amendoim IAC-Tatu ST. As estirpes foram avaliadas quanto à produção de sideróforos e à capacidade de solubilização de fosfato de cálcio. O DNA genômico total foi submetido à amplificação para análise do BOX-A1R e procedeu-se ao sequenciamento do gene 16S rRNA. A estirpe de *Bradyrhizobium* sp, SEMIA 6144 (Coleção de Cultura do laboratório da FEPAGRO, RS), autorizada para a produção de inoculante para o amendoineiro no Brasil, foi incluída como controle.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De um total de mais de 100 isolados, apenas 44 foram comprovados quanto à formação de nódulos efetivos, com coloração interna avermelhada e foram codificadas (IPR-*Ah*) e depositadas na Coleção de microrganismos do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR). A capacidade de produzir sideróforos foi observada em 43% das 44 estirpes. A capacidade de solubilizar fosfato de cálcio em meio de cultura foi observada em 16% das estirpes. A estirpe recomendada SEMIA 6144 não apresentou capacidade para produzir sideróforos nem para solubilizar fosfato de cálcio. O sequenciamento do gene 16S rRNA das 41 estirpes mostrou a presença de oito gêneros, sendo *Bacillus* com 63% de ocorrência (Figura 1).



**Figura 1.** Porcentagem de ocorrência dos gêneros de bactérias do total de 41 estirpes (IPR *Ah*) identificadas pelo sequenciamento do gene 16S rRNA.

Bactérias de crescimento rápido nodulando leguminosas tropicais têm sido relatadas, o que pode ser atribuído à dupla ocupação nos nódulos, sendo sugerido o uso de antibióticos como uma estratégia para isolar apenas as de crescimento lento (Trinick, 1982). Neste estudo, todas as estirpes foram autenticadas duas vezes, então, nossa hipótese é que ocorreu simbiose entre duas bactérias no isolamento, o que significa a formação de uma colônia a partir de duas células com crescimento rápido e lento. Estes resultados mostram a necessidade de buscar estratégias para aumentar a eficiência da inoculação, evitando a competição desta alta população nativa.

## REFERÊNCIAS

- Thies, J.E., *et al.* (1991). *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1540-1545.  
 Trinick, M.J. (1982). In: Vincent, J.M. (Ed.), *Nitrogen Fixation in Legume*. Academic Press Australia, Sydney, pp. 229-238.