

Caracterização Fenotípica de Rizóbios Isolados de Guandu e Amendoim Cultivados em Solos do Semiárido

Phenotypic Characterization of Rhizobia Isolated From Pigeonpea and Peanut Grown on Semi-Arid Soils in Brazil

Camila Campos Barros de Souza¹; Jussara Barbosa de Alencar Cunha²; Islane Andrade Nunes³; Layane Silva Barbosa de Souza³; Sirando Lima Seido⁴; Roseane Cavalcanti dos Santos⁵; Carlos Alberto Tuão Gava⁶; Lindete Míria Vieira Martins⁷; Paulo Ivan Fernandes Júnior⁸

Resumo

O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização fenotípica de bactérias isoladas de nódulos de plantas de amendoim e guandu cultivados em solos da região semiárida. Foi implantado um

¹Estudante de Biologia, bolsista CNPq da Embrapa Semiárido, UPE, Petrolina, PE.

²Engenheira-agrônoma, aluna do curso de pós-graduação em Horticultura Irrigada, DTCS/UNEB, Juazeiro, BA.

³Estudante de Biologia, estagiária da Embrapa Semiárido, Universidade Pernambuco (UPE), Petrolina, PE.

⁴Engenheiro-agrônomo, M.Sc. em Horticultura Irrigada, bolsista BFT Facepe, Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

⁵Engenheira-agrônoma, D.Sc. em Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Algodão, Campina Grande, PB.

⁶Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em Proteção de Plantas, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

⁷Engenheira-agrônoma, D.Sc. em Ciência do Solo, professora adjunta, DTCS/UNEB, Juazeiro, BA.

⁸Biólogo, D.Sc. em Ciência do Solo, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, paulo.ivan@embrapa.br

experimento em quatro tipos de solo; dois coletos em Petrolina, PE e dois, em Barbalha, CE, utilizados como substrato para o crescimento de dois genótipos de guandu e dois de amendoim como plantas-isca. As plantas foram cultivadas até o florescimento, quando o material foi coletado para o isolamento das bactérias. Foram selecionados aleatoriamente dez nódulos por planta, os quais foram desinfestados superficialmente e espremidos em placas de Petri contendo YMA. Após o período de incubação e o surgimento das culturas típicas de rizóbios, estas foram purificadas no mesmo meio. Foram obtidos 182 isolados de guandu e 83 de amendoim, dentre os quais as características de crescimento rápido e capacidade de acidificar o meio de cultura foram predominantes. Para o amendoim, não foram obtidas bactérias de crescimento lento e capazes de alcalinizar o meio de cultura, enquanto, para o guandu, foram obtidos 34 isolados com estas características. Estudos complementares estão sendo conduzidos com o intuito de avaliar a diversidade e a eficiência destes isolados.

Palavras-chave: fixação biológica de nitrogênio, inoculante, diversidade.

Introdução

Diversas leguminosas cultivadas no Brasil apresentam capacidade de se associar a bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio, chamadas coletivamente de rizóbios. Para maximizar esta associação na agricultura, ao longo dos anos, inoculantes contendo bactérias eficientes e competitivas têm sido utilizados. Para a obtenção de bactérias com eficiência agrônômica que possam ser recomendadas para a produção de inoculantes, alguns estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de isolar, caracterizar e selecionar rizóbios.

Muitas das leguminosas com importância para o Nordeste, como o amendoim (*Arachis hypogaea* L.) e o guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millisp.) podem ter o seu potencial para a fixação biológica de nitrogênio maximizado. Para alcançar este objetivo, é importante realizar prospecção por rizóbios autóctones com a finalidade de avaliar a sua eficiência agrônômica.

O guandu é uma espécie que apresenta potencial para ser utilizado como forrageira, alimentação humana e adubo verde. Na região semiárida, grande parte do guandu é utilizada na alimentação humana e animal, principalmente em áreas de produção de sequeiro (FERNANDES JÚNIOR et al., 2012). O amendoim é uma oleaginosa de grande importância em vários países, sendo produzido mundialmente. No Brasil, é cultivado de forma mais significativa nas regiões Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste (SANTOS et al., 2010) e o desenvolvimento de tecnologias de baixo custo pode levar ao aumento da produtividade desta cultura no País, sobretudo na Região Nordeste.

Para ambas as espécies, há uma grande demanda por rizóbios eficientes nas condições do Nordeste do Brasil. Dessa forma, a prospecção por bactérias fixadoras de nitrogênio para estas culturas é prioritária. A caracterização de rizóbios para as culturas do guandu e amendoim tem sido conduzida, nos últimos anos, no Brasil, e as bactérias obtidas têm revelado perfis moleculares e metabólicos bastante peculiares (FERNANDES JÚNIOR et al., 2012; LYRA et al., 2013), indicando que bactérias pertencentes a novos grupos taxonômicos vêm nodulando o amendoim e o guandu.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar fenotipicamente bactérias isoladas de nódulos de amendoim e guandu cultivados em solos da região semiárida.

Material e Métodos

Foi implantado um ensaio em casa de vegetação para a obtenção dos nódulos de amendoim e de guandu que foram utilizados no isolamento das bactérias. Foram utilizados quatro tipos de solo; sendo que dois foram coletados na área do Campo Experimental da Embrapa Algodão, em Barbalha, CE. Nestes solos, na época da coleta, cultivava-se amendoim. Os outros dois tipos foram coletados no Município de Petrolina, PE, nas dependências da Embrapa Semiárido, no Campo Experimental da Caatinga (em área de pastagem de capim-buffel seco) e do Campo Experimental do Bebedouro (área onde o amendoim havia sido cultivado e colhido há 15 dias). Os solos foram destorrados, peneirados e acondicionados em vasos de polietileno com capacidade para 500 mL.

Para a obtenção dos isolados, foram utilizadas como plantas-isca os genótipos de guandu BRS Petrolina e Cariri Mirim. Os genótipos de amendoim foram LVIPE-06 e BR1. Foram plantadas duas sementes por vaso e as plantas foram irrigadas com água destilada, conforme necessário e, após 40 dias de emergência para o amendoim e 60 dias para o guandu, as plantas foram coletadas, sendo os nódulos destacados para o isolamento logo após a coleta e lavagem das raízes.

Foram selecionados, aleatoriamente, dez nódulos por planta que foram desinfestados superficialmente com etanol comercial por 30 segundos, hipoclorito de sódio (5% v/v) por 3 minutos, seguido por dez lavagens em água destilada autoclavada. Os nódulos foram macerados em placas com meio YMA com vermelho congo (VINCENT, 1970) e as placas foram acondicionadas em incubadora até a visualização das colônias. Para purificação, as colônias foram transferidas sucessivas vezes para o meio YMA com azul de bromotimol. Após a purificação dos isolados, foram realizadas as avaliações das características culturais propostas por Martins et al. (1997).

Resultados e Discussão

As características fenotípicas das bactérias estão sumarizadas na Tabela 1. Foram obtidos 182 isolados bacterianos provenientes de nódulos de duas cultivares de guandu; 75 (41%) deles foram obtidos da cultivar BRS Petrolina e 107 (59%) do genótipo Cariri Mirim. Foram obtidos 83 isolados dos nódulos de amendoim, dos quais 48 (58%) isolados foram do acesso LVIPE-06 e 35 (42%) da cultivar BR1. Os isolados que foram obtidos das duas variedades de guandu e do amendoim apresentaram, em comum, o crescimento rápido, a reação de pH no meio ácido, o tamanho maior que 2 mm e a grande quantidade de muco e do tipo viscoso. Quanto ao guandu, observou-se que 99 (54%) isolados apresentaram crescimento rápido; 49 (27%) intermediário e 34 (19%) apresentaram crescimento lento.

Tabela 1. Tempo de crescimento e reação de pH do meio YMA de bactérias isoladas de nódulos de dois genótipos de amendoim e de dois de guandu cultivados em solos do Semiárido.

		Amendoim					
		Tempo de crescimento			Reação de pH		
Solo	Total	Rápido	Intermediário	Lento	Ácido	Neutro	Alcalino
Barbalha-1	31	31 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	31 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Barbalha-2	14	14 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	8 (57%)	6 (43%)	0 (0%)
Petrolina-1	28	27 (96%)	1 (4%)	0 (0%)	23 (82%)	5 (8%)	0 (0%)
Petrolina-2	10	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Total	83	82 (99%)	1 (1%)	0 (0%)	72 (87%)	11 (13%)	0 (0%)
Variedade							
BR1	35	35 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	34 (97%)	1 (3%)	0 (0%)
LViPE- 06	48	47 (98%)	1 (2%)	0 (0%)	37 (77%)	11 (23%)	0 (0%)
Total	83	82 (99%)	1 (1%)	0 (0%)	72 (87%)	11 (13%)	0 (0%)
		Guandu					
		Tempo de crescimento			Reação de pH		
Solo	Total	Rápido	Intermediário	Lento	Ácido	Neutro	Alcalino
Barbalha-1	68	29 (43%)	24 (35%)	15 (22%)	31 (46%)	15 (22%)	22 (32%)
Barbalha-2	72	46 (64%)	17 (24%)	9 (12%)	47 (65%)	11 (15%)	14 (20%)
Petrolina-1	15	10 (67%)	2 (13%)	3 (20%)	9 (60%)	3 (20%)	3 (20%)
Petrolina-2	27	14 (52%)	6 (22%)	7 (26%)	16 (59%)	4 (15%)	7 (26%)
Total	182	99 (54%)	49 (27%)	34 (19%)	103 (57%)	33 (18%)	46 (25%)
Variedade							
BRS Petrolina	75	45 (60%)	20 (27%)	10 (13%)	42 (56%)	12 (16%)	21 (28%)
Cariri Mirim	107	54 (51%)	29 (27%)	24 (22%)	61 (57%)	21 (20%)	25 (22%)
Total	182	99 (54%)	49 (27%)	34 (19%)	103 (57%)	33 (18%)	46 (25%)

Com relação à reação de pH, 103 (57%) isolados apresentaram capacidade de acidificar o meio, 33 (18%) isolados não alteraram o pH e 46 (25%) isolados alcalinizaram o meio de cultura. Dentre os isolados de amendoim, 82 (99%) apresentaram crescimento rápido e apenas um (1%) dos isolados apresentou crescimento intermediário, não havendo, portanto, nenhum com crescimento lento. Relativo à reação de pH, 72 (87%) isolados apresentaram capacidade de acidificar, 11 (13%) isolados não alteraram o pH e não houve nenhum isolado com capacidade de alcalinizar o meio de cultura. Os rizóbios de crescimento rápido das espécies estudadas apresentaram as características culturais similares àquelas apresentadas por *Rhizobium tropici*, que está abundantemente distribuído nos solos tropicais da América do Sul.

Rizóbios de crescimento rápido têm sido isolados de nódulos de guandu (FERNANDES JÚNIOR et al., 2012) e de amendoim (LYRA et al., 2013) nos últimos anos. Estudos com isolados de crescimento rápido obtidos de guandu têm demonstrado alta versatilidade metabólica, indicando bactérias com alta capacidade saprofítica e sobrevivência no solo (FERNANDES JÚNIOR et al., 2012). Avaliando a diversidade genética de bactérias de crescimento rápido isoladas de amendoim, Lyra et al. (2013) observaram que os isolados oriundos de solos do Estado de Pernambuco apresentaram baixa similaridade com aquelas estirpes de rizóbio tradicionais. Estudos taxonômicos com uma abordagem polifásica estão sendo conduzidos para melhor entender a taxonomia das bactérias obtidas nesta coleção.

Conclusão

Rizóbios isolados de amendoim e de guandu cultivados em solos do Semiárido apresentam predominância de crescimento rápido e capacidade de acidificar o meio de cultura, além de apresentar elevada diversidade.

Referências

FERNANDES JÚNIOR, P. I.; LIMA, A. A.; PASSOS, S. R.; GAVA, C. A. T.; OLIVEIRA, P. J.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Phenotypic diversity and amylolytic activity of fast growing rhizobia from pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 43, p. 1.604-1.612, 2012.

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**, Nairobi, v. 12, p. 2.147-2.156, 2013.

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**, Oxford, v. 29, n. 5/6, p. 1.005-1.010, 1997.

SANTOS R. C.; FREIRE R. M. M.; LIMA, L.M.; ZAGONEL, G. F.; COSTA, B. J. Produtividade de grãos e óleo de genótipos de amendoim para o mercado oleoquímico. **Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, p. 1-8, 2010.

VINCENT, J. M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970. 164 p.