

CARACTERIZAÇÃO E DIVERSIDADE DE ESTIRPES DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE AMENDOINZEIRO

Rafael Bruno Guayato Nomura¹, Juscélio Donizete Cardoso², Gisele Milani Lovato³,
Diva Souza Andrade⁴

1Graduando de Farmácia - UniFil, E-mail: rafaelguayato@gmail.com; 2Pesquisador Dr. FAPEAGRO/IAPAR, E-mail: juscelio.cardoso@yahoo.com.br; 3Pesquisadora M.Sc. FAPEAGRO/IAPAR, E-mail: gimilanibio@yahoo.com.br; 4Pesquisadora PhD IAPAR, E-mail: diva@iapar.

Resumo - O amendoineiro (*Arachis hipogaea* L.) é uma cultura originária da América do Sul, sendo a quarta oleaginosa mais cultivada, e apresenta altas taxas de Fixação Biológica de Nitrogênio produzido. Nos solos Paranaenses, em áreas não cultivadas existe ocorrência generalizada e alta diversidade de rizóbios simbióticos do amendoineiro. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as características bioquímicas e moleculares de estirpes de rizóbio, isoladas de nódulos de amendoineiro e comparar a diversidade em áreas cultivadas e não cultivadas. Foram utilizadas 33 estirpes (IPRAh) pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia do Solo do IAPAR, provenientes de áreas com e sem cultivo de amendoineiro de diversos municípios do Paraná. No estudo, foi incluída a estirpe de *Bradyrhizobium* sp., SEMIA 6144 (fornecida pela FEPAGRO) recomendada para amendoineiro. Para a caracterização bioquímica, foram realizadas análises de produção de sideróforos em meio de cultura com Ferro III e solubilização de fosfato de cálcio em meio de cultura sólido. Na caracterização molecular, foram realizadas ampliações do DNA utilizando o oligonucleotídeo iniciador BOX-A1R. A partir das características genotípicas, foi construído um dendrograma de dissimilaridade segundo o coeficiente de Jaccard e o algoritmo UPGMA. Nas análises bioquímicas, independente da origem, das estirpes avaliadas 26% solubilizaram fosfato de cálcio e 56% produziram sideróforos. Com base na análise de agrupamento utilizando o perfil do BOX-A1R, foi realizada a análise de diversidade através do software PAST. O índice de diversidade das estirpes analisadas foi maior em áreas cultivadas em relação às áreas não cultivadas, possivelmente, práticas agrícolas tenham estimulado o aumento desta diversidade.

Palavras-Chave: *Arachis hipogaea* L., *Bradyrhizobium* sp., BOX-A1R, Sideróforos.

Abstract - The peanut (*Arachis hipogaea* L.) is a native crop of South America, which is the fourth most widely grown oilseed, and has high rates of Biological Nitrogen Fixation produced. In the State of Paraná in uncultivated areas is widespread occurrence and high diversity of peanut rhizobia symbionts. In this context, the aim of this study was to evaluate the biochemical characteristics (for the production of siderophores and solubilization of calcium phosphate) and molecular rhizobia strains isolated from nodules of peanut and compare the diversity in cultivated and uncultivated areas. We used 33 strains (IPRAh) belonging to the collection of microorganisms Laboratory of Soil Microbiology IAPAR, from the area with and without peanut cultivation of various municipalities of Paraná. In the study, was included *Bradyrhizobium* sp., SEMIA 6144, (provided

by FEPAGRO) recommended for groundnut. For the biochemical analyzes it were performed siderophore production and solubilization of calcium phosphate. Molecular characterization of DNA amplifications were performed using primer BOX-A1R. From the genotypic characteristics, a dendrogram was constructed using BioNumerics software (Applied Maths) according to the Jaccard coefficient and UPGMA algorithm. In biochemical analysis, 26% of strains solubilized calcium phosphate and 56% siderophore produced. Based on cluster analysis using the profile of the BOX-A1R, analysis was performed using software diversity PAST. The strains analyzed showed higher diversity index in cultivated areas in relation to uncultivated areas.

KeyWord: *Arachis hipogaea* L., *Bradyrhizobium* sp., BOX-A1R, Siderophores.

1. INTRODUÇÃO

O amendoineiro (*Arachis hipogaea* L.) é uma cultura originária da América do Sul, sendo a quarta oleaginosa mais cultivada e ocorre em regiões tropicais e subtropicais. Esta leguminosa oleaginosa tem sido amplamente cultivada em mais de 80 países da Ásia, África, América do Norte e do Sul. O Paraná é o terceiro maior produtor nacional, responsável por 6,9 mil toneladas na safra 2012/13 (2,2%). Nos solos Paranaenses, em áreas não cultivadas, existe ocorrência generalizada e alta diversidade de rizóbios simbióticos do amendoineiro que, quando associados pelo processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) captam o nitrogênio presente no ar, tornando-o assimilável pelos vegetais, sendo este processo, essencial para a viabilidade econômica do agronegócio brasileiro (Hungria *et al.*, 2008), pois, a adubação nitrogenada, que eleva os custos de produção e contribui para a poluição ambiental, pode ser substituída. Outros fatores que limitam o crescimento das plantas são a disponibilidade limitada de micronutrientes, como o ferro e fósforo.

No Brasil, uma estirpe de *Bradyrhizobium* é autorizada pelo Ministério da Agricultura, Pesca e Abastecimento (MAPA), como inoculante para amendoineiro (*Arachis hipogaea* L.). No entanto, o processo de seleção de novas estirpes eficientes na FBN deve ser uma preocupação constante na pesquisa. Na seleção de estirpes para inoculantes, além da capacidade de fixar nitrogênio, a produção de sideróforos e solubilização de nutrientes pelo rizóbio são importantes. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar as características bioquímicas e moleculares de estirpes de rizóbio, isoladas de nódulos de amendoineiro, e comparar a diversidade em áreas cultivadas e não cultivadas com amendoim.

2, MATERIAL E MÉTODOS

Para o estudo foram utilizadas 33 estirpes (IPRAh), pertencentes à coleção de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia do Solo do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), isoladas de nódulos de amendoineiro provenientes de área com e sem cultivo de amendoim, de diversos municípios do Paraná (Tabela 1). No estudo, foi incluída a estirpe de *Bradyrhizobium* sp., SEMIA 6144 (FEPAGRO), recomendada pelo MAPA para amendoineiro. Todas as estirpes foram autenticadas em amendoim, cultivar IAC-Tatu, em vasos Leonard com areia e vermiculita contendo solução nutritiva sem N mineral, esterilizados. Todas as análises foram conduzidas no Laboratório de Microbiologia do Solo e em casas de vegetação do IAPAR, Londrina – PR.

A produção de sideróforos pelas estirpes foi determinada usando o meio YMA (yeast-manitol-agar) suplementado com uma solução indicadora constituída por 1,21 mg mL⁻¹ de cromazurol, 0,1 mM FeCl₃. 6 H₂O e 1,82 mg mL⁻¹ de CTAB. Os isolados foram incubados durante sete dias a 28 °C. A produção de sideróforos foi considerada positiva pela visualização da formação de halo laranja ao redor das colônias.

Para a solubilização de fosfato de cálcio pelas estirpes, foi utilizado o meio GL, contendo por litro 10 g de glucose, 2 g de extrato de levedura e 15 g de ágar, ajustando-se o pH para 6,5. Após esterilização por autoclave a 121 °C e 1,5 atm foram adicionadas duas soluções esterilizadas por meio de filtro 0,2 µm; uma contendo 0,25 g L⁻¹ de K₂HPO₄ e outra 1 g L⁻¹ de CaCl₂. As estirpes foram repicadas para as placas e incubadas durante três dias a 28 °C. A solubilização de fosfato de cálcio foi determinada pela formação de halo transparente ao redor das colônias.

Após a extração do DNA, foram realizadas

amplificações com o oligonucleotídeo BOX-A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') e a reação de amplificação foi realizada em um volume final de 25 µL. Após a amplificação o produto foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1,5% por um período de 6,5 horas a 120 volts. Com base no perfil eletroforético, foi construído um dendrograma através do software BioNumerics (Applied Maths) segundo o coeficiente de Jaccard e o algoritmo UPGMA.

Tabela 1 Município de coleta do solo, histórico de cultivo da área e código IPR-Ah das estirpes isoladas de nódulos de amendoineiro utilizadas neste estudo.

| Município (PR) | Cultura na coleta do solo | IPR-Ah |
|---------------------|---------------------------|--|
| Prado Ferreira – PR | Amendoim | 745 |
| Irati – PR | Milho | 4642 |
| Ponta Grossa | Milho | 4648 |
| Jaguariaiva – PR | Milho | 4653 |
| Joaquim Távora | Milho | 4631 |
| Paranavaí – PR | Milho | 4636 |
| Umuarama – PR | Pastagem | 4635 |
| Joaquim Távora | Floresta | 4638 |
| Planalto – PR | Floresta | 4641 |
| Diamante Norte | Floresta | 4644 |
| Candido Abreu – PR | Floresta | 4646 |
| Ponta Grossa – PR | Floresta | 4647 |
| Ponta Grossa – PR | Amendoim | 4677, 4693, 4696, 4705, 4706, 4707, 4711, 4718, 4723, 4737, 4740, 4741, 4758, 4826, 4829, 4839, 4841, 4850, 4855 |
| *Rhodesia 411 | <i>Arachis</i> sp. | <i>Bradyrhizobium</i> sp. **SEMIA6144 |

*Instrução Normativa Nº 13, de 24 de Março de 2011. **Codificação FEPAGRO.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto à produção de sideróforos, as estirpes IPR-Ah 745, 4631, 4635, 4638, 4653, 4677, 4693, 4705, 4706, 4707, 4711, 4718, 4723, 4740, 4741, 4758, 4829, 4839 e 4855 apresentaram resultado positivo, representando um total de 56% das estirpes, critério esse determinante para a seleção de rizóbios, visto que a produção de sideróforos é uma das principais estratégias para a aquisição de ferro em solos com limitada disponibilidade deste micronutriente.

As estirpes IPR-Ah 4638, 4677, 4829, 4646, 4826,

745, 4741, 4635 e 4710 apresentaram resultado positivo para a solubilização de fosfato de cálcio, representando 26% do total. Estudos anteriores evidenciam que essa capacidade está correlacionada com a diminuição do pH do meio decorrente da formação de ácidos orgânicos.

Foram analisadas duas representações gráficas utilizando 20 estirpes de área cultivada com amendoim e nove estirpes de área sem cultivo do amendoim. O agrupamento das estirpes foi avaliado com base na caracterização genotípica pelo método PCR-BOX. Com um corte no coeficiente 0,7 para a área cultivada formou-se 18 grupos, e para a área não cultivada formou-se nove grupos.

Com base nos agrupamentos genotípicos das estirpes obtidos pelo BOX-A1R, comparados pelo método de Jaccard, foram calculados os índices de diversidade pelo software PAST, conforme Tabela 2.

Tabela 2 Valores Índices (I) de dominância, diversidade e homogeneidade da população derizóbios obtidos a partir da caracterização genotípica no coeficiente 0,7.

| | Com Cultivo | | | Sem Cultivo | | |
|----------------|-------------|-------|-------|-------------|-------|-------|
| | Lower | Upper | | Lower | Upper | |
| Dominance_D | 0,060 | 0,080 | 0,155 | 0,111 | 0,136 | 0,358 |
| Simpson_1-D | 0,940 | 0,845 | 0,920 | 0,889 | 0,642 | 0,864 |
| Shannon_H | 2,857 | 2,042 | 2,623 | 2,197 | 1,273 | 2,043 |
| Margalef | 5,675 | 2,670 | 4,673 | 3,641 | 1,365 | 3,186 |
| Equitability_J | 0,988 | 0,904 | 0,978 | 1 | 0,882 | 0,983 |

p-valor<0,02.

A população das estirpes originárias de áreas cultivadas apresentou índice de diversidade superior à de áreas não cultivadas. O teste t de Student revelou que houve diferença significativa nos índices de diversidade das estirpes obtidas de solos com e sem cultivo de amendoim para as características genotípicas, com p-valor > 0,02.

4. CONCLUSÃO

Independente da área de origem, a maioria das estirpes não solubiliza fosfato de cálcio e mais de 70% das estirpes isoladas de áreas cultivadas produzem sideróforos.

O cultivo altera a diversidade de, embora exista uma alta diversidade genotípica independente da área analisada.

REFERÊNCIAS

- BELTRÃO, N. E. D. M. **A cultura do amendoim na agricultura familiar brasileira.** 2004. Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2001/artigo_2004-12-07.2553547188/#>. Acesso em: 25/04/2013.
- CERETTA, C. A. *et al.* Fornecimento de nitrogênio por leguminosas na primavera para o milho em sucessão nos sistemas de cultivo mínimo e convencional. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 18, n. 2, p. 215-220, 1994.

CHAGAS JUNIOR, A. F. *et al.* Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia1. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 2, 2010. ISSN 1807-8621, 1679-9275.

CONAB, C. N. D. A. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos, safra 2012/2013, quinto levantamento: fevereiro/2013.** 07 de março de 2013 2013. Acesso em: 07 de março de 2013.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 9, 2001. Disponível em: < http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf >.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazônica**, v. 34, n. 3, p. 343-357, 2004.

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola.** Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 542.

HUNGRIA, M. *et al.* Caracterização Genética de Rizóbios e outras Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas por BOX-PCR. **Embrapa Soja. Comunicado Técnico 79**, p. 1-12, Dezembro 2008. ISSN 1516-1752.

SANTOS, R. C.; GODOY, I. J.; FAVERO, A. P. Melhoramento do amendoim. In: SANTOS, R. C. (Ed.). **O agronegócio do amendoim no Brasil.** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005. p.123-190.

ZAGO, V. C. P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N. G. Pseudomonas spp. Fluorescentes - Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas e Biocontroladoras de Fitopatógenos em Sistemas de Produção Agrícola. **Documento 127, Embrapa**, Seropédica, p. 34, 2000. ISSN 0104-6187.