

# EFETIVIDADE NA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO DE BACTÉRIAS NATIVAS ISOLADAS DE PLANTAS DE AMENDOIM

Jackson MARCONDES \*  
Antônio S. FERRAUDO \*\*  
Denilson César SCAQUITTO \*  
Lúcia M. Carareto ALVES \*\*\*  
Eliana G. de Macedo LEMOS \*<sup>1</sup>

## Resumo

O objetivo do trabalho foi o de isolar, caracterizar e avaliar a efetividade da fixação biológica do nitrogênio (FBN) de isolados de rizóbio (JAB) em amendoim (IAC 886 Runner e IAC Tatu ST), comparando-os com a estirpe comercial SEMIA 6144. Após o seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA os isolados foram classificadas como *Burkholderia* sp e *Rhizobium* sp. Em casa de vegetação, os isolados e a estirpe comercial foram inoculadas nas duas cultivares. As seis estirpes de *Rhizobium* sp foram eficientes em nodular as plantas de amendoim, aumentando o Nitrogênio total e a matéria seca da parte aérea. As estirpes *Rizhobium* JAB-2 e JAB15 apresentaram maior capacidade de nodulação e melhor adaptação com ambas as cultivares, sendo que a análise de componentes principais discriminou os tratamentos. Os isolados de *Burkholderia* sp não nodularam as cultivares quando isoladas, entretanto quando associadas à SEMIA 6144 observou-se nodulação e fixação de Nitrogênio. A reposta à inoculação da cultivar IAC 886 Runner mostrou valores maiores para os parâmetros avaliados sugerindo que o genótipo do amendoim pode interferir na eficiência simbiótica dos isolados. O estudo mostra a importância da seleção de novas estirpes e do programa de melhoramento do amendoim para aumentar a produção dessa leguminosa.

**Termos de indexação:** *Arachis hypogaea*. Fixação biológica do N. Simbiose.

## Introdução

A planta de amendoim (*Arachis hypogaea* L.), um membro da família Fabaceae, é usualmente nodulada por *Bradyrhizobium spp* (Yang et al, 2008), embora existam relatos de que bactérias de crescimento rápido, do gênero *Rhizobium*, também possam nodular as raízes desta leguminosa (Santos, 2001; Ibañez et al, 2008). Nestes nódulos infectados por rizóbios, o N<sub>2</sub> é reduzido a NH<sub>3</sub> e transferido para a planta. O nitrogênio é considerado um dos nutrientes mais críticos para o aumento da produtividade agrícola, sendo a fixação biológica do nitrogênio a principal fonte natural nos solos.

A inoculação de sementes de leguminosas de importância para a alimentação é um eficiente e conveniente modo de introduzir rizóbios viáveis no solo e, subsequentemente, na rizosfera das plantas, promovendo a fixação do nitrogênio (HUNGRIA et al, 2000; HAFEEZ et al, 2005; RAPOSEIRAS et al, 2006). Entretanto, a

\* Departamento de Tecnologia, FCAV/UNESP, Jaboticabal/SP.

\*\* Departamento de Ciências Exatas, FCAV/UNESP, Jaboticabal/SP.

\*\*\* Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal.

<sup>1</sup> Autor correspondente: Dra. Eliana G. M. Lemos, Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Rodovia Paulo Donato Castellane s/nº, 14884-900, Jaboticabal, São Paulo; egerle@fcav.unesp.br

resposta à inoculação de plantas de amendoim tem se revelado na maioria das vezes pouco eficiente, provavelmente devido à barreira de competição imposta pela população de rizóbios nativos geralmente presente nos solos tropicais. A competição para o estabelecimento das estirpes inoculadas pode levar à ineficiência do processo (THIES et al, 1991a).

Conscientes de que a nodulação por rizóbios nativos possa freqüentemente ocorrer nos solos previamente cultivados com o amendoim, e desta forma a eficácia do processo de FBN (fixação biológica do nitrogênio) seja comprometida, a busca de novas estirpes que possam vir a serem utilizadas em inoculantes prossegue. Recentemente, em solos dos Estados Unidos, a inoculação de *A. hypogaea*, com aumento da produtividade, foi obtida quando a inoculação acontecia em solos sem história de cultivo anterior com esta leguminosa (LANIER et al., 2005).

Tipicamente, as estirpes de rizóbios são avaliadas individualmente (Hungria et al, 2003) ou combinadas com outras estirpes (HAFEEZ et al, 2005; RAPOSEIRAS et al, 2006), com o intuito de melhorar a produtividade de grãos. Na China (YANG et al, 2005), na Argentina (BOGINO et al, 2006; IBÁÑEZ et al, 2008) e no Marrocos (EL-AKHAL et al, 2008) estirpes foram isoladas e caracterizadas, com marcadores moleculares, e avaliadas em sua eficiência em fixar o N<sub>2</sub>.

A inoculação de amendoim no Brasil não é uma prática comum, embora esforços tenham sido realizados no sentido de encontrar estirpes eficientes para a cultura (Santos et al, 2005; Borges et al, 2007). Atualmente, uma estirpe de *Bradyrhizobium*, SEMIA 6144, é recomendada para a inoculação desta leguminosa.

Associadas às técnicas atuais de caracterização de estirpes, novas ferramentas de estatísticas procuram a melhor forma de analisar os resultados do processo de FBN. Assim, a Análise de Componentes Principais (PCA) pode ser uma alternativa para os métodos tradicionais de análise de resultados. Esse tipo de análise é utilizado na fase exploratória de dados para se tentar reduzir o conjunto das variáveis originais, preservando parte da informação inicial relevante e produzindo um conjunto de novas variáveis não correlacionadas, que são os componentes principais (HAIR, 2005).

O objetivo deste trabalho foi buscar isolados de rizóbios a partir de amendoineiro, obtidos em uma área agrícola de São Paulo, Brasil. Após caracterizá-los geneticamente, a efetividade dos mesmos foi avaliada quanto a fixação biológica do N<sub>2</sub>, em duas cultivares de amendoim, comparando-os com a estirpe padrão comercial.

## Material e Métodos

As plantas de amendoim foram coletadas em campo de cultivo agrícola, entre novembro de 2005 e 2006, na região de Jaboticabal, Estado de São Paulo. Os nódulos coletados foram superficialmente desinfetados, por imersão em álcool a 70% e hipoclorito de sódio a 1%, por 2 minutos. Nódulos ou raízes foram macerados e colocados em placa de Petri contendo meio YMA (“Yeast-Mannitol Agar”) (VINCENT, 1970) e incubados a 28°C, por 24 a 36 horas. Sucessivas passagens foram realizadas até a obtenção de colônias isoladas e puras. Os isolados foram cultivados em 50 mL meio YMB (“Yeast-Mannitol Broth”) e mantidos a 120 rpm, 28°C, por 48 horas, para sedimentação de células e extração de DNA (SAMBROOK et al., 1989). O DNA bacteriano foi amplificado em um termociclador usando os oligonucleotídeos iniciadores “forward”

pA 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' e "reverse" pC5B 5'-TAC CTT GTT ACG ACT T-3' (Kuske et al, 1997). Estes oligonucleotídeos iniciadores amplificam uma região conservada do gene 16 rRNA.

A reação de amplificação foi realizada utilizando-se: 200 µM dNTPs; tampão 1X [20 mM de Tris-HCl (pH8.4), 50 mM KCL]; 1,5 mM MgCL<sub>2</sub>; 30 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador; 1 U de Taq DNA polimerase; e 50 ng de DNA bacteriano. A amplificação do DNA consistiu de um passo inicial de desnaturação a 95°C por 2 minutos; 30 ciclos de 30 segundos a 50°C, 1 minuto a 72°C e 5 minutos a 94°C; seguidos por um período de extensão final de 72°C por 5 minutos (KUSKE et al, 1997). Os produtos da PCR foram purificados e seqüenciados diretamente, usando "ABI Prism Big Dye Terminator kit" (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante em um seqüenciador capilar (modelo ABI 3700, Foster City, Ca, EUA). Para o seqüenciamento foi utilizado o oligonucleotídeo "forward" PA, nas condições de amplificação descritas anteriormente. As seqüências obtidas foram analisadas utilizando os programas "Sequencing Analysis 3.4" (Applied Biosystems) e o pacote "Phred./Phrap/Consed" (GORDON et al., 1998), com requerimento mínimo de 400 bases e qualidade Phred maior que 20. As seqüências com qualidade foram submetidas ao "GenBank" do "National Center For Biotechnology Information" (NCBI) e a uma comparação de similaridade dos nucleotídeos utilizando-se o programa BLAST, "Basic Local Alignment Search Tools" (ALTSCHUL et al, 1997).

Todas as estirpes isoladas foram submetidas à avaliação da produção de Ácido Indolacético (AIA) através do método colorimétrico descrito por Gordon e Weber (1951), Além disso, os diferentes isolados identificados pelo seqüenciamento foram utilizados para experimentos de inoculação em casa de vegetação, utilizando-se duas variedades de amendoimzeiro, IAC 886 Runner e IAC Tatu ST. Sementes previamente desinfetadas, conforme descrito para os nódulos, foram plantadas em vasos contendo vermiculita esterilizada, e inoculadas com uma das 15 diferentes culturas isoladas de amendoimzeiro (JAB1 a 15), isoladamente ou combinadas com a estirpe padrão SEMIA 6144. Foram realizados controles positivos, inoculação com a estirpe padrão de *Bradyrhizobium* sp SEMIA 6144, e controles negativos, plantas sem inoculação. Os inóculos foram preparados com os isolados cultivados em meio YMB, incubados a 28°C, 120rpm por 48 horas, contendo 10<sup>9</sup> células/mL. Foi inoculado um mL de cada preparação, em cada vaso, no momento do plantio das sementes e aos três dias de emergência das plântulas. Após o desbaste, cada planta recebeu adubação isenta de nitrogênio (NORRIS et al., 1964) a cada cinco dias.

Após 40 dias de emergência, as plantas foram colhidas e tiveram determinados os valores de número de nódulos (NN), massa seca da parte aérea (MSPA) e teor de nitrogênio total (NT) da parte aérea. O NT foi medido pelo método do semi-micro Kjeldahl (Bataglia et al, 1983) no Laboratório de Análise de Solo e Planta (Departamento de Solos e Adubos, FCAV/UNESP). A possível discriminação dos tratamentos foi verificada com o auxílio da técnica exploratória multivariada de componentes principais (Hair, 2005) processada com os valores obtidos para cada análise ou parâmetro, por planta. As análises multivariadas foram processadas pelo programa Statistica (Statsoft 7.0).

## Resultados e Discussão

Dentre quinze isolados que apresentaram colônias morfológicamente homogêneas, denominadas “JAB peanut LBMP 1-15”, o seqüenciamento da região 16S rDNA permitiu identificar treze posições taxômicas. A análise de similaridade gerada através do “Genbank” (Tabela 1) revelou que seis linhagens apresentaram similaridade de 82 a 100% com bactérias do gênero *Rhizobium*; enquanto que outras sete apresentaram similaridade de 87 a 100% com o gênero *Burkholderia*. Estes resultados coincidem com os de Ibañez e colaboradores (2007) que encontraram *Rhizobium giardinii* e *Rhizobium tropici*, simbiontes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), nodulando amendoimzeiro na Argentina Central. Entretanto, esta é a primeira vez que é descrita a presença de *Burkholderia* em nódulos de *A. hypogaea*, pois mais freqüentemente são encontrados *Bradyrhizobium spp* (ZHANG et al 1999; EL-AKHAL et al 2008; BOGINO et al 2008).

**Tabela 1.** Classificação dos isolados pelo seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA. Identificação do laboratório LBMP, número de Bankit, identificação e similaridade das seqüências no NCBI gerada pelo programa Blast.

Isolados	Identificações LBMP	Números “Bankit”	Identificações NCBI	Similaridades %
1	JAB 1 peanut LBMP	bankit1138314	<i>Rhizobium sp.</i> ORS214	100
2	JAB 2 peanut LBMP	bankit1148335	<i>Rhizobium lusitanum</i>	82
3	JAB 3 peanut LBMP	bankit1148348	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	85
4	JAB 4 peanut LBMP	bankit1148354	<i>Rhizobium sp.</i> MTR17A	100
5	JAB 5 peanut LBMP	bankit1148381	<i>Rhizobium tropici</i>	100
6	JAB 6 peanut LBMP	bankit1148515	<i>Rhizobium sp.</i> DMP-9	89
7	JAB 7 peanut LBMP	bankit1147821	<i>Burkholderia sp.</i> TFD34	89
8	JAB 8 peanut LBMP	bankit1148516	<i>Burkholderia caribensis</i>	100
11	JAB 11 peanut LBMP	bankit1148531	<i>Burkholderia sp.</i> HSL-4	86
12	JAB 12 peanut LBMP	bankit1148532	<i>Burkholderia sp.</i> CCS	89
13	JAB 13 peanut LBMP	bankit1148534	<i>Burkholderia</i> LMG	100
14	JAB 14 peanut LBMP	bankit1148538	<i>Burkholderia sp.</i> TFD4	87
15	JAB 15 peanut LBMP	bankit1148541	<i>Burkholderia sp.</i>	87

Laboratório de Bioquímica de microorganismo e plantas (LBMP)

As cultivares de amendoimzeiro utilizadas foram: IAC 886 Runner de variedade botânica do tipo *hypogaea*, subespécie *hypogaea*, Virgínia e rasteira; e a cultivar IAC Tatu ST com variedade botânica do tipo *hypogaea*, subespécie *fastigiata*, Valência e ereto. Nas condições do estado de São Paulo, a primeira cultivar tem seu ciclo de plantio à maturação em média de 130 dias, enquanto a segunda cultivar é precoce com ciclo de aproximadamente 90-100 dias. Em ambas as cultivares, o desenvolvimento vegetativo praticamente cessa em 90-100 dias (INSTITUTO AGRONÔMICO, 2003).

A nodulação das plantas de amendoim pelas estirpes foi diferente entre os dois gêneros bacterianos. O número de nódulos (NN), a matéria seca da parte aérea (MSPA) e o teor de nitrogênio total (NT) da parte aérea são mostrados na tabela 2. Todas as plantas dos cultivares IAC 886 Runner e IAC Tatu ST tiveram suas raízes noduladas pelas linhagens de *Rhizobium*, enquanto que as do gênero *Burkholderia*, quando inoculadas

isoladamente, não nodularam nenhuma das duas. Linhagens de *Burkholderia* capazes de nodular leguminosas tropicais e executarem a fixação do N foram descritas através de análise taxonômica polifásica (VANDAMME et al., 2002; MARTÍNEZ-AGUILAR et al., 2008). Contudo, outras linhagens quando analisadas através do ensaio de atividade de redução do acetileno, como *B. caribensis* LMG 18531T, não foram capazes de fixar o N. Esta variabilidade sugere que as capacidades de nodulação e fixação do N, bem como os genes nod e nif, não estão universalmente distribuídos entre as múltiplas linhagens de *Burkholderia* (VANDAMME et al., 2002; CHEN et al., 2005).

**Tabela 2.** Número de nódulos, massa seca e teor de nitrogênio de plantas da cultivar IAC 886 Runner e IAC Tatu ST inoculadas, de forma isolada ou associada com a estirpe SEMIA 6144, com as linhagens isoladas a partir de amendoinzeiro. Controle positivo (inoculação com a estirpe padrão SEMIA 6144) e controle negativo (plantas sem inoculação).

Tratamentos	IAC Tatu ST			IAC 886 Runner		
	Nódulo /planta	Massa seca/g	N <sub>2</sub> g/kg	Nódulos /planta	Massa seca	N <sub>2</sub> g/kg
Controle positivo	30	1,65	23,5	39	1,39	27,2
Controle negativo	00	0,97	7,4	00	1,03	11,2
JAB1	29	0,95	24,9	23	0,96	22,6
JAB 2	24	1,01	25,6	30	1,46	29,5
JAB 3	22	1,12	26,2	21	0,52	24,5
JAB 4	25	0,87	23,5	29	0,81	26,3
JAB 5	26	0,98	22,8	30	0,76	26,3
JAB 6	24	0,89	23,5	26	0,89	24,5
JAB 1/ 6144	31	1,07	25,1	29	1,45	22,2
JAB 2/ 6144	20	0,86	18,2	28	1,05	20,0
JAB 3/ 6144	31	0,73	16,8	31	1,36	25,0
JAB 4/ 6144	20	1,10	13,7	33	1,43	26,5
JAB 5/ 6144	14	0,53	15,4	26	1,58	29,3
JAB 6/ 6144	17	0,44	19,3	21	1,45	26,1
JAB 7/ 6144	30	0,59	26,3	18	1,22	22,8
JAB 8/ 6144	24	0,93	24,2	18	1,03	25,6
JAB 11/ 6144	35	1,03	24,9	23	1,12	23,5
JAB 12/ 6144	22	0,95	22,6	25	0,99	33,9
JAB 13/ 6144	23	1,09	21,5	22	0,89	22,6
JAB 14/ 6144	33	1,16	22,8	24	1,25	24,6
JAB 15/ 6144	34	1,28	25,9	31	0,57	32,9

As combinações entre os microrganismos demonstraram que foi possível promover uma melhor interação com a planta hospedeira, que por sua vez, estimulou uma maior produção de nódulos aumentando a efetividade na fixação do N<sub>2</sub>. A prática de combinar estirpes no processo da inoculação (HASSAN et al, 2004; HAFEEZ et al, 2005; RAPOSEIRAS et al, 2006), é frequentemente utilizada na agricultura com o intuito de melhorar a produtividade de grãos. As interações planta-microrganismo e microrganismo-microrganismo mostraram-se melhor adaptadas a cultivar IAC 886 Runner, com nódulos, massa seca e fixação de nitrogênio, pouco superiores aos da

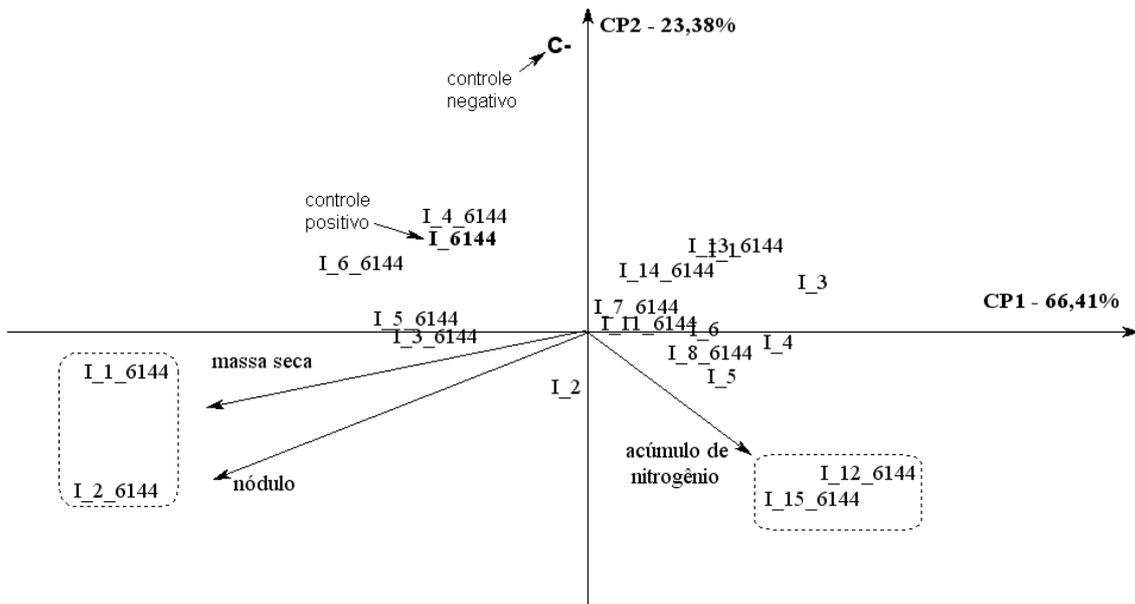
cultivar IAC Tatu-ST (Tabela 2). Estes dados corroboram os apresentados por Borges e colaboradores (2007) que, avaliando a nodulação e fixação biológica do nitrogênio, verificaram a existência de variações entre acessos de amendoim sujeitos a estipes de rizóbios nativos. Além do genótipo, a área de cobertura do vegetal também interfere com a eficiência da nodulação (Santos et al., 2005), assim como as condições de plantio, em vasos contendo vermiculita, podem interferir na adaptação e conseqüentemente na eficiência simbiótica dos isolados (DATE e NORRIS, 1979).

Alguns dos tratamentos, como JAB2 e JAB15/6144 (tabela 2) apresentaram as melhores médias para adaptação, nodulação, formação da matéria seca e efetividade de fixação do nitrogênio, para ambas cultivares, comparados a estirpe padrão 6144 isoladamente. Estes resultados confirmam a significância da estirpe SEMIA 6144, ainda indicando-a como a mais recomendada. Alguns tratamentos (tabela 2) apresentaram médias consideráveis nos três itens avaliados, como, por exemplo, os tratamentos JAB5 e JAB4/6144, para a cultivar IAC 886 Runner e JAB1/6144, JAB11/6144 e JAB14/6144, para a cultivar Tatu-SP. Contudo, observa-se que os resultados ocorrem para apenas uma das cultivares em particular, o que demonstra uma baixa adaptação destas linhagens isoladas em relação aos diferentes genótipos de amendoimzeiro. Desta forma, talvez seja possível que quando utilizadas em diferentes sementes, não se torne um tratamento recomendado.

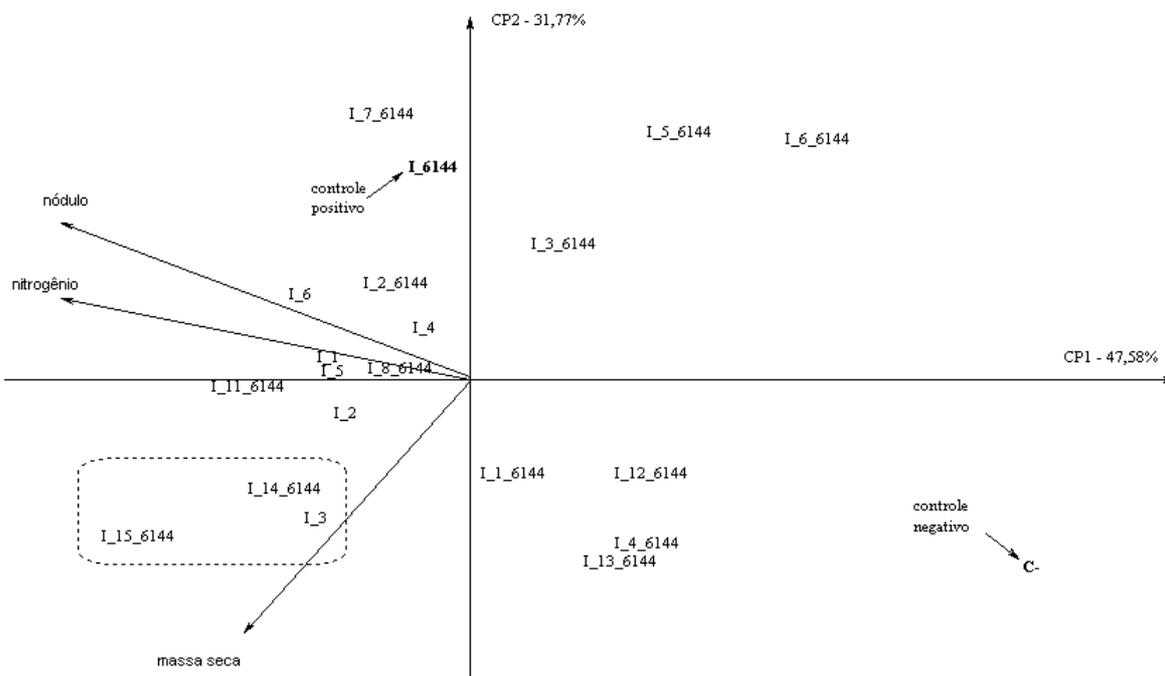
Os diversos tratamentos aplicados as duas cultivares de amendoimzeiro puderam ser discriminadas através da análise multivariada de componentes principais (Figuras 1 e 2). O gráfico biplot analisando os isolados e a cultivar IAC 886 Runner (Figura 1) apresenta duas discriminações importantes quanto a dois componentes principais. A primeira consiste nos tratamentos desta cultivar com JAB1/6144 e JAB2/6144, caracterizados por resultarem em mais massa de matéria seca da parte aérea e maior quantidade de nódulos. O segundo consiste nos tratamentos envolvendo JAB12/6144 e JAB15/6144, caracterizados pela maior concentração de nitrogênio nas plantas da cultivar IAC 886 Runner, que os demais tratamentos. Os dois componentes principais retêm 89,79% (CP1 = 66,41% e CP2 = 23,38%) da variabilidade original, nas análises para a cultivar IAC 886 Runner.

A análise de componentes principais, referente ao tratamento da cultivar IAC Tatu ST com os diferentes isolados, não discriminou nenhum tratamento quanto ao acúmulo de nitrogênio (figura 2). Contudo, o isolado JAB2 demonstrou o mesmo padrão comparado ao observado para a cultivar IAC 886 Runner, nesta distribuição (Figuras 1 e 2). Mesmo o tratamento 15/6144 apresentando médias expressivas para os três itens, os valores não foram satisfatórios para ambos as cultivares. Os dois componentes principais retêm 79,35% (CP1 = 47,58% e CP2 = 31,77%) da variabilidade original, nas análises para a cultivar IAC Tatu ST.

MARCONDES, J. et al. Efetividade na fixação biológica do nitrogênio de bactérias nativas isoladas de plantas de amendoim.



**Figura 1.** Gráfico biplot dos tratamentos de inoculação da cultivar IAC 886 Runner com diferentes isolados JAB (I) e SEMIA 6144, caracterizando nodulação, acúmulo de nitrogênio foliar e massa seca da parte aérea da planta.



**Figura 2.** Gráfico biplot dos tratamentos de inoculação da cultivar IAC Tatu ST com diferentes isolados JAB (I) e SEMIA 6144, caracterizando nodulação, acúmulo de nitrogênio foliar e massa seca da parte aérea da planta.

Os resultados indicaram ainda uma inclinação dos isolado de *Rhizobium* e da SEMIA 6144 de *Bradyrhizobium* em relação ao incremento de massa seca e número de nódulos. O isolado JAB2, nesta distribuição, foi aquele que se posicionou de forma mais adequada e positiva quanto aos três parâmetros analisados. Por outro lado, os tratamentos que envolveram os demais isolados de *Burkholderia*, em combinação com SEMIA 6144, apresentaram uma distribuição tendenciosa em relação ao parâmetro de acúmulo de nitrogênio (Figuras 1 e 2). O incremento no acúmulo de nitrogênio causado por estirpes de *Burkholderia* pode ser sugerido pela sua produção considerável de AIA (Tabela 3) que pode ter atuado como um fator positivo no desenvolvimento vegetal, em particular nas raízes, portanto na fixação do nitrogênio pelos rizóbios.

O isolado JAB15 apresentou a maior concentração de AIA entre todos os isolados, sendo seu valor maior até mesmo que a SEMIA 6144 (tabela 3). Verificou-se também que praticamente todos isolados nativos, deste estudo, apresentam valores de produção de AIA que ficaram acima do Padrão tipo SEMIA 6144, recomendado pelo Ministério da Agricultura. Zakharova et al. (1999) apontaram que 80% das bactérias isoladas de rizosfera de amendoim são capazes de produzir AIA; enquanto que no presente trabalho 100% dos isolados foram produtores.

Estudos têm mostrado que bactérias em vários gêneros, tais como, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Streptomyces* e *Pseudomonas* induzem a formação de raiz e, adicionalmente, rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) são capazes de exercer um efeito benéfico sobre o crescimento vegetal, através do incremento no comprimento e massa radicular (Cello et al, 1997; Tilak et al., 2006; Kaymac et al., 2008). A formação e incremento de raízes em resposta a inoculação com RPCP pode envolver múltiplos mecanismo, entre eles a produção de reguladores de crescimento vegetal (ARSHAD e FRANKENBERGER, 1998).

**Tabela 3.** Produção de AIA pelos isolados JAB de amendoimzeiro.

Amostras	D.O. 0,8 cel/ml	AIA µg/mL
JAB1	$1,3 \times 10^9$	0,89
JAB2	$3 \times 10^8$	1,38
JAB3	$1,2 \times 10^8$	1,0
JAB4	$2 \times 10^8$	3,0
JAB5	$3 \times 10^8$	3,7
JAB6	$4 \times 10^8$	4,0
JAB7	$1,8 \times 10^8$	1,2
JAB8	$1,9 \times 10^8$	0,7
JAB11	$3 \times 10^8$	2,9
JAB12	$2 \times 10^8$	2,8
JAB13	$3 \times 10^8$	2,6
JAB14	$1 \times 10^8$	0,17
JAB15	$6 \times 10^8$	7,9
SEMIA 6144	$3 \times 10^8$	0,7

Esses resultados sugerem continuidade na busca de novos isolados, para novos tratamentos que contenham efetividade na fixação de nitrogênio em diferentes tipos de cultivares de amendoim e integração ao programa de melhoramento do amendoim.

### Conclusões

1. Os novos isolados JAB exibiram diferentes respostas quando inoculados em diferentes cultivares.
2. A cultivar IAC 886 Runner apresentou melhor interação planta-microrganismo e microrganismo-microrganismo, mostrando que o genótipo do amendoim pode interferir na eficiência simbiótica de isolados nativos, mesmo em associação com a estirpe recomendada SEMIA 6144.
3. Comparado com a estirpe padrão SEMIA 6144 isoladamente, os tratamentos JAB2 e JAB15/6144 apresentaram melhor adaptação a ambas as cultivares e, portanto, são os recomendados para teste em campo.

### Agradecimentos

À FAPESP pelo auxílio financeiro e à Capes pela bolsa concedida a D. C. Scaquitto.

### Referências

- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped Blast and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389–3402, 1997.
- ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, W.T. Plant growth regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. **Advance in Agronomy**, v.62, p.45-151, 1998.
- BATAGLIA, O.C.; FURLANI, A.M.C.; TEIXEIRA, J.P.F.; FURLANI, P.R.; GALLO, J.R. **Métodos de Análise Química de Plantas**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1983. 48p. (Boletim Técnico, 78).
- BOGINO, P.; BANCHIO, E.; RINAUDI, L.; CERIONI, G.; BONFIGLIO, C.; GIORDANO, W. Peanut (*Arachis hypogaea*) response to inoculation with Bradyrhizobium sp. in soils of Argentina. **Annals of Applied Biology**, v.148, p.207-212, 2006.
- BORGES, W.L.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G. Variabilidade genética entre acessos de amendoim. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.1151-1157, 2007.
- CHEN, W.M.; FARIA, S.M.; STRALIOTTO, R.; PITARD, R.M.; SIMÕES-ARAÚJO, J.L.; CHOU, J.H.; CHOU, Y.J.; BARRIOS, E.; PRESCOTT, A.R.; ELLIOTT, G.N.; SPRENT, J.I.; YOUNG, J.P.W.; JAMES, E.K. Proof that *Burkholderia* Strains Form Effective Symbioses with Legumes: a Study of Novel Mimosa-Nodulating Strains from South America. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.7461-7471, 2005.
- DATE, R.A.; NORRIS, D.O. *Rhizobium* screening of *Stylosanthes* species for effectiveness in nitrogen fixation. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.30, p.85-104, 1979.

DI CELLO, F.; BEVIVINO, A.; CHIARINI, L.; FANI, R.; PAFFETTI, D.; TABACCHIONI, S.; DALMASTRI, C. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.4485-4493, 1997.

EL AKHAL, M.R.; RINCÓN, A.; ARENAL, F.; LAGLAOUI, A.; EL MOURABIT, N.; PUEYO, J.J.; BARRIJAL, S. Diversity of rhizobia isolated from nodules of peanut (*Arachis hypogaea* L.) in Morocco. In: Dakora, F.D. (Ed.). **Biological Nitrogen Fixation: Towards Poverty Alleviation through Sustainable Agriculture**. Holanda: Springer Science, Business Media, p.157, 2008.

GORDON, D., ABAJIAN, C., GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v.8, p.195-202, 1998.

GORDON, S.A.; WEBER, R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v. 26(1), p.192-195, 1951.

HAFEEZ, F.Y.; NAEEM, F.I.; NAEEM, R.; ZAIDI, A.H.; MALIK, K.A. Symbiotic effectiveness and bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolated from agriculture soils in Faisalabad. **Environmental and Experimental Botany**, v.54, p.142-147, 2005.

HAIR, J.F.; ANDERSON, R.E.; TATHAM, R.L.; BLACK, W. **Análise Multivariada de dados**. 5 ed., Porto Alegre, 2005,

HASSAN, M.; WAFAA, M.A.; DESSOUKY, A. Performance of *Phaseolus* bean rhizobia in soils from the major production sites in the Nile Delta. **Comptes Rendus Biologies**, v.327, p.445-453, 2004.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; CHUEIRE, L.M.O.; PROBANZA, A.; GUTTIERREZ-MANERO, F.J.; MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.32, p.1515-1528, 2000.

HUNGRIA, M.; LOUREIRO, M.F.; MENDES, I.C.; CAMPO, R.J.; GRAHAM, P.H. Inoculant preparation, production and application. In: WERNER, D.; NEWTON, W.E. (Ed.). **Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment**. Londrina: Embrapa Soja, p.223-253, 2005.

IBAÑEZ, F.; TAURIAN, T.; ANGELINI, J.; TONELLI, M.L.; FABRA, A. Rhizobia phylogenetically related to common bean symbionts *Rhizobium giardinii* and *Rhizobium tropici* isolated from peanut nodules in Central Argentina. **Soil Biology and Biochemistry**, v.40, p.537-539, 2008.

INSTITUTO AGRONÔMICO. **O Agrônomo**. Campinas: Centro APTA de Grãos e Fibras, 2003 [p.26-29].

KAYMAK, H.C.; YARALI, F.; GUVENC, I.; FIGEN DONMEZ, M. The effect of inoculation with plant growth rhizobacteria (PGPR) on root formation of mint (*Mentha piperita* L.) cuttings. **African Journal of Biotechnology**, v.7, p.4479-4483, 2008.

MARCONDES, J. et al. Efetividade na fixação biológica do nitrogênio de bactérias nativas isoladas de plantas de amendoim.

KUSKE, C.R.; BARNS, S.M.; BUSCH, J.D. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.3614–3621, 1997.

LANIER, J.E.; JORDAN, D.L.; SPEARS, J.F.; WELLS, R.; JOHNSON, P.D. Peanut Response to Inoculation and Nitrogen Fertilizer. **Agronomical Journal**, v.97, p.79-84, 2005.

MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; DÍAZ, R.; PENÑ-CABRIALES, J.J.; SANTOS, P.E.; DUNN, M.F.; CABALLERO-MELLADO, J. Multichromosomal Genome Structure and Confirmation of Diazotrophy in Novel Plant-Associated *Burkholderia* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.4574-4579, 2008.

NORRIS, D.O. Some concepts and methods in sub-tropical pasture research. In: **Common Wealth Bureau of Pasture and Field Crops**, London, 1964 (Bulletin, 47).

PERIN, L.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; CASTRO-GONZÁLEZ, R.; SANTOS, P.E.; CABELLOS-AVELAR, T.; GUEDES, H.V.; REIS, V.M.; CABALLERO-MELLADO, J. Diazotrophic *Burkholderia* Species Associated with Field-Grown Maize and Sugarcane. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.3103-3110, 2006.

RAPOSEIRAS, R.; MARRIEL, I.E.; MUZZI, M.R.S.; PAIVA, E.; PEREIRA FILHO, I.A.; CARVALHAIS, L.C.; PASSOS, R.V.M.; PINTO, P.P.; SÁ, N.M.H. *Rhizobium* strains competitiveness on bean nodulation in Cerrado soils. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.439-447, 2006.

SANTOS, C.E.R.S. **Diversidade de rizóbio nativo da região nordeste do Brasil capaz de nodular amendoim (*Arachis hypogaea*), *Stylosanthes* e *Aeschynomene***. 2001. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

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 N<sub>2</sub> em amendoim (*Arachis hypogaea*). **Acta Science Agronomy**, v.27, p.301-307, 2005.

STATISTICA. Data analysis software system. Version 8. **StatSoft Inc.**, ([www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)), 2007.

THIES, J.E.; BOHLOOL, B.B.; SINGLETON, P.W. Subgroups of de Cowpea miscellany: symbiotic specificity within *Bradyrhizobium* spp. for *Vigna unguiculata*, *Phaseolus lunatus*, *Arachis hypogaea*, and *Macroptilium atropurpureum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.1540-1545, 1991.

TILAK, K.V.B.R.; RANGANAYAKI, N.; MANOHARACHARI, C. Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and *Rhizobium* on nodulation and nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan*). **European Journal of Soil Science**, v.57, p.67-71, 2006.

VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W.M.; DE VOS, P.; WILLEMS, A. *Burkholderia tuberum* sp. nov. & *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, v.25, p.507-512, 2002.

MARCONDES, J. et al. Efetividade na fixação biológica do nitrogênio de bactérias nativas isoladas de plantas de amendoim.

VINCENT, G.M. **Manual of the practical study of root nodule bacteria.** (International Biology Program, 15), Oxford: Blackwell, p.163, 1970.

YANG, J.K.; ZHOU, J.C. Diversity, phylogeny and host specificity of soybean and peanut bradyrhizobia. **Biology and Fertility of Soils**, v.44, p.843-851, 2008.

YANG, X.D.; WANG, C.T.; CHEN, D.X.; ZHANG, J.C.; XU, J.Z.; LIU, G.Z. Simple sequence repeats in cultivated peanut as reveals by GenBank inquiry. **Journal of Peanut Science**, v.34, p.14-16, 2005.

ZAKHAROVA, E.A.; SHCHERBAKOV, A.A.; BRUDNIK, V.V.; SRIPKO, N.G.; BULKHIN, N.S.; IGNATOV, V.V. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense* insights from quantum chemistry. **European Journal of Biochemistry**, v.259, p.572-576, 1999.