

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS AUTÓCTONES
DE NÓDULOS DE *Arachis hypogaea* L.

Denilson César Scaquitto

Mestre

JABOTICABAL - SP - BRASIL

2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS AUTÓCTONES
DE NÓDULOS DE *Arachis hypogaea* L.

Mestre: Denilson César Scaquitto

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal -UNESP, para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia, área de concentração em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Março de 2009

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

DENILSON CÉSAR SCAQUITTO - nascido em 07 de março de 1977, em Jaboticabal, Brasil, é Biomédico formado pelo “Centro de Excelência Barão de Mauá” em janeiro de 2000, na qual também obteve o título de Especialista em Citologia Oncótica. Em 2004 tornou-se Mestre pelo curso de Mestrado em Microbiologia e em março de 2005, iniciou o curso de doutorado em Microbiologia (área de concentração Microbiologia Agropecuária) na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

Aos meus pais

**José Carlos Scaquitto e Miriam Marucci Scaquitto,
Que me ensinaram o sentido da vida, amor e compreensão,
Pelo esforço e trabalho que possibilitaram meu estudo,
Pela educação, lições de vida e moral.**

Aos meus amigos e Irmãos

**Aline F. Scaquitto
À família Marucci e Scaquitto.**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, com quem muito aprendi, pela orientação, pela amizade e pela oportunidade de crescimento profissional.

A Profa. Dra. Lúcia Maria Carareto Alves pela competência profissional e genialidade, agradeço pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Ao João Carlos Campanharo pelo auxílio técnico e atenção dispensada.

Aos professores Dr. Antônio Carlos Monteiro, Dra. Márcia Ap. Justino Mutton, Dr. Antônio Sergio Ferraudó e o Dr. Sergio Valeri, pelas sugestões no Exame de Qualificação. Aos professores Dr. Miguel Freitas, Haroldo Alves Pereira Junior, Jackson Antonio Marcondes de Souza e Cristina Lacerda Soares Petrarolha Silva, sugestões na defesa de tese, as quais foram de grande valia neste trabalho.

Aos meus amigos, que são grandes irmãos Irlan L. de Abreu, Luciano T. Kishi, Rodrigo M. Pereira, Érico L. Silveira, Eliamar A. N. Pedrinho e Maria Cândida Bento que me ajudaram e apoiaram nesta etapa da minha vida.

A todos do setor de Pós-Graduação, Karina, Márcia, Isabel, Maria do Carmo, pelo carinho e auxílio em todos os momentos.

A todos do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP), Silvana P. Val do Moraes, Maurício Cantão, Tereza Castellane, Viviane, Ester Wickert, Taís (Lesada), Mariana (Oncinha), Douglas Paixão, Carla, Wellington, Ana Rita Raimundo, Elisangela, Rosangela Inui (Rosinha) e Edvan, pelo auxílio e amizade.

Aos amigos de iniciação científica, Érica e Eduardo pelo interesse e auxílio.

Aos **meus grandes amigos**, que direta ou indiretamente, me ajudaram neste trabalho e com os quais tive o privilégio de conviver, trocando experiências acadêmico-profissionais e principalmente, usufruindo o verdadeiro sentido da palavra amizade.

A Capes pela concessão da bolsa de estudo.

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
I. INTRODUÇÃO	12
II. REVISÃO DE LITERATURA	15
II.1. A Cultura do Amendoim (<i>Arachis hypogaea</i> L.).....	15
II.1.1. Cultivar Runner IAC 886 (Grupo Rasteiro).....	17
II.1. 2. Cultivar IAC Tatu-ST (Grupo Ereto).....	20
II.2 Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN).....	21
II.3 Inoculação de Sementes na cultura do amendoim.....	24
II. 4. Utilização da região 16S rDNA na caracterização dos isolados.....	26
II. 5. Hormônios Vegetais.....	28
II. 6. Emprego da Isoenzima α -Esterase na diferenciação dos isolados.....	29
II. 7. Bactérias Produtoras de Fitohormônios.....	30
III. MATERIAL E MÉTODOS	31
III. 1. Localização do Experimento.....	31
III. 2. Isolamento das Bactérias.....	32

III. 3. Seleção e estoque das colônias puras.....	33
III. 4. Extração do DNA.....	33
III. 5. Amplificação do gene 16S RNA.....	35
III. 6. Seqüenciamento do amplicon 16S rDNA.....	36
III. 7. Análise das seqüências.....	37
III. 8. Morfologia e Tempo de Crescimento.....	38
III. 9. Resistência Intrínseca a Antibióticos.....	39
III. 10. Avaliação da atividade da isoenzima α -esterase nos isolados.....	40
III. 11. Avaliação da produção do ácido-indol-acético (AIA) pelos isolados...41	
III. 12. Avaliação dos efeitos da inoculação sobre o desempenho de plantas de amendoim.....	42
III. 13. Complementação dos dados com utilização da análise estatística de Componentes Principais (ECP).....	45
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
IV.1. Nódulos de Plantas em campo de cultivo.....	46
IV. 2. Extração de DNA e PCR do gene 16S rRNA.....	47
IV. 3 Morfologia de Colônias.....	50

IV. 4 Isoenzima α -esterase.....	52
IV. 5. Antibiograma.....	55
IV. 6. Produção do ácido-indol-acético (AIA).....	59
IV. 7. Número de Nódulos, Massa de Matéria Seca da Parte Aérea e Fixação de N ₂	61
IV. 8. Análise Estatística dos Tratamentos por Componentes Principais (PCA).....	68
V. CONCLUSÃO.....	71
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
VII. Apêndice A.....	89
VIII. Apêndice B.....	90

ABREVIATURAS

BOD – Biologic Oxigen Demand (Demanda biológica de oxigenio)

DNA – Ácido desoxirribonucléico

RNA – Ácido ribonucleíco

dNTP – 2 deoxinucleotides 5 trifosfatos

EDTA – ácido Etilenediaminetetracético

Tris – Hidroximetil aminometano

SDS – Sódio dodecil sulfato

RNAase – Ribonuclease A

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (“Polimerase Chain Reaction”)

ITS – Espaço Intergênico Transcrito (“Intergenic Transcribed Spacer”)

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS AUTÓCTONES DE NÓDULOS DE *ARACHIS HYPOGAEA* L.

RESUMO - O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) faz parte da família *Fabaceae*, que é capaz de associar-se com bactérias do gênero *Rhizobium*. Em solos onde o amendoim é cultivado tem-se a presença de uma população autóctone desta bactéria. A necessidade de inoculação das sementes de amendoim em solos contendo população autóctone tem sido sempre discutida. Com o objetivo de avaliar o efeito da inoculação de sementes de amendoim cultivado em vasos contendo vermiculita e a interação existente entre microrganismo-planta e microrganismo-microrganismo, foi realizado um experimento sob cultivo em casa de vegetação, em vasos de 0,5 L, com o cultivar IAC 886 e a IAC Tatu-ST, com três repetições. Os tratamentos foram constituídos de aplicação dos isolados individualmente e combinados com a estirpe padrão tipo SEMIA 6144, *Bradyrhizobium* sp., recomendada pelo Ministério da Agricultura e sem aplicação de inoculante, sem aplicação de qualquer isolado. Houve interação entre o tipo de plantio e a aplicação de inoculante para todas as variáveis analisadas. Para a massa de matéria seca da parte aérea houve uma diferença significativa. O variável número de nódulos e o teor de Nitrogênio também apresentam diferenças quanto à aplicação, sendo que, em todos os casos foram superiores ao controle sem aplicação com os isolados nativos.

Palavras-chave: Amendoim, Burkholderia, Inoculante, Nodulação, Rhizobium.

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF INDIGENOUS BACTERIAL OF
NODULES OF *ARACHIS HYPOGAEA* L.**

SUMMARY - Peanut (*Arachis hypogaea* L.) belonging to *Fabacea* family, is able of associating with bacteria from *Rhizobium* genus. In soils where peanut is grown, there is usually an autochthonous population of these bacterial, however, the need of inoculation in peanut seeds in soils containing autochthonous population has always been controversial subject. With the objective of evaluating the effects of peanut seeds inoculation cultivated in vases contend vermiculite and to verifying the interaction with plant regulators, an experiment was carried out in greenhouse conditions, with three repetitions containing Runner IAC 886 e IAC Tatu-ST cultivar. The treatments were constituted of application of the individually isolated and combined with the lineage standard *Bradyrhizobium* sp., SEMIA 6144, recommended by Bureau of the Agriculture. An interaction was observed between the type of plantation and the application of inoculants for all analysed variable. For the mass of dry matter of the aerial part it had a significant difference. The variable numbers of nodules and rate of Nitrogen also present differences related to the treatments, being that, in all the cases was greater to the control without application of the isolated natives.

Key Words: peanut, Inoculant, Burkholderia, Nodulation, Rhizobium.

I. INTRODUÇÃO

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma cultura que apresenta versatilidade nutricional e industrial, faz parte do grupo de plantas da família *Fabaceae*, que é capaz de associar-se com bactérias do gênero *Rhizobium*. Nesta associação simbiótica, formam-se nódulos nas raízes da planta. Nestes nódulos infectados pelas bactérias, o N_2 é reduzido a NH_3 e transferido para a planta.

Nos solos onde o amendoim é cultivado, normalmente existe uma população autóctone de *Rhizobium* (GIARDINI, 1980), porém tem-se pouca informação da contribuição da nodulação espontânea dessa leguminosa, quanto ao suprimento de nitrogênio fixado pela planta. Isto se deve ao fato de que, o melhoramento genético do amendoim e as pesquisas com rizóbios, ficaram estacionadas por aproximadamente 10 anos (SANTOS et al., 2005).

A inoculação de bactérias do grupo rizóbio é uma prática com reconhecidos benefícios agronômicos em áreas onde a espécie vegetal é cultivada pela primeira vez (BROCKWELL et al., 1988; HUME, 1992) ou em solos onde o número de rizóbios é insuficiente para permitir uma nodulação eficiente da planta (SINGLETON et al., 1992; MARTINS et al., 2003). A especificidade simbiótica e a competitividade das populações de rizóbios nativos também influenciam as respostas da inoculação (MARTINS et al., 2003, XAVIER et al, 2006);

A intensidade da fixação do nitrogênio nas raízes de plantas influencia a produtividade e a qualidade das sementes das leguminosas. Para que bactérias e plantas compatíveis iniciem a nodulação, é necessário que haja um adequado suprimento de energia na planta para que se favoreça o desenvolvimento, crescimento e sustentação do nódulo (OSMAN et al., 1983).

Ainda que a necessidade de inoculação das sementes de amendoim em solos contendo população autóctone tenha sido sempre matéria de controvérsia, o Instituto Agrônomo de Campinas recomenda essa prática (QUAGGIO e GODOY, 1997). A inoculação com estirpes selecionadas, é capaz de aumentar a efetividade da simbiose e aumentar o rendimento do amendoim (HUANG, 1987, 1988).

O conhecimento da variabilidade de resposta de diferentes sementes de amendoim quanto à capacidade de nodulação por estirpes nativas de rizóbios, pode fornecer informações sobre o desempenho dos parâmetros de Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN) e auxiliar futuros programas de inoculação de estirpes e melhoramento vegetal. Esta prática torna-se especialmente importante pela modulação da nodulação por intensas trocas de sinais moleculares dependentes do genótipo da planta e da bactéria (SCHULTZE et al., 1994).

Considerando-se a demanda da planta por nitrogênio, o mercado brasileiro para amendoim e derivados, e a área plantada, estes programas de inoculação podem trazer contribuições significativas, em termos de geração de renda e riqueza no país.

A utilização de novas técnicas culturais, efeitos de reguladores e principalmente a busca de novos isolados, visando o aumento da produtividade, tem conduzido os estudos dos vegetais na produção do amendoineiro. Esses reguladores de planta são combinações orgânicas, as quais, em quantias pequenas, modificam de alguma maneira um determinado processo fisiológico da planta e raramente agem de maneira individual, sendo necessária a combinação de dois ou mais agentes para produzir efeito fisiológico (LEITE et al., 2003).

Até pouco tempo acreditava-se que os hormônios conhecidos eram as auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico, mas atualmente já existem outros grupos conhecidos, fenólicos, flavonóides, poliaminas e brassinoesteróides.

Os reguladores vegetais podem promover o alongamento das células, resultando em um sistema radicular mais profundo e ramificado que, conseqüentemente, permite um aproveitamento maior do solo para absorção dos nutrientes e água. Eles podem ser aplicados diretamente nas plantas, provocando alterações nos processos vitais e estruturais, com o objetivo de aumentos na produção. Quando aplicados nas sementes ou nas folhas, podem interferir em processos como germinação, enraizamento, floração, frutificação e senescência.

O presente estudo tem por objetivo geral a caracterização morfológica, bioquímica e molecular de microrganismos nativos, obtidos de amendoineiros, em uma área do Estado de São Paulo e verificação dos efeitos da inoculação em dois cultivares, IAC 886 e IAC Tatu-ST, em casa de vegetação.

II. REVISÃO DE LITERATURA

II.1. A Cultura do Amendoim (*Arachis hypogaea* L.)

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é bastante cultivado na Ásia, África, América do Norte e América do Sul, de onde é originário. Espécies do gênero *Arachis* ocorrem em regiões tropicais e subtropicais, mas foram introduzidas em muitas outras áreas (SANTOS, 2001).

Na América do Sul, principalmente nas regiões de clima tropical, ocorrem de nove a 19 espécies herbáceas desse gênero. Várias espécies de *Arachis* são capazes de formar nódulos radiculares com rizóbios; entre elas destacam-se *A. hypogaea*, *A. glabata*, *A. marginata*, *A. villosa* e *A. villosulicarpa*. Entretanto, *A. hypogaea*, o amendoim, é a única espécie cultivada, não conhecida no seu estágio selvagem.

Acredita-se que o Brasil seja seu centro de origem e também de distribuição (CORRÊA, 1926; ALLEN, 1981). LEPPIK (1977) encontrou 15 espécies no Brasil, Paraguai, Uruguai e norte da Argentina.

O amendoim já era cultivado pelos índios brasileiros e peruanos há 950 anos a.C. Sua disseminação pelo resto do mundo é atribuída aos navegantes portugueses e espanhóis durante os séculos XVI e XVII. Possui múltipla importância, onde suas folhas

podem ser usadas como forragem para alimentação animal ou ser adicionada ao solo como adubo verde.

Suas flores são ricas em néctar muito apreciado pelas abelhas. Suas sementes são utilizadas na alimentação humana *in natura*, cozidas ou torradas. Possui alta quantidade de calorias e de nutrientes como P, K, S, Ca, Cu, Fe, além das vitaminas B1, B2, e E. Um único grão de amendoim possui aproximadamente 5,8 calorias (ALLEN, 1981).

Na América do Sul, o amendoim apresenta um importante papel econômico por fornecer vários produtos alimentícios e óleo vegetal. No Brasil, o produto do amendoim mais importante para a exportação é o óleo usado na alimentação e na indústria. Quando refinado com alto grau de pureza, é usado para fins farmacêuticos, como veículo de emulsão de produtos injetáveis (URTZ e RTZ; ELKAN, 1996).

O óleo não refinado serve de combustível de lâmpadas de mineração, sendo a França o principal importador desse produto. Quando neutro, o óleo é usado como lubrificante. É também utilizado como matéria prima para indústria de sabão e cosméticos. O subproduto da extração do óleo, a torta, é usado na alimentação animal (ROLIM, 1981).

Segundo dados da FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação) a cultura do amendoim vem se destacando cada vez mais no cenário da agricultura brasileira, com uma área plantada na safra 2007/2008 de 103 mil hectares, com uma produção de 287 mil toneladas.

O estado de São Paulo, maior produtor nacional do grão em 2008, de acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2008), respondeu por cerca de 80% da produção nacional e 70% do total da área plantada.

II. 1. 1. Cultivar Runner IAC 886 (Grupo Rasteiro)

Segundo GODOY et al. (2003), o cultivar Runner IAC 886 descende do cultivar multilinha Florunner, de origem americana. As sementes foram cedidas em 1970 pelo programa de melhoramento da Flórida (EUA) e introduzidas na coleção de germoplasma do IAC com o número 886.

É uma variedade rasteira e têm um ciclo de 125 a 130 dias, cor clara, tamanho médio e rendimento de 18 a 20 kg de grãos por saca de 25 kg de amendoim em casca. Sua colheita pode ser totalmente mecanizada, por arrancamento e enleiramento.

A população original assim obtida passou por 18 gerações de cultivo e seleção, resultando em material genético uniforme e melhor adaptado às condições de clima e solo das regiões produtoras paulistas, quando comparado aos cultivares do mesmo tipo (genericamente conhecidos como “runners”).

O destaque das sementes “Runners” está na sua consagração no mercado internacional, por ser semelhante aos grãos de outros países exportadores, como Argentina, Estados Unidos e China. Com maior tamanho e uniformidade de grãos,

esses cultivares são mais atraentes para a indústria, o que resulta em ampliação dos benefícios econômicos, porque, têm despeliculação mais fácil e no processo industrial os grãos menores são descartados.

O “Runner” tem alto desempenho e é recomendado para áreas com boa distribuição de chuvas e para lavouras tecnificadas. Também requer solos bem preparados e adubados. Em boas condições, sua produtividade pode ultrapassar 6.500 kg/hectare. É uma boa alternativa para a rotação com cana.

O cultivar “Runner” IAC 886 de variedade botânica do tipo *hypogaea*, subespécie *hypogaea*, tipo Virgínia é de crescimento rasteiro, as plantas apresentam folhagem de tonalidade ligeiramente escura e haste principal destacada. Nas condições do Estado de São Paulo, seu ciclo, do plantio à maturação, é, em média, de 130 dias. A fase de florescimento e a emissão de vagens são rápidas e o desenvolvimento vegetativo praticamente cessa em 90-100 dias (GODOY et al., 2003).

O cultivar IAC 886 é suscetível às manchas castanha (*Cercospora arachidicola*) e preta (*Cercosporidium personatum*) e à ferrugem (*Puccinia arachidis*); comparativamente aos cultivares eretos precoces conhecidos e apresenta moderada resistência à mancha-barrenta (*Phoma arachidicola*) e moderada suscetibilidade à verrugose (*Sphaceloma arachidis*).

As vagens são uniformes, apresentam baixa reticulação e produzem duas sementes com película clara, de tonalidade rosada. Em condições normais de cultivo, sua “renda” varia entre 18 e 20 kg de grãos/25 kg em casca. As sementes de ‘IAC 886’ apresentam dormência na época da maturação, ou seja, não produzem brotações

precoces, assegurando melhor qualidade à colheita. O porte de planta e o ciclo mais longo são características típicas de cultivares do grupo rasteiro e trazem vantagens ao produtor nos sistemas mais tecnificados.

Plantas rasteiras possuem arquitetura mais adequada para a colheita totalmente mecanizada. Para o Estado de São Paulo e regiões de clima semelhante, o ciclo ao redor de 130 dias propicia que se evite a colheita no período mais chuvoso (GODOY et al., 2003).

Além do alto potencial produtivo, 'IAC 886' produz grãos que atendem integralmente aos quesitos para o padrão comercial "runner", o mais difundido no mercado internacional, nos aspectos físicos (tamanho, uniformidade, cor da película) e químicos (relação de ácidos graxos oléico / linoléico entre 1,6 e 1,8, em média).

O cultivar 'Runner IAC 886' é recomendado para cultivo na época de verão (para o Estado de São Paulo) em linhas espaçadas de 90 cm e densidade de 10 a 12 plantas/metro. Esse cultivar é indicada para sistemas tecnificados de produção. Verifica-se seu melhor desempenho produtivo em áreas de cultivo medianamente extensas e que disponham de adequada infra-estrutura permitindo eficiência máxima nas operações, tratos culturais e colheita (GODOY et al., 2003).

II. 1. 2. Cultivar IAC Tatu-ST (Grupo Ereto)

O 'Tatu', um antigo cultivar introduzido nas regiões produtoras há mais de 50 anos, é a que predomina ainda hoje, pela boa aceitação dos grãos no mercado consumidor e por sua adaptabilidade a diversas condições de cultivo (GODOY, 2000).

Para contribuir com o mercado do produto, o Instituto Agrônômico (IAC) disponibiliza para os produtores, sementes melhoradas do cultivar Tatu, identificado como IAC Tatu-ST, com variedade botânica do tipo *hypogaea* subespécie *fastigiata*, Valência e ereto.

As sementes foram melhoradas no IAC por meio de trabalho de manutenção da pureza genética. A sigla ST, adotada para diferenciá-lo do Tatu comum, indica "seleção por tamanho" e refere-se ao trabalho desenvolvido para obtenção das sementes genéticas, utilizadas para a produção de vagens mais granadas e de tamanho médio de grãos maior, sem alteração das demais características do cultivar.

Embora com produtividade significativamente superior, o IAC Tatu-ST possui características semelhantes às do cultivar comum, em relação à estrutura das plantas, precocidade (90 a 100 dias do ciclo), aparência e cor da pele das sementes. O tamanho das vagens, porém, tende a apresentar diâmetro ligeiramente superior. A principal vantagem, contudo, está na melhor granação, capaz de produzir quase 50 % dos grãos de tamanho superior.

Como vantagem adicional pode-se esperar um acréscimo de produtividade, que varia entre 4 e 9 % com as sementes melhoradas no Instituto Agrônomo. O crescimento mais vigoroso e uniforme das plantas contribui para o melhor estabelecimento da cultura, principalmente nos primeiros 60 dias e após o plantio, sendo assim, outro diferencial do IAC Tatu-ST.

O cultivar IAC Tatu-ST é precoce e, por conta disso, sujeito a ser colhido em época de umidade alta, quando plantado logo no início da estação das águas. Este é o tipo de plantio mais comum nas regiões produtoras de amendoim do Estado de São Paulo. O retardamento da época de plantio, embora possa significar ligeiro decréscimo da produtividade, pode significar a garantia da obtenção de grãos de melhor qualidade.

A semeadura efetuada entre a segunda quinzena do mês de novembro e os primeiros quinze dias de dezembro possibilita a colheita entre o final de fevereiro e o início de março, reduzindo os riscos de perda (GODOY, 2000).

II. 2. Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN)

A fixação biológica de N_2 (FBN) é o processo biológico mais importante da vida no planeta, pois é por ele que o grande reservatório de N_2 , que constitui 80% dos gases da atmosfera, pode se tornar disponível em formas assimiláveis para o reino vegetal e animal (SANTOS et al., 2005).

Os adubos nitrogenados representam outra importante fonte de N em formas assimiláveis para as plantas. Eles podem ser obtidos de reservas naturais não renováveis, como o salitre do Chile, ou pela fixação industrial do N₂ atmosférico; por exemplo, pelo processo Haber-Bosch.

Na síntese química dos fertilizantes nitrogenados são empregadas altas temperaturas e pressões, obtidas a partir de derivados de petróleo, para quebrar a tripla ligação do N₂, o que os torna os adubos mais caros do mercado (SANTOS et al., 2005).

Para a síntese de uma tonelada de amônia são gastos seis barris de petróleo e os adubos nitrogenados aplicados ao solo não são completamente absorvidos pela cultura. A desertificação, nitrificação e lixiviação são processos que provocam não só sua perda, mas também podem causar danos ecológicos como a eutrofização e a contaminação de mananciais (SIQUEIRA et al., 1994).

Além das vantagens ecológicas, um exemplo da economia conseguida por esse processo biológico pode ser visualizado na cultura da soja. Muitos estudos foram conduzidos no Brasil desde a introdução desta cultura, tornando a simbiose bastante eficiente e resultando em produtividades de 2500 kg/ha (HUNGRIA et al., 1994).

A soja absorve cerca de 200 kg ha⁻¹ de N, sendo que de 67% a 75% são alocados nas sementes. Devido à baixa eficiência de utilização dos fertilizantes nitrogenados, normalmente inferior a 50%, pois há perdas por lixiviação, nitrificação e desnitrificação, seriam necessários 300 a 400 kg/ha de N para se obter a já referida

produtividade; portanto, um custo certamente proibitivo para os agricultores (HUNGRIA et al., 1994).

Nos Estados Unidos, TAUER (1989), estimou que os benefícios econômicos obtidos com avanços tecnológicos na FBN em cinco cenários futuros poderiam representar benefícios anuais de U\$ 1.067 milhões a U\$ 4.484 milhões.

Em outubro de 2008, o uso de 50 kg de N/hectare, na forma de sulfato de amônio, na soja cultivada no Brasil resultaria em um custo adicional de cerca de R\$ 389,00/hectare, totalizando 8,5 bilhões de reais nos 22 milhões de hectares cultivados com soja (EMBRAPA CERRADOS, 2008).

Esses resultados reforçam, mais uma vez, os benefícios econômicos que resultam da substituição dos fertilizantes nitrogenados pela inoculação com rizóbio e indicam que não existe razão para a utilização desses insumos em nenhum estágio do cultivo, seja da soja, amendoim ou qualquer outra cultura que possa utilizar deste tratamento (EMBRAPA CERRADOS, 2008).

A FBN consiste na redução do N_2 molecular para NH_3 através da nitrogenase, enzima de ocorrência restrita a algumas espécies do reino Protista e com representantes nos grupos das bactérias (aeróbias, anaeróbias e facultativas), actinomicetos (*Frankia* spp.) e cianobactérias. A FBN é um processo regulado pelas necessidades do ambiente e das espécies fixadoras, ou seja, não há fixação de N_2 em excesso (SIQUEIRA et al., 1994).

A energia consumida durante o processo de fixação do N_2 , na forma de ATP, provém da fotossíntese da planta hospedeira. Estima-se que cerca de 30% dos fotossintatos da planta são utilizados na manutenção do processo (NEVES e HUNGRIA 1987; HUNGRIA et al., 1994), representando até 5% da energia da fotossíntese do planeta consumidos no processo de FBN pelas leguminosas.

Microorganismos fixadores de N_2 (MFN) estão presentes nos mais diversos tipos de habitats e ecossistemas terrestres e aquáticos, e alguns deles ainda estabelecem simbiose com certas espécies de fungos, insetos e plantas. De todas as simbioses, as associações de rizóbio com espécies da família Fabaceae são as mais importantes em termos ecológicos e econômicos (HUNGRIA et al., 1994).

II. 3. Inoculação de Sementes na cultura do amendoim

Os inoculantes turfosos, líquidos ou outras formulações devem ter comprovada a eficiência agrônômica, conforme normas oficiais da RELARE, aprovadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA, (2008).

A quantidade mínima de inoculante a ser utilizada deve fornecer 600.000 células/sementes. Resultados de pesquisa indicam benefícios crescentes à nodulação e à fixação biológica do nitrogênio pela utilização de populações de até 1.200.000 células/sementes. A base de cálculo para o número de bactérias/semente é a

concentração registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA, (2008) e que consta da embalagem.

O método tradicional de adubação pode ser substituído pela aplicação do inoculante nas sementes ou por aspersão no sulco, por ocasião da semeadura, em solos com ou sem população estabelecida. Esse procedimento pode ser adotado desde que a dose de inoculante seja, no mínimo, seis vezes superior à dose indicada para as sementes (HUNGRIA, 2000).

A utilização desse método tem a vantagem de reduzir os efeitos tóxicos do tratamento de sementes com fungicidas e da aplicação de micronutrientes nas sementes sobre a bactéria., onde a maioria das combinações de fungicidas indicados para o tratamento de sementes reduz a nodulação e a FBN (HUNGRIA, 2000).

O objetivo da inoculação de sementes é estabelecer uma população vigorosa de bactérias em torno das raízes da planta e com isto assegurar que os nódulos sejam formados por inoculantes de eficiência conhecida e que no caso do amendoim, a estirpe tipo SEMIA 6144 é a mais adequada, de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

II. 4. Utilização da região 16S rDNA na caracterização dos isolados

A maioria das novas tecnologias que estão sendo utilizadas no estudo da ecologia microbiana é baseada na filogenia molecular do RNA ribossomal (rRNA), particularmente o rRNA da menor subunidade (SSU ou 16S), uma aproximação para estudar a evolução microbiana e especificamente resolver seus problemas (RAPPÉ e GIOVANONNI, 2003).

O operon do DNA ribossomal, em bactérias, compreende três genes conservados funcionalmente e evolutivamente, sendo o gene da subunidade menor 16S (rRNA), seguido por um espaço, o gene da subunidade maior, 23S (rRNA), com um segundo espaço. Estes espaços entre os genes são as regiões espaçadoras (ITS – Espaço Transcrito Intergênico), nas quais, também podem estar presentes os genes tRNA (SHMIDT, 1994).

A utilização do gene 16S rRNA revolucionou o campo da ecologia microbiana, pois com seu uso, foi possível investigar e determinar posições filogenéticas de comunidades bacterianas de meio ambiente (LUDWIG et al., 1997; KUSKE et al., 1997; HENTSCHEL et al., 2002).

Um grande número de metodologias moleculares, a partir da década de 80, foi sendo desenvolvido para analisar a diversidade microbiana (AMANN et al., 1995), e através dos genes 16S rRNA, 23S rRNA, 5S rRNA e Espaço Transcrito Interno (ITS), tornou-se possível investigar e determinar posições filogenéticas de comunidades

bacterianas (LUDWIG et al., 1997; RANJARD et al., 2001, PEREIRA et al., 2006, SILVEIRA et al., 2006) e o entendimento, da ecologia microbiana em especial novas linhagens (HOLMES et al., 2000).

A extração de DNA, procedimento este que envolve a quebra ou digestão de paredes e membranas celulares possibilitando a liberação do conteúdo genético da célula, em geral era demorado e necessitava de grandes quantidades de amostras (VALADARES-INGLIS e MELO, 1998).

BORNEMAN (1996), utilizando o “kit FastDNA[®] SPIN Kit for Soil”, obteve eficiência na extração dos fragmentos de DNA de diversos organismos, reduzindo o tempo de extração em 5 vezes em relação aos protocolos comumente praticados.

Através da amplificação da região 16S rRNA com oligonucleotídeos pA e pC5B, proposto por KUSKE et al (1997), esses métodos permitiram uma análise molecular do genoma parcial com alta resolução na classificação bacteriana, principalmente, na diferenciação em nível de filos, gêneros e espécies, sendo estes, os marcadores mais comumente utilizados para analisar as mudanças das comunidades microbianas no ambiente (KENT e TRIPLET, 2002).

Combinações de técnicas moleculares podem representar um passo fundamental para uma correta descrição das análises das comunidades microbianas (AMANN e LUDWIG, 2000). Estes estudos baseiam-se, principalmente, na comparação de regiões conservadas dos genes 16S e 18S rRNA e hipervariáveis dos genes do espaço transcrito intergênico (ITS).

II. 5. Hormônios Vegetais

Os hormônios vegetais são substâncias orgânicas que em baixas concentrações influenciam nos processos fisiológicos, tais como, crescimento, diferenciação e desenvolvimento, entretanto outros processos, como o movimento estomatal também pode ser afetado (DAVIES, 2004).

Até pouco tempo acreditava-se que o desenvolvimento vegetal era regulado por cinco tipos de hormônios (auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico). Entretanto, atualmente há fortes evidências indicando a existência de hormônios vegetais esteróides, os brassinoesteróides, que possuem uma ampla gama de efeitos morfológicos no desenvolvimento vegetal (TAIZ e ZEIGER, 2004).

O grupo hormonal das auxinas foi o primeiro a ser descoberto. É sintetizado em ápices de caule, ramos e raízes e transportado para outras regiões da planta, sendo caracterizado, principalmente, pela capacidade de estimular o alongamento celular, mas também responsável pela formação inicial das raízes, diferenciação vascular, tropismo, desenvolvimento de gemas axilares, flores e frutos (HOPKINS, 1999). A principal auxina endógena encontrada nas plantas é o AIA (ácido 3-indol acético), sendo transportado de célula a célula até chegar às raízes das plantas pelo floema (TAIZ e ZEIGER, 2004).

A auxina é uma classe de fitohormônio que funciona em baixas concentrações, para regular o crescimento e desenvolvimento da planta, ocorrendo na natureza na forma de ácido indolacético, AIA (LEBUHN e HARTMANN, 1993).

II. 6. Emprego da Isoenzima α -Esterase na diferenciação dos isolados

A utilização das isoenzimas tem desempenhado papel importante na caracterização e identificação de diversas espécies, principalmente dos indivíduos pertencentes a uma mesma espécie, como no caso das variedades.

De maneira simplificada, as isoenzimas podem ser consideradas variações de uma dada enzima dentro de um organismo, que apresentam uma mesma especificidade de substrato. Assim sendo, a variação específica em número, composição e atividade das isoenzimas em cada sistema enzimático, permite a diferenciação entre variedades, sendo a intensidade das bandas e o perfil isoenzimático específicos para uma determinada parte da planta, tecido e estágio de desenvolvimento (ALFENAS, 1998).

Alguns fatores que afetam o metabolismo das plantas, tais como a nutrição mineral, temperaturas baixas e doenças dentre outras, influenciam a atividade das isoenzimas, especialmente das esterases, peroxidases, fosfatases e fenolases, causando o aparecimento de padrões ou atividades diferentes. Assim sendo, é de fundamental importância a utilização de amostras provenientes de tecidos compatíveis pertencentes a um mesmo estágio de desenvolvimento e que sejam representativos da referida população de plantas.

PAUKSENS (1978) utilizou a combinação dos resultados dos padrões eletroforéticos da esterase, peroxidase e catalase para identificar quatro cultivares de soja. Do mesmo modo, ANDRADE e SOBRINHO (1980), com base no sistema

esterase, separaram vinte cultivares de soja em dois grandes grupos. CARDY e BEVERSDORF (1984) consideraram que, para a soja, o emprego de isoenzimas trará bons resultados se um maior número de enzimas polimórficas for utilizado na identificação de cultivares.

II. 7. Bactérias produtoras de fitohormônios

A produção de fitohormônios, como auxinas, citocinas e giberelinas, são os mais comuns mecanismos encontrados de promoção de crescimento em plantas por bactérias promotoras de crescimento (GRAY e SMITH, 2005).

A auxina é uma classe de fitohormônio que funciona em baixas concentrações, para regular o crescimento e desenvolvimento da planta, ocorrendo na natureza na forma de ácido indolacético, AIA (LEBUHN e HARTMANN, 1993; GRAY e SMITH, 2005). Além disso, outros hormônios que estimulam o desenvolvimento e o crescimento nos vegetais já há muito tempo foram encontrados como metabólitos bacterianos, por exemplo, a citocinina e a giberelina (GRAY e SMITH, 2005).

São vários os trabalhos sobre a biossíntese de auxinas por microrganismos do solo em seu próprio ambiente, porém sabe-se que o aminoácido L-triptofano (L-Trp) é um precursor fisiológico para a biossíntese de auxinas em diversas plantas e microrganismos e que a enzima chamada ipdC (indole-3-pyruvate decarboxylase – EC

4.1.1.74) é a enzima chave para a biossíntese destes compostos (TSAVKELOVA et al, 2006).

A síntese de AIA nos microrganismos também pode ocorrer através de outras vias biossintéticas, sendo mais comum ocorrer a partir do indol-3-acetaldeído (Ipya) (BROEK et al., 1999).

Processos de identificação de AIA em laboratório são freqüentemente utilizados para identificação e seleção de Bactérias Promotoras de Crescimento em Plantas. Desse modo, ONA et al. (2005) sugeriram que o relacionamento entre estas bactérias e a raiz é um fator favorável para a produção de AIA, pois essas interações apresentam características que beneficiam a formação deste hormônio tais como: baixas concentrações de carbono, nitrogênio e oxigênio e a presença de triptofano.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III. 1. Localização do Experimento

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP), do Departamento de Tecnologia, na Faculdade de Ciências e Agrárias e Veterinárias (FCAV), da Universidade Estadual Paulista, Campus Jaboticabal/SP.

III. 2. Isolamento das bactérias

As estirpes utilizadas foram isoladas a partir de nódulos extraídos de plantas de amendoim forrageiro, do tipo *Arachis hypogaea*, obtidos nas regiões de plantio em Jaboticabal, Guariba, Monte Alto e Taquaritinga, Estado de São Paulo, Brasil com localização geográfica 21°15'18.05"S x 48°22'49.19"O (Jaboticabal – Monte Alto), 21°20'34.43"S x 48°14'42.12"O (Jaboticabal – Guariba), 21°23'04.55"S x 48°26'34.45"O (Jaboticabal – Taquaritinga) e 21°17'15.18"S x 48°30'43.87"O (Monte Alto – Taquaritinga), Google Earth,.

Foi realizada a coleta e a lavagem do sistema radicular das plantas, e retirada de alguns nódulos de cada planta com o auxílio de uma tesoura de maneira a não feri-los. Esses nódulos foram então lavados em água corrente e transferidos para tubos estéreis, onde também foi adicionado etanol 95% em quantidade suficiente para cobrir os nódulos, sendo agitado vigorosamente no Vortex durante 1 minuto.

O etanol foi dispensado e foi adicionado hipoclorito de sódio 2,5% em quantidade suficiente para cobrir os nódulos, sendo agitado no Vortex por 10 segundos e deixado em repouso por 5 minutos. O bicloreto de mercúrio foi então dispensado e os nódulos foram lavados em água estéril.

Os nódulos foram esmagados isoladamente com pinças estéreis e as bactérias foram distribuídas em placas de petri contendo meio de cultura sólido YMA ("Yeast Manitol Agar"), pH 6,8, VINCENT (1970) com Vermelho Congo (SOMASEGARAN e

HOBEN, 1994), sendo incubadas, por 24 e 36 horas, em BOD (“Biologic Oxygen Demand” – Demanda Biológica de Oxigênio) a 28°C.

III. 3. Seleção e estoque das colônias puras

A diluição seriada permitiu a seleção de colônias puras que foram coletadas de placas de Petri contendo meio YM (“Yeast-Mannitol Agar”) sólido com diferenciador Vermelho Congo e foram posteriormente estocadas em 900 µL de meio YM líquido adicionando 100 µL de glicerol 40% para estocagem das mesmas em freezer – 85 °C.

III. 4. Extração do DNA

A extração de DNA total dos isolados bacterianos foi realizada segundo SAMBROOK (1989) com utilização de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico, na proporção, (25:24:1). O procedimento consistiu em multiplicar as células em meio TY (“Yeast-Tripton”) a 28°C por 72 horas, centrifugação em 12.000 x g por 30 minutos e 4°C, ressuspensão com 1 mL de solução salina (NaCl 0,85%) e transferido para outro tubo tipo eppendorf, promovendo nova centrifugação em 15.600 x g por 5 minutos. Esta lavagem foi repetida de 3 a 4 vezes. Após lavagem, foi ressuspensão em 1 mL de solução salina-EDTA e incubado a 37°C por 10 minutos. Foi adicionado 500 µL de lisozima (5 mg/mL) para lisar os microrganismos presentes nas amostras, preparada em

tampão Tris-EDTA-Dextrose e incubado por 37°C por 30 minutos. Em seguida foi adicionado 15 µL de RNase (100 mg/mL) e incubado por 37°C por 40 minutos. Foi adicionado 500 µL de solução SDS 20% e incubado em Banho Maria em temperatura de aproximadamente 60°C por 20 minutos. Adicionou-se 500 µL de solução Perclorato de Sódio 5M, gota a gota, com agitação suave. Adicionou-se 2 mL de solução fenol-clorofórmio-álcool isoamílico e deixou agitar por 1 hora em 220 rpm a 4°C. Após esse período centrifugou-se a 12.000 x g por 35 minutos a 4°C e transferiu o sobrenadante para outro tubo tipo corex (nº00152). Recuperou-se a fase superior e adicionar 2 mL de solução clorofórmio-álcool, agitou 20 minutos a 264 x g a 8°C e novamente centrifugou a 5860 x g por 20 minutos a 4°C. Recuperar a fase superior e adicionar 2 volumes de Etanol 95% gelado e incubar a -20°C durante a noite. No dia seguinte centrifugou a 5860 x g por 20 minutos a 4°C, descartou o sobrenadante e lavou o DNA com 1 mL de Etanol 70% por 2 vezes tomando os devidos cuidados, sendo a lavagem de maneira rápida para evitar perdas de DNA. Para finalizar a extração o material verteu-se o tubo em papel, deixou secar e em seguida adicionar 1 mL de tampão TE gelado e transferiu para um tubo limpo e estocou a -20°C para posterior diálise.

A quantificação do DNA foi feita através de eletroforese em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL). A eletroforese foi realizada em uma cuba modelo Horizon 11-14 com uma alíquota de 3µL de DNA adicionada de 3µL de tampão de carregamento (0,025% de azul de bromofenol e 50% de glicerol) e conduzida em tampão TEB 1X (Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3), a 100V. Foi aplicado no gel um plasmídeo (pGEM) de concentração conhecida (50 ng/µL) em

diferentes volumes para comparar a intensidade de fluorescência emitida pelo brometo de etídio. O DNA foi visualizado sob luz UV e a imagem foi documentada em um aparelho fotodocumentador (Bio Rad – Gel doc 1000) e analisada através do “software Quantity One^R” (Bio RadTM, Hercules, CA, USA).

Foi preparada após a quantificação do DNA, uma solução de trabalho, na qual o DNA foi diluído em água ultrapura estéril para se obter uma concentração adequada de 10 ng/μL para realização da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

III. 5. Amplificação dos genes 16S rRNA

Os DNAs extraídos e quantificados dos microrganismos dos solos foram amplificados pela reação de PCR com oligonucleotídeos iniciadores, específicos para o gene 16S rRNA bacteriano utilizados por KUSKE et al., (1997), sendo “forward” **pA** - 5' - AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3' (localização em *Escherichia coli*: bases 8 a 27) e “reverse” **pc5B** - 5' - TAC CTT GTT ACG ACT T - 3' (localização em *E. coli*: bases 1507 a 1492):

As condições para a reação de PCR foram utilizados, tampão PCR 1X [20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl], 200 μM de cada desoxinucleotídeo, 1,5 mM de MgCl₂, 50 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador, 2,5 U de Taq DNA polimerase (InvitrogenTM, São Paulo, Brasil), 50 ng de DNA molde e H₂O Milli Q estéril qsp. com um volume final de 50 μL.

As amostras foram amplificadas em um termociclador de acordo com o programa utilizado por: 94°C, por 2 min.; 30 ciclos de 94°C por 30 seg., 50°C por 30 seg., 72°C por 1 min., seguidos de uma extensão final por 5 min., a 72°C.

III. 6. Seqüenciamento do amplicon 16S rDNA

Os produtos da PCR foram purificados e seqüenciados diretamente, usando ABI Prism Big Dye Terminator kit (Applied Biosystems, USA) de acordo com as instruções do fabricante em um seqüenciador capilar (modelo ABI 3700 Foster City, Ca, E.U.A). Os primers descritos acima e as condições da amplificação da PCR foram também usados para o seqüenciamento.

A reação foi submetida a um termociclador seguindo o programa: 1 ciclo a 96°C por 2 minutos, 40 ciclos de 96° C por 10 segundos, 52° C por 20 segundos e 60° C. Ao final do programa as amostras no aparelho permaneceram a 10° C até serem retiradas.

Após a reação, os amplicados foram purificados para posterior seqüenciamento. Foram adicionados 80 µL de isopropanol 75%, sendo as mesmas agitadas levemente. Posteriormente, as amostras permaneceram por 15 minutos em temperatura ambiente e foram centrifugadas a 3.220 x g, por 45 minutos, a 20°C. Após a centrifugação foi descartado o sobrenadante e os tubos de 2 mL foram deixados por 5 minutos e invertidos em papel absorvente. Aos tubos foram adicionados 150 µL de etanol 70%,

centrifugadas a 3.220 x g por 5 minutos, a 20°C. Esta última operação foi repetida por mais duas vezes e as amostras foram secas em fluxo laminar por 1 hora.

Em seguida, as amostras foram ressuspensas com 9 µL Hi-Di Formamide – Catálogo – P/N 4311320 (ABI Prism) e desnaturadas a 95°C por 5 minutos e aplicadas em seqüenciador capilar modelo ABI 3700 – Perkin Elmer.

III. 7. Análise das seqüências

Para se verificar a qualidade das seqüências geradas utilizou-se o programa “Sequencing Analysis 3.4”, que gerou os eletroferogramas os quais foram submetidos à análise pelo programa “Phred/Phrap/Consed” (GORDON et al., 1998). A seleção das seqüências adequadas foi realizada pelo programa Phred/Phrap, que analisa a qualidade das seqüências, visualizando graficamente e gerando arquivos no formato “fasta”, na qual o nível de exigência mínima foram de 100 bases com qualidade Phred acima de 20, auxiliado pelo programa “Contgen.pl”

Preliminarmente, as seqüências foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos, com seqüências depositadas no banco de dados GenBank acessado através do endereço eletrônico (www.ncbi.nlm.nih.gov) do NCBI (National Center for Biotechnology Information). A ferramenta utilizada para esta consulta foi o BLAST local - “Basic Local Alignment Search Tools” (ALTSCHUL et al., 1997), realizada em

06/06/2003, em uma “workstation” SUNBLADE 1000 (SUN Microsystems), pelo “site” do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas <http://lbmp.fcav.unesp.br/blast>).

Foi desenvolvido e utilizado um banco de dados metagenômico interno, através de um programa MySQL (Sistema de Gerenciamento de Banco de Dados Relacional) para facilitar as comparações entre as comunidades microbianas dos solos, (<http://lbmp.fcav.unesp.br/metagenoma>).

III. 8. Morfologia e tempo de crescimento das colônias

As colônias formadas do esmagamento dos nódulos foram submetidas à diluição seriada das células e após obtenção de colônias isoladas e ou cultura pura foram inoculadas em placas de petri com meio de cultura YMA e Vermelho Congo (SOMASEGARAN e HOBEN, 1994).

As placas foram incubadas em BOD, a 28° C e observadas diariamente para a avaliação do tempo de aparecimento das colônias e de sua morfologia, sendo Transparência da colônia, elevação da colônia, formação de muco, elasticidade do muco, forma da colônia, tempo de crescimento em dias, tempo geração horas, diâmetro da colônia, produção de goma e cor.

Para a determinação da curva de crescimento e do tempo de geração, as bactérias isoladas em meio de cultura sólido YM foram repicadas em frascos especiais

“Side Arn”, contendo 100 mL de YM líquido (“Yeast-Mannitol Broth”). Em cada frasco foi inoculado um isolado e estes foram mantidos sob agitação (140 rpm), à 28° C, sendo registrado o crescimento a cada três horas, através da leitura da turbidez do meio realizada em um fotolorímetro (Klett-Summerson, 640-700 nm). No tempo zero, também foi realizada a leitura da turbidez antes e após a inoculação do meio de cultura. Para a determinação do número de células viáveis inicial, foi retirada uma alíquota de 100µL do isolado+YM no tempo zero, para a diluição seriada em placas contendo meio de cultura YMA com Vermelho Congo (SOMASEGARAN e HOBEN, 1994). As placas foram incubadas em BOD, a 28°C e observadas diariamente para a avaliação do tempo de aparecimento das colônias, do número de colônias e de sua morfologia.

Expressões matemáticas foram utilizadas para obtenção do tempo de geração ($g = t/n$), dividindo-se um intervalo de tempo específico ($\Delta T_2 - T_0 = 48$ hs) pelo número de gerações (n). O número de gerações foi calculado pela fórmula $n = 3,3(\log_{10}N_2 - \log_{10}N_0)$, onde N corresponde ao número de células calculado.

III. 9. Resistência Intrínseca a Antibióticos

A resistência intrínseca a antibióticos através do teste de antibiograma foi realizada em placa de Petri contendo meio de cultura YM com incorporação de onze antibióticos, AN (Ácido Nilidíxico), AM (Amicacina), GN (Gentamicina), KN (Kanamicina),

CO (Cloranfenicol), AX (Amoxicilina), PEN (Penicilina), EI (Eritromicina), SFT (Sulfazotrin), CD (Cefaloridina) e AP (Ampicilina), (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo).

III. 10. Avaliação da atividade da isoenzima α -esterase nos isolados

Para a extração de isoenzimas, os isolados foram cultivados em 50 mL de meio TY (Tryptona e Extrato de Levedura), e o produto gênico ou proteína foi extraído para avaliação da α -esterase (BERINGER, 1974) .

Para a eletroforese, os géis de separação a 10% e de concentração a 5% foram preparados de acordo com LAEMMLI (1970) e montados entre duas placas de vidro de 173 x 163 mm com 1,0 mm de espessura. Utilizou-se a eletroforese vertical onde as cubas continham o seguinte tampão de eletrodo (0,19M glicina; 0,025M Tris; 0,0035M de dodecil sulfato de sódio; pH 8,3). O sistema foi submetido a uma corrente elétrica inicial, constante de 20 mA, até que o corante “de front” atingisse o separador. A corrente elétrica foi então elevada para 25 mA, permanecendo constante até o final da corrida. No gel foram aplicados 50mg de proteína referente a cada isolado, que foram previamente determinadas pelo método de LOWRY modificado (HARTREE, 1972).

A revelação das bandas das isoenzimas α -esterase nos géis foi realizada segundo as metodologias descritas por PASTEUR et al. (1988) e CARDY e

BEVERSDORF (1984). Em 50 ml de tampão fosfato pH 6,2 acrescentou-se 50mg de fast-blue RR e 30mg de α -naftil acetato dissolvido em 500 mL de acetona.

A avaliação dos isolados foi feita através da análise visual dos zimogramas obtidos após a eletroforese. Os parâmetros utilizados na diferenciação, basearam-se na intensidade e na ausência ou presença das bandas isoenzimáticas, que tiveram os seus coeficientes de mobilidade (Rf) calculados. O coeficiente de mobilidade expressa a relação entre a distância de migração da proteína e a distância de migração do corante “de front” no gel, em condições eletroforéticas pré-estabelecidas. Os valores de Rf comparativos de todas as amostras serviram como base para elaboração de uma matriz binária.

A construção da árvore foi obtida através da Matriz binária medida pela distância das bandas no gel pelo programa Free-Tree 1.6.6 com coeficiente B - Jaccard de variância e representados de forma esquemática.

III. 11. Avaliação da produção do ácido-indol-acético (AIA) pelos isolados

Os isolados foram submetidos à avaliação da produção de ácido-indol-acético (AIA) pelo uso do método colorimétrico descrito por GORDON e WEBER (1951), com algumas modificações. Primeiramente as bactérias foram inoculadas e cultivadas em 50 mL de meio de cultura DYGS suplementado com 100 μ g/mL de triptofano, no escuro, a

30°C e agitação constante de 150 rpm. As bactérias foram avaliadas em três diferentes estágios: quando o cultivo atingiu a DO_{600} (Densidade ótica 600 nm) de 0,8 e 1,5, com o ajuste da densidade bacteriana pela adição de solução salina 0,85%.

Depois de atingido cada período de cultivo nas densidades citadas, uma alíquota de 1,5 mL foi retirada de cada amostra e centrifugada durante 10 minutos, a 7.000 xg e temperatura de 15°C. Em seguida, 1 mL do sobrenadante de cada amostra foi transferido para tubo de ensaio de vidro de 25 mL, sendo adicionados 2 mL do reagente de Salkowisk ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 2% e HCl_3 37%). Os tubos foram mantidos no escuro por 30 minutos. A presença do hormônio foi visualizada pela coloração rósea e quantificada pela absorbância a 530nm em um espectrofotômetro. Todas as dosagens foram realizadas em triplicata. Como controle negativo utilizou apenas o meio de cultura DYGS. Para a estimativa de produção de AIA, utilizou-se uma curva de padrão com Ácido indol-acético (Sigma), com 98% de pureza, nas seguintes concentrações: 10, 25, 50, e 100 $\mu g/mL$.

III. 12. Avaliação dos efeitos da inoculação sobre o desempenho de plantas de amendoim

O experimento foi conduzido sob cultivo protegido, em casa de vegetação, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, tendo como, latitude

21° 15'. 22" S e longitude de 48 ° 18'58" W, com altitude média de 595 metros e clima mesotérmico com inverno seco.

O experimento foi realizado de 6 de dezembro de 2007 a 13 de janeiro de 2006. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente esquema fatorial de 2x21, sendo dois cultivares com vinte e um tratamentos em três repetições cada.

Os isolados identificados pelo seqüenciamento foram cultivados em meio YM líquido e inoculados, 0,5mL nas sementes e 0,5 mL via foliar após 3 dias da emergência. Os tratamentos foram constituídos de dois cultivares de amendoim, Runner IAC 886 e a IAC Tatu-ST, em vasos contendo vermiculita, com aplicação na semente e sem aplicação de inoculante. (EMBRAPA, 1999).

A semeadura, com três sementes por vaso, foi realizada com diferentes tratamentos de inoculação com os isolados de *Rhizobium* e ou *Burkholderia*, selecionados pelo seqüenciamento. Estes tratamentos compreendiam a inoculação dos dois cultivares com: 15 isolados denominados JAB 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15 isoladamente; uma inoculação com a estirpe recomendada para a cultura *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6144 e a mistura de cada um dos isolados com esta estirpe SEMIA.

Os tratamentos de inoculação foram preparados em formulação líquida de meio YM, incubados a 28°C agitados a 120 rpm por 48 horas, VINCENT (1970). O número de células foi determinado por densidade óptica usando um fotolorímetro resultando

em uma formulação com aproximadamente 10^9 células/mL (unidades formadoras de colônias foram estimadas).

Aos três dias da emergência, foi feito o desbaste, deixando-se uma planta por vaso e nova aplicação dos tratamentos na mesma concentração de células. Em intervalos de cinco dias, foi realizada uma adubação básica, isenta de nitrogênio e a adição de 1mL de solução contendo fósforo e potássio na forma de KH_2PO_4 e KCl , nas concentrações de 2% e 1% respectivamente, segundo metodologia proposta por NORRIS et al., 1964.

Após 40 dias da emergência, as plantas foram colhidas, contou-se o número de nódulos, mediu-se a massa de matéria seca da parte aérea e o acúmulo de nitrogênio total da parte aérea de cada planta. O acúmulo de nitrogênio 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, UNESP, Jaboticabal, São Paulo.

III. 13. Complementação dos dados com utilização da análise estatística de Componentes Principais (ECP)

A possível discriminação de tratamentos foi verificada com o auxílio da técnica exploratória multivariada de componentes principais (HAIR, 2005), processada com a massa de matéria seca, número de nódulos e acúmulo de nitrogênio por planta. As

análises multivariadas foram processadas no software Statistica, versão 8 (Statsoft 7.0).

Utilizada para o auxílio na avaliação dos tratamentos, esta importante ferramenta constrói novas variáveis latentes (componentes principais) que são combinações lineares das variáveis originais a partir dos autovalores da matriz de covariância dos dados. Com os escores dos tratamentos e das variáveis é possível a construção de um gráfico biplot que contém em uma mesma escala, o tratamento e variáveis.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV. 1. Nódulos de Plantas em campo de cultivo

As plantas retiradas das áreas de cultivo que compõem o quadrante entre as cidades de Jaboticabal, Guariba, Monte Alto e Taquaritinga apresentaram quantidade de nódulos suficiente para extração dos microrganismos presentes (figura 1).



Figura 1. Coleta das plantas em campo de cultivo para obtenção dos microrganismos contidos nos nódulos.

No processo de isolamento das bactérias da cultura de amendoim, os microrganismos foram extraídos dos nódulos, em meio de cultura YM, que após o

processo de purificação e obtenção de colônia pura foram obtidos aproximadamente 54 isolados.

Após a amplificação da região 16S rDNA, 25 destes isolados apresentaram qualidade de seqüenciamento acima de 100 pares de base, sendo que desta maneira 15 desses isolados nativos foram selecionados por corresponder a dois gêneros, *Rhizobium* e *Burkholderia*.

Mesmo que o meio semi-seletivo YM não seja o mais apropriado para isolados diazotróficos, devido à sua composição, o objetivo principal da utilização deste foi o de selecionar bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium*.

IV. 2. Extração e Reação de PCR do gene 16S rRNA.

A extração de DNA e a reação de PCR da região 16S rDNA dos 15 isolados (figura 2) apresentou similaridade com os isolados do Banco de Dados internacional, GenBank entre 82 e 100% (tabela 1).

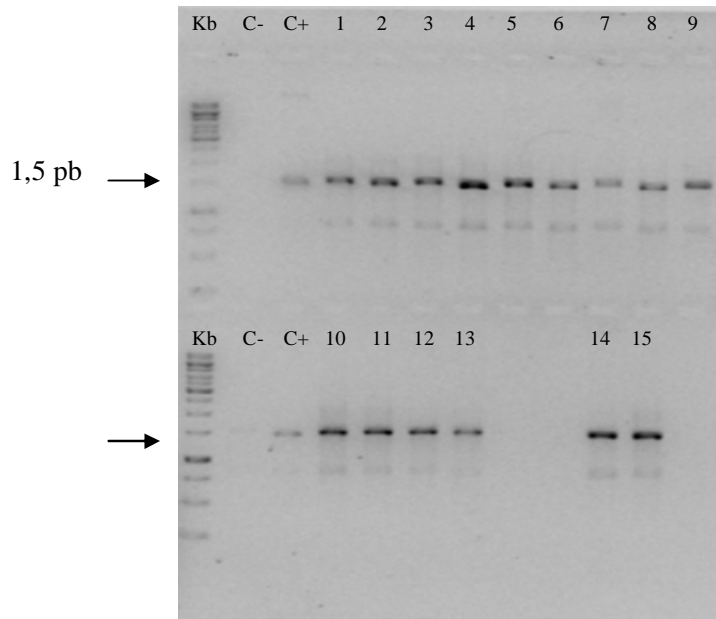


Figura 2. Perfil eletroforético de fragmentos de DNA gerados pela amplificação da região 16S rDNA dos isolados bacterianos através do conjunto de oligonucleotídeos iniciadores pA e pC5B em gel de Agarose 1% contendo Brometo de etídeo (0,5 mg/μl). Canaletas: Padrão de tamanho molecular (1 Kb Gene Ruler DNA Ladder-Fermentas), C- (controle negativo), C+ (controle positivo SEMIA 6144) e 1 a 15 isolados selecionados.

Dos quinze isolados após identificação molecular, treze foram selecionados e utilizados como tratamentos das sementes, envolvendo a inoculação dos dois cultivares, sendo seis microrganismos do gênero *Rhizobium*, numerados por 1, 2, 3, 4, 5 e 6 e outros sete do gênero *Burkholderia*, numerados por 7, 8, 11, 12, 13, 14 e 15 nomeados como “JAB peanut” e depositadas no *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* com seus respectivos números de Bankit e que podem ser consultadas no Banco de Dados Internacional, GenBank (tabela 1).

Tabela 1. Identificações dos isolados e similaridade com as seqüências depositadas no NCBI.

Identificações LBMP	Números Bankit	Identificações NCBI	Score/	evalue	%
JAB 1 peanut LBMP	1138314	<i>Rhizobium sp.</i> ORS214	2682	0.0	100
JAB 2 peanut LBMP	1148335	<i>Rhizobium lusitanum</i>	589	1e-164	82
JAB 3 peanut LBMP	1148348	<i>Rhizobium leguminosum</i>	595	0.0	85
JAB 4 peanut LBMP	1148354	<i>Rhizobium sp.</i> MTR17A	2645	0.0	100
JAB 5 peanut LBMP	1148381	<i>Rhizobium tropici</i>	1103	0.0	100
JAB 6 peanut LBMP	1148515	<i>Rhizobium sp.</i> DMP-9	1135	0.0	89
JAB 7 peanut LBMP	1147821	<i>Burkholderia sp.</i> TFD34	1088	0.0	89
JAB 8 peanut LBMP	1148516	<i>Burkholderia caribensis</i>	1844	0.0	100
JAB 11 peanut LBMP	1148531	<i>Burkholderia sp.</i> HSL-4	928	0.0	86
JAB 12 peanut LBMP	1148532	<i>Burkholderia sp.</i> CCS	1139	0.0	89
JAB 13 peanut LBMP	1148534	<i>Burkholderia</i> LMG	2663	0.0	100
JAB 14 peanut LBMP	1148538	<i>Burkholderia sp.</i> TFD4	875	0.0	87
JAB 15 peanut LBMP	1148541	<i>Burkholderia sp.</i>	1083	0.0	87

* Laboratório de Bioquímica de microorganismo e plantas (LBMP). Bankit, número de cadastro no NCBI.

IV. 3. Morfologia das colônias

Foram selecionadas colônias com diferentes características, onde os testes para determinar a morfologia de cada uma das colônias, a resistência a antibióticos, o perfil eletroforético da isoenzima α -esterase e produção de ácido-indol-acético, AIA, apresentaram uma série de fatores que comprovam a ocorrência de diferenças entre os isolados.

A caracterização morfológica (tabela 2) demonstrou que a maioria dos isolados são distintos em relação aos critérios adotados de diferenciação. Em todos os testes os isolados 5 e 6 apresentaram semelhança de resultados, o que sugere que são semelhantes ou idênticos, porém distintos pelo seqüenciamento com 100% e 89% de similaridade respectivamente.

Tabela 2. Características morfológicas das colônias isoladas obtidos por crescimento em meio de cultura puro YM sólido.

	TR	EL	FM	EM	FC	TCD	TG	DC	PG	Cor
JAB 1	O	C	P	AF	R	1	4	1	Média/alta	Branca
JAB2	O	C	P	PF	R	1	5	1	Alta	Branca
JAB3	T	C	P	AF	R	2	3	2	Média	Branca
JAB4	T	C	P	AF	R	1	3	2	Média	Branca
JAB5	T	C	P	AF	R	2	3	3	Alta	Branca
JAB6	T	C	P	AF	R	2	3	3	Média/alta	Branca
JAB7	O	C	P	PF	R	2	7	1	Alta	Amarelada
JAB8	O	C	P	PF	R	2	8	1	Baixa	Amarelada
JAB11	T	C	P	AF	R	1	4	1	Média	Branca
JAB12	T	C	P	AF	R	1	3	2	Média	Branca
JAB13	T	C	P	AF	R	1	3	2	Média	Branca
JAB14	T	C	P	AF	R	1	4	1	Baixa	Branca
JAB15	O	C	P	PF	R	2	5	1	Baixa	Avermelhada
6144	O	A	P	AF	R	3	10	1	Baixa	Avermelhada

*TR - Transparência da colônia (Opaca – O, Translúcida – T), EL - Elevação da colônia (convexa – C, achatada – A), FM – formação de muco (ausente – A, presente – P), EM – elasticidade do muco (presença de fio – PF, ausência de fio – AF), FC - forma da colônia (redondo – R, cônica – C, irregular – I), TCD – Tempo de crescimento em dias, TG – Tempo geração horas, DC – diâmetro da colônia, PG – produção de goma (alta, média ou baixa) e Cor.

Na curva de crescimento pode ser observado que o tempo de geração da estirpe tipo SEMIA 6144 foi a que apresentou o crescimento mais lento com características diferentes de todos os isolados. Isso mostra qual a importância de buscar novos isolados, haja vista os testes feitos com essa SEMIA que apresentam baixa eficiência em aplicação no campo.

IV. 4. Isoenzima α -esterase.

Os resultados obtidos, pela produção da proteína α -esterase, comprovaram que os isolados são distintos e as diferentes vias metabólicas seguida por eles são únicas. Com exceção, novamente, dos isolados 5 e 6 apresentaram semelhanças (figura 3).

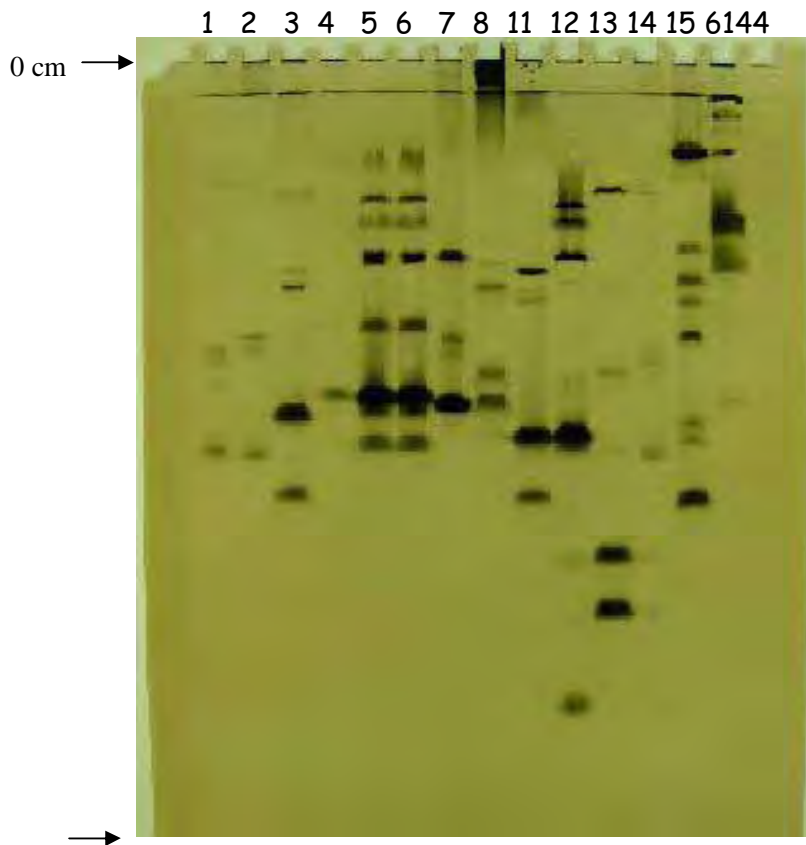


Figura 3. Zimograma da isoenzima α -esterase dos isolados 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15 e 6144, em gel SDS-PAGE.

Para uma melhor visualização dos resultados, os zimogramas obtidos da Matriz Binária para α -esterase e aderidos ao programa Free-Tree, com coeficiente B-Jaccard de variância foram representados de forma esquemática na figura 4.

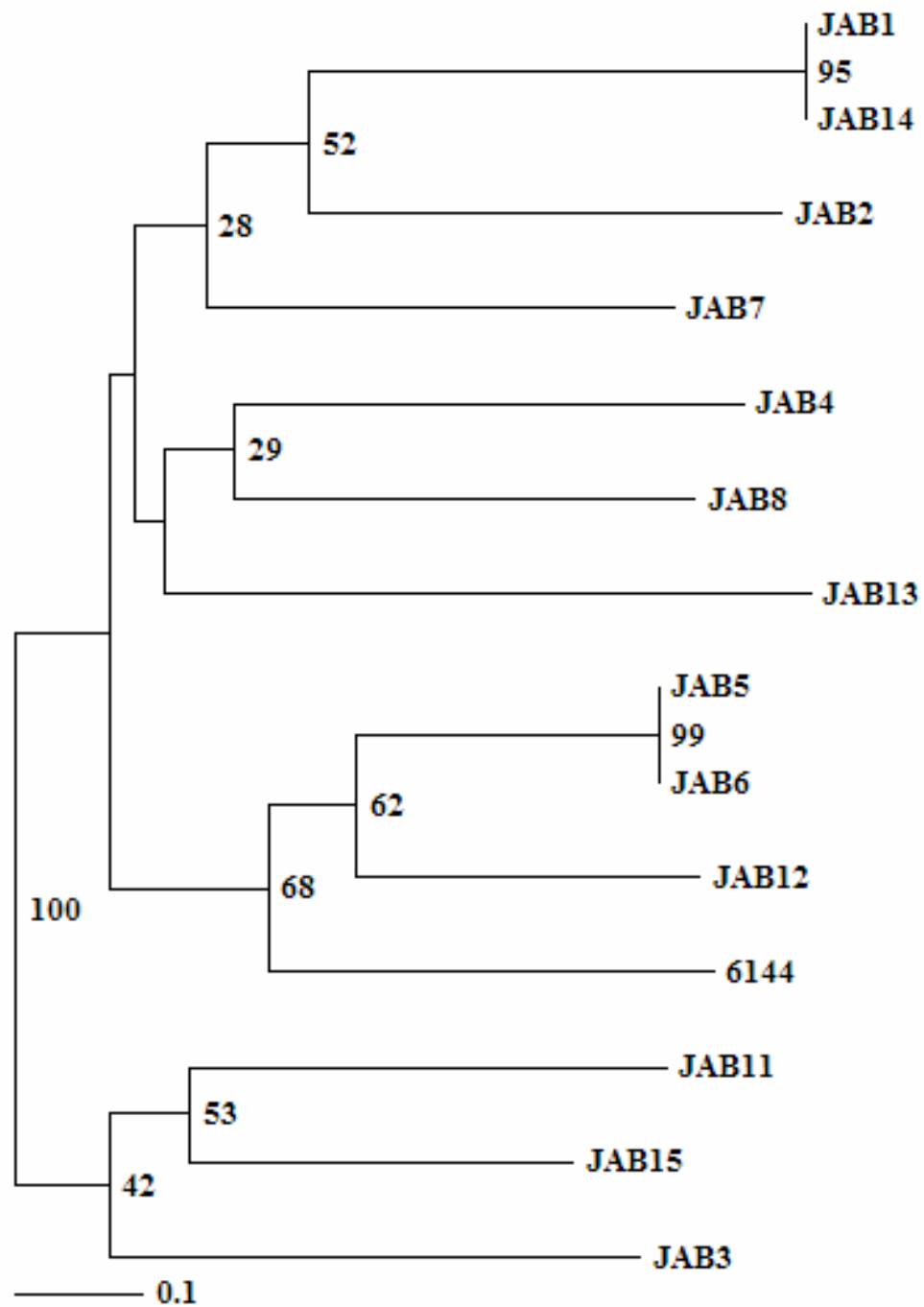


Figura 4. Filograma da isoenzima α -esterase dos isolados JAB - 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15 e 6144, pelo programa Free-Tree 6.1.1 com os respectivos bootstraps de similaridade representada em porcentagem (%).

A análise dos zimogramas da isoenzima α -esterase, nos isolados estudados, revelou que esse sistema enzimático apresenta graus distintos de polimorfismo e os isolados JAB 5 e JAB 6 apresentam o mesmo número e disposição de bandas, confirmado pelo filograma com 99% de similaridade.

IV. 5. Antibiograma

O teste com os 11 antibióticos demonstrou que a sensibilidade e resistência dos isolados também são distintas (tabela 4), onde pode ser observado que o isolado 8 (figura 4) é sensível somente a Ampicilina (AP) e os isolados 2, 3, 12 e 15 (figura 5), também apresentam resistência para a maior parte dos antibióticos. Já os isolados 6 e 14 (figura 6) apresentaram Sensibilidade para todos os antibióticos (tabela 4).

A bactéria *Burkholderia cepacia*, pertencente à família *Pseudomonadaceae*, previamente denominada *Pseudomonas cepacia*, está associada a doenças em plantas (BURKHOLDER, 1950; HOLMES et al., 1998), no homem (BIDDICK et al., 2003) e animais domésticos (BERRIATUA et al., 2001).

Tabela 4. Antibiograma dos isolados pelo teste de (S) sensibilidade ao antibiótico e (R) resistência.

Isolado	KN	CD	PEN	AP	EI	CO	SFT	GN	AX	AM	AN
1	S	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R
2	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
3	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R
4	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S
8	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
11	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S
12	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R
13	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R	S
14	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
15	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
6144	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S

*Antibióticos: KN (Kanamicina), CD (Cefaloridina), PEN (Penicilina), AP (Ampicilina), EI (Eritromicina), CO (Cloranfenicol), SFT (Sulfazotrin), GN (Gentamicina), AX (Amoxicilina), AM (Amicacina) e AN (Ácido Nilidíxico).

Os isolados do tipo *Burkholderia* são tidos na literatura como altamente patogênicos, e que neste trabalho, apresentaram Resistência para maioria dos antibióticos, porém não tiveram sua patogenicidade avaliada.



Figura 5. Antibiograma do isolado 8, em meio YM, com visualização da Resistência aos antibióticos e Sensibilidade somente para Ampicilina (AP).

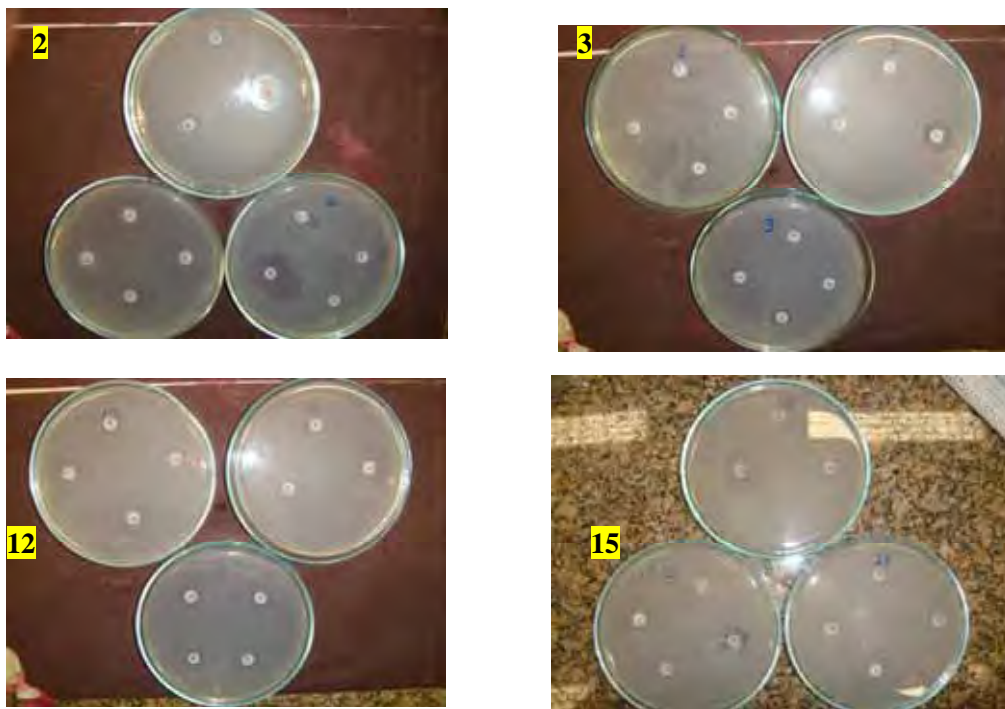


Figura 6. Antibiograma dos isolados 2, 3 12 e 15, em meio YM, apresentando maior resistência aos antibióticos.

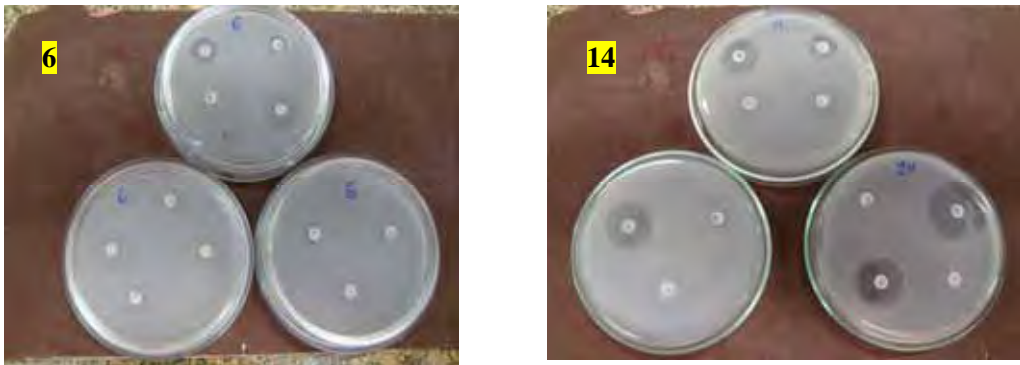


Figura 7. Antibiograma dos isolados 6 e 14, em meio YM, apresentando sensibilidade para todos os antibióticos.

V. 6. Produção do ácido-indol-acético (AIA)

Os resultados qualitativos de produção de AIA indicaram que todos os 6 isolados de *Rhizobium* e os 7 de *Burkholderia* produziram AIA em meio de cultura DYGS líquido (Figuras 7 e 8).

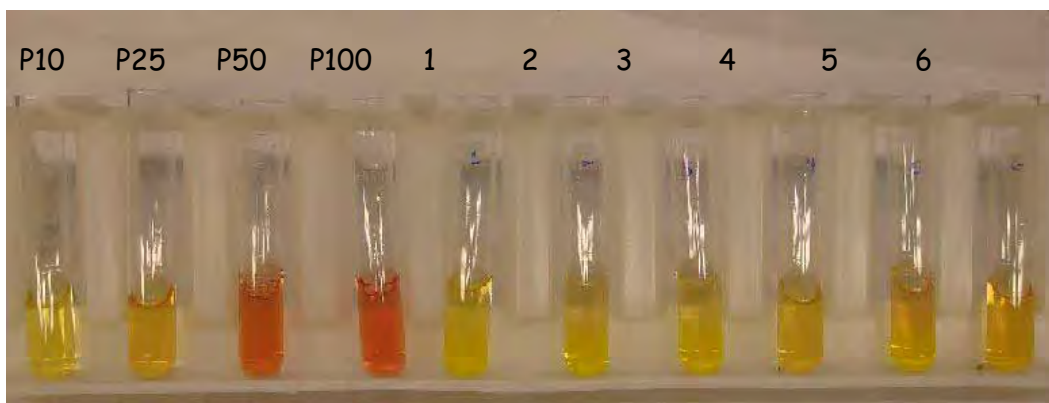


Figura 8. Teste colorimétrico de produção de AIA com os isolados de *Rhizobium* cultivadas em meio de cultura DYGS suplementado com 100µg/mL de triptofano. Padrões com concentrações conhecidas de AIA (P10, 25, 50 e 100).

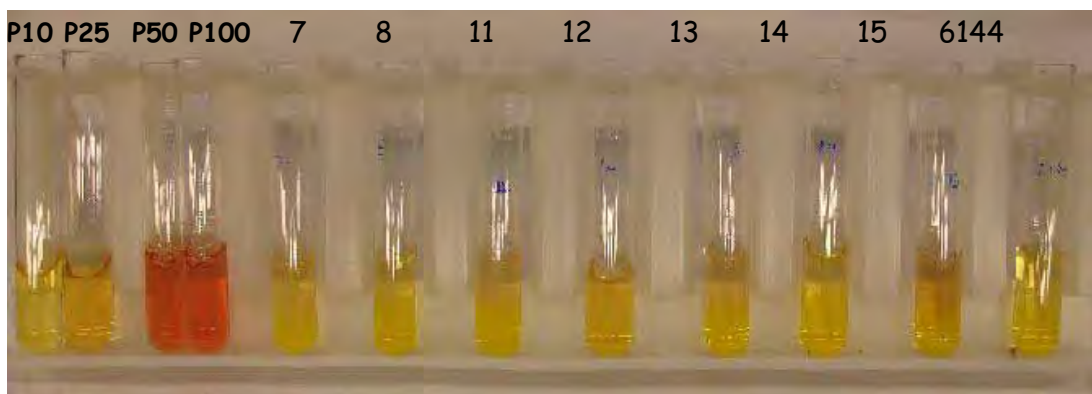


Figura 9. Teste colorimétrico de produção de AIA com os isolados de *Burkholderia* cultivadas em meio de cultura DYGS suplementado com 100µg/mL de triptofano. Padrões com concentrações conhecidas de AIA (P10, 25, 50 e 100).

O isolado 15 apresentou a maior concentração de AIA entre todos os isolados, sendo seu valor maior até mesmo que a SEMIA 6144 (tabela 5). Verificou-se também que todos isolados nativos, deste estudo, apresentam valores de produção de AIA que ficaram acima do Padrão tipo SEMIA 6144, recomendado pelo Ministério da Agricultura.

ZAHAROVA et al. (1999) apontaram que 80% das bactérias isoladas de rizosfera de amendoineiro são capazes de produzir AIA e que neste trabalho 100% foram produtores.

Tabela 5. Produção de AIA das bactérias JAB peanut e da estirpe padrão tipo SEMIA 6144 em diferentes períodos de cultivo e Densidade Óptica (D.O).

	1	2	3	4	5	6	7	8	11	12	13	14	15	6144
D.O. 0.8	0,89	1,38	1,0	3,0	3,7	4,0	1,2	0,7	2,9	2,8	2,6	0,17	7,9	0,7
D.O. 1.5	2,7	3,68	3,3	6	6,1	10	2	1,1	4,8	7	4,3	0,34	9,2	0,9

*D.O 0.8 e D.O 1.5 em 12 e 24 horas respectivamente. Concentração do AIA em µg/mL.

IV. 7. Número de Nódulos, Massa de Matéria Seca da Parte Aérea e Fixação de N₂

A análise de variância do número de nódulos observados nos dois cultivares de amendoim, *Arachis hypogaea*, inoculadas com os isolados selecionados e com associação dos mesmos com a estirpe tipo SEMIA 6144 foram significativos em relação aos tratamentos, cultivares e suas associações (tabela 6).

O plantio das sementes estéreis das cultivares IAC Tatu-ST e IAC 886 totalizaram 21 tratamentos, envolvendo os diferentes isolados, para cada cultivar (tabela 7).

O número de nódulos foi influenciado pela aplicação de inoculante (tabela 6). Houve diferença significativa nas interações: 1) tratamento com inoculante e planta; 2) planta e tipo de plantio em vasos contendo vermiculita; e 3) interação tripla tratamento com inoculante, tipo de plantio e tratamento com tratamento.

Tabela 6. Análise de variância do número de nódulos observados em amendoim, *Arachis hypogaea*, nas cultivares IAC Tatu-ST e IAC 886 inoculadas com os isolados selecionados e com associação dos mesmos com a estirpe tipo SEMIA 6144. Controle positivo SEMIA 6144.

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Cultivar	1	23,0564	23,0564	2,6717 ^{NS}
Inoculante	19	3488,4936	183,6049	21,2757 **
Cultivar X Inoculante	19	2640,4253	138,9698	16,1035 **
Tratamentos	39	6151,9753	157,7430	
Resíduo	156	1346,2500	8,6298	
Media geral do ensaio	25,7806			
Desvio padrão	2,9377			
Coefficiente de variação	11,3948			

Tabela 7. Comparação das médias, pelo Teste de Tukey, do número de nódulos observados em amendoim, *Arachis hypogaea*, nas cultivares IAC Tatu-ST e IAC 886

Inoculantes	Tratamento número	cv IAC Tatu-ST	cv IAC 886
Controle positivo	1	30,0 abc B	38,8 a A
JAB1	2	29,0 abcd A	22,8 efgh B
JAB 2	3	24,0 cdef B	30,0 bcd A
JAB 3	4	22,0 efg A	20,8 ghi A
JAB 4	5	22,8 defg B	29,0 bcde A
JAB 5	6	26,4 bcde B	30,2 bcd A
JAB 6	7	19,6 fgh B	25,6 cdefg A
JAB 1/ 6144	8	31,2 ab A	29,0 bcde A
JAB 2/ 6144	9	20,2 efgh B	28,2 bcdef A
JAB 3/ 6144	10	31,0 ab A	30,8 bc A
JAB 4/ 6144	11	20,4 efgh B	32,8 ab A
JAB 5/ 6144	12	14,4 h B	26,2 bcdefg A
JAB 6/ 6144	13	17,0 gh B	21,0 ghi A
JAB 7/ 6144	14	30,0 abc A	17,8 hi B
JAB 8/ 6144	15	23,8 cdef A	14,8 i B
JAB 11/ 6144	16	34,8 a A	23,2 efgh B
JAB 12/ 6144	17	21,8 efg A	24,8 cdefg A
JAB 13/ 6144	18	23,2 defg A	23,8 defgh A
JAB 14/ 6144	19	33,0 ab A	23,8 defgh B
JAB 15/ 6144	20	33,8 a A	30,8 bc A
Controle negativo	21	--	--

Médias na mesma coluna seguidas de mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si. Médias na mesma linha seguidas de mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente entre si. Teste de Tukey, $p < 0,05$. Controle negativo com ausência de nódulos.

Quando testou-se a eficiência de inoculação na cultivar IAC Tatu-ST, através da contagem de nódulos, verificou-se que os melhores isolados e associações, foram aqueles que apresentaram níveis de nodulação semelhantes ao controle positivo, ou seja o isolado SEMIA 6144 recomendado pelo Ministério da Agricultura. Dessa forma os isolados JAB 5 (6), JAB 2 (3) obtiveram o mesmo desempenho estatístico ($p < 0,05$) do isolado SEMIA 6144. Entretanto quando JAB 2 e 3 foram associadas ao SEMIA 6144, as nodulações foram significativamente inferiores (Tabela 7). As associações JAB 11/6144 (16), JAB 15/6144 (20), JAB 14/6144 (19), JAB 1/6144 (8), JAB 3/6144 (10), JAB 7/6144 (14), JAB1 (2), e JAB 8/6144 (15), também não diferiram estatisticamente do SEMIA 6144. Entretanto deve-se ressaltar que as associações JAB 11/ 6144 (16), JAB 15/ 6144 (20), foram superiores às JAB 8/ 6144 (15), JAB 2 (3), JAB 8/ 6144 (15) (Tabela 7).

Já na cultivar IAC 886 apenas a associação JAB 4/6144 apresentou o mesmo nível de proporcionado pelo isolado SEMIA 6144. Entretanto, os isolados JAB 2 (3), JAB 5 (4), JAB 5 (6), e as associações JAB 1/6144 (8), JAB 2/6144 (9), JAB 3/6144 (10), JAB 5/6144 (12) e JAB 15/6144 (20) também apresentaram um bom desempenho, estando apenas um nível abaixo da JAB 4/6144 e da SEMIA 6144 (Tabela 7).

Observou-se interação significativa entre cultivares e inoculantes, significando que o efeito de um mesmo isolado pode diferir significativamente entre as variedades (Tabela 7). Como exemplo expressivo dessa interação variedade X inoculante, podemos citar a associação JAB 11/ 6144 (16), que proporcionou excelente desempenho de nodulação para a cv IAC Tatu-ST e baixo desempenho na cv IAC 886.

Tabela 8. Médias da massa de matéria seca e teor de nitrogênio de plantas da cultivar IAC 886 e IAC Tatu-ST inoculadas com os isolados selecionados separadamente e combinadas entre si e com a estirpe tipo SEMIA 6144.

Tratamento número	IAC 886		IAC Tatu-ST	
	Massa de matéria seca/g	N ₂ g/kg	Massa de matéria seca/g	N ₂ g/kg
1	0,71	27,2	1,65	25,5
2	0,96	22,6	0,95	24,9
3	1,46	29,5	1,01	25,6
4	0,52	24,5	1,12	22,2
5	0,81	26,3	0,87	23,5
6	0,76	26,3	0,98	22,8
7	0,89	24,5	0,89	23,5
8	1,45	22,2	1,07	25,1
9	1,05	20,0	0,86	18,2
10	1,36	25,0	0,73	16,8
11	1,43	26,5	1,10	13,7
12	1,58	29,3	0,53	15,4
13	1,45	26,1	0,44	19,3
14	1,22	22,8	1,59	24,3
15	1,03	25,6	0,93	24,2
16	1,12	23,5	1,03	24,9
17	0,99	32,9	0,95	22,6
18	0,89	22,6	1,09	21,5
19	1,25	24,6	1,16	22,8
20	0,57	32,9	1,28	23,0
21	1,03	11,2	0,97	7,4

* N₂ (Nitrogênio) g/Kg = % (porcentagem) x 10. Controle negativo C- (sem inoculação). (--) ausência.

Observa-se que alguns tratamentos foram expressivos nos dois cultivares, onde a ausência de qualquer influência no tipo de cultivo sugere de acordo com o trabalho proposto por MONTANS (2006), que as chances de sucesso com a inoculação das sementes de amendoim seriam maiores em áreas novas.

Semelhante ao trabalho proposto por SANTOS et al., 2005, as combinações entre os microrganismos demonstram que foi possível promover a melhor interação com a planta hospedeira, que por sua vez, estimulou uma maior produção de nódulos aumentando a efetividade na fixação do nitrogênio. Além da interação planta-microrganismo, a interação microrganismo-microrganismo utilizada nos tratamentos também merece destaque.

Pode ser observado que a interação planta-microrganismo e microrganismo-microrganismo apresentaram melhor adaptação no cultivar IAC 886 com nódulos, massa de matéria seca e fixação de nitrogênio, pouco superiores aos do cultivar Tatu-ST (tabelas 7 e 8). Dessa maneira, conforme apresentado neste trabalho, assim como os trabalhos propostos por SANTOS et al., 2005 e DATE e NORRIS, 1979, o genótipo das plantas de amendoim e as condições de plantio em vasos contendo vermiculita podem interferir na adaptação e conseqüentemente na eficiência simbiótica dos isolados.

Para as plantas sem tratamento com inoculação dos isolados, assim como as plantas inoculadas somente com os isolados de *Burkholderia* pode ser observado que

em ambos os casos houve ausência de nódulos. Desta maneira, as plantas foram posteriormente descartadas de futuras análises.

Os tratamentos 2 e 15/6144 apresentaram valores semelhantes de nodulação, acúmulo da massa de matéria seca e efetividade de fixação do nitrogênio, com a estirpe padrão tipo SEMIA 6144, para os dois cultivares, mostrando eficiência de adaptação, o que justifica a recomendação deste tratamento pelo Ministério da Agricultura.

Os tratamentos 5 e 4/6144, para o cultivar IAC 886 e 1/6144, 11/6144 e 14/6144, para o cultivar Tatu-ST, apresentaram valores consideráveis nos três itens avaliados, porém estes resultados ocorreram, como citado acima, em apenas uma das cultivares. Desta forma, por ter baixa adaptação, quando utilizada em diferentes sementes, este tratamento não é recomendado para futuros estudos.

VIDOR et al., (1979); THIES et al., (1991); STAMFORD et al., (1995), mostraram que isolados nativos inoculados em leguminosas tropicais apresentaram-se ineficazes ou de baixa eficiência na fixação do nitrogênio. Porém, neste trabalho, assim como MARTINS et al., (2003), foi verificado que os isolados apresentaram baixa, média e alta eficiência na fixação do nitrogênio.

AYLA e VELÁSQUEZ (1978), avaliando 11 estirpes de *Rhizobium* sp., em amendoim, em solos da Venezuela, obtiveram incrementos na produção de vagens/planta devido à inoculação. Esses aumentos foram na ordem de 28 a 108%, em relação ao controle sem inoculação.

IV. 8. Análise Estatística dos Tratamentos por Componentes Principais (PCA)

Verifica-se no gráfico biplot (figura 10) gerado dos dois primeiros componentes principais obtidos com os isolados no cultivar IAC 886, duas principais discriminações de tratamentos: 1/6144 e 2/6144 caracterizados por terem mais massa de matéria seca da parte aérea e maior quantidade de nódulos e 12/6144 e 15/6144 caracterizados por maior concentração de nitrogênio que os demais tratamentos. Os dois componentes principais retêm 89,79% (CP1 = 66,41% e CP2 = 23,38%) da variabilidade original.

Os resultados PCA indicaram ainda uma inclinação das espécies de *Rhizobium*, seja 6144 ou demais isolados, em relação ao incremento de massa seca e número de nódulos. O tratamento com o isolado 2, nesta distribuição, foi aquele que se posicionou de forma mais adequada quanto aos três parâmetros analisados.

Por outro lado, os tratamentos que envolveram os demais isolados de *Burkholderia* em combinação com 6144 apresentaram uma distribuição tendenciosa agrupando-se em relação ao parâmetro de acúmulo de nitrogênio (figura 10). O incremento no acúmulo de nitrogênio causado por estirpes de *Burkholderia* pode ser sugerido pela sua produção considerável de AIA (tabela 5) que pode atuar como um fator positivo no desenvolvimento vegetal, em particular nas raízes, e, portanto na fixação do nitrogênio pelos rizóbios.

A análise de componentes principais referente ao tratamento com os isolados no cultivar IAC Tatu-ST não discrimina nenhum tratamento com acúmulo de nitrogênio

(figura 11). Contudo, o tratamento com o isolado 2 demonstra o mesmo padrão quanto ao observado para o cultivar IAC 886, nesta distribuição (figuras 10 e 11). Mesmo o tratamento 15/6144 apresentando médias expressivas para os três itens, os valores não foram satisfatórios para ambos os cultivares.

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.

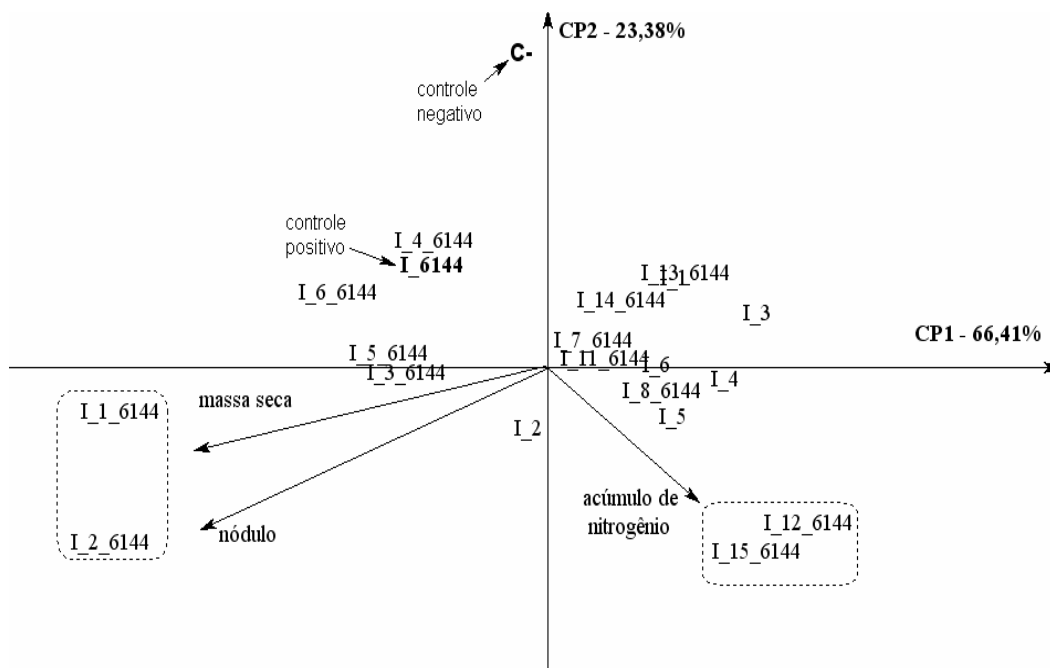


Figura 10. Gráfico biplot dos tratamentos na cultivar IAC 886 pelas características nódulo da raiz, nitrogênio foliar e massa de matéria seca da parte aérea da planta.

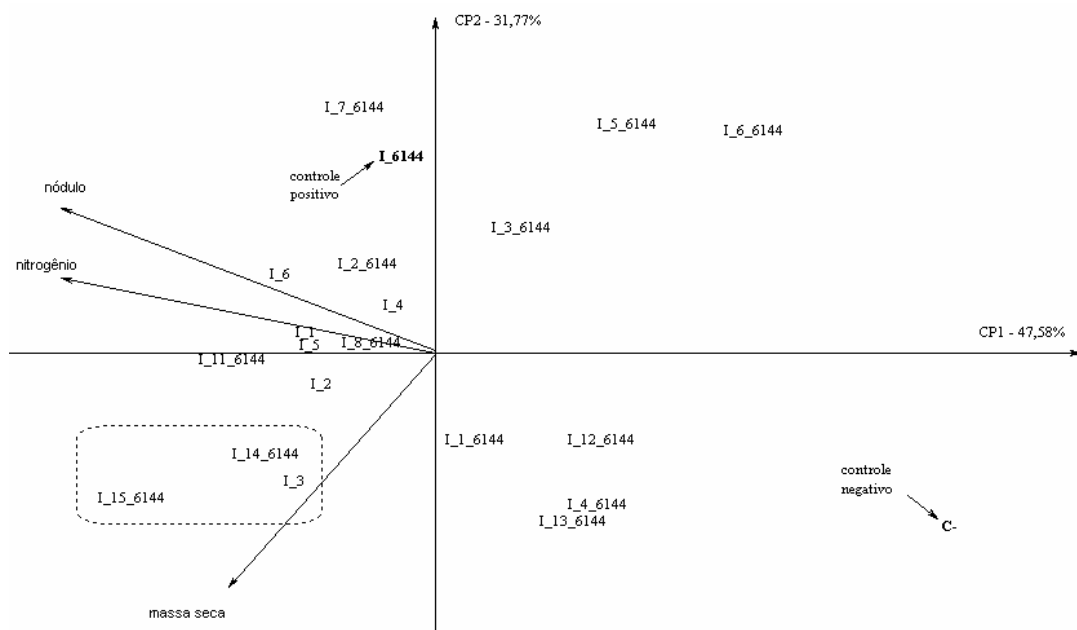


Figura 11. Gráfico biplot dos tratamentos na cultivar Tatu-ST pelas características nódulo da raiz, nitrogênio foliar e massa de matéria seca da parte aérea da planta.

V. CONCLUSÕES

Diante das condições e dos resultados obtidos durante a realização deste trabalho, pode-se concluir:

- Os isolados bacterianos obtidos a partir de nódulos de amendoim apresentam diversidade nas características morfológicas, bioquímicas e isoenzimáticas que possibilitam sua classificação.
- A análise eletroforética da isoenzima α -esterase pode auxiliar na caracterização dos isolados pela resposta na produção desta proteína.
- A análise das seqüências do fragmento 16S rDNA dos isolados demonstra similaridade com as seqüências das espécies de *Rhizobium* e *Burkholderia*.
- O cultivar IAC 886 apresenta 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 tipo SEMIA 6144.
- A aplicação dos tratamentos como inoculante nos cultivares proporciona o aumento do número de nódulos, da massa de matéria seca e a fixação biológica do nitrogênio.
- Os tratamentos 15/6144 e principalmente o tratamento 2 são os recomendados para teste em campo, por apresentar, juntamente com a estirpe tipo 6144 inoculado isoladamente a melhor adaptação em ambos os cultivares.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ALFENAS, A.C., BRUNE, W., OLIVEIRA, J.R., KUNIEDA, S. e SCORTICHINI, M. Extração de proteínas para eletroforese. In: Alfenas, A.C. (Ed.) Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV. p. 85-113, 1998.

ALLEN, O . N.; ALLEN, E. K. The leguminosae; a source book of characteristics, uses, and nodulation. Madison: **The University of Wisconsin Press**,. p. 812, 1981.

ALSTSCHUL, S. F., MADDEN, T.L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. and 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.

AMANN, R, AND LUDWIG, W.. **Ribossomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology.** *FEMS Microbiology Ecology*, Rev. v. 24, 555-565, 2000.

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K-H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Review**, Washington, v. 59, p 143-169, 1995.

ANDRADE. R.N,B.; SOBRINHO, E.H. Caracterização de cultivares de soja através da técnica eletroforética. **Revista Brasileira de Sementes**. Brasília, v.2, p.97-104, 1980.

AYLA, B. L. B.; VELÁSQUEZ, L. **Evaluacion agronômica de once (11) cepas de Rhizobium sp. Inoculadas em mani (*A. hipogaea*) cultivado em suelos de los llanos orientales de Venezuela**. In: IX Reunion Latinoamericana sobre Rhizobium, México, p. 31-44, 1978.

BATAGLIA, O.C.; FURLANI, A.M.C.; TEIXEIRA, J.P.F.; FURLANI, P.R.; GALLO, J.R. Métodos de Análise Química de Plantas. Campinas: Ins. **Título Agronômico**, (Boletim Técnico, 78), p. 48, 1983.

BERINGER, J. E. R. Factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**, v. 84, p, 188-198, 1974.

BERRIATUA, E.; ZILUAGA, I.; MIGUEL-VIRTO, C.; URIBARREN, P.; JUSTE, R.; LAESENS, S.; VANDAM-ME, P.; GOVAN, J.R. Outbreak of subclinical mastitis in a flock of dairy sheep associated with *Burkholderia cepacia* complex infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 990-994, 2001.

BIDDICK, R.; SPILKER, T.; MARTIN, A.; LIPUMA, J.J. Evidence of transmission of *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia dolosa* among persons with cystic fibrosis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 228, p. 57-62, 2003.

BORNEMAN, J., SKROCH, P. W., O'SULLIVAN, K. M., PALUS, J. A., RUMJANEK, N. G., JANSEN, J. L., NIENHUIS, J. and TRIPLETT, E. W.. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1935-1943, 1996.

BROCKWELL, J., GAULT, R., MORTHORPE, L. J., PEOPLES, M. B., TURNER, G. L., and BERGERSEN, F. J. Effects of soil nitrogen status and rate of inoculation on the establishment of populations of *Bradyrhizobium japonicum* and on the nodulation of soybeans. **Australian Journal of Agricultural Research**, Volume 40 (Issue 4), p. 753-762, 1988.

BROEK, A.V. Auxins upregulate expression of the indole-3- Pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 181, p. 1338-1342, 1999.

BURKHOLDER, W. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. **Phytopathology**, v. 40, p. 115-118, 1950.

CARDY, B.J.; BEVERSDORF, W.D. Identification of soybean cultivars using isoenzyme electrophoresis. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.12, p.943-954, 1984.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <http://www.conab.gov.br> Acesso em: 11 nov. 2008.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro, 1926.

DATE, R.A; NORRIS, D.O. *Rhizobium* screening of *Stylosanthes* species for effectiveness in nitrogen fixation. **Australian Journal Agriculture Reserch.**, Collingwood, v. 30, p. 85-104, 1979.

DAVIES, P. J. **Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action**. Kluwer Academic Publishers, p. 750, 2004.

EMBRAPA CERRADOS. Délcio Rocha. Ambiente em Foco. É preciso fazer adubação nitrogenada suplementar tardia na soja cultivada em Latossolos do Cerrado?, 12 novembro, 2008.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Manual de Métodos para Análise de solos Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. 2. ed. Rio de Janeiro: **Centro Nacional de Pesquisa do Solo**, 1999.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Disponível em <http://faostat.fao.org> Acesso em 01 mar. 2007.

GIARDINI, A. R. Efeitos da população natural de *Rhizobium* sp, estirpes selecionadas, e época de aplicação de nitrogênio, na produção de amendoim (*Arachis hypogaea* L.). **Dissertação** (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas)- **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba**, 1980.

GODOY, I. et al. Cultivares IAC de amendoim. **O Agrônômico**, v. 55, n.1, Campinas, 2003.

GODOY, I, J., IAC Tatu-ST, amendoim com maior produtividade. **IAC – Centro de Plantas Graníferas. O Agrônômico**, v. 52, nº2/3), Campinas, 2000.

GORDON, D., ABAJIAN, C., GREEN, P. Consed: A Graphical Tool for sequence Finishing. **Genome Research**, Toronto, v. 8, p. 195-202, 1998.

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

GRAY, E.J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracelular PGPR:commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 37, p. 395-412, 2005.

HAIR JF, ANDERSON RE, TATHAM RL, BLACK W. **Análise Multivariada de dados**. 5 ed. Porto Alegre; 2005.

HARTREE, E.F. Determination of protein a modification of the Lowry Method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, Cambridge, v.48, p.422-427, 1972.

HENTSCHEL, U. et al. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.09, p. 4431-4440, 2002.

HOLMES, A.; GOVAN, J.; GOLDSTEIN, R. Agricultural use of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*: a threat to human health? **Emerging Infectious Diseases**, v.12, 1998.

HOLMES, B., VANDAMME, P., MAHENTHIRALINGAM, E.,. Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp nov (formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV). **Journal Clinical Microbiology**. V. 38, p. 1042-1047, 2000.

HOPKINS, W. G. **Introduction to Plant Physiology**. 2.ed. New York: John Wiley, P. 512, 1999.

HUANG, H.Q. The effect of *Rhizobium* inoculation on Tianfu peanut. **Journal Sichuan Agricultura**. Uni. 5, p. 191–195, 1987.

HUANG, H.Q. Selection and Application of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and *Rhizobium* sp. (*Arachis*) strains. **Journal Sichuan Agriculture**. Uni. 6, p. 287–290, 1988.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. de S.; CHUEIRE, L.M. de 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.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A.R.; PERES, J.R.R. Fixação biológica do nitrogênio na soja. In: ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. In: Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. **Avanços obtidos nos estudos sobre microorganismos do solo de importância agrícola**. Brasília: Embrapa, 1994.

Instituto Agrônômico – O Agrônômico, IAC – Centro de Plantas Graníferas. Campinas (SP), p. 21-22, 2000.

Instituto Agronômico – O Agrônomo. Centro APTA de Grãos e Fibras – Caixa postal 28, 13020-902 – Campinas (SP), p. 26-29, 2003.

KENT, A. D.; TRIPLETT, E. W. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v.56, p. 211-36, 2002.

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.

LAEMMILI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.117, p.680-685, 1970.

LEBUHN, M; HARTMANN, A. Method for the determination of indole-3-acetic acid and related compounds of L-tryptohan catabolism in soils. **Journal of Chromatography**, Amisterdam, v.629, p.255-266, 1993.

LEITE, V. M.; ROSOLEM, C. A.; RODRIGUES, J. D. Gibberellin and cytokinin effects on soybean growth. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.60, n.3, p. 537-541, jul./set. 2003.

LEPPIK, E. E. **Floral evolution in relation to pollination ecology**., p. 164, 1977.

LUDWIG, W. BAUER, M., HELD, I., KIRCHHOF, G., SCHULZE, R., HUBER, I., SPRING, S., HARTMANN, A., SCHLEIFER, K. H. Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. **FEMS Microbiology**, v.153, p. 181-190, 1997.

MARTINS, L.M.U. et al. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the northeast of Brazil. **Soil Biological Biochemistry**., Oxford, v. 29, p. 1005-1010, 2003.

MONTANS, F. M.. Inoculação e aplicação de regulador vegetal em amendoim Runner IAC 886 em solos de diferentes texturas. Marília: UNIMAR, 2006. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade de Marília, 2006.

NEVES, M. C. P.; HUNGRIA, M. The physiology of nitrogen fixation in tropical grain legumes. **CRC Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v. 6, p. 267-321, 1987.

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

ONA, O. et al. Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. **Fems Microbiology Letters**, Oxford, v.246, p. 125-132, 2005.

OSMAN, A. K. et al. Effect of leaf removal on symbiotic nitrogen fixation in peanut. **Peanut Science**, v.10, p.107-110, 1983.

PAUKSENS, J. Determination of cultivars. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.6, p.579-583, 1978.

PASTEUR, N.; PASTEUR, G.; BONHOMME, F.; CATALAN, J.; BRITTONDAVIDIAN, J. **Practical Isoenzyme Genetics**. New York: Ellis Horwood, p. 215, 1988.

PEREIRA, R. M.; SILVEIRA, E. L. ; VAI MORAES, S. P. ; PEDRINHO, E. A. N. ; SCAQUITTO, D. C. ; WICKERT, E. ; ALVES, L. M. C. ; LEMOS, E. G. M . Molecular Characterization of Bacterial Populations of Different Soils. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 37, p. 439-447, 2006.

QUAGGIO, J. A.; GODOY, I. J. Amendoim. In: RAIJ, B. van; SILVA, N. M.; BATAGLIA, O. C.; QUAGGIO, J. A.; HIROCE, R.; CANTARELLA, H.; BELLINAZZI JÚNIOR, R.; DECHEN, A. R.; TRANI, P. E. (Ed.) **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Campinas: Instituto Agronômico, p.192. (Boletim técnico, 100), 1997.

RANJARD, L., POLY, F., LATA, J. C., MOUGEL, C., THIOULOUSE, J., and NAZARET, S,. Characterization of Bacterial and Fungal Soil Communities by Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis Fingerprints: Biological and Methodological Variability. **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 67, nº. 10, p. 4479-4487, October 2001.

RAPPÉ, M. S. and GIOVANNONI, S. J. **The Uncultured Microbial Majority**. *Annual Reviews Microbiology*. v. 57, 369-394, 2003.

ROLIM, A. A. B. Óleos vegetais: usos gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 7, n. 82, p. 17-22, 1981.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Gel electrophoresis of DNA. In: Nolan, C. (Ed.) **Molecular Cloning a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v.1, p. 6.1-6.62, 1989.

SANTOS, C. E. R. et al. Efetividade de rizóbios isolados de solos da região do Nordeste do Brasil na fixação do N₂ em amendoim (*Arachis hypogaea*). **Acta Scientiarum Agronomica**, Maringá, v. 27, n. 2, p. 301-307, Abril/Jun 2005.

SANTOS, C.E.R.S. et al. 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, 2001.

SCHULTZE, M.; KONDOROSI, E.; RATET, P.; BUIRÉ, M.; KONDOROSI, A. Cell and molecular biology of *Rhizobium* – plant interactions. **International Review Cytology**, New York, v.156, p.1-75, 1994.

SIQUEIRA, J. O. et al. **Microorganismos e Processos Biológicos do Solo: Perspectiva Ambiental**. Embrapa, Brasília, p. 142, 1994.

SILVEIRA, E. L.; PEREIRA, R. M. ; SCAQUITTO, D. C. ; PEDRINHO, E. A. N. ; VAL MORAES, S. P. ; LEMOS, E. G. M.; ALVES, L. M. C. . Bacterial diversity of soil under eucalyptus assessed by 16S rDNA sequencing analysis. *Pesquisa Agropecuária Brasileira (Online)*, v. 41, p. 1507-1516, 2006.

SINGLETON, P.; THIES, J.; BOHLOOL, B. B. Useful models to predict response to legume inoculation. In: Mulongo, Y.K.; Gueye, M.; Spencer, S. (Ed.). **Biological Nitrogen Fixation and Sustainability of Tropical Agriculture**. New York. John Wiley & Sons, Inc., 1992.

SHMIDT, T. Fingerprinting bacterial genomes using ribosomal RNA genes and operons. *Methods in Molecular and Cellular Biology*. New York, v.5, p. 3-12, 1994.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. Handbook for rhizobia: Methods in legume Rhizobium technology. **Paia: Niftal Project**. p. 450, 1994.

STAMFORD, N.P. et al. Avaliação de estirpes de rizóbio para jacatupé em regime de temperatura elevada. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Campinas, v. 19, p. 49-54, 1995.

STATISTICA. Data analysis software system. Version 8. **StatSoft**, Inc., 2007.
www.statsoft.com.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 2. ed Sunderland: Sinauer Associates, p. 792, 2004.

TAUER, L. W. Economic impact of future biological nitrogen fixation technologies on United States agriculture. **Plant and Soil**, The Netherlands, v. 119, p. 261-270, 1989.

THIES, J.E. et al. Subgroups of de Cowpea miscellany: symbiotic specificity within Bradyrhizobium spp. for *Vigna u-guiculata*, *Phaseolus lunatus*, *Arachis hypogaea* and *Macroptilium atropurpureum*. **Applied Environment Microbiology**., Washington, DC, v. 57, p. 1540-1545, 1991.

TSAVKELOVA, E.¹; KLIMOVA, S.; CHERDYNTSEVA, T.; NETRUSOV, A. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 117-126, 2006.

URTZ, B. E.; ELKAN, G. H. Genetic diversity among *Bradyrhizobium* isolates that effective by nodulate peanut (*Arachis hypogaea*). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, p1120-1132, 1996.

VALADARES-INGLIS, M.C.; MELO, I. S. Métodos de extração de DNA e sua aplicação em estudos genéticos e ecológicos. In: MELO, I. S; AZEVEDO, J.L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa/CNPMA, p. 187-204, 1998.

VIDOR, C. et al. Competição por sítios de infecção nodular entre estirpes de *Rhizobium japonicum* em cultivares de soja (*Glycine Max* (L) Merrill.). **Agronomic Sulriograndense**, Porto Alegre, v. 15, p. 227-238, 1979.

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

XAVIER G.R.; MARTINS, L.M.V.; RIBEIRO, J.R.A.; GOUVÊA, N.G. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. *Caatinga*, v.19, n.1, p.25-33, 2006.

ZAHAROVA E.A. et al. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. **European Journal Biochemistry**, Berlin, v. 259, p. 572- 576, 1999.

www.cpaembrapa.br/relare2008

www.ncbi.nlm.nih.gov

<http://bmp.fcav.unesp.br/blast>

<http://bmp.fcav.unesp.br/metagenoma>

<http://maps.google.com.br>

VII. APÊNDICE A**a. Meio DYG'S**

Glicose	2g
Peptona	1,5g
Extrato de Levedura	2g
KH ₂ PO ₄ .7H ₂ O	0,5
Acido Glutâmico	1,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5g

Completar para 1000mL com H₂O destilada e ajustar o pH 6.8

Meio sólido colocar a quantidade 9g/L de ágar bacteriano

b. Meio YM

Extrato de Levedura	0,5g
K ₂ HPO ₄	0,5g
Manitol	10g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2g
NaCl	0,1g

Completar para 1000mL com H₂O destilada, ajustar o pH 6.8

c. Meio TY

Extrato de Levedura	3g
Triptona	5g
KCl	0,87g

Completar para 1000mL com H₂O destilada, ajustar o pH 7,0

VIII. APENDICE B

geneid	Bankit	NCBI	score	Evalue	%
AF511502.1	JAB 6F	<i>Rhizobium sp.</i>	778	0.0	81
EU827473.1	JAB 9	<i>Burkholderia sp</i>	794	0.0	85
Y17009.1	JAB 10	<i>Burkholderia caribiensis</i>	1005	0.0	87
AY586519.1	JAB 10F	Burkholderia caribensis	783	0.0	83
AY586519.1	JAB 14F	Burkholderia caribensis	784	0.0	83
FJ593643.1	JAB 17	Uncultured Bacillus sp	2512	0.0	100
AY528711.1	JAB 18	Rhizobium sp	2590	0.0	100
EF509994.1	JAB 20	Uncultured bacterium	2700	0.0	100
EF088208.1	JAB 21	Burkholderia gladioli	2756	0.0	100
DQ922762.1	JAB 22	Dyadobacter	1450	0.0	100
AY435403.1	JAB 23	Klebsiella sp	1380	0.0	100
EF194089.1	JAB 24	Brevundimonas sp	2527	0.0	100
EF491544.1	JAB 25	Uncultured proteobacterium	1399	0.0	100
	JAB 26	No significant similarity found.			
EU771732.1	JAB 27	Uncultured bacterium	416	1e-112	75
DQ207364.1	JAB 28	Brevibacillus sp	884	0.0	84
EU082139.1	JAB 29	Bordetella sp	1187	0.0	90
EF509960.1	JAB 30	Uncultured bacterium	1094	0.0	88
EF509960.1	JAB 31	Uncultured bacterium	1193	0.0	91
DQ207364.1	JAB 32	Brevibacillus sp	1310	0.0	94
EU661699.1	JAB 33	Pseudomonas aeruginosa	985	0.0	87
DQ814882.1	JAB 34	Uncultured bacterium	953	0.0	87