

Resposta de cultivares de Amendoim Forrageiro à Inoculação com Micro-organismos Diazotróficos na Amazônia Sul Ocidental⁽¹⁾

**Marinete Flores da Silva⁽²⁾; Mirna Maria do Nascimento Pereira⁽³⁾;
Elias Melo de Miranda⁽⁴⁾;**

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos da FUNTAC; ⁽²⁾ Bolsista de Desenvolvimento Científico Regional CNPq, Embrapa Acre, Rodovia BR 364, km 14, CEP 69900-056 Rio Branco, Ac., E-mail: marineteflores@yahoo.com.br ⁽³⁾ Estudante do Curso de Biologia, União Educacional do Norte (UNINORTE), Rodovia BR 364 km 02, Alameda Hungria, 200 Jardim Europa CEP. 69.915-497 Rio Branco, Ac. ⁽⁴⁾ Pesquisador A, Embrapa Acre, Rodovia BR 364, km 14, CEP 69900-056 Rio Branco, Ac.

RESUMO: Microrganismos selecionados para eficiência na fixação de nitrogênio atmosférico podem promover economia de fertilizantes na cultura do amendoim forrageiro. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta de três cultivares e um acesso de amendoim forrageiro à inoculação de estirpes de rizóbio nativo em casa de vegetação. As cultivares Belmonte, Alqueire, Amarelo e o acesso SV5821 da Coleção Ativa de Germoplasma da Embrapa Acre foram inoculadas com 10^7 células mL^{-1} das estirpes R12M, R18M, 77A e BR1405. A coleta das plantas foi realizada aos 45 dias após a inoculação. Foi avaliada a massa da parte aérea seca, massa de raízes secas, número de nódulos e teor de nitrogênio. Aos 45 dias após a inoculação foi observado que as estirpes contribuíram para o acúmulo de massa seca por vaso, promovendo aumento médio de 556 mg.vaso^{-1} em relação ao controle. Para a massa de raízes foi observado incremento médio de 149 mg.vaso^{-1} sem diferença para o controle com N. As estirpes promoveram, para Amarelo e o SV5821, incrementos médios de 8 mg.vaso^{-1} no conteúdo de nitrogênio em relação aos demais tratamentos de inoculação sem diferença em relação aos controles. Amendoim forrageiro responde à inoculação com incrementos na fitomassa e nitrogênio.

Termos para indexação: *Arachis pintoi*, Fixação biológica de nitrogênio, Bactérias.

INTRODUÇÃO

Microrganismos diazotróficos podem contribuir na manutenção da fertilidade do solo, pois através da associação simbiótica com as plantas, promovem a fixação biológica do nitrogênio (FBN) atmosférico. Estima-se que esta contribuição seja de 139 milhões de Mg de N ano^{-1} , enquanto que a fixação química contribui com 49 milhões de Mg de N ano^{-1} e que a substituição de fertilizantes químicos pela inoculação com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* nos campos de soja, representou uma economia na casa dos US\$ 3,3 bilhões para

agricultura brasileira em 2006 (Moreira & Siqueira, 2008). A importância da FBN nos sistemas agrícolas é indiscutível, principalmente quando se trata de solos tropicais, onde as perdas nutricionais são mais elevadas e o nitrogênio se constitui num dos elementos mais limitantes para os vegetais.

A aplicação de fertilizantes químicos para minimizar a baixa fertilidade de grande parte dos solos amazônicos vai de encontro ao alto custo destes insumos, além das implicações ambientais que sugerem o uso comedido e até mesmo a inadequação dos insumos químicos em algumas áreas desta região, devido à fragilidade de boa parte de seus ecossistemas (Araujo et al., 2005). Considerando-se os preços de fertilizantes químicos, que são fatores limitantes também nas outras regiões brasileiras, por estarem diretamente relacionados ao preço do petróleo tornando, portanto, os custos de produção da atividade agrícola vulnerável à oscilação do mercado desta commodity, podendo comprometer a segurança alimentar e a competitividade do agronegócio brasileiro (Ministério da fazenda, 2013). Estes fatos demonstram que um dos grandes desafios da agricultura moderna é o investimento em inovações tecnológicas eficientes, tanto do ponto de vista econômico quanto ambiental, para garantir a oferta de alimentos para o crescente consumo interno e externo.

Desta forma, estudos de comunidades microbianas associadas à identificação e o desenvolvimento de genótipos de plantas, que favoreçam processos biológicos como fontes de nutrientes, tornam-se estratégico para sustentabilidade agrícola, possibilitando a redução dos custos de produção dos alimentos e a redução do consumo de energia de fontes não renováveis. Assim, o processo de FBN apresenta-se como uma tecnologia importante, para o suprimento de nitrogênio. Entretanto, muito ainda precisa ser feito para que o sucesso deste processo seja estendido para outras plantas leguminosas e não-leguminosas, como observado na cultura da soja

brasileira, sendo este um grande desafio da pesquisa agropecuária.

Sendo assim, manejar ecologicamente os micro-organismos do solo torna-se uma prática potencialmente viável, podendo contribuir para preservar e aumentar a sustentabilidade dos sistemas agrícolas na Amazônia (Caheté, 2005). Salienta-se que a pesquisa nesta área do conhecimento na Amazônia está em fase inicial, sendo necessário intensificar os estudos de prospecção, isolamento, seleção e aplicação de microssimbiontes para uso agrícola, explorando a grande diversidade, ainda desconhecida, de micro-organismos desta vasta região.

No estado do Acre o uso do amendoim forrageiro para o manejo e recuperação de pastagens já é uma prática consolidada e vem trazendo muitos benefícios à economia da região (Miranda et al., 2012). Todavia, esta espécie pode ser utilizada para diversas outras finalidades, como a adubação verde, em sistemas de produção agroecológicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta de três cultivares e um acesso de amendoim forrageiro frente a inoculação de três estirpes de rizóbio nativo e uma de *Bradyrhizobium*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em substrato areia e vermiculita (1:1) em casa de vegetação da Embrapa localizada na BR 364 km 14, no 2º distrito do município de Rio Branco-AC. Foi utilizado o delineamento em blocos ao acaso, com 30 tratamentos e 4 repetições. Os tratamentos foram arrançados em esquema fatorial, sendo combinadas quatro cultivares de amendoim forrageiro (Belmonte, Mandobi, Alqueire, Amarelho), mais o acesso SV5821, obtidos da coleção ativa de germoplasma da Embrapa Acre, com quatro estirpes de rizóbio, mais os controles sem inoculação e fertilizado com nitrogênio, na forma de NH_4NO_3 com 100 mg de N.vaso⁻¹.

As estirpes utilizadas foram as seguintes: R18M, R12M; 77A, isoladas de materiais presentes na coleção de amendoim forrageiro da Embrapa, de acordo com a metodologia de Hungria (1994) mais a estirpe de *Bradyrhizobium* sp. BR 1405 (testemunha positiva) fornecida pela curadora da coleção da Embrapa Agrobiologia.

As estirpes foram cultivadas em frascos erlenmeyer contendo meio de cultivo, YM (Fred & Walksman, 1928) pH 6,8 sob agitação de 175rpm a 28°C por 24h. Posteriormente ao crescimento dos micro-organismos, foi feita a contagem do número de células viáveis utilizando a técnica da microgota de acordo com (Miles & Misra, 1938). Os estolões de amendoim forrageiro foram padronizados para 20 cm de comprimento, lavados em água corrente, água destilada e autoclavada, sendo em seguida

pré-enraizados em água destilada e autoclavada por 16 dias.

Foram plantados três estolões por vaso, em seguida foram inoculados 2 mL da suspensão bacteriana, através de um orifício no substrato e ao lado dos estolões, com cerca de 10^7 células mL⁻¹. O tratamento fertilização com nitrogênio mineral foi feito concomitantemente ao de inoculação. Os vasos foram molhados semanalmente.

O experimento foi avaliado aos 45 dias após a inoculação e as plantas foram separadas em: parte aérea, raízes e nódulos. Foram avaliados: matéria seca da parte aérea, raízes, número dos nódulos, e acúmulo de nitrogênio na parte aérea. Parte aérea, raízes e nódulos foram levados à estufa de secagem a 65°C até estabilização da massa quando foram pesadas para determinação da matéria seca e N-total, na parte aérea da planta. O nitrogênio foi analisado pelo método semimicro Kjeldahl (Alves et al., 1994). Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% e 1% de probabilidade, e as análises foram realizadas pelo programa SAEG e SISVAR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado efeito significativo da inoculação das estirpes sobre a produção de massa de matéria seca de parte aérea, de raízes, número de nódulos e nitrogênio total das cultivares aos 45 dias após a inoculação (Tabela 1). Na média, o aumento da produção de massa de matéria seca da parte aérea, nos tratamentos com significância foi de 556 mg.vaso⁻¹ em relação ao controle absoluto, e foi igual ao controle nitrogênio.

Quanto à produção de massa de raízes seca, foi observado um incremento médio de 149 mg.vaso⁻¹ nos tratamentos com significância em relação ao controle absoluto, sem diferença para o controle nitrogenado. Em relação ao número de nódulos houve diferença significativa entre os tratamentos para as cultivares analisadas (Tabela 1). Na média, o número de nódulos, nos tratamentos com significância foi 14 nódulos em relação aos demais tratamentos inoculados, embora não tenha sido observado diferença significativa em relação aos controles o que demonstra ter havido contaminação com bactérias entre tratamentos. No trabalho de inoculação para avaliar a FBN em cultivares de feijão caupi realizado (Melo et al., 2009) foi observado o mesmo comportamento.

Com relação ao nitrogênio na planta (Tabela 1) foi observado acúmulo médio significativo entre tratamentos para a cultivar Amarelho e o acesso Sv8521 em relação às demais cultivares, embora não tenha sido observado diferença estatística significativa em relação aos controles. A observação

de significância estatística para os controles pode estar relacionada à contaminação por bactérias o que sugere uma nova avaliação desse experimento.

De acordo com Purcino et al., (2013) a inoculação de estirpes de rizóbio SEMIA 6439 e SEMIA 6440 em sementes de *Arachis pintoi* em uma área de cerrado degradada, no primeiro ano de cultivo promoveu aumentos de produção de até 54% na matéria seca e de 74% no teor de nitrogênio na parte aérea comparada com a testemunha nodulada com estirpes nativas.

Resultados contrastantes foram encontrados por (Bogino et al., 2006) que ao avaliarem o efeito da inoculação de três estirpes de *Bradyrhizobium* sp. na nodulação e produção de amendoim comum em solos Argentinos, verificaram que a estirpe C-145 foi a mais promissora tanto em condições controladas quanto nos experimentos de campo produzindo maior número de nódulos quando inoculada diretamente nas sementes do amendoim ou na linha de plantio. Entretanto, a produção da cultura não foi influenciada por nenhum dos dois tipos de inoculação devido ao alto número de estirpes de *Bradyrhizobium* encontrados no solo, pois promoveu um alto grau de nodulação e fixação sendo suficiente para a máxima nodulação e produção em condições de campo superando a inoculação.

O efeito da inoculação de *Bradyrhizobium* sp. USDA 3187 em sementes de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) a campo foi avaliado por Bogino et al. (2006), sendo verificado que as plantas de amendoim foram mais noduladas pelas estirpes de ocorrência natural no solo do que pela estirpe inoculada, o que demonstrou que a estirpe USDA 3187 de *Bradyrhizobium* sp foi menos competitiva. Entretanto, verificaram que não houve diferença significativa na massa seca dos nódulos, biomassa seca, atividade da nitrogenase e produção de sementes tanto nos tratamentos de inoculação quanto nos não inoculados.

Os mesmos autores, inoculando estirpes de *Bradyrhizobium* sp em vermiculita e em sementes de amendoim comum, utilizaram ferramentas moleculares e a resistência a antibiótico como métodos para analisar a competitividade entre as estirpes de *Bradyrhizobium* introduzidas e nativas na nodulação de amendoim na Argentina, verificaram aumento do número de nódulos por plantas e a ocupação dos nódulos foi maior em plantas crescidas no substrato vermiculita. No experimento a campo, verificaram que somente 9% dos nódulos totais foram formados por bactérias inoculadas diretamente em semente de amendoim. Entretanto, 78% dos nódulos foram formados por bactérias inoculadas nas raízes das plântulas no campo.

CONCLUSÃO

A aplicação das bactérias em experimentos de curto prazo em casa de vegetação demonstra ser eficiente no processo de colonização das bactérias inoculadas, refletindo no incremento de massa de parte aérea, massa de raízes e acúmulo de nitrogênio na cultura do amendoim forrageiro aos 45 dias após a inoculação.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão da bolsa de DCR, a FUNTAC pelo apoio financeiro e a Embrapa Acre pelo apoio no desenvolvimento do projeto.

REFERÊNCIAS

- ALVES, B.J.R.; SANTOS, J.C.F. dos; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Métodos de determinação do nitrogênio em solo e planta. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S. ed. Manual de métodos empregados em estudo de microbiologia agrícola. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. p.449-409.
- ARAÚJO, E. A.; AMARAL, E. F.; WADT, P.; LANI, J. L. Aspectos gerais dos solos do Acre com ênfase ao manejo sustentável. In: Paulo Guilherme Salvador Wadt. (Org.). Manejo de solo e recomendação de adubação para o estado do Acre. Rio Branco: Embrapa/CPAF-Acre, 2005, p. 10-38.
- BOGINO, P.; BANCHIO, E.; RINAUDI, L.; CERIONI, G.; BONFIGLIO, C.; GIORDANO, W. Peanut (*Arachis hypogaea*) response to inoculation with *Bradyrhizobium* sp in soils of Argentina. *Annals of Applied Biology*, 2006, p. 207-212.
- CAHETÈ, F.L.S. Sustentabilidade dos sistemas agrícolas: Uma análise no context da agrobiodiversidade. Um estudo de caso na Amazônia Oriental. Belém, PA, 2005, 195 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Pará.
- FRED, E. B. & WAKSMAN, S.A. Yeast extract-mannitol Agar for laboratory manual of general microbiology. New York: McGraw Hill, 1928. 145p.
- HUNGRIA, M. ARAÚJO, R. S.; JAMES, E. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Brasília: Embrapa/SPI, 1994. 542 p.
- LIAO, C.F.H. Devard's alloy method for total nitrogen determination. *Soil Science Society of American Journal*, v.45, p.852-855, 1981.
- MILES, A. A. & MISRA, A. A. The stimulation of the bacteria Power of blood. *Journal of Hygiene, Jena*, v. 38, p. 732-749, 1938.
- MELO, S. R. & ZILLI, J. E. Fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijão caupi. *Pesq.agropec.bras.* Brasília, v.44, n.9, p.1177-1183. 2009.

MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. 2. ed. Atual ampl: Lavras, UFLA, 2008. 729p.

MIRANDA, E.M.; VALENTIM, J. F.; ANDRADE, C. M. S.; ASSIS, G.M.L. Potencialidades do amendoim forrageiro na recuperação de pastos e roçados degradados na Amazônia Ocidental. In: Araújo, E.A.; Lani, J.L.. (Org.). Uso Sustentável de Ecossistemas de Pastagens Cultivadas na Amazônia Ocidental. Rio Branco: SEMA, 2012. p. 109-118.

PURCINO, H. M. A.; SÁ, N. M. H.; VARGAS, M. A. T. e MENDES, I. C. Inoculação com rizóbio: Como melhorar o

desempenho do amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*). Disponível em: <<http://www.fazendeiro.com.br/cietec/artigos/ArtigosTexto.asp?codigo=81>>. Acesso em: 07 mar.2013.

MINISTÉRIO DA FAZENDA. Panorama do mercado de fertilizantes. Disponível em <http://www.seae.fazenda.gov.br/.../i_fert_fertseae_2011_fertilizanteglauco.pdf>. Acesso em 07 mar.2013.

VINCENT, J. M. A manual for the practical study of root nodule bactéria. Oxford: Blackwell Scientific, 1970, 164p.

Tabela 1: Avaliação da inoculação de isolados de rizóbio em diferentes cultivares de amendoim forrageiro aos 45 dias após a inoculação.

Tratamentos	Cultivares			
	Belmonte	Aqueire	Amarilho	SV5821
Massa da parte aérea seca (g.vaso ⁻¹)				
R18M	0,66 b	0,54 b	0,76 b	1,31 a
77A	1,12 a	0,51 b	1,03 b	1,46 a
R12M	0,78 b	0,78 b	1,42 a	0,76 b
BR1405	0,98 b	0,83 b	1,52 a	0,53 b
Controle absoluto	0,81 b	0,81 b	0,81 b	0,81 b
Controle nitrogenado	1,38 a	1,38 a	1,38 a	1,38 a
CV (%)	34,07			
Massa de raízes secas (g.vaso ⁻¹)				
R18M	0,19 b	0,24 a	0,12 b	0,20 b
77A	0,25 a	0,23 a	0,28 a	0,21 b
R12M	0,27 a	0,24 a	0,23 a	0,18 b
BR1405	0,24 a	0,15 b	0,35 a	0,17 b
Controle absoluto	0,11 b	0,11 b	0,11 b	0,11 b
Controle nitrogenado	0,24 a	0,24 a	0,24 a	0,24 b
CV (%)	24,50			
Número de nódulos				
R18M	8,8 b	13,8 b	3,3b	21,5 b
77A	23,3 b	12,8 b	29,0 a	24,0 b
R12M	11,5 b	12,0 b	26,0a	17,5 b
BR1405	8,5 b	32,3 b	31,3 a	9,5 b
Controle absoluto	19,8 b	19,8 b	19,8 a	19,8 b
Controle nitrogenado	16,3 b	16,3 b	16,3 a	16,3 b
CV (%)	60,83			
Nitrogênio total (mg.vaso ⁻¹)				
R18M	21,1 b	27,0 b	19,5 b	27,1 a
77A	22,4 b	23,5 b	18,9 b	19,1 b
R12M	23,1 b	22,3 b	31,0 a	24,2 a
BR1405	26,0 b	26,3 b	29,8 a	19,1 b
Controle absoluto	27,7 b	27,7 b	27,7 a	27,7 a
Controle nitrogenado	30,0 b	30,0 b	30,0 a	30,0 a
CV (%)	7,9			

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott com $p < 0,05$.