

**EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE RIZÓBIOS ISOLADOS DE SOLOS
AMAZÔNICOS EM AMENDOIM FORRAGEIRO**

DANIELLA DE VASCONCELOS DA SILVA

DANIELLA DE VASCONCELOS DA SILVA

**EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE RIZÓBIOS ISOLADOS DE SOLOS
AMAZÔNICOS EM AMENDOIM FORRAGEIRO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Agricultura no Trópico Úmido.

Orientador: Dr. Aleksander Westphal Muniz

Coorientador: Dr. Everton Rabelo Cordeiro

MANAUS-AM
2020

Folha de aprovação



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA NO TRÓPICO ÚMIDO

MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



Folha de aprovação

A Banca Julgadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

TÍTULO: "EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE RIZÓBIOS ISOLADOS DE SOLOS
AMAZÔNICOS EM AMENDOIM FORRAGEIRO

AUTOR (A):

DANIELLA VASCONCELOS DA SILVA

BANCA JULGADORA:

Cláudia Majlo

Dra Dra. Cláudia Majlo (EMBRAPA)
(Membro)

Inocêncio Junior de Oliveira

Dr. Inocêncio Junior de Oliveira (EMBRAPA)
(Membro)

Enilson Luis Saccol de Sá

Dr. Enilson Luis Saccol de Sá (UFRGS)
(Membro)

Manaus, 11 de dezembro de 2020

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA NO TRÓPICO ÚMIDO - PPG ATU
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA
Av. André Araújo, nº 2936 – Bairro: Petrópolis – Manaus/Am CEP: 69.067-375
Fone: (92) 3643-1844
Site: <http://pg.inpa.gov.br> e-mail: ppgatu@gmail.com

SILVA e Silva, Daniella de Vasconcelos
EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE RIZÓBIOS ISOLADOS DE SOLOS AMAZÔNICOS EM AMENDOIM FORRAGEIRO / Daniella de Vasconcelos Silva; orientador Dr. Aleksander Westphal Muniz MUNIZ; coorientador Dr. Everton Rabelo Cordeiro CORDEIRO. -- Manaus:[s.l], 2020. 47 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós Graduação em Agricultura do Trópico Úmido) -- Coordenação do Programa de Pós-Graduação, INPA, 2020.

1. Microbiologia do solo. 2. Rizóbios. I. MUNIZ, Dr. Aleksander Westphal Muniz, orient. II. CORDEIRO, Dr. Everton Rabelo Cordeiro, coorient. III. Título.

CDD: 630

SINOPSE

Estudou-se a eficiência simbiótica de rizóbios de Amendoim Forrageiro, *Arachis pintoi* em casa-de-vegetação.

Palavras – chave: Rizóbios, Amendoim, Simbiose.

Dedicatória

A ao pai celestial, a meus orientadores do decorrer do curso, a minha querida mãe, a minha linda filha Laura, bem como a todos os meus familiares e amigos (a) e a banca examinadora.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao pai celestial em primeiro lugar, por sempre me conceder esperança e me confortar em todos os momentos difíceis durante o curso de mestrado.

A minha querida mãe Maria Ivaneide Vasconcelos que sempre me incentivou, me apoiou e me mostrou o que era o certo, que sempre me fez acreditar que eu era capaz de conseguir tudo que almejava, bastava traçar uma meta, focar e me esforçar para alcançar tais objetivos, que esteve presente em todos os momentos da minha vida, eu sou imensamente grata a minha querida mãe.

A minha linda filha Laura, por sua existência a qual tem me dado força e ânimo para continuar a lutar pelos meus sonhos.

As minhas irmãs Maria Salomé, Maria Socorro e Lucina pelo grande apoio psicológico, bem como ao ricos conselhos, obrigada minhas irmãs.

Aos meus amigos de mestrado PPG-ATU 2018 e da Embrapa, pela compreensão, aprendizagem e carinho.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, em especial ao Curso de Pós-graduação em Agricultura no Trópico Úmido, pela oportunidade de aprofundar meu conhecimento científico.

A Fundação de amparo a Pesquisa no Estado do Amazonas (FAPEAM) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao meu companheiro de laboratório Luiz Neto, pela parceria, companheirismo e respeito.

A Dra. Cláudia pela orientação, suporte, amizade e por todos os ensinamentos no laboratório.

Ao Dr. Everton Rabelo Cordeiro pela orientação e suporte na ausência do Dr. Aleksander Muniz.

Ao meu orientador professor Dr. Aleksander Westphal Muniz e aos demais colaboradores da Embrapa Ocidental. E por fim, a todos que contribuíram para eu chegar aqui. A todos que acreditaram em mim, que sempre me deram força, que sempre olharam para mim e me fizeram crer que eu conseguiria. Obrigada a todos vocês!

RESUMO

Arachis pintoi é uma leguminosa de pequeno porte, muito utilizada em consórcio com pastagem, na recuperação de áreas degradadas, conhecida pela boa associação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio. Apesar do potencial de uso dessa espécie, as informações acerca da seleção de estirpes para amendoim forrageiro adaptadas as condições edafoclimáticas da região amazônica ainda são escassas. Assim, buscou-se avaliar a eficiência simbiótica de rizóbios obtidos de diversos solos da região amazônica para *Arachis pintoi* cv. Amarillo em casa de vegetação após 45 dias, considerando como controle as cepas SEMIA 6439 e SEMIA 6440 recomendadas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento em condições de Cerrado Brasileiro. Para tanto, este trabalho foi elucidado no artigo intitulado **Eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos Amazônicos em Amendoim Forrageiro**, apresenta resultados da caracterização morfológica, dos testes bioquímicos, bem como da produção de ácido indolacético e da eficiência simbiótica dos isolados testados. Verificou-se que a maioria dos isolados possui características morfológicas idênticas as estirpes controle, que apresentaram cor vermelha quanto ao teste de coloração de Gram, com variação quanto à presença e ausência das enzimas oxidase e catalase. Todas as estirpes produzem ácido indolacético em quantidades variadas, doze estirpes de diferentes solos se mostraram eficientes na fixação biológica de nitrogênio com resultado superior as estirpes recomendadas e a testemunha nitrogenada.

Palavras – chave: Fixação biológica de nitrogênio, ácido indolacético, leguminosa forrageira.

SYMBIOTIC EFFICIENCY OF FORAGE PEANUT RHIZOSES IN HOUSE OF VEGETATION

ABSTRACT

Arachis pintoi is a small legume, widely used in consortium with pasture, in the recovery of degraded areas, known for its good symbiotic association with nitrogen-fixing bacteria. Despite the potential use of this species, information on the selection of forage peanut strains adapted to the edaphoclimatic conditions of the Amazon region is still scarce. Thus, we sought to evaluate the symbiotic efficiency of rhizobia obtained from different soils in the Amazon region for *Arachis pintoi* cv. Amarillo in a greenhouse after 45 days, considering the control strains SEMIA 6439 and SEMIA 6440 recommended by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply under conditions of Brazilian Cerrado. For this purpose, this work was elucidated in the article entitled Symbiotic efficiency of rhizobia isolated from Amazonian soils in Peanut Forrageiro, presents results of the morphological characterization, biochemical tests, as well as the production of indolacetic acid and the symbiotic efficiency of the tested isolates. It was found that the majority of the isolates have morphological characteristics identical to the control strains, which showed red color in relation to the Gram stain test, with variation in the presence and absence of the oxidase and catalase enzymes. All strains produce indolacetic acid in varying amounts, twelve strains from different soils proved to be efficient in biological nitrogen fixation with a result superior to the recommended strains and the nitrogen control.

Keywords: Biological nitrogen fixation, indolacetic acid, forage legume.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	09
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN)	10
2.2 AS LEGUMINOSAS	11
2.3 AMENDOIM FORRAGEIRO	12
2.4 FBN EM AMENDOIM FORRAGEIRO	13
3. REFERÊNCIAS	14
4. OBJETIVOS.....	22
4.1 OBJETIVO GERAL.....	22
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
ARTIGO.....	27
Eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos Amazônicos em Amendoim Forrageiro	28
1. Introdução.....	29
2. Material e Métodos.....	29
2.1 Coleta de solo	29
2.2 Obtenção dos tratamentos.....	30
2.3 Delineamento experimental	30
2.4 Seleção de rizóbios	31
2.5 Caracterização fenotípica	31
3. Resultados e Discussão	32
3.1 Eficiência simbiótica dos isolados em casa de vegetação	32
3.2 Caracterização morfológica	34
4. Conclusão	39
5. Divulgação.....	40
5. Referências bibliográficas	40

1. INTRODUÇÃO GERAL

A degradação no solo bem como problemas quanto à fertilidade e outras complicações ambientais são potencializadas por práticas agrícolas inadequadas (Deus & Bakonyi 2012). De acordo com dados de 2012 do Ministério do Meio Ambiente estima-se que o Brasil tenha duas França's em áreas degradadas equivalendo a 140 milhões de hectares (TCU 2013). Isso porque a falta de medidas de preservação em atividades agrícolas tem promovido diversos impactos negativos ao meio ambiente (Silva *et al.* 2015).

O uso inadequado dos fertilizantes químicos causa problemas ambientais, entre eles os nitrogenados, o mais requerido pelo setor agrícola (Otto 2016). A falta de cuidados quanto à aplicação dos fertilizantes químicos e nitrogenados leva a redução da matéria orgânica e perda dos nutrientes, considerando que são indicadores quanto à qualidade do solo (Martins e Fernandes 2017).

O Brasil ainda depende da importação de fertilizantes nitrogenados (Anda 2017). Em 2017 as entregas atingiram 4.377 mil t havendo um acréscimo de 0,24% em relação ao ano de 2016 (Vegro 2018). Do ponto de vista ambiental, é importante frisar que a utilização de 1 kg de fertilizante nitrogenado equivale aproximadamente a 4,5 kg de CO₂ liberados na atmosfera (Hungria *et al.* 2013). Além disso, os fertilizantes nitrogenados são onerosos e representam alto custo aos produtores agrícolas.

O uso de leguminosas como alternativa para sustentabilidade na agricultura tem sido considerado nos últimos anos (Lewandowski *et al.* 1999; Vieira 2017). E a Fixação biológica de nitrogênio proveniente das leguminosas forrageiras vem trazendo grandes benefícios para a agricultura (Araujo *et al.* 2016), contribuindo na eficiência da ciclagem de nutrientes, aumentando a matéria orgânica e melhorando física e quimicamente o solo (Ferreira 2017).

Considerando as condições de baixa fertilidade dos solos na região norte, a inoculação de estirpes de rizóbios em leguminosas traz grandes contribuições (Júnior *et al.* 2010), subsidiando nas pastagens cultivadas a sustentabilidade (Dias Filho *et al.* 1991). Essa prática eleva o desenvolvimento vegetal (Junior e Reis 2008), a produtividade (O'Callaghan 2016) maximizando o potencial produtivo (Florentino *et al.* 2014).

No entanto, a eficiência da simbiose de rizóbios com o Amendoim Forrageiro ainda é pouco explorada (Dall'Agnol *et al.* 2016). Assim, há necessidade de estudos com rizóbios em nível de espécies adaptadas a cada região do Brasil (Brito *et al.* 2015). Neste

contexto, o conhecimento sobre novas estirpes de rizóbios eficientes no processo de FBN em simbiose com o Amendoim Forrageiro proporcionará grandes contribuições à agricultura nos trópicos úmidos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN)

O nitrogênio (N) é o elemento mais abundante na atmosfera, com cerca de 78% sendo 98% na litosfera (Dilworth *et al.* 2008; Vieira 2017). Esse nutriente é essencial para vida no planeta terra, pois está na constituição da fita de DNA dos vegetais e animais, influencia no processo de divisão celular (Aduan *et al.* 2004), e contribui nas produtividades agrônômicas (Costa *et al.* 2009). Componente fundamental de proteínas e enzimas, sendo constituintes estruturais da célula (Vieira 2017).

No entanto, o N é um gás estável (N)² não assimilado diretamente pelas plantas. A FBN é o processo de transformação do nitrogênio em uma forma disponível para as plantas. Bactérias diazotróficas associadas a raízes de plantas da família Leguminosae são capazes de fixar o nitrogênio no interior de nódulos formados nas raízes de plantas leguminosas, sendo a simbiose mais significativa na agricultura (Embrapa 2016; Viera 2017).

Essas bactérias diazotróficas apresentam variação no crescimento de acordo com a espécie (Araujo *et al.* 2016). Os gêneros *Rhizobium*, *Azorhizobium* e *Sinorhizobium* de crescimento rápido, o gênero *Mesorhizobium* de crescimento intermediário e o gênero *Bradyrhizobium* de crescimento lento (Embrapa 2006).

Uma descoberta recente é a FBN em Beta-Proteobactérias (Araujo *et al.* 2016) uma subclasse de bactéria associativa a qual foi transferida ao gênero *Burkholderia* (Gillis *et al.* 1995) encontrada especialmente em raízes de arroz (Marin *et al.* 2014).

Embora a FBN seja muito importante no setor agrícola, o uso inadequado tem causado grandes impactos ao meio ambiente (Gergoletti 2008; Rodrigues *et al.* 2017). A busca por uma agricultura sustentável se tem feito necessário por meio da implementação de tecnologias de baixo carbono (Newton *et al.* 2016). Tais como compostagem (Pereira *et al.* 2017), sistemas de forragens, uso de leguminosas e associação com bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* através da aplicação de bioinoculantes para estímulo da fixação biológica de nitrogênio (Espíndola *et al.* 1997).

2.2 AS LEGUMINOSAS

As leguminosas pertencem à família Fabaceae, representando uma das maiores famílias de angiospermas do mundo com mais de 19.500 espécies, distribuídas entre uma estimativa de 732 a 765 gêneros (Schlautman *et al.* 2018). É considerada a maior família de angiospermas do Brasil e a terceira maior família do mundo (Lima 2000; BFG 2015).

São plantas conhecidas pela boa associação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio (Pires 2017). As leguminosas são bem adaptadas à exploração de diversos ambientes (Sousa 2007). Apresentando grande importância ecológica (Gomes *et al.* 2017) e econômica (Barcellos *et al.* 2008). Utilizadas nas indústrias para fins madeireiros, alimentícios, medicinais, produção de combustível, cosméticos, pesticidas e entre outros produtos (Gomes *et al.* 2017).

Mas também, o uso em sistemas de forragem, pastejo direto, consorciações, recuperação de áreas degradadas e adubação verde vêm ganhando destaque principalmente na região norte (Barroso *et al.* 2007; Valdo e Techio 2016). Onde solo é pobre em nutrientes apresentando grande deficiência de nitrogênio (Dalling 2016).

Dentre os estudos desenvolvidos com espécies pertencentes à família Fabaceae a inoculação em amendoim forrageiro tem sido de grande importância na agricultura, pois eleva os níveis de produtividade e contribui fortemente para manutenção do meio ambiente fixando nitrogênio com mais eficiência e em alguns casos solubilizando fosfatos do solo (Starkanova *et al.* 1999; Nogueira *et al.* 2012; Dalling 2016). Além da FBN, a inoculação acarreta a redução do uso de fertilizantes nitrogenados, contribuindo para o baixo custo da produção agrícola (Fernandes e Rodrigues 2012).

O grupo de maior importância para a agronomia tropical são os rizóbios (Kahindi *et al.* 1997) sendo as estirpes mais utilizadas e recomendadas em leguminosas pela eficiência na FBN, garantindo uma redução no uso de fertilizantes nitrogenados e contribuindo com programas de recuperação de áreas degradadas (Junior *et al.* 2010).

Os rizóbios são bactérias diazotróficas gram-negativas podendo ser de vida livre, associativos e simbióticos (Evans e Burris 1992; Fernandes e Rodrigues 2012). Os rizóbios simbióticos participam no aumento da produtividade na agricultura (Borges 2016) servindo como bioindicadores quanto à qualidade do solo (Araújo e Monteiro 2007).

Considerando que o tipo de solo influencia diretamente na atividade dos microrganismos (Heijnen *et al.* 1992). A presença de metais pesados são fatores limitantes à sobrevivência da microbiota fixadora de nitrogênio (Hirsch *et al.* 1993).

No entanto em condições de solos favoráveis a sobrevivência dos microrganismos e adequação das espécies as condições de trópico úmido, a inoculação com rizóbios específicos gera altas taxas de FBN (Marin *et al.* 2014). Os rizóbios podem ser isolados a partir dos nódulos ou diretamente do solo tendo variação quanto à identificação (Elkan e Bunn, 1992).

Na Amazônia, os solos são em sua maioria do tipo latossolo amarelo distrófico, pobre em nutriente, com baixa CTC, apresentando níveis tóxicos de Al^{3+} , metais pesados com variação de clima (Júnior *et al.* 2011), contribuindo para diminuição da população de micros organismos fixadores de N_2 (Hungria e Vargas 2000). Entretanto, a variação de estirpes existentes atualmente pode apresentar adaptação às condições edafoclimáticas, à toxicidade de alumínio e aos baixos níveis de pH (Kawai *et al.* 2000; Ferreira 2008; Oliveira 2013).

2.3 AMENDOIM FORRAGEIRO

A espécie *Arachis pintoi* (Amendoim Forrageiro) pertence à família Fabaceae de origem Sul Americana (Kerridge e Hardy 1994). O gênero engloba atualmente 81 espécies perenes e anuais (Perin *et al.* 1998; Saraiva 2016). No Brasil apresenta maior diversidade, com 79% das espécies totais, Bolívia com 18%, Paraguai com 17%, Argentina com 7% e Uruguai com 2% aproximadamente (Saraiva 2016).

O crescimento é rasteiro, de hábito estolonífero bem ramificado com altura variando entre 20 cm a 40 cm de raiz pivotante com boa concentração chegando até 1,95 m de profundidade do solo (Valentim *et al.* 2001). A propagação pode se dar por sementes (Perez 1999; Ludwig *et al.* 2010), estolões ou coroa com parte da raiz (Bueno e Pereira 2016). Com floração indeterminada, pode florescer várias vezes ao ano, garantindo boa produção (Ludwig *et al.* 2010).

O desenvolvimento é favorável em clima tropical ou subtropical e temperatura ideal por volta de 25°C a 30°C, não tolerando temperaturas abaixo de 10°C (Purcino 1994; Ludwig *et al.* 2010; Ferreira 2017), e de bom desenvolvimento nos solos da Amazônia (Dalling 2016).

O amendoim forrageiro (*Arachis pintoi* Krapov. & W. C. Greg.) vem sendo a leguminosa forrageira mais recomendada na recuperação de áreas degradadas, em

consórcios com pastagens, em sistemas agroflorestais, na jardinagem, como banco de proteína (Embrapa 2016) e como planta de cobertura (Ferreira 2017), apresentando ótima fixação de nitrogênio (Babilônia 2013).

No agronegócio e na consorciação com outros produtos, gerando emprego, renda, agregando valor e diversidade para o Brasil (Sousa *et al.* 2006). Bem como nos sistemas de produção bovina a pasto favorecendo a baixa emissão de carbono na atmosfera (Miranda *et al.* 2008; De Sá *et al.* 2014). Podendo ser cultivada por meio de práticas agrícolas simples sem necessitar de insumos e fertilizantes beneficiando o agricultor (Valentim *et al.* 2009).

Atualmente as cultivares de amendoim forrageiro mais utilizadas na região norte são as cv. Amarillo-MG-100 lançado por Matsuda em 1996 e cv. Belmonte lançado em 1999 pela CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira) (Ludwig *et al.* 2010; Santos 2012).

Existe um Banco de Germoplasma ativo de *Arachis pintoi* no estado do Acre na cidade de Rio Branco, de onde é conduzida toda diversidade existente da espécie, subsidiando o desenvolvimento de diversas pesquisas com o Amendoim Forrageiro (Valls e Coradin 2016).

2.4 FBN EM AMENDOIM FORRAGEIRO

As bactérias que formam associações com o amendoim forrageiro são do gênero *Bradyrhizobium* de crescimento lento (Rocha 2007; Araujo *et al.* 2016). Podem ter capacidade de formar nódulos na espécie tanto nas raízes quanto no caule (Silva 2004).

Essa formação de nódulos ocorre através da infecção bacteriana que entram por onde emergem a raiz lateral e posteriormente de forma intercelular são distribuídas através da lamela média (Allen e Allen 1940; Chandler 1978). Os bradyrhizóbios possivelmente invadem o tecido vegetal devido a produção de enzimas específicas como a poligalacturonase (Uheda *et al.* 2001). Quando essas bactérias entram nas células corticais ocorre uma rápida multiplicação do micro-organismo ocasionando repetidas divisões celulares das células invadidas até formar o tecido infectado do nódulo (Chandler 1978).

O tecido infectado dos nódulos, onde ocorre a FBN, são 100% preenchida por bacteroides, com variação de tamanho de 2 a 4 µm em diâmetro apresentando forma circular e tridimensionalmente esféricos com citoplasma granular (Gross *et al.* 2007), muito semelhante à estrutura dos nódulos de *Arachis hypogaea* L. (Sprent 1994).

A inclusão de tratamentos com estirpes nativas do solo (Xavier e Souto 1988; Thies *et al.* 1991) e o uso da testemunha nitrogenada para comparar o nível de eficiência das estirpes em testes são fatores de grande relevância em trabalhos de seleção (Date 1977; Oliveira *et al.* 1998).

Atualmente as estirpes de rizóbios registradas recomendadas para amendoim forrageiro são do gênero *Bradyrhizobium* sp. Registradas como SEMIA 6439 e SEMIA 6440 (Purcino *et al.* 2000; Muniz *et al.* 2016).

Em trabalhos de seleção as estirpes recomendadas se mostraram eficientes no incremento de massa seca da arte área, considerando sua adaptação as condições de Cerrado (Purcino *et al.* 2000; Muniz *et al.* 2016). Destacando que cerca de 91% de N₂ presente no tecido vegetal da espécie é obtido por meio da simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio (Espindola 2001).

3. REFERÊNCIAS

ADUAN, R. E.; VILELA, M. de F.; JÚNIOR, F. B. dos R. 2004. Os grandes ciclos biogeoquímicos do planeta. Planaltina, DF. Ministério da agricultura e abastecimento. **Embrapa: Documentos 119**. 1º ed, 23 f: 1517-5111.

ALLEN, O. N.; ALLEN, E. K. 1940. Response of the Peanut Plant to Inoculation with Rhizobia, with Special Reference to Morphological Development of the Nodules. **Botanical Gazette**, v.102, n.1: 121-142.

ANDA, D. R. 2017. Fertilizantes (Associação Nacional para a Difusão de Adubos). Brasília. **CTIA-MAPA**. 89º Reunião. 16 f.

ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. 2007. Indicadores biológicos de qualidade do solo. Uberlândia. **Review Biosci. J**, v. 23, n. 3: 66-75.

ARAUJO, R. S.; ARDLEY, J.; ABAIDOO, R.; BALA, A.; DEAKER, R.; DILWORTH, Michael; GEMELL, G.; GILLER, K.; HARTLEY, E.; HERRIDGE, D.; HOWIESON, J.; HUNGRIA, M.; KARANJA, N.; RAMAKRISHNAN, K.; MELINO, V.; MEYER, S.; O'HARA, G.; PEOPLE, P.; REEVE, W.; SPRENT, J.; TERPOLILLI, J.; TIWARI, R.;

WOOMER, P., YATES, R.; ZILLI, J. 2016. *Working with rhizobia*. **Australian Centre for International Agricultural Research**. Canberra. 315f.

BFG - The Brazil Flora Group. 2015. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v.66, n.4: 1085-1113.

BABILÔNIA, J. L. 2013. **Pastagens consorciadas, estoques de carbono e nitrogênio, produtividade e persistência de leguminosas**. Lavras, MG. Tese de doutorado. Universidade Federal de Lavras. 159f.

BARROSO, M. do R.; MAGALHÃES, M. J.; CARNIDE, V.; MARTINS, S.; VEGAS, C. A.; CACHÓN, M. R. 2007. Caracterização e avaliação de diferentes espécies de leguminosas grão na região de Trás-os-Montes. Mirandela, Portugal. **Ministério da agricultura de desenvolvimento rural e das pescas**. DRAP Norte. Coleção: Uma agricultura no norte. 65: 978-972-8506-67-4.

BARCELLOS, A. de O.; RAMOS, A. K. B.; VILELA, L.; JUNIOR, G. B. M. 2008. Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros. Viçosa, MG. **R. Bras. Zootec**, v. 37, 18: 1806-9290.

BORGES, C. de S. 2016. **Rizóbios como promotores de crescimento de plantas olerícolas**. Porto Alegre, RS. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Agronomia. Tese de doutorado. 81f.

BRITO, L. F.; PACHECO, R. S.; FILHO, B. F. de S. 2015. Resposta do feijoeiro comum à inoculação com rizóbio e suplementação com nitrogênio mineral em dois biomas brasileiros. Viçosa, MG. **R. Bras. Ci. Solo**: 981-992. 10.1590/01000683rbc20140322.

BUENO, I. C. da S.; PEREIRA, L. E. T. 2016. **Produção e conservação de forragens parte I**. Pirassununga, SP. USP. Faculdade de zootecnia e engenharia de alimentos. 85f.

CHANDLER, M. L. 1978. Some observations of infection of *Arachis hypogaea* L. by *Rhizobium*. **Journal Experimental Botany**, v.29: 749-755.

COSTA, A. R.; MADARI, B. E.; CARVALHO, M. T. de M.; MACHADO, P. L. O. de A.; BERNARDES, T. G.; SILVEIRA, P. M. 2009. Uso do nitrogênio na agricultura e suas implicações na emissão do gás de efeito estufa óxido nitroso (N₂O). Goiás, GO. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. **Embrapa: Documentos 249**. 1º ed., 47: 1678-9644.

DALLING, J. W.; HEINEMAN, K.; LOPEZ, O. R.; WRIGHT, S. J.; TURNER, B. L. 2016. Nutrient Availability in Tropical Rain Forests: The Paradigm of Phosphorus Limitation. **Springer International Publishing Switzerland**. G. Goldstein and L.S. Santiago (eds.). *Tropical Tree Physiology, Tree Physiology* 6. 10.1007/978-3-319-27422-5_12.

DALL'AGNOL, R.F; PLOTEGHER, F.; SOUZA, R.C; MENDES, I.C; DOS REIS, Junior F.B; BÉNA G.; MOULIN L.; HUNGRIA M. 2016. *Paraburkholderia nodosa* is the main N₂-fixing species trapped by promiscuous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Brazilian 'Cerradão'. **FEMS Microbiol Ecol** 92: 108.

DATE, R.A. 1997. *The contribution of R & D on root-nodule bacteria to future cultivars of tropical forage legume*. **Tropical Grasslands**, v.31, n. 4: 350-354.

DE SÁ, C. P.; BAYMA, M. M. A., CARVALHO, B. P. 2014. Avaliação dos impactos da tecnologia: Recomendação do amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*) em pastagens no Acre. Rio Branco, AC. **Embrapa**. 18f.

DEUS, R. M.; BAKONYI, S. M. C. 2012. O impacto da agricultura sobre o meio ambiente. **REGET, UFSM. Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v(7), nº 7: 1306-1315. 2236-1170.

DIAS FILHO, M.B., SIMÃO NETO, M. & SERRÃO, E.A.S. 1991. Avaliação agronômica de leguminosas forrageiras para a Amazônia Oriental brasileira. **Pasturas Tropicales**. 13(3): 31-34.

DILWORTH, M. J.; JAMES, E. K.; SPRENT, J. I.; NEWTON, W. E. 2008. **Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses. Australia**. Murdoch University, v. 7. Springer Science + Business Media B.V. 402f.

ELKAN. G.H.; BUNN. C.R. The Rhizobia. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.H. eds. 1992. **The prokaryotes**. New York. Springer-Verlag, v.3, 2º ed: 2197-2213.

EMBRAPA. 2016. **Balanco Social 2016**.

Disponível em: <<http://bs.sede.embrapa.br/2016/>>. Acessado em 09.08.2018.

ESPINDOLA, J.A.A. 2001. **Avaliação de leguminosas herbáceas perenes usadas como cobertura viva de solo e seus efeitos sobre a produção da bananeira (Musa spp.)**. Seropédica. Rio de Janeiro, RJ, UFRJ, Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 144 f.

ESPINDOLA, J.A.A; GUERRA, José G.M.; ALMEIDA, Dejair L. de. 1997. Adubação verde: Estratégia para uma agricultura sustentável. Seropédica, RJ. Ministério da agricultura e do abastecimento. **Embrapa: Agrobiologia. Documentos**, 42. 20: 0104-6187.

EVANS, H.J.; BURRIS, R.H. 1992. Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J eds. Biological Nitrogen Fixation. New York. **Chapman and Hall**: 1-42.

FERNANDES, J. R. C.; RODRIGUES, P. 2012. Importância da inoculação com bactérias Rhizobium e Bradyrhizobium na produção de leguminosas e o uso do azoto. Portugal. **Agrotec**, n. 3, 6f. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10316.2/25690>>. Acessado em: 04/01/2019.

FERREIRA, D. F. 2008. Sisvar: um programa para análises e ensino de estatística. Lavras. **Revista Científica Symposium**, v. 6, n. 2, p. 36-41.

FERREIRA, R. B. C. 2017. **Produção de cobertura viva de amendoim forrageiro (Arachis pintoi) em pomar de caquizeiro com diferentes frequências de corte.** Seropédica, RJ. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal rural do Rio de Janeiro-Instituto de agronomia, programa de pós-graduação em agricultura orgânica. 35f.

FLORENTINO, L. A.; REZENDE, A. V.; MESQUITA, A. C.; LIMA, A. R. S.; MARQUES, D. J.; MIRANDA, J. M. 2014. Diversidade e potencial de utilização dos rizóbios isolados de nódulos de *Gliricidia sepium*. Alfenas, MG. UNIFENAS. **Sociedade de Ciências Agrárias de Portugal**: 320.

GERGOLETTI, I. F. 2008. **Produção de alimentos: uma análise comparativa de cenários na perspectiva da sustentabilidade ambiental.** Santa Bárbara d' Oeste, SP. Universidade Metodista de Piracicaba. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Produção. Tese de doutorado. 191f.

GILLIS, M.; VAN, T.V.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HEBBAR, P.; WILLWMS, A.; SEGERS, P.; KERSTERS, K.; HEULIN, T.; FERNADEZ, M.P. 1995. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to na emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* ap. nov. for N₂ –fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal of Systematic Bacteriology**. 45:274-289.

GOMES, G.S.; SILVA, G. S.; CONCEIÇÃO, G. M. 2017. Diversidade de leguminosas no cerrado do município de São João do Sóter, Maranhão, Brasil. Goiânia. Centro Científico Conhecer. **Agrarian academy**, v.4, n.7: 167.

GROSS, E.; ROCHA, G. P.; SANTOS, H. R. M. 2007. Ultra-Estrutura dos nódulos da raiz de *Arachis pintoi* (Papilionoideae-Leguminosae). Porto Alegre, RS. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 1: 390-392.

HEIJNEN, C.E.; BURGERS, S.L.G.E.; VEEN, L.A.VAN. 1992. Metabolic Activity and Population Dynamics of Rhizobia Introduced into Unamended and Bentonite-Amended Loamy Sand. **American Society for Microbiology: Applied and environmental microbiology**, v. 59, n°3: 743-747.

HIRSCH, P. R.; JONES, M. J.; MCGRATH, S. P.; GILLER, K. E. 1993. Heavy metals from past applications of sewage sludge decrease the genetic diversity of rhizobium leguminosarum biovar trifolii populations. **Soil Biology and Biochemistry**, 25(11), 1485–1490. doi:10.1016/0038-0717(93)90003-t.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. 2000. Environmental factors affecting N² fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. Amsterdam. **Field Crops Research**, 65:151-164.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. 2013. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49: 791-801.

JUNIOR, P. I. F.; REIS, V. M.. 2008. Algumas limitações à fixação biológica de nitrogênio em leguminosas. Seropédica, RJ. **Documentos: Embrapa**, 252. 33: 1517-8498.

JÚNIOR, J. Q. de O.; NETO, A. J.; FONSECA, E. da S.; LASTE, K. C. D.; FARIA, S. M. 2010. Estirpes de “rizóbio” indicadas para a inoculação de espécies de leguminosas florestais-aproximação 2010. Seropédica, RJ. Documentos 268: **Embrapa Agrobiologia**. 1° ed. 21: 1980-3075.

JÚNIOR, O. J. S.; BORGES, W. L.; NOVAIS, C. B.; SILVA, E. M. R. 2011. Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Fungos Micorrízicos Arbusculares. Brasília, DF. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**. 23f.

JÚNIOR, J. F. de V.; SOUZA, M. I. L.; NASCIMENTO, P. P. R. R.; CRUZ, D. L. de S. 2011. Solos da Amazônia: etnopedologia e desenvolvimento sustentável. Boa Vista, RR.

Universidade Federal de Roraima. Centro de Ciências Agrárias. **Revista Agro@ambiente On-line**. V. 5, n. 2, p.158-165. 1982-8470.

KAHINDI, J. H. P.; WOOMER, P.; GEORGE, T.; de SOUZA MOREIRA, F. M.; KARANJA, N. K.; GILLER, K. E. 1997. Agricultural intensification, soil biodiversity and ecosystem function in the tropics: the role of nitrogen-fixing bacteria. **Applied Soil Ecology**, v.6: 55-76.

KAWAI, F.; ZHANG, D.; SUGIMOTO, M. 2000. Isolation and characterization of acid and Al-tolerant microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, 189:143-147.

KERRIDGE, Peter C.; HARDY, Bill. 1994. Biology and Agronomy of Forage Arachis. Cali, Colombia. **Centro internacional de agricultura tropical**. 209f.

LEWANDOWSKI, I.; HARDTLEIN, M.; KALTSCHMITT, M. 1999. Sustainable crop production: definition and methodological approach for assessing and implementing sustainability. **Crop Sciences**, v. 39: 184-193.

LIMA, H. C. 2000. **Leguminosas arbóreas da Mata Atlântica – uma análise da riqueza, padrões de distribuição geográfica e similaridades florísticas em remanescentes florestais do estado do Rio de Janeiro**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 122f.

LUDWIG, R. L.; LOVATO, T.; PIZZANI, R.; GOULART, R. Z.; SCHAEFER, P. E. 2010. PRODUÇÃO E QUALIDADE DO Arachis pintoi. Goiânia. **Enciclopédia Biosfera**. Centro Científico Conhecer, v.6. 11: 2-15.

MIRANDA, E. M.; JÚNIOR, O. J. S.; SILVA, E. M. R. 2008. Amendoim Forrageiro: Importância, Usos e Manejo. Seropédica, RJ. **Embrapa Agrobiologia**. 85f.

MARIN, V. A.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. dos S. 2014. Fixação Biológica de Nitrogênio: bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura

tropical. Seropédica, RJ. **ResearchGate**. 33f. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/237613129>>. Acessado em: 19/01/2019.

MARTINS, C.; FERNANDES, R. 2017. Processos de degradação do solo-medidas de prevenção. INIAV. Dossier técnico. **Vida Rural**: 34-36.

MUNIZ, A. W; CÔRREA, R. B.; SILVA, T. A. C.; PERIN, R.; TONATO, F.; ASSIS, G. M. L. 2016. Inoculação de Rizóbios em Amendoim Forrageiro cv. Amarelo em Manaus, AM. **Embrapa: Circular Técnica**, 56. Ed. 01: 1517-2449.

NEWTON, P.; GOMEZ, A. E. A.; JUNG, S.; KELLY, T.; MENDES, T. de A.; RASMUSSEN, L. V.; REIS, J. C.; RODRIGUES, R. de A. R.; TIPPER, R.; HORST, D. V.; WATKINS, C.. 2016. Overcoming barriers to low carbon agriculture and forest restoration in Brazil: The *Rural* Sustentável Project. **ScienceDirect: Elsevier Ltd**, v.4: 5-7. Disponível em: <<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>>. Acessado em: 19/01/2019.

NOGUEIRA, N. O.; OLIVEIRA, O. M.; MARTINS, C. A. da S.; BERNARDES, C. de O. 2012. Utilização de leguminosas para recuperação de áreas degradadas. Goiânia, GO. **Enciclopédia Biosfera**. Centro Científico Conhecer, v. 8, n.14: 2121-2131.

O'CALLAGHAN, M. 2016. Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. New Zealand. **Springer**. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 100, 13: 5729–5746.

OLIVEIRA, F. L.; PITARD, R. M.; SOUTO, S. M. 1998. Seleção de estirpes de rizóbio para leguminosas *Arachis pintoi* e *Cratylia argentea*. Seropédica, RJ. **Embrapa Agrobiologia**. 19f.

OLIVEIRA, C. M. 2013. **Caracterização das amilases produzidas por rizóbios e mutantes de *Bacillus sp.* proveniente de solos amazônicos**. Manaus, AM. UFAM. Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical. 112f.

OTTO, R. 2016. **Impactos ambientais dos fertilizantes e sua mitigação**. Piracicaba, SP. USP: ESALQ. 55f.

PEREIRA, A. de J.; SANTANA, F. C.; PEREIRA, F. de J.; TIBIRIÇÁ, A. V. R. 2017. Técnicas de compostagem desenvolvidas pela horticultura familiar agroecológica. Viçosa, MG. **Revista ELO - Diálogos em Extensão** 61, v. 06, n. 02: 61-65.

PEREZ, N.B. 1999. **Método de estabelecimento do amendoim forrageiro perene (*Arachis pintoï Krap. & Greg*)**. Porto Alegre. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 83f.

PERIN, A.; TEIXEIRA, M. G.; GUERRA, J. G. M.. 1998. Avaliação inicial de algumas leguminosas herbáceas perenes para utilização como cobertura viva permanente de solo. II. Amendoim forrageiro, galáxia e centrosema. Seropédica, RJ. Ministério da agricultura e do abastecimento. **Embrapa: Agrobiologia**. Comunicado técnico. N°28: 1-6: 0104-8945.

PIRES, R. de C. 2017. **Associação Simbiótica entre espécies de leguminosas dos gêneros *Mimosa* e *Stryphnodendron* e bactérias fixadoras de nitrogênio**. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Botânica. Universidade de Brasília-UNB, Instituto de Ciências Biológicas. Brasília, DF. 87f.

PURCINO, H.M.; VIANA, M.C.M. 1994. Avaliações preliminares de *Arachis pintoï* em solo de várzea. Maringá. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia: EDUEM: 261**.

PURCINO, H. M. A.; SÁ, N. M. H.; VARGAS, M. A. T.; MENDES, I. C. 2000. Novas estirpes de rizóbios para a inoculação do amendoim forrageiro (*Arachis pintoï*). Ministério da agricultura e do abastecimento. **Embrapa. Recomendações técnicas**. Ano I, n. 20, 2f.

ROCHA, G. P. 2007. **Bactérias associativas e simbioses dos nódulos de *Arachis pintoi* (leguminosae)**. Feira de Santana, BA. Universidade Estadual de Feira de Santana-Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Dissertação de Mestrado. 112f.

RODRIGUES, L. G. da S. M.; RODRIGUES, F. M.; OLIVEIRA, E. M.; VIERA, V. B.; ARÉVALO, A. M.; VIROLI, S. L. M. 2017. Amendoim (*Arachis sp.*) como fonte na matriz energética brasileira. Macapá, AP. Instituto Federal do Amapá. J. **Bioen. Food Sci.**, v.3, n.3: 178-190.

SANTOS, E. C. 2012. **Características agronômicas e bromatológicas de amendoim forrageiro em diferentes intervalos de corte**. Rio Branco, AC. Universidade Federal do Acre. Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal. Dissertação. 96f.

SARAIVA, T. S. 2016. Efeitos alelopáticos de espécies do gênero *Arachis*: uma revisão da literatura. Coromandel. **Revista Agroveterinária, Negócios e Tecnologias**, v. 1, 1: 08-27.

SCHLAUTMAN, B.; BARRIBALL, S.; CIOTIR, C.; HERRON, S.; MILLER, A. J. 2018. Perennial Grain Legume Domestication Phase I: Criteria for Candidate Species Selection. **Sustainability**: 10-730: 10.3390.

SILVA, M. P. 2004. **Amendoim forrageiro – *Arachis pintoi***. Campo Grande. *Fauna e Flora do Cerrado*. Disponível em: <http://cloud.cnpqc.embrapa.br/faunaeflora/plantasforrageiras/amendoimforrageiro-arachis-pintoi-krapov-w-c-gregory>. Acesso em: 09 de Julho de 2018.

SILVA, D.D.E.; FELIZMINO, F.T.A.; OLIVEIRA, M.G. 2015. **Avaliação da degradação ambiental a partir da prática da cultura do feijão no município de Tavares-PB**. *Holos*, v. 8, 18: 1807-1600.

SOUSA, I. S. F.; SILVA, J. de S.; CABRAL, J. R. F.; BALSADI, O. V.; GUEDES, V. G. F.; HOMMA, A. K. O.; SILVA, P. C. G.; FILHO, C. G.; PERES, J. R. R.; OLIVEIRA, M. C. B.; ZOBY, J. L. F.; SILVEIRA, M. A.; FERRAZ, J. M. G.; HOEFLICH, V. A.

2006. Agricultura familiar na dinâmica da pesquisa agropecuária. **Embrapa. Informações tecnológicas**. Brasília, DF. 20f.

SOUSA, P. M. 2007. **Potencial de uso da inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio: Alternativas para aumentar a produtividade do feijão-caupi na agricultura familiar de Confresa, Mato Grosso**. Lavras, MG. UFLA. Programa de Pós-graduação Microbiologia Agrícola. Dissertação. 111 f.

torkanova, G.; Vorisek, K.; Randova, D. (Ceska Zemedelska Univ., Prague-Suchdol (Czech Republic)); Mikanova, O.;

STARKANOVA, G.; VORISEK, K.; RANDOVA, D.; MIRAKOVA, O. 1999. P-solubilization activity of Rhizobium species strains. **Rostlinna Vyroba**, 45: 403-406.

SPRENT, J. I. 1994. Nitrogen fixation. In: SMART, J. (Ed.). The groundnut crop: a scientific basis for improvement. London. **Chapman & Hall**: 255-280.

THIES, J.E.; COOK, S.E.; CORNER, R.J. 1991. Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. **Applied Environmental Microbiology** 57: 19–28.

TRIBUNAL DE CONTAS DA UNIÃO. 2013. Análise de eventos de riscos de uso sustentável do solo e da água. Secretária de controle extremo da agricultura e do meio ambiente. 2º diretoria técnica, documento 1. **SecexAmbiental/DT2**. 5: 53038344.

UHEDA, E.; DAIMON, H.; YOSHIKAWA, F. 2001. Colonization and invasion of peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots by gusA-marked *Bradyrhizobium* sp. **Canadian Journal Botanic**, v.79, p.733-738.

VALDO, R. H.; TECHIO, L. E. 2016. **Leguminosas forrageiras de clima tropical e temperado**. Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de alimentos. Pirassununga, SP. 103f.

VALENTIM, J. F.; CARNEIRO, J. da C.; SALES, M. F. 2001. Amendoim forrageiro cv. Belmonte: leguminosa para a diversificação das pastagens e conservação do solo no Acre. Rio Branco-AC. **Embrapa**: 0100-9915.

VALENTIM, J. F.; ASSIS, G. M. L.; SÁ, C. P.. 2009. Produção de sementes de amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*) no Acre. v. 4. Belém. **Amazônia: Ci. & Desenv**, 8: 189-205.

VALLS, J. F. M.; CORADIN, L. 2016. Forrageiras Fabaceae In: **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial**. Brasília. 14f.

VEGRO, C. L. R. 2018. Mercado de Fertilizantes: aumento das importações preocupa. São Paulo, SP. **Instituto de economia agrícola: Análises e Indicadores do agronegócio**, v. 13. N. 4. 5: 1980-0711.

VIEIRA, R. F. 2017. Ciclo do Nitrogênio em Sistemas Agrícolas. Brasília. **Embrapa**. 165f.

XAVIER, D.F.; SOUTO, S.M. 1988. Potencial das estirpes naturais de Rhizobium em Calopogonio. In: Reunião anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Viçosa. **Sociedade Brasileira de Zootecnia**: 203.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar eficiência simbiótica de rizóbios para Amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*) cv. Amarillo em casa de vegetação.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar rizóbios de amendoim forrageiro de diferentes solos em casa de vegetação;
- Selecionar os rizóbios mais eficientes na fixação biológica de nitrogênio para amendoim forrageiro;
- Caracterizar de forma fenotípica as espécies de rizóbios mais eficientes para amendoim forrageiro.

ARTIGO

SILVA, D.V.; MUNIZ, A.W. 2020. Eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos Amazônicos em Amendoim Forrageiro. *Scientia Amazonia*.

EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE RIZÓBIOS ISOLADOS DE SOLOS AMAZÔNICOS EM AMENDOIM FORRAGEIRO

Daniella de Vasconcelos da Silva¹, Everton Rabelo Cordeiro², Aleksander Westphal Muniz³

Resumo

Arachis pintoi é uma espécie de leguminosa de múltiplos usos na agricultura devido a boa simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio. O objetivo deste trabalho foi avaliar eficiência simbiótica de rizóbios, isolar, selecionar as espécies mais eficientes e identificar de forma morfológica. O experimento foi conduzido sob delineamento inteiramente casualizado, com 45 tratamentos, que são os isolados obtidos de diversos solos da Amazônia, e quatro repetições. Na avaliação da eficiência simbiótica doze isolados demonstraram resultados superiores às estirpes recomendadas atualmente para *Arachis pintoi*, sendo os isolados E501a, E503a, E514a, E505a provenientes da Terra Preta de Índio, os isolados E524a, E528a, E527a, E536a provenientes da terra mulata e os isolados E547a, E551a, E548a, E552a provenientes do solo latossolo amarelo. Demonstrando melhor resultado o isolado E514 comparado aos doze melhores isolados.

Palavras – chave: Estirpe, Rizóbios, Amendoim, Simbiose.

Symbiotic efficiency of Forage Peanut rhizobia in greenhouse. *Arachis pintoi* is a legume species with multiple uses in agriculture due to its good symbiosis with nitrogen-fixing bacteria. The objective of this work was to evaluate the symbiotic efficiency of rhizobia, isolate, select the most efficient species and identify morphologically. The experiment was conducted under a completely randomized design, with 45 treatments, which are the isolates obtained from different soils in the Amazon, and four replications. In the evaluation of the symbiotic efficiency, twelve /m isolates demonstrated results superior to the strains currently recommended for *Arachis pintoi*, being the isolates E501a, E503a, E514a, E505a from Terra Preta de Índio, the E524a, E528a, E527a, E536a from the mulatto earth and the isolates E547a, E551a, E548a, E552a from the yellow latosol soil. The E514 isolate showed better results compared to the twelve best isolates.

Keywords: Strain, rhizobia, peanuts, symbiosis.

¹Programa de Pós-Graduação em Agricultura no Trópico Úmido/INPA, 69060-001 – Manaus, AM, Brasil.

²Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Embrapa, 69010-970, Pesquisador em microbiologia e biogeoquímica do solo, Rodovia AM 010, s/n Manaus, Amazonas, Brasil.

³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Embrapa, 69010-970, Pesquisador de Melhoramento Genético de Plantas, Rodovia AM 010, s/n Manaus, Amazonas, Brasil.

*Autor para correspondência: danyella.vaz@gmail.com

1. Introdução

A espécie *Arachis pintoii* conhecida popularmente como amendoim forrageiro apresenta boa interação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Bradyrhizobium* (Herling e Techio 2016), que disponibilizam nitrogênio e em contrapartida o hospedeiro vegetal disponibiliza carbono para o desenvolvimento bacteriano (Rocha 2007). Essa habilidade tem despertado grande interesse do ponto de vista ecológico e agrônômico (Snak 2018).

O uso da leguminosa beneficia o aumento dos níveis de atividade microbiana estabilizando a matéria orgânica e garantindo qualidade do solo (Miranda *et al.* 2008). Outra vantagem é a alta capacidade de descompactação e proveito para alimentação animal (Antunes 2017), viabilizando os sistemas de produção bovina a pastos com baixa emissão de CO₂ (Valentim *et al.* 2017).

É recomendada para fins alimentícios sendo fonte de proteína, vitaminas E e B, complexos minerais e óleos (Siqueira 2017). Bem como para fins ornamentais, construção de banco de proteína, como planta de cobertura, proteção do solo, controle de ervas daninhas e recuperação de áreas degradadas (Embrapa 2016), pois melhora a qualidade do solo, contribui na eficiência de ciclagem de nutrientes, disponibiliza nitrogênio e assim reduz o uso de adubação mineral nitrogenada, bem como o uso de herbicidas beneficiando o agricultor (Ferreira 2017).

A espécie *A. pintoii* possui boa nodulação mesmo sem aplicação de bioinoculantes (Ludwig *et al.* 2010). No entanto, resultados de pesquisas apontam que a prática de inoculação têm influenciado no aumento da Fixação biológica nitrogênio (FBN) (Starkanova *et al.* 1999), elevando os níveis de produção do vegetal (Araujo *et al.* 2016).

Dessa forma a busca por rizóbios mais eficientes no processo simbiótico em leguminosas forrageiras têm sido de grande importância para maior eficiência na FBN (Santana 2017). Além do mais, é importante avaliar a eficiência simbiótica de isolados adaptadas à região do trópico úmido da Amazônia (Ferreira 2008). Considerando que a estirpe SEMIA 6439 é a única recomendada atualmente no estado do Amazonas para a cultivar Amarillo (Muniz *et al.* 2016).

Portanto, a pesquisa teve como objetivo avaliar eficiência simbiótica de rizóbios para *Arachis pintoii* cv. Amarillo em casa de vegetação.

2. Material e Métodos

2.1 Coleta de solo

Foram coletadas amostras de solo nos municípios de Iranduba e Manaus no estado do Amazonas. A amostragem de solo foi realizada na profundidade de 0 a 10 cm em Terra Preta de Índio e Terra Mulata em Iranduba e em Latossolo Amarelo em Manaus (Tabela 1). Essas amostras de solo foram utilizadas para cultivo de amendoim forrageiro (*Arachis pintoii*) como planta hospedeira. Para isto, o solo foi destorroado e acondicionado em recipientes plásticos com volume de 300 ml e em seguida foi realizada a semeadura.

Tabela 1. Local com coleta de terra preta de índio (TPI) em cultura de milho (CM) e área de floresta (FL), terra mulata (TM) em área cultivada (AC) e latossolo amarelo (LAT) em cultura de seringueira (CS), para cultivo do amendoim forrageiro como planta-isca.

Área	Solo	Coordenadas	Local	Número de estirpes
CM	TPI		Campo Experimental do	9
FL	TPI	03°26' 00'' S;	Caldeirão	7
AC	TM	60°23'00 W		13
CS	LAT	2°53'36,11''S; 59°58'18,62''W	Sede da Embrapa Ocidental	11

2.2 Obtenção dos tratamentos

Após a germinação das sementes, foi aplicado semanalmente 50 mL de solução nutritiva, preparada com 150g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ + 15,8g de $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ + 8,908g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ + 0,3g de H_3BO_3 + 0,5g de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ + 20g de $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ + 20g de Ácido Cítrico, de acordo com Franco e Dobereiner (1967), completando para 1000 mL com água destilada, , atentando para sinais de toxidez nas plantas, efetuando a diminuição da frequência de aplicação. Completando o período de 45 dias, realizou-se a colheita das plantas e a retirada dos nódulos para isolamento dos rizóbios.

O isolamento dos rizóbios foi realizado em capela de fluxo laminar após a retirada dos nódulos das raízes de amendoim forrageiro. Em seguida, os nódulos foram desinfetados seguindo o método de Araujo *et al.* (2016). Com auxílio de uma pinça e alça de platina os nódulos foram inoculados em placas de Petri com meio Ágar-Manitol-Levedura (AML) (Vincent 1970). As placas foram incubadas de forma invertidas em estufa bacteriológica a 30°C por um período variável de três a 28 dias, até o surgimento de colônias bacterianas, sendo verificado a cada 24 horas o crescimento dos rizóbios e contaminantes (Fungos). Uma colônia bacteriana isolada por placa foi selecionada de forma aleatória, a qual foi inoculada em uma nova placa de Petri em meio de cultura com extrato de levedura, manitol e ágar (AML) e incubada em estufa bacteriológica a 30°C em um período variável de três a 28 dias. Em seguida foi feita uma nova inoculação em tubos de ensaio com o meio de cultura (AML) que foi incubado em estufa bacteriológica a 30°C durante o mesmo período de tempo anterior, originando as 40 estirpes.

2.3 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido sob delineamento inteiramente casualizado, seguindo os princípios da experimentação agrícola, repetição, casualização e controle local (Duarte 1996) com quatro repetições, 40 tratamentos provenientes das estirpes obtidas dos solos coletados. Cinco testemunhas,

sendo duas não inoculadas sem e com adição de nitrogênio mineral, recebendo parcelado semanalmente 160 mg.L^{-1} de N e três estirpes controle: CNPSo1119 (SEMIA 6439), CNPSo1201 (SEMIA 6440), CNPSo1200 (SEMIA 6439). Com avaliação, após 45 dias da inoculação, quanto ao número e peso dos nódulos, peso da parte aérea, N total, bem como a eficiência simbiótica dos isolados.

2.4 Seleção de rizóbios

A seleção dos isolados mais eficientes deu-se a partir da avaliação da eficiência simbiótica dos isolados de rizóbios, feita do cultivo de plantas hospedeiras de amendoim forrageiro cv. Amarelo em casa de vegetação utilizando vasos com areia e vermiculita estéril numa proporção de 2:1 v/v e aplicação semanalmente de 50 mL de solução nutritiva, controlando a umidade e temperatura.

Foram inoculadas plantas de amendoim forrageiro cv. Amarelo com suspensão bacteriana multiplicada em tubos de ensaio (25 x 200 mm) com meio líquido (Levedura-Manitol) a uma temperatura de 30°C (Dilworth *et al.* 2008). Utilizando uma alíquota de 1 mL deste meio com uma planta germinada por vaso com altura média de 10 cm. A avaliação dos tratamentos se deu quanto à produção de massa seca da parte aérea, capacidade de nodulação (número e massa) e o teor de nitrogênio foliar realizada através da solubilização sulfúrica do método semi-micro Kjeldahl (Carmo *et al.* 2000). Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância e teste de separação de médias de Scott-Knott ($p < 0,05$).

2.5 Caracterização fenotípica

Para caracterização fenotípica foram considerados aspectos morfológicos e fisiológicos dos isolados estudados. Os aspectos morfológicos dos isolados foram avaliados em lupa estereoscópica, utilizando placas de Petri com meio de cultura (AML) branco, meio de cultura acrescentado de vermelho congo e meio de cultura acrescentado de azul de bromotimol (Hungria 1994), incubados em estufa bacteriológica a 30°C por um período de até 16 dias (Vincent 1970). Então foram avaliados a taxa de crescimento das colônias em meio branco e em meio com vermelho congo: a forma, elevação, borda, superfície, categoria quanto a opacidade e a consistência das colônias, bem como a modificação do pH em meio de cultura com corante de azul de bromotimol (Hungria *et al.* 2001).

Quanto aos aspectos fisiológicos foram observados a coloração de Gram (Hucker 1921), presença da enzima oxidase e catalase utilizando as tiras para reação de oxidase e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para reação de catalase. Síntese de ácido indolacético (AIA) a partir da avaliação da produção de auxinas utilizando o método colorimétrico a 535nm (Asghar *et al.*, 2002).

3. Resultados e Discussão

3.1 Eficiência simbiótica dos isolados em casa de vegetação

Dos 40 isolados obtidos de diferentes solos e testados em casa de vegetação, 99% dos isolados nodularam o amendoim forrageiro, confirmando serem produtores de nódulos, ou seja, bactérias nodulíferas de acordo com Silva (2012). Porém, 1% não produziu nódulos confirmando a incapacidade do mesmo. Contudo é importante ressaltar que nos tratamentos controle que não receberam inoculação (sem adição de nitrogênio e com nitrogênio), não houve formação de nódulos nas plantas (Tabela 2), mostrando que não houve contaminação no experimento.

Os dados dos isolados avaliados quanto à nodulação foram divididos em três grupos conforme a Tabela 2. O grupo I apresentou de 70,75 a 111,25 nódulos/vaso, sendo superior que os outros grupos e similar a estirpe de referência CNPSo1201. Não obstante o grupo II apresentou entre 42,0 a 66,0 nódulos/vaso, superior ao grupo III que apresentou 0 a 33,0 nódulos/vaso, resultados similares as estirpes de referência CNPSo1119 e CNPSo1200.

O amendoim forrageiro sob condições de cultivo tradicionais chega a apresentar de 39 a 53 nódulos por planta (Lopes *et al* 1972). Toda via observa-se que houve uma variação de 33 a 111,25 nódulos por planta, comprovando o efeito positivo da inoculação.

Quanto à produção da massa seca dos nódulos, os isolados utilizados nesse estudo foram classificados em três grupos distintos (Tabela 2). O grupo I representado pelo isolado E544 com massa seca de nódulos de 3,94 mg/vaso, superior que as estirpes recomendadas e aos demais grupos. O grupo II apresentou massa seca de nódulos de 0,57 a 1,56 mg/vaso, sendo maior que o grupo III com produção de massa seca de nódulos de 0 a 0,52 mg/vaso.

Em relação à produção de matéria seca da parte aérea, esta foi dividida em dois grupos distintos (Tabela 2). O grupo I com produção de matéria seca da parte aérea com 151,0 a 281,0 mg/vaso, sendo maior que o grupo II com 031,0 a 142,0 mg/vaso. Considerando que o grupo I engloba os isolados com resultados similares a testemunha nitrogenada e resultados superiores às cepas CNPSo1201 e CNPSo1119.

Os resultados mostraram que em casa-de-vegetação o número de nódulos pode não ter influenciado na produção de massa seca da parte aérea, bem como na eficiência simbiótica dos isolados, pois nem todos os isolados que obtiveram maior número de nódulos também obtiveram maior massa seca da arte aérea ou melhor eficiência simbiótica. Por outro lado 97% das melhores estirpes quanto à eficiência simbiótica obtiveram maior número de massa seca da arte aérea. Podendo ser considerada como parâmetro de seleção das estirpes quanto à eficiência simbiótica, mas o número de nódulo não poderá ser considerado como parâmetro para tal seleção, indicando a importância da massa seca dos nódulos (DÖbereiner 1996; Fernandes e Fernandes 2000).

Tabela 2. Massa seca da parte aérea, número e peso de nódulos de *Arachis pintoi* inoculada com estirpes de *Bradyrhizobium* em casa de vegetação. Médias de 4 repetições.

Tratamento	NN ⁽¹⁾ (número.planta ⁻¹)	MSN ⁽²⁾ (mg.planta ⁻¹)	MSPA ⁽³⁾ (mg/planta)	Ef. ⁽⁴⁾ Relativa (%)	Tratamento	NN ⁽¹⁾ (número.planta ⁻¹)	MSN ⁽²⁾ (mg.planta)	MSPA (mg/planta)	Ef. Relativa (%)
CNPSo1119	4,0 c	1,27 b	109,0b	4,1d	E526	56b	1,13b	125,0b	34,7c
CNPSo1201	103,2a	0,76b	113,0b	4,3d	E527	77,75a	0,336c	151,0a	133,6a
CNPSo1200	18,0 c	1,567b	184,0b	76,0b	E528	75,5a	0,492c	159,0a	137,1a
Test S/N	0,0 c	0c	090,0b	0d	E529	45b	0,122c	077,0b	115,4b
Test + N	0,0 c	0c	219,0a	100,0b	E530	66b	0,120c	090,0b	121,9b
E501	42,0 b	0,643b	224,0a	144,4a	E531	72,75a	0,205c	117,0b	113,8b
E502	0,0 c	0c	095,0b	4,2d	E532	70,75a	0,139c	067,0b	82,5b
E503	46,7 b	0,734b	101,0b	140,4a	E533	61,75b	0,244c	104,0b	95,3b
E504	42,0 b	0,509c	113,0b	112,9b	E534	3,75c	0,024c	031,0b	18,4d
E505	59,5 b	0,258c	104,0b	166,3a	E535	18c	0,080c	044,0b	58,7c
E506	10,0 c	0,208c	132,0b	23,0d	E536	30,25c	0,233c	193,0a	127,5a
E507	49,2 b	0,120c	045,0b	80,9b	E542	1,75c	0,135c	122,0b	8,7d
E508	59,2 b	0,116c	054,0b	79,2b	E543	51b	0,359c	141,0b	41,8c
E509	64,0 b	0,197c	078,0b	112,5b	E544	33c	3,940a	161,0a	109,6b
E513	66,0 b	0,852b	183,0a	8,8d	E545	27c	0,475c	219,0a	109,9b
E514	76,2 a	0,454c	198,0a	167,8a	E546	8,25c	0,874b	130,0b	9,6d
E515	89,7 a	0,291c	097,0b	90,6b	E547	111,25a	0,524c	253,0a	163,4a
E516	32,0 c	0,113c	089,0b	104,1b	E548	87,75a	0,817b	281,0a	153,6a
E517	7,2 c	0,058c	038,0b	61,1c	E549	5c	0,760b	142,0b	39,8c
E518	15,0 c	0,088c	063,0b	50,3c	E550	44,25b	1,099b	212,0a	101,8b
E519	0,5 c	0,003c	050,0b	4,0d	E551	53,75b	0,579b	226,0a	162,6a
E524	59,2 b	0,588b	114,0b	143,9a	E552	83,5a	0,435c	218,0a	139,8a
E525	20,5 c	0,520c	127,0b	97,7b					

*Fonte: Autor

Número de nódulos;1-Massa seca dos nódulos;2-Massa seca da parte aérea;3-Eficiência relativa;4. Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Todavia, as melhores estirpes quanto à eficiência simbiótica (E514, E505, E547, E551a, E548, E501, E524, E503, E552, E528, E527, E536) apresentaram eficiência relativa (%) a fixação biológica de nitrogênio de 127,5 a 167,8 maior que a testemunha nitrogenada e as cepas recomendadas atualmente. Resultados superiores às cepas recomendadas também foram reportados por Junior *et al.* (2010) em um trabalho de seleção com isolados nativos de solos da Amazônia em simbiose com leguminosa.

Isto se deve as bactérias nativas dos solos da Amazônia possuem menor competitividade simbiótica (é uma análise) com o amendoim forrageiro do que as estirpes recomendadas atualmente. Considerando que as estirpes de referência são registradas como SEMIA 6439 e SEMIA 6440 recomendadas para inoculação do *Arachis pintoi* em condições do Cerrado Brasileiro (PURCINO *et al.* 2000).

3.2 Caracterização morfológica

O resultado da caracterização morfológica dos 40 isolados analisados na pesquisa está apresentado na tabela 3. Dos 40 isolados, 16 foram obtidos de amostras de solo de TPI, 13 de TM e 11 de LA (Tabela 1). A forma das colônias apresentou-se circular, com elevação variando de plana e convexa, de borda inteira e superfície lisa, com 99% dos isolados apresentaram característica opaca, onde a colônia não permite a passagem de luz e apenas o isolado E543 apresentou translucidez, permitindo a passagem de luz através da colônia, considerando que a consistência colonial variou de viscosa, butirosas e gomosas (Tabela 3).

Tais características coloniais nodulando o amendoim forrageiro podem ser observadas em outros trabalhos de seleção de Rocha (2007). É importante salientar que a caracterização colonial dos isolados releva uma grande diversidade, sendo o principal meio para o desenvolvimento biotecnológico (Martins *et al.* 1997).

Dos melhores isolados na FBN (E514, E505, E547, E551, E548, E501, E524, E503, E552, E528, E527, E536), oito isolados (E514, E547, E551, E548, E503, E528, E527, E536) apresentaram características similares as das estirpes de referência (CNPSo1201, CNPSo1200 CNPSo1119) quanto a forma da colônia circular com elevação plana de borda inteira, lisa, sem passagem de luz pela colônia de consistência gomosa.

De acordo com Martins (2014) as características morfológicas das bactérias fixadoras de nitrogênio estão relacionadas à sua sobrevivência no solo. Considerando os aspectos bioquímicos de cada solo origem das bactérias testadas. Outros resultados demonstraram que o LA apresenta baixa fertilidade natural e elevada acidez (Lima *et al.* 2002), enquanto a TPI e a TM apresentaram grande fertilidade (Soares *et al.* 2018), com níveis elevados de matéria orgânica (Kern *et al.* 2009).

Tabela 3. Características morfológicas e bioquímicas das estirpes estudadas.

ISOLADO	Form ⁽¹⁾	Elev ⁽²⁾	Bord ⁽³⁾	Sup ⁽⁴⁾	Cat ⁽⁵⁾	Cons ⁽⁶⁾	VC ⁽⁷⁾	pH ⁽⁸⁾	Gram ⁽⁹⁾	Oxi ⁽¹⁰⁾	Cat ⁽¹¹⁾
501	C	Pl	In	L	Op	V	I	AC	-	-	-
502	C	Pl	In	L	Op	B	I	N	-	-	+
503	C	Pl	In	L	Op	G	R	AC	-	-	-
504	C	Pl	In	L	Op	G	R	AC	-	-	-
505	C	Pl	In	L	Op	V	R	AC	-	-	-
506	C	Pl	In	L	Op	V	R	N	-	-	-
507	C	Pl	In	L	Op	G	R	Al	+	-	-
508	C	Pl	In	L	Op	G	R	AC	-	-	-
509	C	Pl	In	L	Op	G	R	N	-	-	+
513	C	Pl	In	L	Op	G	R	AC	+	-	-
514	C	Pl	In	L	Op	G	R	AC	-	+	+
515	C	Pl	In	L	Op	V	R	N	-	-	-
516	C	Pl	In	L	Op	V	I	AC	-	-	+
517	C	Co	In	L	Op	V	R	AC	+	-	-
518	C	Pl	In	L	Op	V	R	AC	-	-	-
519	C	Pl	In	L	Op	V	R	N	-	-	+
524	C	Pl	In	L	Op	V	R	AC	-	-	+
525	C	Pl	In	L	Op	V	I	AL	-	-	+
526	C	Pl	In	L	Op	G	R	AL	-	-	+
527	C	Pl	In	L	Op	G	R	AC	-	-	-
528	C	Pl	In	L	Op	G	R	AC	-	-	+
529	C	Pl	In	L	Op	G	R	AC	-	-	+
530	C	Pl	In	L	Op	G	R	AC	-	-	-
531	C	Pl	In	L	Op	G	L	AC	-	-	-
532	C	Pl	In	L	Op	G	R	AC	-	-	-
533	C	Pl	In	L	Op	G	R	AC	+	-	-
534	C	Pl	In	L	Op	G	L	AC	-	-	-
535	C	Pl	In	L	Op	V	R	AC	+	-	-
536	C	Pl	In	L	Op	G	R	AC	-	-	+
542	C	Pl	In	L	Op	G	I	AC	-	-	-
543	C	Pl	In	L	Tr	B	I	N	-	-	-
544	C	Pl	In	L	Op	V	R	AC	-	+	+
545	C	Pl	In	L	Op	V	R	AC	-	-	-
546	C	Co	In	L	Op	G	I	N	-	-	+
547	C	Pl	In	L	Op	G	R	AC	-	+	-
548	C	Pl	In	L	Op	G	R	AC	-	-	-
549	C	Pl	In	L	Op	G	I	AL	-	-	-
550	C	Co	In	L	Op	G	R	AC	-	-	-
551	C	Pl	In	L	Op	G	I	AL	-	-	-
552	C	Co	In	L	Op	G	R	AC	-	+	-
1119	C	Pl	In	L	Op	G	R	AL	-	-	-
1201	C	Pl	In	L	Op	G	I	AL	-	-	-
1200	C	Pl	In	L	Op	G	I	AL	+	-	+

-Forma; 1 (circular; C)-Elevação; 2 (Plana;C-Convexa; Co)-Borda;3 (Inteira; In) Superfície; 4 (Lisa; L)-Categoria; 5 (Opaca; Op-Translucida; Tr)- Consistência; 6 (Viscosa; V-Gomosa;G-Butirosa;B)-Velocidade de crescimento;7 (Rápido; R-Intermediário; I-Lento; L)-pH; 8 (ácido; Ac-alcálico; Al- neutro; N)-Gram;9 Oxidase; 10-Catalase;11

Cerca de 72,5% dos isolados obtidos de diferentes solos testados em casa de vegetação apresentaram crescimento rápido em meio de cultura AML (Figura 1), considerando o surgimento das colônias bacterianas até três dias. Seguindo um percentual de 22,5% dos isolados com crescimento intermediário variando de 3 a 7 dias para surgimento das colônias e 5% apenas dos isolados com crescimento lento de 7 a 16 dias.

Dos isolados obtidos observou-se que em TPI (32,5%) ocorreram o maior número de isolados com crescimento rápido, seguido por TM (25 %) e por último o LA (15%). Os demais isolados apresentaram crescimento intermediário, sendo 12,5; 7,5 e 2,5 %, em LA, TPI e TM, respectivamente (Figura 1).

Quando o tempo de crescimento é comparado ao das estirpes de referência CNPSo1201 e CNPSo1200 de crescimento intermediário, os isolados obtidos do solo latossolo amarelo apresentaram maior percentual do que os demais isolados obtidos dos outros solos. No entanto, se comparado a estirpe de referência CNPSo1119 de crescimento rápido, os isolados obtidos do solo terra preta de índio apresentaram maior percentual do que os demais isolados obtidos dos outros solos (Tabela 3 e Figura 1).

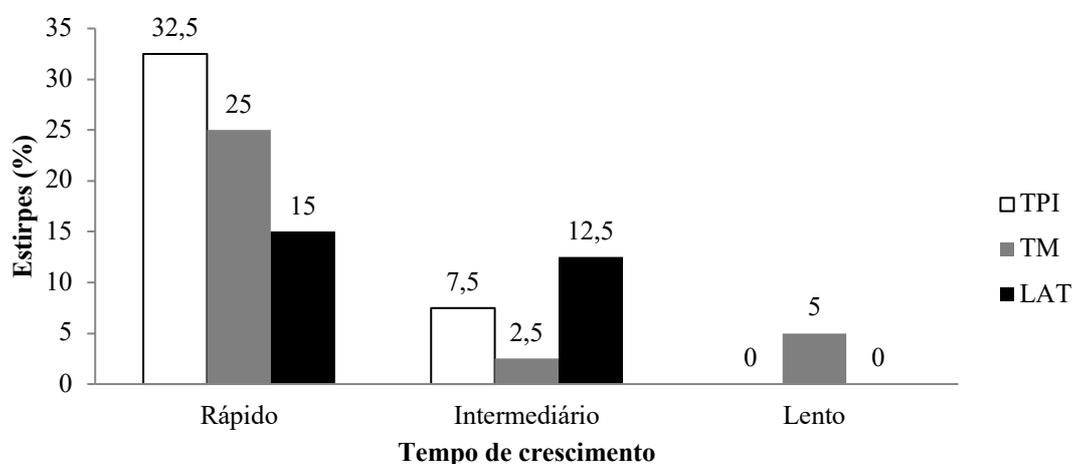
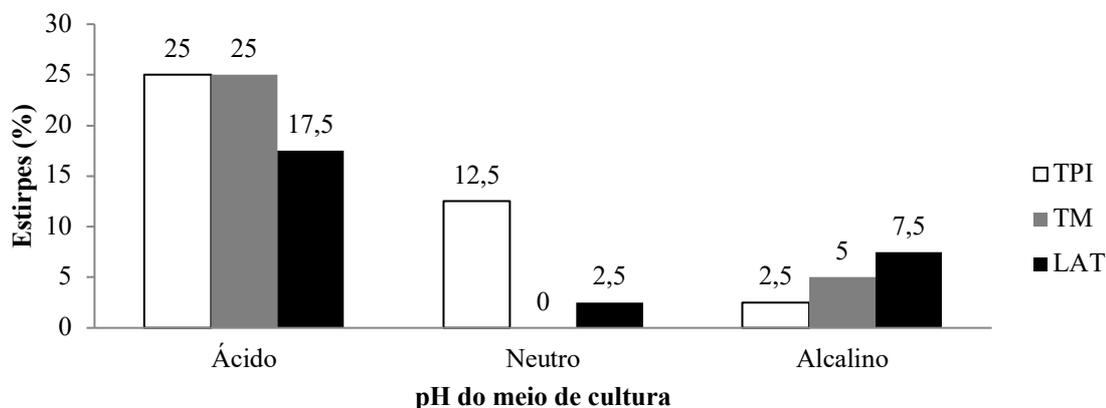


Figura 1. Distribuição em porcentagem quanto ao tempo de crescimento em meio de cultura com extrato de levedura, manitol e ágar (YMA) de isolados obtidos de amostras de solo do tipo terra preta de Índio (TPI), Terra mulata (TM) e Latossolo amarelo (LAT) do estado do Amazonas.

O crescimento rápido e intermediário apresentaram maior percentual do que o crescimento lento. Tendo em vista que a espécie *Arachis pintoi* é geralmente nodulada por bactérias do gênero *Bradyrhizobium* de crescimento lento (Rocha 2007; Araujo *et al.* 2016). No entanto há evidências que bactérias de crescimento rápido, como do gênero *Rhizobium* são capazes de formar nódulos nas raízes de amendoim forrageiro (IBAÑEZ *et al.* 2008).

Figura 2. Distribuição em porcentagem quanto ao pH em meio com extrato de levedura, manitol e ágar (YMA) acrescido de azul de bromotimol dos isolados obtidos de amostras de solo do tipo terra



preta de Índio (TPI), Terra mulata (TM) e Latossolo amarelo (LAT) do estado do Amazonas.

Na figura 2 encontra-se distribuídos em porcentagem os isolados obtidos de três tipos de solo quanto as características de pH em meio de cultura acrescido de azul de bromotimol. Observou-se uma maior quantidade de isolados para as características de pH ácido com 67,5%. No entanto as estirpes de referência (CNPSo1119, CNPSo1201, CNPSo1200) apresentaram características de pH alcalino e 99% dos melhores isolados apresentaram características de pH ácido, por outro lado 1% apresentou característica de pH alcalino (E551).

Os autores Martins *et al.* (1997) e Freitas *et al.* (2007) associam as características de pH das bactérias fixadoras de nitrogênio ao tempo de crescimento, sendo que as bactérias cujo crescimento é mais lento ou intermediário tendem a tornar o meio de cultura alcalino, cuja cor muda para azul. As bactérias de crescimento considerado rápido tendem a acidificar o meio de cultura, cuja cor muda para amarelo (SILVA *et al.* 2014). Tal associação pode ser vista em 31 isolados, 23 isolados de crescimento rápido acidificaram o meio de cultura e 8 isolados mudaram o meio de cultura para azul, o mesmo foi observado por Rocha (2007).

3.2 Bioquímica

Quanto aos testes bioquímicos: coloração de Gram, presença das enzimas oxidase e catalase, a maioria dos isolados de diferentes solos e as estirpes de referencia CNPSo1119 e CNPSo1201 apresentaram características negativas (Figura 3). O percentual mais alto para característica positivo correspondeu à enzima catalase com 32,5%, considerando a estirpe de referência CNPSo1200. Os melhores isolados de diferentes solos são Gram-negativas e variado para a presença das enzimas oxidase e catalase, com maior incidência da ausência das enzimas (Tabela 3).

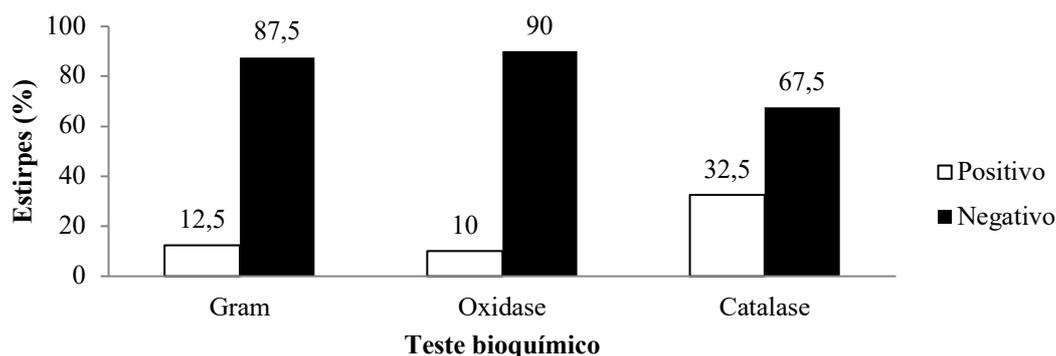


Figura 3. Distribuição em porcentagem quanto aos testes bioquímicos dos isolados testados em casa de vegetação.

A coloração de GRAM é uma técnica muito utilizada em estudos taxonômicos de bactérias fixadoras de nitrogênio (Baldani *et al.* 1998). Os resultados quanto coloração de GRAM e a morfologia das bactérias mostraram que grande parte dos isolados testados são constituídos de bactérias com parede celular mais complexa e resistente com formato de bastonete, resultado parecido é encontrado em um trabalho de seleção com *Arachis pintoii* por Rocha (2007).

De acordo com Silva (2013) os bacilos com GRAM negativas de oxidase negativa e catalase positiva podem ser caracterizados como pertencentes à família das Enterobactérias. No entanto 10% das estirpes apresentaram oxidase positiva, estando presente em apenas algumas bactérias catalisando uma reação de oxidação/redução do O_2 a água (H_2O) ou a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Videira *et al.* 2007).

A diversidade morfológica e bioquímica é uma indicação da distinção entre os isolados estudados, podendo ser o indicio da diversidade genética (Rocha, 2007). Isolados com presença das enzimas oxidase e catalase fornecem a planta um mecanismo de defesa antioxidante, capaz de responder a estresses ambientais (Barbosa *et al.* 2010). Essas enzimas também foram observadas em rizóbios associados a raízes de feijoeiro cultivados em Santa Catarina (SEI 2012).

3.3 Produção de ácido indolacético (AIA)

Os isolados avaliadas quanto à produção de ácido indolacético (AIA) podem ser divididos em quatro grupos distintos (Figura 4). Onde o grupo I estão inseridas os isolados com maior produção de auxinas (E517, E547, E552, E515, E548, E532, E542, E546, E514, E501, E534) com média de 93,05 a 108,88 mg de AIA/L. O grupo II com média de 74,63 a 89,206667 mg de AIA/L sendo mais próximo ao grupo I e superior ao grupo III com média de 18,99 a 30,5mg de AIA/L, o qual é mais próximo do grupo IV com média de 5,88 a 17,24mg de AIA/L.

O AIA é um hormônio considerado como melhor estimulador de crescimento das raízes (LOSS *et al.* 2008). Todos os isolados testados foram capazes de produzir AIA em quantidades variadas, isso demonstra bons resultados. Visto que em trabalhos de seleção a inoculação de rizóbios promotores de

AIA favorece a germinação, apresenta mecanismos de promoção de crescimento vegetal, induz o enraizamento, aumenta a absorção de nutrientes do solo, vigor das plantas, induzindo a floração e frutificação em leguminosas (De Salamone *et al.* 2001; Chi *et al.* 2005; Zhao 2010; Atunes 2016; Nosoline 2016).

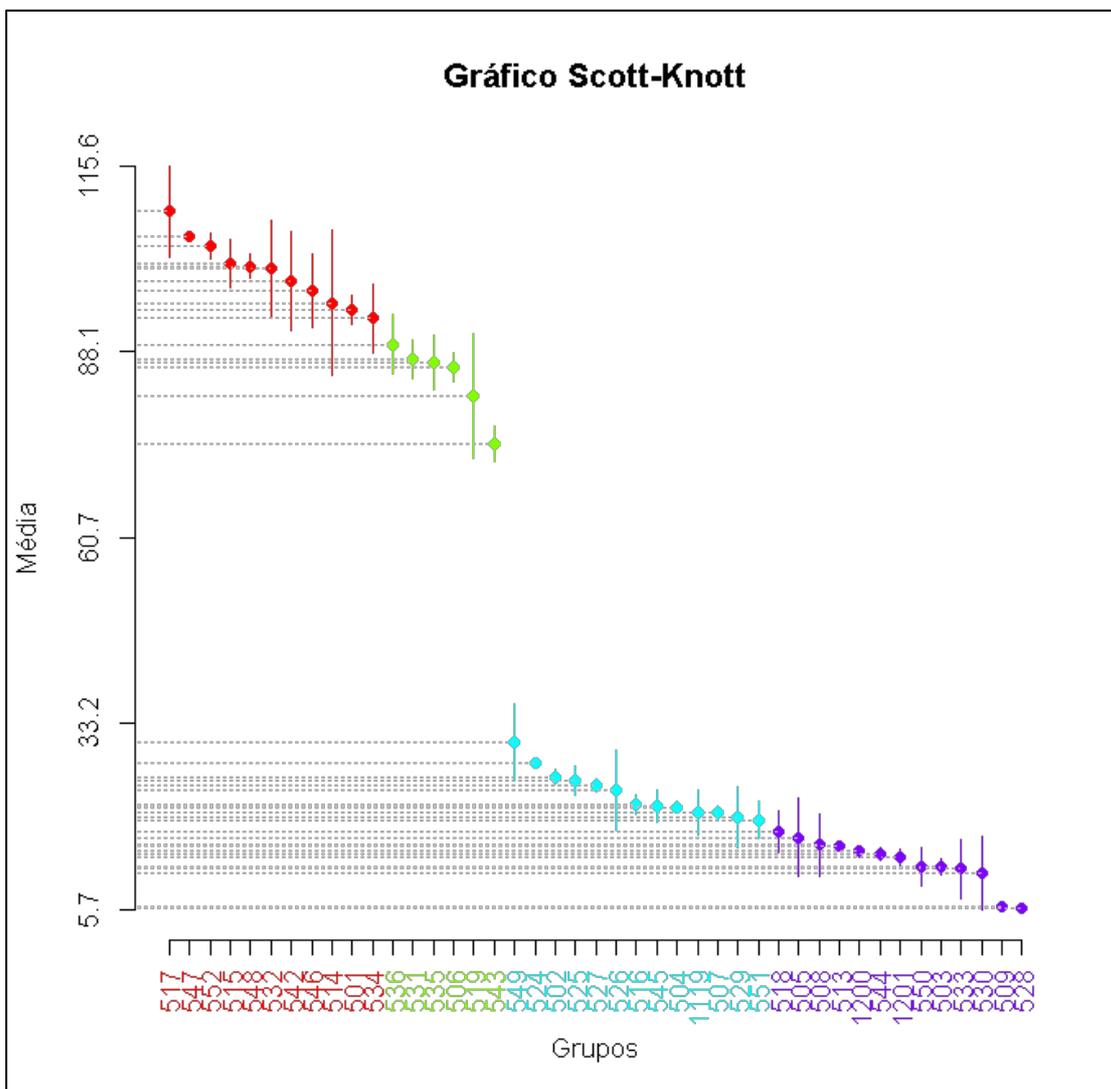


Figura 4. Agrupamento das estirpes de diferentes solos quanto a produção de auxinas.

4. Conclusão

Conclui-se que os isolados E514, E505, E547, E551, E548, E501, E524, E503, E552, E528, E527, E536 apresentaram bons resultados quanto à eficiência simbiótica para amendoim forrageiro cv. Amarillo em condições controladas de casa-de-vegetação superior as estirpes de referência atualmente recomendadas pela Embrapa. Podendo ser utilizados em novos trabalhos de seleção tanto em casa de vegetação quanto em campo.

5. Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. O(s) autor(es) e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

6. Referências bibliográficas

ATUNES, G. R. 2016. **Diversidade e eficiência na promoção do crescimento vegetal por bactérias isoladas de plantas forrageiras do semiárido**. Petrolina. UNIVASF. Programa de Pós-graduação em ciência animal. Dissertação, 92.

ANTUNES, F. M. 2017. **Avaliação das propriedades física e química do solo em sistema agroflorestal no centro-sul fluminense**. Seropédica, RJ. UFRRJ. Programa de Pós-graduação em agricultura orgânica. Dissertação, 52.

ARAUJO, R. S.; ARDLEY, J.; ABAIDOO, R.; BALA, A.; DEAKER, R.; DILWORTH, Michael; GEMELL, G.; GILLER, K.; HARTLEY, E.; HERRIDGE, D.; HOWIESON, J.; HUNGRIA, M.; KARANJA, N.; RAMAKRISHNAN, K.; MELINO, V.; MEYER, S.; O'HARA, G.; PEOPLE, P.; REEVE, W.; SPRENT, J.; TERPOLILLI, J.; TIWARI, R.; WOOMER, P., YATES, R.; ZILLI, J.. 2016. Working with rhizobia. **Australian Centre for International Agricultural Research: Canberra**, 315.

ASGHAR, H. N; ZAHIR, Z. A.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. 2002. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in Brassica juncea L. **Biology and Fertility of Soils**. 35: 231-237.

BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; GOI, S. R.; SILVA, R. A. da; BALDANI, J. I.; BÖBEREINER, J. 1998. Técnicas microscópicas aplicadas na identificação e localização de bactérias fixadoras de nitrogênio e biomacromoléculas em tecidos vegetais. Seropédica. **Embrapa Agrobiologia**, 27.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. 2010. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. Campinas. **Revista de nutrição**. Jul-Agost: 629-643.

CARMO, Ciriaca Arcangela Ferreira de Santana do; ARAÚJO, Wilson Sant'Anna de; BERNARDI, Alberto Carlos de Campos; SALDANHA, Marcelo Francisco Costa. 2000. Métodos de análise de tecidos vegetais utilizados na Embrapa Solos. **Embrapa Solos**. Circular Técnica N°6. Dezembro: 1517-5146.

CHI, F.; SHEN, S.H.; CHENG, H.P.; JING, Y.X.; YANNI, Y.G.; DAZZO, F.B. 2005. Ascending Migration of Endophytic Rhizobia, from Roots to Leaves, inside Rice Plants and Assessment of Benefits to Rice Growth Physiology. **Applied and Environmental Microbiology**. V.71, n.11: 7271-7278.

DE SALAMONE, I.; HYNES, R.; NELSON, L. 2001. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. **Canadian Journal of Microbiology**. V.47: 404-411.

DILWORTH, M. J.; JAMES, E. K.; SPRENT, J. I.; NEWTON, W. E. 2008. Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses. Australia. Murdoch University. **Springer Science + Business Media B.V.** v. 7, 402.

DÖBEREINER, J. 1996. Evaluation of nitrogen fixation in legumes by the regression of total plant nitrogen with nodule weight. **Nature**, 210: 850-852.

DUARTE, J. B. 1996. **Princípios sobre Delineamentos em Experimentação Agrícola**. Goiânia, GO. Universidade Federal de Goiás. Programa de Pós-graduação em Estatística e Informática, 66.

EMBRAPA. 2016. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Balanço Social. Disponível em <http://bs.sede.embrapa.br/2016/>>. Acessado em 09.08.2018.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M. 2000. Seleção inicial e caracterização parcial de rizóbio de tabuleiros costeiros quando associados ao guandu. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. 24: 321-327.

FERREIRA, D. F. 2008. Sisvar: um programa para análises e ensino de estatística. Lavras. **Revista Científica Symposium**. V. 6, n. 2: 36-41.

FERREIRA, R. B. C. 2017. **Produção de cobertura viva de amendoim forrageiro (Arachis pintoi) em pomar de caquizeiro com diferentes frequências de corte**. Seropédica, RJ. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal rural do Rio de Janeiro- Instituto de agronomia, programa de pós-graduação em agricultura orgânica, 35.

FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, C. L.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; LYRA, M. C. C. P. 2007. Caracterização e seleção de população nativas de rizóbios de solo da região semi-árida de Pernambuco. **Bragantia**, v.66, n. 3: 497-504.

HERLING, V. R.; TECHIO, L. E. 2016. **Leguminosas forrageiras de clima tropical e temperado**. SP, Pirassununga. USP. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. 113p.

Hungria, M.; Araújo, S.R. 1994. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Brasília. **Embrapa: SPI**, 519.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. D.; COCA, R. G.; MEGIAS, M. 2001. Preliminary characterization of fastgrowing rhizobial strain isolated from soyabean nodules in Brazil. Oxford. **Soil Biology & Biochemistry**. V. 33, p. 1349-1361.

HUCKER G. J. A. 1921. New Modification and Application of the Gram Stain. **J Bacteriol**, v. 6, n. 4: 395-397.

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

JUNIOR, A. F. C. OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N. 2010. Caracterização fenotípica de rizóbios nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupia. Maringá. **Acta Sci., Agron.** (online) v. 32, n.1. Disponível em: <<http://doi.org/10.4025/actasciagron.v32i1.90010.40.25/actasciagron.v32i1.900>>. Acessado em: 16/11/2021>.

KERN, D.C.; KAMPF, N.; WOODS, W.I.; DENEVAN, W.M.; COSTA, M.L.; FRAZAO, F.J.L. 2009. Evolução do Conhecimento em Terra Preta de Índio. In: TEIXEIRA, W.G.; KERN, D.C.; MADARI, B.E.; LIMA, H.N.; WOODS, W. (Ed.). As terras Prestas de Índio da Amazônia: sua caracterização e uso deste conhecimento na criação de novas áreas. Manaus, AM. **Embrapa Amazônia Ocidental**: 285-296.

- LIMA, H. N.; SCHAEFER, C. E. R.; MELLO, J. W. V.; GILKES, R. J.; KER, J. C. 2002. Pedogenesis and pre-Colombian land use of “Terra Preta Anthrosols” (“Indian black earth”) of Western Amazonia. **Geoderma**: 110, 1.
- LOSS, A.; TEXEIRA, M. B.; ASSUNÇÃO, G. M.; HAIM, P. G.; LOUREIRO, D. C.; SOUZA, J. R. 2008. Enraizamento de estacas de *Allamanda cathartica* L. tratadas com ácido Indol-Butírico (AIB). **Ciências Agrárias**, v. 3, n. 4: 313-316.
- LOPES, E. S.; TELLA, R.; ROCHA, J. L. V.; IGUE, T. 1972. Inoculação de sementes de amendoim (*Arachis hypogaea* L.). **Bragantia**, v.31:27-34.
- LUDWIG, R. L.; LOVATO, T.; PIZZANI, R.; GOULART, R. Z.; SCHAEFER, P. E. 2010. PRODUÇÃO E QUALIDADE DO *Arachis pintoi*. Goiânia. **Enciclopédia Biosfera**. Centro Científico Conhecer, v.6. 11: 2-15.
- MARTINS, L. M.V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. 1997. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east Region of Brazil. **Soil biology and Biochemistry**, v.29: 1005-1010.
- MARTINS, N. M. 2014. **Caracterização morfofisiológica de rizóbios simbiotes de guandu, feijão-de-porco, crotalária, mucuna-cinza e mucuna-preta**. Dourados, MS. UFGD. Programa de Pós-graduação em Biologia Geral, Bioprospecção. *Dissertação*. 104 p.
- MIRANDA, E. M.; JÚNIOR, O. J. S.; SILVA, E. M. R. 2008. Amendoim Forrageiro: Importância, Usos e Manejo. Seropédica, RJ. **Embrapa Agrobiologia**. 85 f.
- NOSOLINE, S. M. 2016. **Prospecção e Caracterização de Rizobactérias de Feijão Caupi cultivado no Estado do Rio de Janeiro**. RJ. UENFDR. Tese. 163 f.
- PURCINO, H. M. A.; SÁ, Nadja M. H.; VARGAS, M. A. T.; MENDES, Lêda C. 2000. Novas Estirpes de rizóbios para inoculação do amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*). PE. **Embrapa**. RTE 020. 2 f.
- ROCHA, G. P. 2007. **Bactérias associativas e simbiotes dos nódulos de *Arachis pintoi* (leguminosae)**. Feira de Santana, BA. Universidade Estadual de Feira de Santana-Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Dissertação de Mestrado. 112 f.
- SANTANA, Jacilene Angela de. 2017. **Avaliação do potencial fixador de nitrogênio de genótipo de *Desmanthus***. Recife, PE. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Melhoramento Genético de Plantas. 56 f.
- SEI, F. B. 2012. **Diversidade de rizobactérias e coinoculação com fungos micorrízicos na nutrição fosfatada e expressão gênica no feijoeiro**. UDESC, CAV. Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias. Tese. 117 f.
- SILVA, U. 2013. **Microbiologia**. Disponível em: <<http://ifcursos.com.br>>. Acessado em: 15/11/2021.
- SILVA, L. L.; PINHEIRO, M. S.; SOUZA, J. B.; MARTINS, S. C. S.; MARTINS, C. M. 2014. Diversidade de rizóbios da unidade de conservação parque nacional de Ubajara no estado do Ceará. Goiânia. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, v.10, n. 19: 2142.
- SIQUEIRA, F. F. da S. 2017. Perspectives to the exploitation of peanut plants by farmers: a state-of-the-art in Brazil. **International Journal of Agriculture and Environmental Research**, v. 03, p. 3561-3576: 2455-6939.

SNAK, A. 2018. **Associação de bactérias endofíticas com forrageiras e submetidas ao déficit hídrico**. Palotina, PR. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Bioprodutos Agroindustriais. Dissertação. 144 f.

SOARES, R.; MADDOCK, J. E. L.; CAMPOS, D. V. B.; MADARI, B. E.; MACAHADO, P. L. O. A.; SANTELLI, R. E. 2018. O papel das terras pretas de índio do antropoceno. **Rev.Virtual Quim:10(6)**: 1984-6835. Disponível em: <htt//: rvq.s bq.org.br. Acessado em: 16/11/2021>.

STARKANOVA, G.; VORISEK, K.; MIKANOVA, O.; RONDOVA, D. P. 1999. P-solubilization activity of Rhizobium species strains. **Rostlinna Vyroba**, 45: 403-406.

VALETIM, J. F.; ANDRADE, C. M. S.; ASSIS, G. M. L.; DE SÁ, C. P.; COSTA, F. de S.; SALES, M. F. L.; FERREIRA, A. S.; MESQUITA, A. Q. 2017. Semeadura de amendoim forrageiro BRS Mandobi em pastagens estabelecidas. Rio Branco, AC. **Embrapa**: Circular técnica 73: 0100-9915. 16 f.

VIDEIRA, Sandy Sampaio; ARAÚJO, Jean Luiz Simões; BALDANI, Vera Lúcia Divan. 2007. De Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não-leguminosas. Seropédica, RJ. **Documentos, Embrapa Agrobiologia**, 74 f. ISSN: 1517-8498.

VINCENT, J.M. 1970. Manual for the practical study of root nodule bacteria. **Oxford: Blackwell Scientific Publications**, 16 f. (IBP Handbook, 15).

ZHAO, Y. 2010. Auxin Biosynthesis and Its Role in Plant Development. **Annual Review of Plant Biology**. V. 61, p.49-64.

