

## **Avaliação de isolados de rizóbios tolerantes a acidez in vitro na simbiose com feijão Caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) em Latossolo Amarelo**

Evaluation of isolates of rhizobia tolerant to acidity in vitro in symbiosis with Caupi bean (*Vigna unguiculata* L. Walp.) in an Oxisol

Evaluación de aislados de rizobios tolerantes a la acidez in vitro en simbiosis con frijol caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp.) en un Oxisol

Recebido: 20/02/2021 | Revisado: 28/02/2021 | Aceito: 01/03/2021 | Publicado: 08/03/2021

**Francisco Adilson dos Santos Hara**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3215-953X>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: fhara@ufam.edu.br

**Sophia Kathleen da Silva Lopes**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5011-4936>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: sophiakathleen03@gmail.com

**Theoderic Shay Botelho da Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8151-5177>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: theolvbk@gmail.com

**Jhony Vendruscolo**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3043-0581>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: jhonyvendruscolo@gmail.com

**Angela Maria da Silva Mendes**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6527-8482>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: amendes@ufam.edu.br

**Ariele Cristine Ferreira Inácio**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7663-059X>

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil

E-mail: arielec20@gmail.com

**Luiz Carlos Costa de Souza**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4681-2114>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: luiz.costa.15@gmail.com

### **Resumo**

A baixa concentração de N nos solos agrícolas da Amazônia é um fator limitante para uma agricultura econômica e ecologicamente sustentável, logo, constata-se a grande importância da fixação biológica para suprir a demanda deste macronutriente nos ecossistemas. O presente trabalho tem como objetivo, avaliar a capacidade infectiva de isolados de rizóbio e a eficiência na fixação do nitrogênio em um Latossolo Amarelo. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente ao acaso, com esquema fatorial de 6 (4 Inoculantes e sem nitrogênio, 1 sem inoculantes e com nitrogênio, e 1 sem inoculante e sem nitrogênio) x 2 (calagem e sem calagem) em 4 repetições, perfazendo um total de 48 parcelas experimentais. A calagem aumentou a eficiência dos isolados e dos rizóbios nativos do solo em nodularem as plantas de caupi e estimularem o crescimento da biomassa. Os rizóbios nativos do solo apresentaram eficiência simbiótica semelhante aos isolados usados como inoculantes. O Isolado FCAN07B se equiparou à adubação nitrogenada em relação a proporcionar ganho de biomassa nas plantas de caupi. A dose de 20 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio foi deletéria para a nodulação do feijão caupi.

**Palavras-chave:** Fixação biológica do nitrogênio; Adubação nitrogenada; Ciclagem de nutrientes; Acidez do solo.

### **Abstract**

The low concentration of N in agricultural soils in the Amazon is a limiting factor for economically and ecologically sustainable agriculture. In this context, the biological fixation of N is of fundamental importance, as it is a natural entry of N into ecosystems. The present work aims to evaluate an infectious capacity of rhizobia and the efficiency in

fixing nitrogen in a Yellow Latosol. The present work aims to evaluate the infectious capacity of rhizobia isolates and their efficiency in fixing nitrogen in a Yellow Latosol. The experiment was installed entirely at random, corresponding to a factorial scheme of 6 (4 inoculants without nitrogen + without inoculant without N and without inoculant with N) x 2 (liming and without liming) in 4 repetitions. Liming increased the efficiency of the isolates and rhizobia native to the soil in nodulating the cowpea plants and stimulating the growth of biomass. The native rhizobia of the soil showed symbiotic efficiency similar to the isolates used as inoculants. The FCAN07B isolate is equivalent to nitrogen fertilization in relation to providing biomass gain in cowpea plants. The dose of 20 kg ha<sup>-1</sup> of nitrogen was harmful to the nodulation of cowpea.

**Keywords:** Biological nitrogen fixation; Nitrogen fertilization; Nutrient cycling; Soil acidity.

### Resumen

La baja concentración de N en los suelos agrícolas de la Amazonía es un factor limitante para la agricultura económica y ecológicamente sostenible. En este contexto, la fijación biológica de N es de fundamental importancia, ya que es una entrada natural de N a los ecosistemas. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la capacidad infecciosa de los rizobios y la eficiencia en la fijación de nitrógeno en un Latosol amarillo. El experimento se instaló totalmente al azar, correspondiente a un esquema factorial de 6 (4 inoculantes sin nitrógeno + sin inoculante sin N y sin inoculante con N) x 2 (encalado y sin encalado) en 4 repeticiones. El encalado aumentó la eficiencia de los aislados y rizobios nativos del suelo para nodular las plantas de caupí y estimular el crecimiento de biomasa. Los rizobios nativos del suelo mostraron una eficiencia simbiótica similar a los aislados utilizados como inoculantes. El aislado FCAN07B es equivalente a la fertilización con nitrógeno en relación a proporcionar ganancia de biomasa en plantas de caupí. La dosis de 20 kg ha<sup>-1</sup> de nitrógeno fue perjudicial para la nodulación del caupí.

**Palabras clave:** Fijación biológica de nitrógeno; Fertilización nitrogenada; Ciclo de nutrientes; Acidez del suelo.

## 1. Introdução

O crescente aumento da demanda por alimentos em algumas regiões, tem levado à adoção de práticas agrícolas que podem degradar o solo e estimular o uso de áreas impróprias para os cultivos agrícolas. A situação é mais séria nos trópicos, devido à fragilidade da estrutura do solo, erosão, baixo teor de matéria orgânica e tecnologias agrícolas inapropriadas. A diminuição dos nutrientes e a acidificação do solo são duas das maiores consequências do manejo inadequado, isso é marcante na Amazônia pois segundo Silva et al. (2021) a agricultura é praticada após o corte e queima da floresta primária ou secundária, ou seja, a floresta nativa é retirada pelo método de derruba e queima, a cultura é instalada e cultivada até que a fertilidade do solo decresça ao nível de degradação. Além disso, uma limitação regional para a implantação de sistemas mais adequados para a região, é o fato de que as populações das comunidades tradicionais, afastadas dos grandes centros urbanos, possuem menor infraestrutura para as necessidades básicas, gerando vulnerabilidade socioambiental e econômica (Santos et al., 2019).

A maioria dos solos amazônicos são deficientes em nitrogênio e fósforo (Nicholaides, et al., 1983), dois elementos essenciais para a planta e de difícil aplicação como fertilizantes pelos agricultores regionais, devido ao alto custo e dificuldades de transporte. Torna-se imprescindível, portanto, desenvolver sistemas de uso do solo compatíveis com estas características regionais, para que o binômio preservação do meio ambiente e auto-sustentação da população regional seja atingido rapidamente. A baixa disponibilidade de nitrogênio nos solos agrícolas da Amazônia tem tornado a agricultura uma prática econômica e ecologicamente insustentável, aumentando a pressão para o desmatamento de áreas de vegetação natural e afetando os ecossistemas regionais. A aplicação de grandes quantidades de nitrogênio na forma de fertilizantes químicos não está ao alcance da maioria dos produtores regionais. Além disso, ela é seletiva quanto à população microbiana do solo (Nuernberg, 1983) e pode resultar em grandes perdas por lixiviação, causando poluição ambiental (Amado & Mielniczuk, 2000). Estes mesmo autores citam este processo de poluição que se torna mais intenso em condições de altas precipitações e doses de adubos nitrogenados, sendo a primeira uma realidade e a segunda, uma necessidade na região Amazônica.

A fixação simbiótica do N<sub>2</sub> é um processo biológico chave para o manejo sustentável na Amazônia. No entanto, ao se introduzir uma leguminosa no campo, a nodulação e a fixação do nitrogênio são geralmente baixas, devido à baixa

eficiência dos isolados nativos do solo. Isto torna necessária a utilização da inoculação com isolados de rizóbio previamente selecionados. Não obstante, a acidez e a alta concentração de alumínio tóxico são fatores que prejudicam o estabelecimento da fixação simbiótica do N<sub>2</sub> (Hungria & Vargas, 2000). Assim, algumas estirpes podem desenvolver mecanismos de tolerância a esses fatores estressantes (Kawai, et al., 2000; Watkin, et al., 2000). A utilização dessas estirpes tolerantes pode aumentar a fixação biológica em solos ácidos e reduzir a aplicação de nitrogênio, de acordo com os princípios da agricultura ecológica e economicamente sustentável, principalmente para o feijão caupi que possui rendimento médio nacional baixo, cerca de 500 kg ha<sup>-1</sup>.

O feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) é uma excelente alternativa para os produtores de baixa renda, pois é uma espécie adaptada às condições edafoclimáticas da Amazônia, e que apresenta produção satisfatória quando associada com as bactérias fixadoras de nitrogênio. A cultura apresenta importância socioeconômica nas regiões Norte e Nordeste, sendo a região Norte a segunda maior produtora e consumidora de feijão-caupi no Brasil; no entanto, ainda apresenta baixa produtividade de grãos, devido a vários fatores, podendo-se citar o baixo uso de tecnologia pelo pequeno produtor, uso de cultivares pouco adaptadas às condições de cultivo e manejo inadequado da cultura (Rocha et al., 2009; Zilli et al., 2006).

Estudos têm demonstrado aumento da produtividade do feijão-caupi quando inoculado com estirpes de rizóbios previamente selecionados (Nascimento et al., 2008; Santos et al., 2014; Boddey et al., 2016; Cavalcante et al., 2017). Hara & Oliveira (2004) salientam que a seleção de isolados de rizóbio que possuem alta capacidade fixadora de nitrogênio, resistência à acidez e ao alumínio tóxico, é fundamental para a produção e utilização de inoculantes pelos agricultores para o incremento na produção do feijão-caupi na região Amazônica. Nascimento et al. (2008) observaram que a inoculação com estirpes recomendadas permitiu a produção de biomassa e grãos na cultura do feijão-caupi semelhante à da adubação com 50 kg ha<sup>-1</sup> de N.

A necessidade de selecionar estirpes de rizóbio mais eficazes tem levado ao interesse pela ecologia da comunidade microbiana, e como consequência, tem gerado uma evolução da diversidade de rizóbio, bem como o conhecimento da distribuição, sobrevivência e adaptabilidade deste importante grupo de organismos. Sendo assim, a análise de isolados em casas de vegetação é uma fase primordial para se selecionar isolados para serem levados a campo.

Este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade infectiva [A2] de isolados de rizóbio e a eficiência na fixação do nitrogênio em um Latossolo Amarelo na cultura do feijão-caupi na presença e na ausência da calagem e, comparar a fixação biológica do nitrogênio atmosférico com a adubação nitrogenada.

## 2. Metodologia

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação, na Faculdade de Ciência Agrárias (FCA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), em Manaus, AM. O solo utilizado no experimento foi um Latossolo Amarelo, coletado na camada de 0-20 cm, em área de floresta dentro do próprio campus da UFAM. Neste trabalho foram utilizadas metodologias quantitativas para aquisição dos dados de produção de biomassa e nodulação do feijão-caupi. A metodologia quantitativa possibilitou a coleta de dados numéricos por medições em casa de vegetação e em laboratório, já a metodologia qualitativa permitiu a interpretação destes dados e a elaboração de opiniões sobre o fenômeno (Pereira, et al., 2018).

A secagem do solo foi realizada à sombra e ao ar livre. O solo seco foi destorroado e passado numa peneira de 2,0 mm, e ao mesmo tempo, foram retirados os fragmentos de material biológico como raízes, restos de plantas e animais. Após, foi feita uma amostragem para a realização da análise química do solo de acordo com a metodologia proposta pela Embrapa (1999). Foi determinado o pH (CaCl<sub>2</sub> 1N), Al, Ca, Mg, K e P. Foram calculadas ainda, a saturação de bases, saturação de alumínio, CTC total e CTC efetiva (Lopes & Alvarez, 1999).

O solo foi repassado para vasos com capacidade para 3 kg de solo. Após a análise do solo, em metade das parcelas experimentais (24 parcelas) foi realizada a correção da acidez, aplicando calcário dolomítico 30 dias antes da semeadura, com a saturação do alumínio mantida abaixo de 20%, de acordo com Cravo & Souza (2010). Em todas as parcelas experimentais foram realizadas a adubação com superfosfato triplo ( $60 \text{ kg P ha}^{-1}$ ) e KCl ( $30 \text{ kg K ha}^{-1}$ ) duas semanas antes do plantio. Ainda foi aplicado o nitrogênio na forma de sulfato de amônia na proporção de  $20 \text{ kg ha}^{-1}$  nas parcelas em que este fertilizante foi avaliado.

Foram utilizados os isolados tolerantes à acidez e ao alumínio trocável, capazes de solubilizar fosfatos insolúveis e sintetizar o ácido indolacético (AIA) *in vitro*. Os isolados cresceram em 50 mL de meio com extrato de levedura e manitol (YM) segundo Vincent (1970), em erlenmeyer de 150 mL, e foram acondicionados em agitador vertical à temperatura ambiente durante cinco dias.

As sementes de feijão de cultivar BRS Nova Era, lançada pela EMBRAPA, foram esterilizadas em álcool 70% por cinco minutos e logo em seguida em solução de hipoclorito de sódio a 5%. Após a assepsia, as sementes passaram por 5 (cinco) lavagens em água esterilizada para retirada dos resíduos de álcool e hipoclorito de sódio. No dia anterior à semeadura, as sementes foram passadas para um Becker com capacidade de 250 mL e em seguida, receberam a solução bacteriana dos isolados separadamente na proporção de  $10^6$  células por grama de sementes. As sementes ficaram por um período de 24 h embebidas na solução bacteriana antes do momento do plantio.

A semeadura foi realizada diretamente nos vasos a 2 cm de profundidade com auxílio de quatro pinças esterilizadas, como medida para evitar a contaminação de um isolado sobre o outro nos lotes de sementes. Foram semeadas sete sementes por vaso e aos 15 dias após o plantio foi realizado o primeiro desbaste, deixando-se quatro plantas por vaso; o segundo desbaste ocorreu uma semana depois, deixando duas plantas por vaso. A irrigação foi realizada diariamente com água esterilizada. O controle de plantas daninhas e insetos pragas foram realizadas manualmente, para evitar o uso de defensivos químicos que possam prejudicar os inóculos presentes no sistema radicular do feijão-caupi.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente ao acaso e correspondeu a um fatorial de 6 (4 inoculantes sem nitrogênio + sem inoculante sem N e sem inoculante com N) x 2 (com calagem e sem calagem), com 4 repetições; sendo um vaso com duas plantas correspondente a uma parcela, num total de 48 parcelas experimentais.

Quando 50% das plantas atingiram a fase da floração, a parte aérea das plantas foi seccionada à altura do colo. A parte aérea fresca foi posta em sacos de papel e identificadas, e logo em seguida, foi mensurada a matéria fresca da parte aérea (MFPA) (g). Após a pesagem, as mesmas foram postas para secar a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  até peso constante, para determinação da matéria seca da parte aérea (MSPA) ( $\text{g planta}^{-1}$ ). As raízes foram retiradas dos vasos para a extração dos nódulos radiculares e obtenção do número de nódulos (NN) e peso dos nódulos frescos (PNF) ( $\text{mg planta}^{-1}$ ); após foram colocados para secar a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  até peso constante para obtenção do peso da massa seca das raízes sem os nódulos (PSR) e dos nódulos secos (PNS) ( $\text{mg planta}^{-1}$ ). A matéria seca total foi obtida com a soma da matéria seca da parte aérea com a matéria seca da raiz ( $\text{g planta}^{-1}$ ).

As significâncias dos tratamentos foram verificadas pelo teste F com 1 e 5% de probabilidade no Software SISVAR. Para as características em que houve interação dos fatores, foi realizado o desdobramento da análise de variância. Para os parâmetros que se mostraram significativos, foi aplicado o teste de Tukey (5%), para o contraste das médias. Os dados referentes ao número de nódulos foram transformados pela fórmula Raiz ( $X+0,5$ ) para a análise estatística.

### 3. Resultados e Discussão

De acordo com a análise de variância houve efeito isolado da inoculação/adubação nitrogenada sobre o peso fresco e seco da parte aérea, e sobre a nodulação (Tabela 1). O efeito isolado da calagem foi observado sobre o peso fresco da parte

aérea e nodulação (Tabela 2). Houve efeito somente da interação do fator Inoculação/Nitrogênio x sem calagem sobre o peso fresco e seco da parte aérea, e sobre a nodulação (Tabela 1).

**Tabela 1.** Análise de variância dos dados.

FV	Pr > Fc						
	MFPA	MSPA	MFR	MSR	NN	PNF	PNS
Inoculação/Nitrogênio	0,0017**	0,0022**	0,4420 <sup>ns</sup>	0,8636 <sup>ns</sup>	0,0287*	0,0045**	0,0045**
Calagem	0,0006**	0,2023 <sup>ns</sup>	0,0709 <sup>ns</sup>	0,3990 <sup>ns</sup>	0,0000**	0,0000**	0,0000**
Inoculação/Nitrogênio x com calagem	0,1438 <sup>ns</sup>	0,6608 <sup>ns</sup>	0,1977 <sup>ns</sup>	0,8358 <sup>ns</sup>	0,8802 <sup>ns</sup>	0,6047 <sup>ns</sup>	0,1142 <sup>ns</sup>
Inoculação/Nitrogênio x sem calagem	0,0129*	0,0043**	0,8847 <sup>ns</sup>	0,9270 <sup>ns</sup>	0,0018**	0,0001**	0,0000**

FV = fonte de variação; MFPA = Matéria fresca da parte aérea; MSPA = Matéria seca da parte aérea; MFR = Matéria fresca da raiz; MSR = Matéria seca da raiz; NN = Número de nódulos; PNF = Peso dos nódulos frescos; PNS = Peso dos nódulos seco; <sup>ns</sup> = não significativo; \* e \*\* = Significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente. Fonte: Autores.

**Tabela 2.** Médias do efeito dos tratamentos inoculação e adubação nitrogenada sobre o rendimento de biomassa aérea e nodulação do feijão caupi, em Latossolo Amarelo.

Tratamento	MFPA	MSPA	NN	PNF	PNS
	----- g planta <sup>-1</sup> -----			----- mg planta <sup>-1</sup> -----	
FCAN02B	52,50 b	9,47 b	51,8 a	0,44 a	0,15 a
FCAN02C	46,87 b	8,97 b	47,9 a	0,38 ab	0,15 a
FCAN04C	52,50 b	9,82 b	54,1 a	0,36 ab	0,19 a
FCAN07B	54,38 b	10,51 ab	41,4 a	0,50 a	0,21 a
Sem Inoculante e com N	69,38 a	12,97 a	7,1 b	0,03 b	0,01 b
Sem Inoculante e sem N	52,50 b	9,25 b	41,8 a	0,56 a	0,17 a

MFPA = Matéria fresca da parte aérea; MSPA = Matéria seca da parte aérea; NN = Número de nódulos; PNF = Peso dos nódulos frescos; PNS = Peso dos nódulos seco; FCAN02B = inoculante 1; FCAN02C = inoculante 2; FCAN04C = inoculante 3; FCAN07B = inoculante 4. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Fonte: Autores

A adubação nitrogenada proporcionou rendimento de matéria fresca da parte aérea superior aos demais tratamentos e não houve diferença significativa entre os isolados de rizóbios e entre o tratamento sem inoculação (Tabela 2). Resultado semelhante ocorreu para a matéria seca da parte aérea, sendo que o isolado FCAN07B foi único que se equiparou à adubação nitrogenada (Tabela 2). Mesquita et al. (2020) também observaram isolados de rizóbios tão eficiente quanto a adubação nitrogenada em estimular o ganho de matéria seca da parte aérea, com parte de um ajustamento fotossintético em plantas submetidas a estresse hídrico. O efeito semelhante entre os isolados de rizóbios e a ausência de inoculação e sem nitrogênio indica que os isolados utilizados no experimento possuem eficiência semelhante aos rizóbios nativos do solo em promover o crescimento vegetativa do caupi, o que foi corroborado com os resultados da nodulação (Tabela 2). Resultado semelhante foi obtido por Chaves et al. (2018) também num Latossolo distrófico. Howieson e Ballard (2004) concluíram que as leguminosas muitas vezes respondem à inoculação onde a comunidade rizobiana é inferior a 100 células g<sup>-1</sup> de solo.

A nodulação das plantas (Número de nódulos, peso dos nódulos frescos e peso dos nódulos secos) que não receberam inoculante foi expressiva, e se equiparou aos tratamentos com inoculantes. Resultado semelhante foi encontrado por Farias et al., (2016), Chagas Júnior et al., (2014), Rocha et al., (2018). Todos os inoculantes utilizados foram capazes de proporcionar nodulação no feijão-caupi, isso é atribuído à alta capacidade intrínseca dos mesmos em competir pela formação dos nódulos (Ogega, et al., 2018). O resultado da nodulação indica alta capacidade dos rizóbios estabelecidos no solo em nodularem as plantas de feijão-caupi, como é frequentemente observado (Farias, et al., 2016; Chaves, et al., 2018; Guimarães, et al., 2012; Jaramillo, et al., 2013; Rufini, et al. 2014). É importante salientar que este fato pode estar relacionado com a

presença de bactérias fixadoras de nitrogênio nativas no solo da área de condução do experimento e, desta forma, tornar-se comum encontrar plantas que não receberam esse tratamento, mas alcançarem números elevados de nódulos (Rufini, et al., 2014). A menor nodulação obtida no tratamento com N em relação ao tratamento sem inoculante e sem N (Tabela 1) demonstra que esse nutriente aplicado no plantio restringe a nodulação espontânea, conforme observado em outros trabalhos (Zilli, et al., 2010; Saboya, et al., 2013; Silva, et al., 2016; Chaves, et al., 2018). Para o efeito no peso dos nódulos frescos, os isolados FCAN02C e FCN04C não diferiram significativamente do tratamento com adubação nitrogenada (Tabela 1). O suprimento de N via fertilização mineral influencia o processo de FBN em leguminosas, uma vez que as plantas podem absorver diretamente o N presente no solo o que torna a nodulação desnecessária. Por outro lado, o processo pode ocorrer com eficiência em condições de baixa disponibilidade de N no solo (Franco & Neves, 1992), embora seja recomendado o uso de pequenas doses de N aplicadas no plantio (Hungria & Araújo, 1994) para melhorar o crescimento das plantas e promover efeito sinérgico sobre a nodulação (Tsai, et al., 1993).

Ao analisar o efeito isolado da calagem, foi identificado que a mesma influenciou apenas a matéria fresca da parte aérea e a nodulação (Tabela 3). A matéria fresca da parte aérea e os parâmetros de nodulação foram superiores na presença da calagem quando comparada com o tratamento sem correção do solo (Tabela 3). Isso provavelmente ocorreu devido à neutralização da acidez e do alumínio trocável (Quaggio, 2000), propiciando melhores condições para o desenvolvimento das plantas e favorecendo a ação dos rizóbios inoculados e dos nativos do solo. Este resultado demonstra que os isolados utilizados no experimento não expressaram a tolerância à acidez apresentada em laboratório, portanto, tolerância à acidez e ao alumínio em vitro não significa necessariamente tolerância em condições de campo.

**Tabela 3.** Médias do efeito dos isolados e adubação nitrogenada na presença da calagem sobre o rendimento de biomassa aérea e nodulação do feijão-caupi, em Latossolo Amarelo.

Tratamento	MFPA	NN	PNF	PNS
	g planta <sup>-1</sup>		----- mg planta <sup>-1</sup> -----	
Sem calagem	49,38 b	8,8 b	0,1155 b	0,05 b
Com calagem	60,00 a	72,58 a	0,6405 a	0,25 a

MFPA = Matéria fresca da parte aérea; NN = Número de nódulos; PNF = Peso dos nódulos frescos; PNS = Peso dos nódulos secos. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Fonte: Autores.

A análise de variância detectou que houve interação significativa entre a inoculação ou adubação nitrogenada e a calagem para os parâmetros matérias fresca e seca da parte aérea e nodulação (Tabela 4). Ao analisar o efeito do fator inoculação e adubação nitrogenada quando se aplicou a calagem, observa-se que a adubação nitrogenada proporcionou rendimento de matéria fresca e seca superiores, no entanto, não diferiu estatisticamente do efeito do inóculo FCAN07B (Tabela 4). Não houve diferença significativa entre os isolados de rizóbios utilizados como inoculantes e os rizóbios nativos do solo para o rendimento de biomassa da parte aérea do feijão-caupi (Tabela 4), isso demonstra que a calagem estimula a nodulação natural do feijão-caupi. Fernandes et al., (2013) também observaram efeito positivo da calagem na cultura do feijão-caupi. Farias et al., (2016) observaram aumento na concentração de N no sistema radicular do feijão caupi com reflexo no crescimento da planta, no entanto, a calagem não influenciou significativamente os tratamentos em relação à formação de nódulos, indicando que o isolados utilizados são tolerantes à acidez.



**Tabela 4.** Médias do efeito dos isolados na presença e na ausência da calagem sobre a nodulação do feijão-caupi, em Latossolo Amarelo.

Tratamento	MFPA	MSPA	NN	PNF	PNS
	----- g planta <sup>-1</sup> -----			----- mg planta <sup>-1</sup> -----	
FCAN02B	48,75 b	9,28 b	100,8 a	0,85 ab	0,30 a
FCAN02C	48,75 b	8,94 b	75,0 a	0,53 bc	0,23 a
FCAN04C	58,75 b	10,21 b	97,2 a	0,58 bc	0,29 a
FCAN07B	61,25 ab	10,69 ab	66,5 a	0,74 ab	0,32 a
Sem Inoculante e Com N	76,25 a	14,34 a	13,8 b	0,05 c	0,03 b
Sem Inoculante e Sem N	57,50 b	9,71 b	82,3 a	1,10 a	0,34 a

MFPA = Matéria fresca da parte aérea; MSPA = Matéria seca da parte aérea; NN = Número de nódulos; PNF = Peso dos nódulos frescos; PNS = Peso dos nódulos secos; FCAN02B = inoculante 1; FCAN02C = inoculante 2; FCAN04C = inoculante 3; FCAN07B = inoculante 4. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Fonte: Autores.

Ao analisar o efeito da interação em relação aos parâmetros de nodulação foi observado que a adubação nitrogenada na presença da calagem inibiu a formação dos nódulos do caupi (Tabela 4) da mesma forma como foi observado no efeito isolado (Tabela 2). Farias et al. (2016) citam que a recomendação de calagem para produção de feijão-caupi inoculado com bactérias fixadores de N<sub>2</sub> deve ser baseada nas diferentes respostas dos simbiossitos, pois a magnitude definirá a necessidade de correção do solo e sua viabilidade econômica.

Ao se comparar o efeito dos fatores inoculação e adubação nitrogenada na presença e na ausência da calagem (Tabela 5), observa-se que para todos os parâmetros de nodulação, os tratamentos foram estatisticamente superiores na presença da calagem, com exceção do tratamento com adubação nitrogenada (Tabela 5), como foi observado nos efeitos isolados, houve inibição da formação dos nódulos. Esse resultado evidencia a influência do pH do solo no processo de fixação do N atmosférico

**Tabela 5.** Médias do efeito dos isolados na presença e na ausência da calagem sobre a nodulação do feijão caupi.

Tratamento	NN		PNF		PNS	
	CC	SC	CC	SC	CC	SC
	----- mg planta <sup>-1</sup> -----					
FCAN02B	100,8 a	2,75 b	0,85 a	0,03 b	0,30 a	0,01 b
FCAN02C	75,0 a	20,75 b	0,53 a	0,23 b	0,23 a	0,07 b
FCAN04C	97,2 a	11,00 b	0,58 a	0,13 b	0,29 a	0,09 b
FCAN07B	66,5 a	16,25 b	0,74 a	0,27 b	0,32 a	0,11 b
Sem Inoculante e Com N	13,8 a	0,50 a	0,05 a	0,01 a	0,03 a	0,00 a
Sem Inoculante e Sem N	82,3 a	1,50 b	1,10 a	0,03 b	0,34 a	0,06 b

MFPA = Matéria fresca da parte aérea; MSPA = Matéria seca da parte aérea; NN = Número de nódulos; PNF = Peso dos nódulos frescos; PNS = Peso dos nódulos secos; FCAN02B = inoculante 1; FCAN02C = inoculante 2; FCAN04C = inoculante 3; FCAN07B = inoculante 4. Médias seguidas da mesma letra na linha para NN, PNF e PNS não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Fonte: Autores.

A sobrevivência do rizóbio no solo e o crescimento na rizosfera, bem como o estabelecimento da infecção e da nodulação, a função do nódulo e o crescimento da planta hospedeira são afetados pela acidez do solo, e este efeito varia entre e dentro das espécies (Howieson, et al., 1992; Wani, et al., 1995). A exposição de isolados de rizóbio à acidez diminui o crescimento, sugerindo que alguns processos citoplasmáticos da bactéria são extremamente sensíveis à acidez (Hungria & Vargas, 2000). Na presença da acidez há uma diminuição da síntese de proteínas pelas bactérias, o que também pode afetar o crescimento bacteriano, tendo em vista que as proteínas têm função estrutural nos organismos (Aarons & Graham, 1991). Alguns trabalhos têm demonstrado o efeito mutagênico do Al sobre estirpes de rizóbio. Wood (1995) detectou um aumento na

síntese de DNA em uma estirpe sensível ao alumínio. Oclave et al., (1994) citam um aumento na motilidade, diminuição do número de nódulos e aumento da resistência a antibióticos. A diminuição da nodulação por conta da acidez pode também ser explicada pela atividade dos íons  $H^+$  que limita totalmente a sobrevivência dos rizóbios nas condições naturais, conforme relatado em pesquisa realizada por Bordelau e Prévost (1994). Os isolados utilizados neste trabalho, embora resistente à acidez em condições *in vitro*, não apresentaram esse comportamento no solo em condições de casa-de-vegetação, reforçando a teoria de que a tolerância *in vitro* à acidez pode não significar tolerância em condições de campo

#### 4. Conclusão

A calagem aumentou a eficiência dos isolados e dos rizóbios nativos do solo em nodularem as plantas de feijão-caupi e estimularem o crescimento da biomassa

Os rizóbios nativos do solo apresentaram eficiência simbiótica semelhante aos isolados usados como inoculantes

O Isolado FCAN07B se equiparou à adubação nitrogenada em relação a proporcionar ganho de biomassa nas plantas de caupi.

A dose de 20 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio foi deletéria para a nodulação do feijão caupi.

Será necessária a realização de experimento de campo para avaliar a eficiências dos isolados em estimular o rendimento de grãos do feijão-caupi.

#### Referências

- Aarons, S. R., & Graham, P. H. (1991). Response of *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* to acidity. *Plant and Soil*, 13(4/1), 145-151.
- Amado, J. J. C., & Mielniczuk, J. (2000). Estimativa da adubação nitrogenada para o milho em sistemas de manejo e culturas de cobertura do solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 24, 553-560. 10.1590/S0100-06832000000300009.
- Bordelau, L. M., & Prévost, D. (1994). Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant and Soil*, 161, 115-125. 10.1007/BF02183092
- Cavalcante, A. C. P., Cavalcante, A. G., Neto, M. A. D., Matos, B. F., Diniz, B. L. M. T., & Bertion, A. M. (2017). Inoculação das cultivares locais de feijão-caupi com estirpes de rizóbio. *Revista de Ciências Agrárias*, 60(1), 38-44. 10.4322/rca.2170
- Chagas Júnior, A. F., Oliveira, A. G., Reis, H. B., Santos, G. R., Chagas, L. F. B., & Miller, L. O. (2014). Eficiência da inoculação combinada de rizóbio e *Trichoderma* spp. em diferentes cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) no cerrado (Savana Brasileira). *Revista de Ciências Agrárias*, 37(1), 20-28.
- Chaves, J. S., Oliveira, G. A., Rodrigues, T. G., Maia, S. S., Teixeira Júnior, D. L., Souza, F. G., & Rodriguez, C. A. (2018). Produtividade do feijão-caupi sob inoculação em área alterada no estado de Roraima – Brasil. *Nucleus*, 15(2), 319-324.
- Cravo, M. S., & Souza, B. D. L. Recomendação de Adubação e Calagem para Culturas Anuais - Feijão-Caupi (2010). In: Cravo, M. S., Viégas, I. J. M., & Brasil, E. C. (Org.). *Recomendações de adubação e calagem para o Estado do Pará*. 1ª ed. Belém-PA: Embrapa Amazônia Oriental.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (1999). *Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes*. Brasília: Embrapa/Solos.
- Farias, T. P., Trochmann, A., Soares, B. L., & Moreira, F. M. S. (2016). Rhizobia inoculation and liming increase cowpea productivity in Maranhão State. *Acta Scientiarum Agronomy*, 38(3), 387-395. 10.4025/actasciagron.v38i3.28630
- Fernandes, A. R., Fonseca, M. R., & Braz, A. M. (2013). Produtividade de feijão caupi em função da calagem e fósforo. *Revista Caatinga*, 26(4), 54-62.
- Franco, A. A., & Neves, M. C. P. (1992). Fatores limitantes à fixação biológica de nitrogênio. In: Cardoso, E. J. B. N., Tsai, S.M., & Neves, M. C. P. (1992). *Microbiologia do solo*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo.
- Guimarães, A. A., Jaramillo, P. M., Nóbrega, R. S. A., Florentino, L. A., Silva, K. B., & Moreira, F. M. S. (2012). Genetic and Symbiotic Diversity of Nitrogen - Fixing Bacteria Isolated from Agricultural Soils in the Western Amazon by Using Cowpea as the Trap Plant. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(18), 6726-6733. 10.1128/AEM.01303-12
- Hara, F. A. S., & Oliveira, L. A. (2004). Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbio oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. *Acta Amazonia*, 34(1), 343-357. 10.1590/S0044-59672004000300002
- Howieson, J., & Ballard, R. (2004). Optimizing the legume symbiosis in stress-ful and competitive environments within southern Australia - some contemporary thoughts. *Soil Biol Biochem*, 36, 1261-1273. 10.1016/j.soilbio.2004.04.008



- Howieson, J. G., Robson, A. D., & Abott, L. K. (1992). Calcium modifies pH effects on the growth of acid-tolerant and acid-sensitive *Rhizobium meliloti*. *Australian Journal of Agriculture Research*, 43, 765-772. 10.1071/AR9920765
- Hungria, M., & Vargas, M. T. A. (2000). Environmental factors affecting grain legumes in the tropics, with a emphasis on Brazil. *Field Crops Research*, 65, 151-164. 10.1016/S0378-4290(99)00084-2
- Hungria, M., Vargas, M. A. T., Suhett, A. R., & Peres, J. R. R. (1994). Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: Araujo, R.S., & Hungria, M. (Eds). *Microrganismos de importância agrícola*. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.
- Jaramillo, P. M. D., Guimarães, A. A., Florentino, L. A., Silva, K. B., Nóbrega, R. S. A., & Moreira, F. M. S. (2013). Symbiotic nitrogen-fixing bacterial populations trapped from soils under agroforestry systems in de Wester Amazon. *Scientia Agricola*, 70(6), 397-404. 10.1590/S0103-90162013000600004
- Kawai, F., Zhang, D., & Sugimoto, M. (2000). Isolation and characterization of acid and Al-tolerant microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 189(2), 143-147. 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09220.x
- Lopes, A. S., & Alvarez V., V. H. (1999). Apresentação dos resultados das análises de solos. In: Ribeiro, A. C., Guimarães, P. T. G., & Alvarez V., V. H. *Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais*. Viçosa-MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo.
- Mesquita, A. C., Gomes, L. F., Santos Junior, J. B. M. dos, Souza, I. J. da S., Nogueira, W. R. da S., & Felix, A. T. R. (2020). Bactérias diazotróficas no crescimento inicial e alterações bioquímicas de *Vigna unguiculata* sob déficit hídrico. *Research, Society and Development*, 9(8), 1-23. 10.33448/rsd-v9i8.5641
- Nascimento, C. S., Lira Junior, M. A., Stamford, N. P., Freire, M. B. G. S., & Sousa, C. A. (2008). Nodulação e produção do caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) sob efeito de plantas de cobertura e inoculação. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 32(2), 579-587. 10.1590/S0100-06832008000200013
- Nicholaides, J. J. I., Sanchez, P. A., Bandy, D. E., Villachia, J. H., Couto, A. J., & Valverde, C. S. (1983). Crop production systems in the Amazon Basin. In: Moran, E. F. *The Dilemma of Amazonian Development*. New York: Westview Press.
- Nuernberg, N. J. (1983). *Efeito de sucessões de culturas e tipos de adubação no rendimento e características de um solo na encosta basáltica sul-rio grandense*. Rio Grande do Sul-RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Octive, J. C., Johson, A. C., & Wood, M. (1994). Effects of previous aluminum exposure on motility and nodulation by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *Soil Biology and Biochemistry*, 26(11), 1477-1482. 10.1016/0038-0717(94)90087-6
- Ogega, J. K., Were, B. J., Nekesa, A. O., & Okalebo, J. R. (2018). Evaluating the effectiveness of different rhizobia strains and their effect on crop yields in acid soils of Western Kenya. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 6(2), 195-198. 10.24925/turjaf.v6i2.195-198.1553
- Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J., & Shitsuka, R. (2018). Metodologia da Pesquisa Científica. Santa Maria-RS: Universidade Federal de Santa Maria. [https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic\\_Computacao\\_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1](https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1)
- Quaggio, J. A. (2000). *Acidez e calagem em solos tropicais*. Campinas-SP: Instituto Agronômico.
- Rocha, M., Freire Filho, F. R., Silva, K. J. D., Ribeiro, V. Q., Lopes, A. M., Vilarinho, A. A., Gonçalves, J. R. P., Cavalcante, J. S., & Vieira Júnior, J. R. (2009). *Adaptabilidade e estabilidade produtiva de genótipos de feijão-caupi eretos na Região Norte do Brasil*. Belém-PA: Embrapa Amazônia Oriental.
- Rocha, W. S., Santos, M. G. dos, Sakai, T. R. P., Silva, T. A. da, Fidelis, R. R., & Santos, M. M. (2018). Acúmulo de biomassa em função de doses de fósforo e inoculação de rizóbio em feijão-caupi. *Cultura Agronômica*, 27(2), 273-286. 10.32929/2446-8355.2018v27n2p273-286
- Rufini, M., Silva, M. A. P., Ferreira, P. A. A., Cassetari, A. S., Soares, B. L., Andrade, M. J. B., & Moreira, F. M. S. (2014). Symbiotic efficiency and identification of rhizobia that nodulate cowpea in a Rhodic Eutrudox. *Biol Fertil Soils*, 50, 115-122. 10.1007/s00374-013-0832-4
- Saboya, R. C. C., Borges, P. R. S., Saboya, L. M. F., Monteiro, F. P. R., Souza, S. E. A., Santos, A. F., & Santo, E. R. (2013). Response of cowpea to inoculation with nitrogen-fixing strains in Gurupi Tocantins State. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 4(1), 40-48. 10.20873/jbb.uft.cemaf.v4n1.saboya
- Santos, K. C. S., Uchôa, S. C. P., Melo, V. F., Alves, J. M. A., Rocha, P. R. R., & Ximenes, C. K. S. (2014). Inoculação com Bradyrhizobium e adubação nitrogenada em feijão-caupi cultivado em diferentes solos. *Revista Agro@mbiente*, 8(3), 306-317. 10.18227/1982-8470ragro.v8i3.469
- Santos, M. S.; Correa, E. S. Shinaigger, T. (2019). Diagnostico socioambiental e econômico dos quintais produtivos para agricultura familiar na Amazônia: estudo de caso em Fordlândia, Aveiro (PA). *Nature and conservation*, 12(1): 46-54. 10.6008/CBPC2318-2881.2019.001.0005.
- Silva, A. O. Da.; Silva, A. O. Da; Santos, D. C. R.; Rosário, I. C. B. Do.; Barata, H. Da S.; Raiol, L. L. (2021) Da tradição à técnica: perspectivas e realidades da agricultura de derruba e queima na Amazônia. *Research, Society and Development*, 10(1): e38310111799. 10.33448/rsd-v10i1.11799.
- Silva, G. C., Magalhães, R. C., Sobreira, A. C., Schmitz, R., & Silva, L. C. (2016). Rendimento de grãos secos e componentes de produção de genótipos de feijão-caupi em cultivo irrigado e de sequeiro. *Revista Agro@Mambiente On-Line*, 10(4), 342-350. 10.18227/1982-8470RAGRO.V10i4.3385
- Tsai, S. M., Bonetti, R., Agbala, S. M., & Rosseto, R. (1993). Minimizing the effect of mineral nitrogen on biological nitrogen fixation in common bean by increasing nutrient levels. *Plant and Soil*, 152(1), 131-138. 10.1007/BF00016342
- Vincent, J. M. A. (1970). *Manual for practical study of root nodule bacteria*. Edinburgh: Blackwell Scientific Publ.
- Wani, S. P., Rupela, O. P., & Lee, K. K. (1995). Sustainable agriculture in the semi-arid tropics through biological nitrogen fixation in grain legumes. *Plant and Soil*, 147(1), 19-49. 10.1007/BF00032240

Watkin, E. L. J., O'hara, G. W., Howieson, J. G., & Glenn, A. R. (2000). Identification of tolerance to soil acidity in inoculant strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. *Soil Biology and Biochemistry*, 32, 1393-1403. 10.1016/S0038-0717(00)00057-2

Wood, M. (1995). A mechanism of aluminum toxicity to soil bacteria and possible ecological implications. *Plant and Soil*, 171, 63-69. 10.1007/BF00009566

Zilli, J. E., Gianluppi, V., Campo, R. J., Rouws, J. R. C., & Hungria, M. (2010). Inoculação da soja com Bradyrhizobium no sulco de semeadura alternativamente à inoculação de sementes. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 34(6), 1875-1881. 10.1590/S0100-204X2008000400014

Zilli, J. E., Valichski, R. R., Rumjanek, N. G., Simões Araújo, J. L., Freire Filho, F. R., & Neves, M. C. P. (2006). Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do Cerrado em caupi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41(5), 811-818. 10.1590/S0100-204X2006000500013