

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

TESE

**Crescimento e Produtividade de Grãos do Feijoeiro
Comum Sob Inoculação com *Rhizobium* e Adubação
Nitrogenada**

Rodrigo Luiz Neves Barros

2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**CRESCIMENTO E PRODUTIVIDADE DE GRÃOS DO FEIJOEIRO
COMUM SOB INOCULAÇÃO COM *RHIZOBIUM* E ADUBAÇÃO
NITROGENADA**

RODRIGO LUIZ NEVES BARROS

Sob a Orientação do Professor
Carlos Pimentel

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Área de Concentração em Fisiologia da Produção.

Seropédica, RJ
Outubro de 2016

635.652

B277c

T

Barros, Rodrigo Luiz Neves, 1985-
Crescimento e produtividade de grãos do feijoeiro comum sob inoculação com Rhizobium e adubação nitrogenada / Rodrigo Luiz Neves Barros. - 2016.
87 f.: il.

Orientador: Carlos Pimentel.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, 2016.

Bibliografia: f. 51-57.

1. Feijão - Cultivo - Teses. 2. Feijão - Inoculação - Teses. 3. Feijão - Crescimento - Teses. 4. Feijão - Adubos e fertilizantes - Teses. 5. Fertilizantes nitrogenados - Teses. 6. Nitrogênio - Fixação - Teses. 7. Rizóbio - Teses. I. Pimentel, Carlos, 1955- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

RODRIGO LUIZ NEVES BARROS

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de Concentração em Fisiologia da Produção.

TESE APROVADA EM: / / /

Carlos Pimentel. (Dr.) UFRRJ/IA/FITOTECNIA
(Orientador)

Antônio Carlos de Sousa Abboud. (Dr.) UFRRJ/IA/FITOTECNIA

Jorge Jacob Neto. (Dr.) UFRRJ/IA/FITOTECNIA

Ederson da Conceição Jesus. (Dr.) EMBRAPA-CNPAB

Jerri Édson Zilli. (Dr.) EMBRAPA-CNPAB

DEDICATÓRIA

A minha mãe Amanda, ao meu pai Áureo e meus irmãos Antonio e Fernanda.

Ofereço!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que sempre me apoiaram e me incentivaram a trilhar pelo caminho do bem.

Ao orientador Carlos Pimentel pela dedicação, contribuindo a cada dia pelo aprimoramento do estudo.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro UFRRJ, especialmente ao Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade concedida para a realização do doutorado.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos companheiros de laboratório Leandro, Welliton, David e Gepatrik pela ajuda na condução dos experimentos.

Ao técnico do laboratório Marcos pela condução das análises laboratoriais.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Instituto de Agronomia.

Aos meus amigos que sempre estiveram me apoiando nos momentos mais difíceis.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para que eu pudesse concluir essa tese.

RESUMO GERAL

BARROS, Rodrigo Luiz Neves. **Crescimento e produtividade de grãos do feijoeiro comum sob inoculação com *Rhizobium* e adubação nitrogenada**. 2016. 72f. Tese (Doutorado em Agronomia, Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

A produtividade média de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) no Brasil é uma das mais baixas do mundo. Alternativas que possam aumentar a produtividade de forma sustentável devem ser preconizadas, tais como a redução do uso de fertilizantes nitrogenados pela adoção da fixação biológica de nitrogênio (FBN). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da inoculação de rizóbios e, ou da adubação nitrogenada de semeadura no crescimento e produtividade do feijoeiro comum. Foram instalados quatro experimentos no campo experimental do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Brasil, de modo que cada experimento fosse repetido duas vezes na mesma época de cultivo. Os experimentos foram instalados nas épocas da seca e das águas dos anos de 2013 e 2014, em um solo classificado como Argissolo Vermelho Amarelo. Para ambos os experimentos, foi utilizado o cultivar de feijoeiro comum Carioca, de crescimento indeterminado e alto potencial produtivo. No primeiro ano de cultivo das épocas da seca e das águas os experimentos foram compostos por três tratamentos: apenas adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 dias após a emergência (DAE) (A), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (I+N), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (IA) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* sem adubação nitrogenada em nenhum estágio (I-N), apenas avaliado no segundo ano de ambas as épocas de cultivo. O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso, com quatro repetições em ambos os anos. Cada parcela foi constituída por 6 linhas de 5 m, espaçadas de 0,5 m de distância. No estágio de polinização, avaliou-se o número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca raiz (MSR), sendo observado o maior NN e MSN nos tratamentos que não receberam adubação nitrogenada na semeadura em ambos os anos. Também foram realizadas coletas de tecido foliar para determinação do teor de proteínas solúveis (TPSF) em quatro estádios de desenvolvimento (vegetativo, polinização, florescimento pleno e enchimento de grãos), com valores mais elevados para o TPSF no tratamento IA no estágio de florescimento. Além disso, para análise de crescimento, foram coletadas três plantas por parcela, semanalmente dos 14 DAE até a maturação fisiológica. Na maturação fisiológica foram coletadas todas as plantas das duas linhas centrais de cada parcela, desprezando-se o meio metro final de cada extremidade, para avaliar os componentes de produção: número de vagens por planta (NV), número de grãos por vagem (NGV), massa seca de 100 grãos (MS100G) e produtividade de grãos (PG). Quanto aos componentes de produção, ocorreu diferença significativa apenas para PG, com o tratamento IA apresentando rendimentos mais elevados em ambos os anos. Portanto, segundo os resultados obtidos, a inoculação de rizóbios pode substituir a adubação nitrogenada com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura sem perda de produtividade. Além disso, a inoculação com rizóbios, acrescida da adubação com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura, inibiu parcialmente a nodulação e propiciou acréscimo de produtividade em ambas as épocas. No entanto, mais estudos são necessários para recomendação dessas práticas agrônômicas.

Palavras-chave: Análise de crescimento de plantas, Fixação biológica de nitrogênio, *Phaseolus vulgaris* L., *Rhizobium fleirei*, Ureia

GENERAL ABSTRACT

BARROS, Rodrigo Luiz Neves. **Growth and grain yield of common bean under inoculation with *Rhizobium* and nitrogen fertilization**. 2016. 72f. Thesis (Ph.D. in Crop Science). Institute of Agronomy, Crop Science Department, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

The average productivity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Brazil is one of the lowest in the world. Alternatives that can increase yield in a sustainable manner should be preconized, such as reducing the use of nitrogen fertilizers through the adoption of biological nitrogen fixation. Therefore, the objective of this study was to evaluate the influence of rhizobia inoculation and sowing nitrogen fertilization on growth and common bean yield (*Phaseolus vulgaris* L.). Four experiments were conducted in the field, at the Experimental Station of the Department of Crop Science at the Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, Brazil. So that each experiment was repeated twice in the same growing season. The experiments were conducted in the dry season and rainy the years 2013 and 2014, In a soil classified as Kanhapudalf. For both experiments, we used the common bean cultivar Carioca, indeterminate growth and high yield potential. In the first year of cultivation in the dry season and rainy the experiments were composed of three treatments: only fertilized with 20 kg N ha⁻¹ at sowing and with 40 kg N ha⁻¹ at 25 DAE (A); only inoculated with *Rhizobium* at sowing and fertilized with 40 kg N ha⁻¹ at 25 DAE (I+N); and inoculated and fertilized with 20 kg N ha⁻¹ at sowing and with 40 kg N ha⁻¹ at 25 DAE (IA); and an additional treatment only inoculated with *Rhizobium* with no N fertilization at any phase (I-N), only evaluated in the second year of both growing seasons. The experimental design used was in randomized blocks, with four replications in both years. Each plot consisted of 6 rows of 5 m spaced 0,5 m apart. At pollination, it was evaluated the number of nodules (NN), nodules dry weight (MSN), shoot dry weight (MSPA) and root dry weight (MSR). However, was observed the highest NN and MSN in treatments without nitrogen fertilization at sowing in both years. Also, it was determinate the leaf soluble proteins content (TPSF) in four developmental stages vegetative, pollination, flowering and grain filling), with higher values for the TPSF in the treatment IA flowering stage. Moreover, for the growth analysis, three plants were collected on the second line of each side of the plot, weekly from 14 DAE until physiological maturation. At physiological maturation all the plants of the two central rows were collected from each plot to evaluate the crop yield components: number of pods per plant (NV), number of grains per pod (NGV), 100 grain matter (MS100G) and grain yield (PG). As for the production of components, there was a significant difference only for PG, with IA producing the highest PG in both years. Therefore, based on these results, it can be concluded that the inoculation with *Rhizobium* may replace the nitrogen fertilization (20 kg ha⁻¹) at planting without yield loss, however, the nitrogen fertilization (20 kg ha⁻¹) combined with inoculation with *Rhizobium* at sowing partly inhibit the root nodulation of the common bean plants and increased its total dry weight and grain yield, in both season. However, more studies are needed to recommend these agronomic practices.

key words: Plant growth analysis, Biological nitrogen fixation, *Phaseolus vulgaris* L., *Rhizobium fleirei*, Urea

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Massa seca total (MST, em g m^{-2}) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (A, ▼), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (I+N, ○), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (IA, Δ) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N, ●), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, maio de 2013 e 2014).19
- Figura 2:** Índice de área foliar (IAF, em $\text{m}^2 \text{ m}^{-2}$) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (A, ▼), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (I+N, ○), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (IA, Δ) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N, ●), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, maio de 2013 e 2014).....20
- Figura 3:** Taxa de crescimento da cultura (TCC, em $\text{g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (A, ▼), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (I+N, ○), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (IA, Δ) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N, ●), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, maio de 2013 e 2014).....21
- Figura 4:** Taxa de assimilação líquida (TAL, em $\text{g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (A, ▼), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (I+N, ○), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (IA, Δ) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N, ●), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, maio de 2013 e 2014).....22
- Figura 5:** Teor de proteína solúvel (TPSF, em mg de proteína solúvel g^{-1} de massa fresca foliar), quantificadas aos 20 dias após a emergência (20 DAE), polinização (P), florescimento pleno (FP) e enchimento de grãos (EG) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (A), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (I+N), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (IA) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, maio de 2013 e 2014).....25

- Figura 6:** Massa seca total (MST, em g m^{-2}) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (A, ▼), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (I+N, ○), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (IA, Δ) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N, ●), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, outubro de 2013 e 2014).37
- Figura 7:** Índice de área foliar (IAF, em $\text{m}^2 \text{ m}^{-2}$) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (A, ▼), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (I+N, ○), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (IA, Δ) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N, ●), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, outubro de 2013 e 2014).38
- Figura 8:** Taxa de crescimento da cultura (TCC, em $\text{g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (A, ▼), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (I+N, ○), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (IA, Δ) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N, ●), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, outubro de 2013 e 2014).39
- Figura 9:** Taxa de assimilação líquida ($\text{g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (A, ▼), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (I+N, ○), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (IA, Δ) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N, ●), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, outubro de 2013 e 2014).40
- Figura 10:** Teor de proteína solúvel (TPSF, em mg de proteína solúvel g^{-1} de massa fresca foliar), quantificadas aos 20 dias após a emergência (20 DAE), polinização (P), florescimento pleno (FP) e enchimento de grãos (EG) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (A), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (I+N), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (IA) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, maio de 2013 e 2014).42
- Figura 11:** Teor de aminoácidos livres no tecido foliar (TALF, em μg leucina g^{-1} massa fresca), teor de amido no tecido foliar (TAF, em mg de glicose g^{-1} massa fresca) e açúcares solúveis no tecido foliar (TASF, em mg de glicose g^{-1} massa fresca) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, quantificados aos 20 dias após a emergência (20 DAE), polinização (P), florescimento pleno (FP) e enchimento de grãos (EG), nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (A), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (I+N), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (IA) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, maio de 2013 e 2014).44

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1:** Número de nódulos por planta (NN), massa seca de nódulos por planta (MSN), massa seca da parte aérea por planta (MSPA) e massa seca de raiz por planta (MSR), do feijoeiro comum, cultivar Carioca, avaliados no estágio de polinização, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (A), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (I+N), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (IA) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, maio de 2013 e 2014).24
- Tabela 2:** Número de vagens por planta (NV), número de grãos por vagem (NGV), massa seca de 100 grãos (MS100G) e produtividade de grãos (PG), do feijoeiro comum, cultivar Carioca, avaliados na maturação dos grãos, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (A), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (I+N), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (IA) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, maio de 2013 e 2014).26
- Tabela 3:** Número de nódulos por planta (NN), massa seca de nódulos por planta (MSN), massa seca da parte aérea por planta (MSPA) e massa seca de raiz por planta (MSR) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, avaliados no estágio de polinização, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (A), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (I+N), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (IA) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, outubro de 2013 e 2014).41
- Tabela 4:** Número de vagens por planta (NV), número de grãos por vagem (NGV), massa seca de 100 grãos (MS100) e produtividade de grãos (PG) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, avaliados na maturação dos grãos, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (A), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (I+N), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (IA) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, outubro de 2013 e 2014).45

ÍNDICE DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

AF	área foliar (m^2)
DAE	dias após a emergência
FBN	fixação biológica de nitrogênio
IAF	índice de área foliar ($\text{m}^2 \text{m}^{-2}$)
MS100G	massa seca de cem grãos (g)
MSN	massa de nódulos por planta (mg)
MSPA	massa seca da parte aérea por planta (g)
MSR	massa seca de raiz por planta (g)
MST	massa seca total (g m^{-2})
NGV	número de grãos por vagem
NN	número de nódulos por planta
NV	número de vagem por planta
PG	produtividade de grãos (kg ha^{-1})
TAL	taxa de assimilação líquida ($\text{g m}^{-2} \text{dia}^{-1}$)
TCC	taxa de crescimento da cultura ($\text{g m}^{-2} \text{dia}^{-1}$)

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 A Cultura do Feijoeiro Comum	1
1.1.2 Importância do feijoeiro comum	1
1.2 Adubos Nitrogenados na Cultura do Feijoeiro Comum	2
1.3 Fixação Biológica de Nitrogênio no Feijoeiro Comum.....	3
1.4 Interação Entre a Adubação Nitrogenada e a Fixação Biológica de Nitrogênio	5
1.5 Análise de Crescimento	7
1.6 Proteínas Solúveis	9
2 OBJETIVOS	10
3 HIPÓTESES	10
4 CAPÍTULO I.....	11
CRESCIMENTO E PRODUTIVIDADE DE GRÃOS DO FEIJOEIRO COMUM SOB INOCULAÇÃO COM <i>RHIZOBIUM</i> E ADUBAÇÃO NITROGENADA NA ÉPOCA DA SECA.....	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
4.1 INTRODUÇÃO	14
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	16
4.2.1 Descrição da Área Experimental e do Clima	16
4.2.2 Manejo da Cultura.....	16
4.2.3 Delineamento Experimental e Análise Estatística.....	17

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.3.1 Acúmulo de Massa Seca e Área Foliar	18
4.3.2 Nodulação e Acúmulo de Massa Seca das Plantas no Estádio de Polinização	23
4.3.3 Teor Foliar de Proteína Solúvel em Quatro Estádios Fenológicos	24
4.3.4 Componentes de Produção.....	26
4.4 CONCLUSÃO	28
5 CAPÍTULO II.....	29
CRESCIMENTO E PRODUTIVIDADE DE GRÃOS DO FEIJOEIRO COMUM SOB INOCULAÇÃO COM <i>RHIZOBIUM</i> E ADUBAÇÃO NITROGENADA NA ÉPOCA DAS ÁGUAS	29
RESUMO	30
ABSTRACT	31
5.1 INTRODUÇÃO	32
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
5.2.1 Descrição da Área Experimental e do Clima	34
5.2.2 Manejo da Cultura.....	34
5.2.3 Delineamento Experimental e Análise Estatística.....	35
5.3 RESULTADOS	36
5.3.1 Acúmulo de Massa Seca e Área Foliar.....	36
5.3.2 Nodulação e Acúmulo de Massa Seca das Plantas no Estádio de Polinização	40
5.3.3 Teores Foliar de Proteína Solúvel, Aminoácidos Livres, Amido e Açúcares Solúveis em Quatro Estádios Fenológicos.....	41
5.3.4 Componentes de Produção.....	45
5.4 DISCUSSÃO	46
5.4.1 Acúmulo de Massa Seca e Área Foliar.....	46

5.4.2 Nodulação e Acúmulo de Massa Seca das Plantas no Estádio de Polinização	47
5.4.3 Teores Foliar de Proteína Solúvel, Aminoácidos Livres, Amido e Açúcares Solúveis em Quatro Estádios Fenológicos.....	47
5.4.4 Componentes de Produção.....	48
5.5 CONCLUSÃO	49
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
8 ANEXOS.....	58
Anexo 8.1: Massa seca de folhas (MSF, em g m ⁻²) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha ⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha ⁻¹ aos 25 DAE (A), inoculado com <i>Rhizobium</i> e adubado com 40 kg N ha ⁻¹ aos 25 DAE (I+N), inoculado com <i>Rhizobium</i> e adubado com 20 kg N ha ⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha ⁻¹ aos 25 DAE (IA) e um tratamento adicional somente inoculado com <i>Rhizobium</i> (I-N), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, maio de 2013 e 2014).....	58
Anexo 8.2: Massa seca de folha (MSF, em g m ⁻²) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha ⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha ⁻¹ aos 25 DAE (A), inoculado com <i>Rhizobium</i> e adubado com 40 kg N ha ⁻¹ aos 25 DAE (I+N), inoculado com <i>Rhizobium</i> e adubado com 20 kg N ha ⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha ⁻¹ aos 25 DAE (IA) e um tratamento adicional somente inoculado com <i>Rhizobium</i> (I-N), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, outubro de 2013 e 2014).	59
Anexo 8.3: Massa seca de caule (MSC, em g m ⁻²) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha ⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha ⁻¹ aos 25 DAE (A), inoculado com <i>Rhizobium</i> e adubado com 40 kg N ha ⁻¹ aos 25 DAE (I+N), inoculado com <i>Rhizobium</i> e adubado com 20 kg N ha ⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha ⁻¹ aos 25 DAE (IA) e um tratamento adicional somente inoculado com <i>Rhizobium</i> (I-N), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, maio de 2013 e 2014).....	60
Anexo 8.4: Massa seca de caule (MSC, em g m ⁻²) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha ⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha ⁻¹ aos 25 DAE (A), inoculado com <i>Rhizobium</i> e adubado com 40 kg N ha ⁻¹ aos 25 DAE (I+N), inoculado com <i>Rhizobium</i> e adubado com 20 kg N ha ⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha ⁻¹ aos 25 DAE (IA) e um tratamento adicional somente inoculado com <i>Rhizobium</i> (I-N), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, outubro de 2013 e 2014).	61

Anexo 8.5: Massa seca de raiz (MSR, em g m ⁻²) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha ⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha ⁻¹ aos 25 DAE (A), inoculado com <i>Rhizobium</i> e adubado com 40 kg N ha ⁻¹ aos 25 DAE (I+N), inoculado com <i>Rhizobium</i> e adubado com 20 kg N ha ⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha ⁻¹ aos 25 DAE (IA) e um tratamento adicional somente inoculado com <i>Rhizobium</i> (I-N), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, maio de 2013 e 2014).....	62
Anexo 8.6: Massa seca de raiz (MSR, em g m ⁻²) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha ⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha ⁻¹ aos 25 DAE (A), inoculado com <i>Rhizobium</i> e adubado com 40 kg N ha ⁻¹ aos 25 DAE (I+N), inoculado com <i>Rhizobium</i> e adubado com 20 kg N ha ⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha ⁻¹ aos 25 DAE (IA) e um tratamento adicional somente inoculado com <i>Rhizobium</i> (I-N), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, outubro de 2013 e 2014).	63
Anexo 8.7: Massa seca de vagem (MSV, em g m ⁻²) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha ⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha ⁻¹ aos 25 DAE (A), inoculado com <i>Rhizobium</i> e adubado com 40 kg N ha ⁻¹ aos 25 DAE (I+N), inoculado com <i>Rhizobium</i> e adubado com 20 kg N ha ⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha ⁻¹ aos 25 DAE (IA) e um tratamento adicional somente inoculado com <i>Rhizobium</i> (I-N), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, maio de 2013 e 2014).....	64
Anexo 8.8: Massa seca de vagem (MSV, em g m ⁻²) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha ⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha ⁻¹ aos 25 DAE (A), inoculado com <i>Rhizobium</i> e adubado com 40 kg N ha ⁻¹ aos 25 DAE (I+N), inoculado com <i>Rhizobium</i> e adubado com 20 kg N ha ⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha ⁻¹ aos 25 DAE (IA) e um tratamento adicional somente inoculado com <i>Rhizobium</i> (I-N), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, outubro de 2013 e 2014).	65
Anexo 8.9: DOSAGEM DE METABÓLITOS PRIMÁRIOS, PARA CARACTERIZAR O “STATUS FISIOLÓGICO” DA FOLHA E DA PLANTA.	66
Anexo 8.10. Correlação entre o teor de proteína solúvel e a produtividade de grãos do feijoeiro comum, cultivar carioca, cultivado nas épocas da seca e das águas sob três tratamentos no primeiro ano da época da seca e das águas: apenas adubado com 20 kg N ha ⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha ⁻¹ aos 25 DAE (A), inoculado com <i>Rhizobium</i> e adubação com 40 kg N ha ⁻¹ aos 25 DAE (I+N), inoculado com <i>Rhizobium</i> e adubação com 20 kg N ha ⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha ⁻¹ aos 25 DAE (IA) e um tratamento adicional somente inoculado com <i>Rhizobium</i> sem adubação nitrogenada em nenhum estágio (I-N), apenas avaliada no segundo ano das épocas de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, maio e outubro de 2013 e 2014).	71

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 A Cultura do Feijoeiro Comum

O feijoeiro comum pertence à ordem Rosales, família Fabaceae (Leguminosae), subfamília Faboideae (Papilionoideae), tribo Phaseoleae, gênero *Phaseolus*, espécie *Phaseolus vulgaris* L. O gênero *Phaseolus* originou-se nas Américas e possui cerca de 55 espécies, das quais cinco são cultivadas: *P. vulgaris* L. (feijão comum), *P. lunatus* L. (feijão espadinho, feijão verde), *P. coccineus* L. (feijão-da-Espanha, feijão-de-sete-anos), *P. acutifolius* A. Gray var. *latifolius* Freeman e *P. polyanthus* Greenman. Destas o feijoeiro comum, *Phaseolus vulgaris*, é o mais importante, por ser a espécie cultivada mais antiga e também a mais utilizada nos cinco continentes (GEPTS; DEBOUCK, 1991).

O feijoeiro comum é uma planta herbácea de hábito de crescimento determinado (ereto, terminando em inflorescência) ou indeterminado (nunca termina em inflorescência). A sua reprodução se dá por autofecundação, devido ao mecanismo de cleistogamia, com apenas 5% de fecundação cruzada. O ciclo biológico da planta do feijoeiro comum é dividido nas fases vegetativa e reprodutiva (VIEIRA et al., 2006). Estas fases por sua vez, são subdivididas em dez etapas. A fase vegetativa (V) é constituída das etapas V0 a V4 e a reprodutiva (R), das etapas R5 a R9. Quando a semente é colocada em condição de germinar, começa o período vegetativo, que continua até o aparecimento do primeiro botão floral nos cultivares de hábito de crescimento determinados, ou da primeira inflorescência, nos cultivares de hábito indeterminados (SANTOS; GAVILANES, 2006).

No Brasil os genótipos mais cultivados de feijão comum são do tipo *Phaseolus vulgaris* var. *mexicanus*, com centro de origem no México, grãos pequenos, proteína phaseolina tipo “T” e adaptados a temperaturas mais elevadas (NORMAN et al., 1995). A maioria dos cultivares, utilizadas no Brasil apresenta teores de proteína nos grãos de 20 a 25% (BORÉN; CARNEIRO, 2006), e sob condições ambientais normais, completam seu ciclo em 70-85 dias (FAGERIA; BALIGAR, 2005). O feijão tipo carioca, até a década de 1970, possuía um mercado muito restrito no país, mas atualmente é o tipo mais cultivado e consumido no país, apresentando grãos de coloração creme com rajas marrons, peso de 100 grãos variando de 23 a 25 gramas, hábito de crescimento indeterminado e ciclo de aproximadamente 85 dias (VIEIRA et al., 2006).

Os grãos do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) representam uma das principais fontes de proteínas da população brasileira. Contudo, embora o Brasil seja o principal produtor e consumidor mundial de grãos dessa leguminosa, o rendimento médio nacional é baixo (HUNGRIA; MENDES; MERCANTE, 2013a), estimado em apenas 866 kg ha⁻¹ na safra 2015 (CONAB, 2015). Considera-se que a baixa adoção de tecnologias pelo agricultor e o cultivo em solos marginais estejam entre os principais fatores contribuindo para esse cenário (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2003).

1.1.2 Importância do feijoeiro comum

O feijão comum é um importante constituinte na dieta da população brasileira em função de sua proteína rica em aminoácido essencial lisina, porém pobre nos aminoácidos sulfurados metionina e cisteína, essenciais ao homem (BORÉN; CARNEIRO, 2006). Isto exige uma parceria com cereais, pois estes são pobres em lisina, mais ricos em aminoácidos sulfurados, o que torna a tradicional dieta brasileira, o arroz com feijão complementar em

termos de aminoácidos essenciais, sendo considerada por especialistas de excelente valor nutritivo. Além da importância do feijão na alimentação da população brasileira e mundial, a cadeia de produção, beneficiamento e comercialização, gera emprego e renda, principalmente para a classe menos privilegiada (VIEIRA et al., 2006).

O Brasil é o maior produtor mundial de feijão comum, que se constitui no alimento protéico básico na dieta do brasileiro. O consumidor é regionalmente exigente quanto à cor e o tipo de grão, além da qualidade culinária, sendo que, cerca de 70% do consumo é de grãos tipo carioca, 20% de grãos do tipo preto e 10% de outros tipos de grãos, produzidos, principalmente, nos Estados das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (DEL; MELO, 2005). O feijão comum, com denominações diferentes, pode ser cultivado em três épocas distintas de semeadura: feijão de 1ª época ou “feijão das águas”, cultivo de primavera-verão; feijão de 2ª época ou “feijão da seca”, cultivo de verão-outono; e o feijão de 3ª época ou “feijão de inverno”, cultivo de outono-inverno. Os cultivos do feijão de 1ª e 2ª épocas correspondem a mais de 80% da produção nacional (HUNGRIA; MENDES; MERCANTE, 2013a).

O Brasil produziu na safra de 2015/2016, cerca de 2,514 milhões de toneladas de grãos de feijão comum, em uma área 2,837 milhões de hectares, com produtividade média de 866 kg ha⁻¹, contudo em áreas irrigadas a produtividade pode superar facilmente os 3000 kg ha⁻¹ (CONAB, 2015), existindo cultivares com potencial produtivo acima de 4000 Kg ha⁻¹ (HUNGRIA et al., 2000).

O feijoeiro comum reveste-se de grande importância econômica e social (HUNGRIA; KASCHUK, 2014). Visto que, aproximadamente 70% do total de feijão comum produzido no Brasil é proveniente da agricultura familiar, em plantios realizados principalmente na época das águas (primeira safra) e da seca (DEL; MELO, 2005). Entre os principais fatores limitantes da produtividade da cultura do feijoeiro no País, destacam-se aqueles relacionados ao baixo nível técnico empregado pelos produtores e ao cultivo do feijoeiro em solos de baixa fertilidade, especialmente pobres em N (STRALIOTTO; ARAÚJO, 2015).

1.2 Adubos Nitrogenados na Cultura do Feijoeiro Comum

O feijoeiro comum é considerado uma planta exigente em nutrientes, devido ao pequeno e pouco profundo sistema radicular e ao ciclo curto, sendo fundamental que o nutriente seja colocado à disposição da planta em tempo e local adequados (VIEIRA, TSAI, TEXEIRA, 2005). O nitrogênio (N) é o nutriente mais exigido pelo feijoeiro (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2003), desempenhando diversas funções no metabolismo da planta, participando de diversos compostos considerados indispensáveis para o crescimento e desenvolvimento da planta, destacando-se as proteínas e as clorofilas, sendo que 50% do N foliar em plantas C₃, como o feijoeiro comum, está contido na molécula de Ribulose-1,5-Bisfosfato Carboxilase/Oxigenase (Rubisco), enzima responsável pela assimilação do CO₂ (EPSTEIN; BLOOM, 2005; LONG et al., 2006).

Entre os fertilizantes nitrogenados sólidos no mercado mundial, a uréia é a fonte mais utilizada, destacando-se pela facilidade de acesso, menor custo por unidade de N (45% de N), elevada solubilidade e compatibilidade para a mistura com outros fertilizantes e defensivos e alta taxa de absorção foliar (MALAVOLTA, 2006). Porém, o N é perdido com muita facilidade por lixiviação (lavagem no perfil do solo), desnitrificação (transformação do NO₃⁻ em N₂ e NO₂⁻²), volatilização do NH₃, e imobilização microbiana (STRALIOTTO et al., 2002; MALAVOLTA, 2006).

O nitrogênio é muito importante tanto no incremento da produção de grãos, como na elevação do teor proteico (FIDÉLIS et al., 2007). A absorção do nitrogênio, nutriente de alta mobilidade no solo, ocorre tanto na forma de cátion NH₄⁺ como na de ânion NO₃⁻ (HUNGRIA; KASCHUK, 2014). A forma amoniacal possui a vantagem de se fixar às

partículas coloidais do solo, principalmente às partículas de argila que são carregadas negativamente na periferia. Além disso, esta forma requer menos energia para a assimilação do que o nitrato (ZHOU et al., 2011). Já o nitrogênio nítrico é totalmente solúvel em água, não se fixa nas argilas e é facilmente lixiviado no solo (MALAVOLTA, 2006).

Os fertilizantes nitrogenados, embora representem a forma assimilada com maior rapidez pelas plantas, apresentam problemas como, custo elevado, poluição e emissão de gases de efeito estufa (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). A aplicação de N mineral nos solos tropicais pode apresentar, às vezes, baixa frequência de resposta (STRALIOTTO, 2002; MULAS et al., 2011). O aproveitamento do nitrogênio do fertilizante é normalmente inferior a 50%, podendo, em determinadas situações, em solos arenosos, atingir entre 5 e 10% (DUQUE et al., 1985). Considerando-se que os teores médios de N nos grãos de feijão são da ordem de 5%; conseqüentemente, para produzir 2000 kg de grãos ha⁻¹ são exportados, aproximadamente 100 kg N ha⁻¹, somente considerando o teor de N nos grãos (HUNGRIA; MENDES; MERCANTE, 2013a). Assumindo que 50% dessa necessidade possam ser fornecidos pelo solo (o que em geral não ocorre nos solos brasileiros, pobres em N), para suprir os 50 kg de N restantes com o uso de adubação nitrogenada seriam necessários 100 kg de N ha⁻¹, considerando a eficiência de uso pelas plantas de 50% e o uso da ureia (adubo nitrogenado mais comercializado no Brasil e que contém 45% de N), teríamos que fornecer 222 kg de ureia ha⁻¹. Considerando-se o elevado preço da ureia, do transporte e aplicação, o custo com a inoculação torna-se bem menos oneroso quando comparado ao uso de fertilizantes nitrogenados.

1.3 Fixação Biológica de Nitrogênio no Feijoeiro Comum

Assim como a maioria das leguminosas, o feijão comum pode se beneficiar da Fixação Biológica de nitrogênio (FBN) por meio de uma relação simbiótica com rizóbios fixadores de nitrogênio (PINTO; HUNGRIA; MERCANTE, 2007; MULAS et al., 2011; CARDOSO et al., 2012). Porém, a FBN no feijoeiro comum não é capaz de prover todas as suas exigências, para obtenção de elevada produtividade, sendo necessária a adição de fertilizante nitrogenado, objetivando principalmente a complementação das exigências de nitrogênio pelas plantas que não foram supridas pelo N-inorgânico do solo ou pela fixação biológica do nitrogênio atmosférico (HUNGRIA; MENDES; MERCANTE, 2013a).

O nitrogênio na planta pode ser obtido a partir do solo (principalmente pela decomposição da matéria orgânica), com pequenas doses pela fixação não biológica (como descargas elétricas), pela adição de fertilizantes nitrogenados, ou pelo processo de FBN do N₂ atmosférico (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). Sendo a FBN, o processo através do qual o N presente na atmosfera (N₂) é convertido em formas que podem ser utilizadas pelas plantas (HUNGRIA; MENDES; MERCANTE, 2013a). A simbiose entre bactérias fixadoras de N (pertencentes a vários gêneros e espécies de bactérias, mas conhecidas de modo coletivo como rizóbios) e leguminosas (família de plantas à qual pertence o feijoeiro e a soja, entre outras), no caso do feijoeiro comum, se desenvolve nas raízes, quando o rizóbio está presente no solo, naturalmente ou via inoculação, ele reconhece e infecta as raízes da planta hospedeira, induzindo a formação de nódulos, onde ocorre a fixação do N₂ (HUNGRIA; STACEY, 1997).

A nodulação é um processo complexo, que se inicia logo após a germinação, com a presença do rizóbio no solo ou aderido à semente, e envolve três etapas principais: pré-infecção; infecção e desenvolvimento nodular; e ativação e funcionamento do nódulo (CASSINI; FRANCO, 2006). Na pré-infecção, o rizóbio é atraído até as raízes da planta hospedeira através de diferentes substâncias exsudadas pelas raízes, como carboidratos, aminoácidos, além de compostos fenólicos (flavonóides) que compõem um gradiente químico

na rizosfera, resultando na atração da bactéria até a superfície radicular, fenômeno conhecido como quimiotaxia (HUNGRIA; STACEY, 1997). Essas substâncias atuam na bactéria ativando os genes específicos (genes nod) da nodulação. Após essa ativação, o rizóbio começa a produzir uma série de compostos denominados *fatores nod*, que interagem com os pêlos radiculares, modificando sua estrutura e morfologia, induzindo o curvamento para a adesão das células de rizóbios. Após a adesão inicial, o rizóbio consegue penetrar até as células corticais e formar uma estrutura especial chamada de cordão de infecção, sendo que no interior dessa estrutura, multiplicam-se as células do rizóbio. Ao atingir a região cortical, o rizóbio passa para o interior das células corticais, adaptando-se à sua nova função de fixação de nitrogênio, e é denominado de bacteróide. Após essa série de eventos, a estrutura nodular formada está apta a funcionar como um verdadeiro órgão de fixação de nitrogênio; sendo que, a FBN no feijão comum ocorre de 15 a 20 dias após a emergência (DAE) das plantas (HUNGRIA; BARRADAS; WALLSGROVE, 1991; CASSINI; FRANCO, 2006).

Entretanto, existem vários relatos e certo consenso de que a simbiose de rizóbios com a cultura do feijoeiro não é tão eficiente quanto com a cultura da soja. Isso ocorre devido a uma série de fatores relacionados à bactéria, à planta e ao meio ambiente (HUNGRIA; MENDES; MERCANTE; 2013a). Em relação à planta, uma limitação reside no melhoramento genético, que historicamente não tem priorizado o processo da FBN (NODARI et al., 1993). Em relação ao meio ambiente, a simbiose feijoeiro-rizóbio apresenta maior sensibilidade a estresses ambientais. Também existe a limitação devido a uma população elevada de rizóbios nos solos, que são muito eficientes em formar nódulos, mas pouco eficientes em fixar nitrogênio. Esses fatores resultam em que, muitas vezes, a contribuição da FBN seja baixa para o fornecimento de N à planta (HUNGRIA; STACEY, 1997; HUNGRIA, VARGAS, 2000).

O rizóbio, em simbiose, utiliza os carboidratos provenientes da fotossíntese da planta hospedeira na sua manutenção e para promover o processo de FBN; e por outro lado, a planta se beneficia do nitrogênio fixado pela bactéria (STRALIOTTO, 2002). Assim, a associação do feijoeiro comum com espécies de bactérias do grupo dos rizóbios, principalmente *Rhizobium fleirei*, é uma tecnologia capaz de substituir a adubação nitrogenada pelo menos em parte, reduzindo o custo de produção (GRANGE et al., 2007). Por outro lado, o nitrogênio no solo é um nutriente cuja presença ou ausência afeta a simbiose de várias formas (VIEIRA; TSAI; TEXEIRA, 2005). Em excesso, o fertilizante nitrogenado pode causar redução da eficiência simbiótica, porém, quando aplicado em pequenas quantidades, na semeadura da cultura do feijoeiro, permite um aumento no crescimento dos nódulos e maior FBN e produtividade da cultura (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2003).

O Rhizobium tropici é um gênero de bactérias gram-negativas, aeróbicas, que toleram pH abaixo de 5,5 e temperaturas de até 40°C, o que as tornam as bactérias fixadoras mais eficientes na nodulação do feijoeiro nas condições edafoclimáticas brasileiras (MARTINEZ-ROMERO et al., 1991). Existem estirpes de *Rhizobium tropici* com alto desempenho para a FBN, selecionadas para as condições edafoclimáticas brasileiras, sendo as estirpes recomendadas e aprovadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para inoculação do feijoeiro comum no Brasil são: SEMIA 4077 (=CIAT 899), SEMIA 4080 (=PRF 81) e SEMIA 4088 (=H 12) (MAPA, 2011; BARBOSA; GONZAGA, 2012). Porém, a estirpe SEMIA 4080, foi reclassificada como *Rhizobium fleirei*. Sendo esta selecionada dentro da variabilidade natural da população bacteriana dos solos do Estado do Paraná, Brasil, proporcionou rendimentos elevados de até 4000 kg de grãos ha⁻¹ para o feijoeiro comum, apenas com a inoculação, conduzindo a sua recomendação pelo MAPA para seu uso em inoculantes comerciais para a cultura do feijão comum desde 1998 (HUNGRIA et al., 2000; HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2003).

Assim sendo, o cenário da cultura do feijoeiro comum, com baixos rendimentos, pode ser drasticamente alterado pelo suprimento adequado de nitrogênio. Embora, durante muitos anos, tenha havido descrédito em relação a uso da tecnologia da FBN, rendimentos elevados e consistentes vêm sendo obtidos pela inoculação com estirpes de *Rhizobium fleirei* selecionadas pela pesquisa e disponíveis no mercado (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2003; PELEGRIN, 2009). A consistência desses resultados resultou em uma alteração da recomendação para a cultura do feijoeiro comum, dando maior ênfase ao uso de inoculantes. Vantagens econômicas e ambientais da FBN frente ao uso de fertilizantes nitrogenados são aplicáveis desde pequenos agricultores familiares, até propriedade altamente tecnificadas que visam altos rendimentos (HUNGRIA; MENDES; MERCANTE, 2013a).

1.4 Interação Entre a Adubação Nitrogenada e a Fixação Biológica de Nitrogênio

Os fertilizantes nitrogenados necessitam de um elevado consumo de energia na sua fabricação e, portanto, representam um elevado custo para a produção de alimentos, principalmente para os pequenos agricultores (SPECHT; HUME; KUMUDINI, 1999). Assim como a maioria das leguminosas, o feijão comum pode se beneficiar da FBN, por meio da simbiose com rizóbios (CARDOSO et al., 2012). A fixação biológica do nitrogênio (FBN) constitui-se em uma valiosa fonte deste nutriente para o feijão comum, tendo sua magnitude influenciada pela disponibilidade de N mineral na solução do solo (BRITO et al., 2015), geralmente a FBN do feijoeiro comum não é tão eficiente quanto à do feijão-caupi (HUNGRIA; MENDES; MERCANTE, 2013b) e a da cultura da soja que podem fixar todo o N necessário para obtenção de altas produtividades. Por causa do baixo desempenho do sistema simbiótico em feijão comum a adubação nitrogenada é uma prática comum na maioria das áreas de cultivo (HUNGRIA; MENDES; MERCANTE, 2013a).

Na cultura do feijão comum, para a obtenção de rendimentos econômicos, geralmente, é essencial a suplementação nitrogenada, principalmente até que a nodulação esteja plenamente estabelecida (HUNGRIA; MENDES; MERCANTE, 2013a). No entanto, é necessária uma dose de N que proporcione bom desenvolvimento da planta, mas que não venha prejudicar a FBN (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2003). De acordo com estudos realizados por Araújo et al. (1996); Amane et al. (1999), quando a aplicação do fertilizante nitrogenado foi realizada na época da semeadura ou logo após a emergência, até os 20 dias (V2 - V3), 70% do nitrogênio contido na planta provinha do fertilizante; mas a partir de 60 dias (R6) essa taxa caiu para menos de 40%, de maneira que a planta ao final do ciclo continha bem mais nitrogênio proveniente do solo do que de fertilizante. Baseado nestes resultados, Araújo et al. (1996) recomendam o parcelamento da adubação nitrogenada, devendo-se aplicar 1/3 da dose na semeadura e 2/3 dos 30 aos 45 dias após a semeadura (V4 - R6). Estes mesmos autores ainda relataram que, quando o nitrogênio é aplicado antes ou durante o florescimento, a utilização do fertilizante pelo feijoeiro é maior do que quando aplicado na semeadura. Tal fato pode estar relacionada ao pico de atividade das enzimas Nitrogenase e redutase do nitrato responsáveis, respectivamente, pela fixação biológica do Nitrogênio e pela assimilação do nitrogênio mineral do solo, ocorrem em épocas diferentes no feijoeiro. O pico de atividade da nitrogenase ocorre logo após o início da floração enquanto o pico de atividade da redutase do nitrato ocorre mais tarde, durante a fase de enchimento de grãos (FRANCO et al., 1979). Por isso o feijoeiro comum é mais beneficiado pela FBN no início do ciclo enquanto que a aplicação de adubos nitrogenados tem maior contribuição na fase de enchimento de grãos. Desta forma seria recomendável sempre inocular o rizóbio e, dependendo da relação custo/benefício, efetuar adubação com fertilizante nitrogenado no início da floração (VIEIRA et al, 2008).

As pesquisas em biotecnologia poderiam fornecer estratégias para melhorar a eficiência da FBN para o feijão comum, como na seleção de estirpes de rizóbios mais eficientes para a inoculação, de modo que pudessem substituir a adubação nitrogenada, sem redução na produtividade (GRANGE et al., 2007; MULAS et al., 2011). No entanto, as bactérias fixadoras de N não fornecem a quantidade necessária deste elemento à cultura do feijoeiro, de modo a assegurar uma alta produtividade, tornando-se necessária uma suplementação de N mineral (VIEIRA et al., 2008). Porém, em condições adequadas de manejo e condições ambientais, apenas o uso da inoculação de rizóbio proporcionou produtividade superior aos 4000 kg de grãos por ha⁻¹ (HUNGRIA et al., 2000).

A associação do feijoeiro comum com espécies de bactérias do grupo dos rizóbios é uma tecnologia capaz de substituir a adubação nitrogenada, reduzindo o custo de produção, principalmente em cultivo de subsistência (GRANGE et al., 2007). Por outro lado, o nitrogênio no solo é um nutriente cuja presença ou ausência afeta a simbiose de várias formas (VIEIRA; TSAI; TEXEIRA, 2005). Em excesso, o fertilizante nitrogenado pode causar redução da eficiência simbiótica, porém, quando aplicado em pequenas quantidades, na semeadura da cultura do feijoeiro comum, permite um aumento no crescimento dos nódulos e maior FBN, sendo que, por outro lado, o teor muito baixo de N no solo pode até ser limitante à atividade simbiótica (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2003).

Em solos ricos em matéria orgânica e nutrientes da região central dos Estados Unidos (EUA), cultivados com soja, onde a inoculação com rizóbio não é feita, estudos mostraram que o aumento contínuo da produtividade da soja ao longo dos anos, com novos cultivares, tem como uma de suas causas, o aumento da capacidade de FBN com rizóbios nativos, mesmo nesses solos ricos em N e matéria orgânica (SPECHT; HUME; KUMUDINI, 1999). Além disto, estudos realizados por Voisin et al. (2003), mostraram que a adição de nitrato em solução nutritiva, em doses inibitórias para a FBN da ervilha, diminuiu a massa seca dos nódulos, porém a atividade específica da nitrogenase se manteve. De acordo com Pelegrin et al. (2009), a adubação com 20 kg ha⁻¹ de N, acrescida de inoculante, com a estirpe de *Rhizobium tropici* semia 4077, possibilitou a obtenção de rendimento de grãos na cultura de feijoeiro comum equivalente à aplicação de até 160 kg ha⁻¹ de N.

No feijoeiro muitos esforços foram feitos para identificar e caracterizar genótipos com nodulação e fixação de N₂ superior (PEREIRA et al., 1989; WOLYN et al., 1989). Hungria; Campos; Mendes (2003) estudando a interferência da adubação com N em diferentes estirpes de rizóbios no feijoeiro comum constataram que, a adição de fertilizante nitrogenado na forma de ureia resultou em ganho de produção quando foi realizada a inoculação e adubação com 15 Kg N ha⁻¹ na semeadura e 30 Kg N ha⁻¹ em cobertura. No estágio de polinização, indicando que pequenas doses de N na semeadura podem proporcionar um efeito sinérgico na FBN, porém quando foram aplicados 30 Kg N ha⁻¹ na semeadura ocorreu redução no número, massa de nódulos e teor de ureídeos, indicando inibição da FBN pela adubação com N. Os mesmos autores também demonstram que estirpes mais adaptadas de rizóbio podem incrementar a FBN no feijoeiro, podendo ser obtidas produtividades elevadas apenas com o uso da inoculação.

Wahab; Zahran; Abd-Alla, (1996) avaliaram a interferência de fertilizantes nitrogenados no mecanismo de infecção do pêlo radicular e os resultados obtidos mostraram que a aplicação no solo de nitrato de amônia (NH₄NO₃) e ureia são prejudiciais ao curvamento dos pêlos radiculares e infecção em *Vicia faba* e *Pisum sativum*. Os resultados estão de acordo com relatos anteriores de Munns (1968). A redução no número de nódulos após a aplicação de N mineral foi atribuída a modificações das condições da rizosfera antes da infecção, sendo demonstrado que o NO₃⁻ altera a composição da parede celular da raiz ou reduz a aderência bacteriana e invasão de pêlos radiculares (HUNGRIA; STACEY, 1997).

Kwon; Beevers (1993) observaram que plantas de *Sesbania rostrata* desenvolveram nódulos na ausência de nitrato, a adição de 9 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$ conduziu à inibição do crescimento adicional do nódulo. Gibson; Harper (1985) relataram que a concentração de NO_3^- que rodeia as raízes parece ser o fator mais importante na inibição do nódulo, enquanto o NO_3^- assimilado parece ter um efeito maior sobre a formação de nódulos. Por outro lado, Latimore et al. (1977) concluíram que a inibição do NO_3^- no desenvolvimento de nódulos e comprometimento da atividade de nódulos já desenvolvidos é frequentemente atribuída a privação de fotoassimilados dos nódulos devido à prioridade de utilização de fotoassimilados na assimilação do NO_3^- e crescimento da planta. Por outro lado o aumento da massa de nódulos, associada com baixos níveis de adubação nitrogenada pode ser atribuído ao seu menor número, ou seja, menos nódulos com menos competição por fotoassimilados. (LAWN; BRUN, 1974) também considerou que a aplicação de ureia em soja cultivada em campo teve um efeito supressor sobre o número e a massa de nódulos. Porém a aplicação foliar de fertilizantes nitrogenados foi menos supressiva a nodulação e na atividade da nitrogenase, mesmo em níveis mais elevados do que os tratamentos com aplicação de N no solo. Segundo Wolyn et al. (1989) os efeitos deletérios da adubação nitrogenada sobre a nodulação e raízes de feijão e de soja poderiam ser reduzidos pela aplicação foliar.

Em certos genótipos de alfafa, a baixa concentração de N no meio é suficiente para induzir o desenvolvimento de nódulos isentos de bactérias (TRUCHET et al. 1989). A baixa concentração de N também é crucial para o desenvolvimento de nódulos em mutantes de nodulação espontânea, isolados em *Lotus* spp. (TIRICHINE et al. 2006). Pequenas doses de N mineral, como NO_3^- , NH_4^+ , e ureia, adicionado na semeadura podem beneficiar simbiose pelo aumento da taxa de crescimento das plântulas e o número, tamanho e eficiência dos nódulos resultantes, enquanto a adição de doses excessivas de N mineral reduz a nodulação (PATRIARCA et al., 2002). No entanto, pouco se sabe sobre como fontes de N mineral interferem no processo simbiótico. Várias considerações têm sido relatadas, especialmente sobre o efeito de NO_3^- como um inibidor de todas as fases da nodulação, incluindo a infecção bacteriana (por redução do número de sítios infecciosos ou o número de infecções com sucesso em raízes primárias), formação de nódulos, e a função da nitrogenase (CAETANO-ANOLLÉS; GRESSHOFF, 1991).

O efeito da aplicação localizada de NO_3^- na concentração isoflavonoides foi relatado em raízes de *Glycine max* (CHO; HARPER, 1991). O NH_4^+ também é conhecido por inibir potencialmente a formação de nódulos, um efeito exercido logo após a inoculação, através da inibição da divisão das células corticais na infecção inicial, assim como a formação do cordão de infecção (MALIK et al 1987). No entanto, os resultados destes experimentos são influenciados por um efeito do NH_4^+ sobre a indução mediada por flavonoides na indução da transcrição de genes nod bacterianos para a produção de exopolissacarídeos, que desempenham um papel crítico na invasão da raiz pela bactéria (PATRIARCA et al. 2002). O NH_4NO_3 , também foi relatado como um inibidor eficaz na deformação do pêlo radicular em *Vicia sativa* (HEIDSTRA et al., 1997). Os pêlos radiculares, que se desenvolvem na presença de NH_4NO_3 não sofrem deformação quando tratados com factores Nod (HEIDSTRA et al 1994).

1.5 Análise de Crescimento

A análise de crescimento é uma das técnicas de medida do balanço de carbono e trocas de gases nas plantas (EVANS, 1972). Baseia-se nas medidas primárias de matéria seca e dimensões de área foliar, realizadas em plantas ou estande de plantas, em determinados intervalos de tempo (HUNT, 1978). Essa técnica pode ser usada para investigar a adaptação ecológica de culturas a novos ambientes, a competição entre espécies, o efeito do manejo e

tratamento culturais e a identificação da capacidade produtiva de diferentes genótipos (HUNT et al., 2002).

Segundo Pereira; Machado (1987), a análise de crescimento representa a referência inicial na análise de produção das espécies vegetais, requerendo informações que podem ser obtidas sem a necessidade de equipamentos sofisticados. Tais informações são as quantidades de material contido em toda planta e em suas partes (folha, caule, raiz e frutos), e o tamanho do aparelho fotossintetizante (área foliar) obtidas a intervalos de tempo regular durante o desenvolvimento fenológico da planta. Vários índices morfofisiológicos têm sido utilizados para analisar as diferenças de crescimento entre indivíduos de comunidades vegetais, dentre os quais, os mais utilizados são o índice de área foliar (IAF), a taxa de crescimento da cultura (TCC) e a taxa de assimilação líquida (TAL). (HUNT et al., 2002).

O índice área foliar (IAF) expressa à disponibilidade de superfície assimiladora de CO₂ e da radiação fotossinteticamente ativa e de perdas de água (transpiração) da população de plantas em relação à área de solo explorado (BENICASA, 2003). É o fator primário que determina a taxa de produção de massa seca em grupos fechados, refletindo a capacidade produtiva atual de um grupo de plantas. O IAF aumenta durante o ciclo da cultura, atinge valor ótimo quando a taxa de crescimento da cultura (TCC) é máxima, e varia em função da densidade de semeadura, entretanto, aumentos do IAF, promovidos por auto sombreamento das folhas decrescem a produção de massa seca, sendo o conhecimento das mudanças de IAF no estande de plantas de fundamental importância para o entendimento das mudanças de outras características de crescimento especialmente a TAL (PEREIRA; MACHADO, 1987). Segundo Hunt et al. (2002), o IAF representa a capacidade da comunidade vegetal explorar o espaço disponível e pode ser calculado por meio da razão entre a área foliar (AF) e a área terreno ocupada pela cultura (S).

Índice de área foliar (IAF) é dado pela equação:

$$\text{IAF} = \text{AF}/\text{S} [\text{m}^2 \text{ m}^{-2}], \text{ onde (AF) é a área foliar em m}^2 \text{ contida em } 1 \text{ m}^2 \text{ de terreno (S).}$$

A Taxa de crescimento da cultura (TCC) é definida como a variação de massa seca (MS) por unidade de área do terreno (S) e de tempo (t), pode ser considerada como o produto de fatores integrados no tempo: a quantidade de radiação diária incidente no topo do dossel, a fração da incidência que é efetivamente interceptada pela massa foliar, e a quantidade de massa seca produzida por unidade de radiação interceptada, isto é, a eficiência de uso da radiação solar, ou seja, e representa a capacidade de produzir fitomassa do cultivo (PEREIRA; MACHADO, 1987). Segundo Hunt (1978), a taxa de crescimento da cultura ou a taxa de produção de fitomassa de uma comunidade vegetal avalia a produtividade primária líquida, constituindo o somatório das taxas de crescimento dos diversos componentes das plantas.

Taxa de crescimento da cultura (TCC) é dada pela seguinte equação:

$$\text{TCC} = \text{dMS}/\text{dt} [\text{g m}^{-2} \text{ de terreno dia}^{-1}], \text{ onde dMS}/\text{dt} \text{ indica a derivada do acúmulo de massa seca (MS) com o tempo (t).}$$

A taxa de assimilação líquida (TAL, em g m⁻² área foliar dia⁻¹), possibilita conhecer a eficiência das folhas na produção de novos materiais vegetais, considerando que são as maiores responsáveis pela produção de matéria seca, ela expressa o balanço entre o material produzido pela fotossíntese e aquele perdido através da respiração (BENICASA, 2003).

A taxa foliar unitária ou taxa de assimilação líquida, mede o aumento líquido da massa seca da planta por área foliar unitária, sendo diferente da taxa fotossintética que mede a assimilação líquida de carbono somente durante o período de luz (PEREIRA; MACHADO, 1987). Devido ao aumento recíproco do sombreamento foliar com o índice de área foliar

(IAF), a taxa de assimilação líquida se correlaciona negativamente com IAF e consequentemente com todos os fatores que influenciam no seu aumento (adubação nitrogenada, densidade, sombreamento, altos níveis de suprimento de água). Por isso, a TAL normalmente decresce durante o crescimento e desenvolvimento de um conjunto de plantas (HUNT, 1978).

Taxa de assimilação líquida (TAL) é dada pela seguinte equação:

$TAL = (1/AF) dMS/dt$ [$g\ m^{-2}$ área foliar dia^{-1}], onde AF é a área foliar (em m^2 planta $^{-1}$) e dMS/dt indica a derivada do acúmulo de massa seca (MS) com o tempo (t).

O estudo sobre a interação N mineral e inoculação com rizóbios, usando a análise de crescimento, baseia-se fundamentalmente no fato de que cerca de 90%, em média, da massa seca acumulada pelas plantas ao longo do seu crescimento, resulta da atividade fotossintética; o restante é proveniente da absorção de nutrientes minerais do solo. No entanto, para avaliar a contribuição do N proveniente da FBN no crescimento das plantas, a análise de crescimento é fundamental, pois por meio de sucessivas coletas, permite descrever as alterações no acúmulo de massa seca do vegetal em função do tempo (HUNT et al., 2002). Dentre as possibilidades de uso da análise de crescimento, ela é muito útil na avaliação do efeito do crescimento na produtividade das espécies vegetais cultivadas, possibilitando análises precisas e reais, sem a necessidade de equipamentos sofisticados (PEREIRA; MACHADO, 1987).

1.6 Proteínas Solúveis

O teor de proteínas solúveis em folhas de vegetais é a característica mais usada em estudos que relacionam a influência das condições de cultivo da planta com o seu estado fisiológico (PARENT et al., 2013). O estado fisiológico da planta é alterado sob condições de estresse nutricional, com consequente mudança nos teores de proteína bruta, fibras solúveis e matéria seca total (ANDRADE et al., 2003), sendo essas alterações ocorridas por meio mudanças na expressão gênica, que altera os tipos e quantidades de proteínas expressas na planta.

Guimarães et al. (2013) observou que sob baixas doses de N a planta sintetizou preferencialmente proteínas estruturais, o que foi evidenciado pelo aumento apenas dos valores de proteína total determinados por Kjeldahl (KJELDAHL, 1883), por outro lado, doses de N acima de $100\ kg\ N\ ha^{-1}$, resultaram em menor síntese de proteínas estruturais em favorecimento da síntese de proteínas solúveis, determinados pelo método de Bradford, que correspondem a proteínas metabólicas funcionais.

Segundo estudos de Liao et al. (2012) com milho (*Zea mays* L.), utilizando espectrometria de massas e eletroforese bidimensional relataram que a deficiência de nitrogênio leva a uma resposta generalizada ao estresse, com variações nas concentrações e tipos de proteínas expressas relacionadas ao metabolismo de carbono, nitrogênio e hormônios e que as proteínas diferencialmente expressas eram majoritariamente proteínas solúveis.

O método de Bradford (BRADFORD, 1976) é amplamente utilizado em análises bioquímicas para quantificação de proteínas solúveis (AMINIAN et al., 2013), e se baseia no efeito hipsocrômico de 465 nm para 595 nm, decorrente da ligação seletiva do corante Coomassie® Brilliant Blue G-250 a proteínas, especificamente a aminoácidos aromáticos e básicos (WENRICH; TRUMBO, 2012). Este método pode ser de grande importância para avaliar o teor de proteína solúvel no tecido foliar do feijoeiro comum, pois o mesmo, por se tratar de uma planta C_3 , mais de 50% do teor de N solúvel nas folhas é usado na síntese da proteína Rubisco, enzima responsável pela fixação do CO_2 , o crescimento vegetal e, por consequência, a produção de grãos do feijão comum (KRAMER; BOYER, 1995).

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da interação entre a inoculação com rizóbio e a adubação nitrogenada, no crescimento e produtividade da cultura do feijoeiro comum, nas épocas da seca e das águas.

3 HIPÓTESES

O uso combinado da inoculação com *Rhizobium* e adubação com N permite maximização do retorno da cultura.

4 CAPÍTULO I

CRESCIMENTO E PRODUTIVIDADE DE GRÃOS DO FEIJOEIRO COMUM SOB INOCULAÇÃO COM *RHIZOBIUM* E ADUBAÇÃO NITROGENADA NA ÉPOCA DA SECA

RESUMO

O cultivo do feijoeiro comum em solos de baixa fertilidade, especialmente pobres em nitrogênio (N), é um dos principais fatores limitantes da sua produtividade. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito de diferentes fontes de N, fertilizante mineral e fixação biológica de N, no crescimento e produtividade do feijoeiro comum, cultivar Carioca. Para isto, dois experimentos foram conduzidos, nos anos de 2013 e 2014, no campo experimental da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso, com três tratamentos no primeiro ano: apenas adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 dias após a emergência (DAE) (A); inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (I+N); inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (IA); e um quarto tratamento somente inoculado com *Rhizobium* (I-N), apenas avaliado no segundo ano de cultivo. Na polinização, avaliou-se o número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR). Além disto, foi determinado o teor de proteínas solúveis nas folhas (TPSF), em quatro estádios de desenvolvimento e foram coletadas semanalmente três plantas ao acaso para uma análise de crescimento. A maior produtividade de grãos (PG) foi obtida no tratamento IA, em ambos os anos, não sendo observada diferença significativa nos demais componentes de produção. Assim a inoculação de rizóbios pode substituir a adubação com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura sem perda de produtividade, mas a inoculação com rizóbios, acrescida de 20 kg N ha⁻¹ na semeadura, não inibiu a nodulação e propiciou alta produtividade do feijoeiro comum na época da seca. No entanto, mais estudos são necessários para recomendação dessas práticas agrônômicas.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*, *Rhizobium fleirei*, Nutrição de plantas, Ureia.

ABSTRACT

The principal cause for common bean low yield is its cultivation in soils with low fertility and poor in nitrogen (N). Therefore, the aim of the study was to evaluate the effect of different forms of N, mineral fertilizer or N biological fixation, on growth and yield of common bean cultivar Carioca. Accordingly, two experiments were conducted, in the years of 2013 and 2014, at the experimental field of the Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro State, Brazil. The experimental design was in randomized blocks with three treatments in the first year: only fertilized with 20 kg N ha⁻¹ at sowing and 40 kg N ha⁻¹ with 25 days after emergence (DAE) (A); inoculated with *Rhizobium* and fertilized with 40 kg N ha⁻¹ with 25 DAE (I+N); inoculated with *Rhizobium* and fertilized with 20 kg N ha⁻¹ at sowing and 40 kg N ha⁻¹ with 25 DAE (IA); a fourth treatment was include in the second year, which was only inoculated with *Rhizobium* (I-N). At pollination, it was evaluated the number of nodules (NN), nodules dry weight (MSN), shoot dry weight (MSPA) and root dry weight (MSR). In addition, it was determinate the leaf soluble proteins content (TPSF) in four developmental stages. Also, a growth analysis was performed using three plants collected weekly. A significantly higher yield (PG) was observed in the treatment IA, for both years, without differences for the others yield components. Therefore, the inoculation with *Rhizobium* can substitute the sowing fertilization with 20 kg N ha⁻¹, without reduction in yield, but the inoculation with *Rhizobium* plus a sowing fertilization with 20 kg N ha⁻¹ allow a higher yield of common bean in the dry season. However, more studies are needed to recommend these agronomic practices.

Key words: *Phaseolus vulgaris*, *Rhizobium fleirei*, Plant nutrition, Urea.

4.1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum é cultivado em diversificados sistemas de produção e em todas as regiões brasileiras, revestindo-se de grande importância socioeconômica, pelo fato de ser componente fundamental da dieta do brasileiro como rica fonte de proteínas, vitaminas, carboidratos, ferro, além de ser uma cultura com geração de empregos, devido a demanda de mão-de-obra na agricultura familiar, que é considerada uma importante forma de produção do feijoeiro comum no Brasil (BINOTTI et al., 2009; HUNGRIA; MENDES; MERCANTE, 2013a).

Embora o Brasil seja o principal produtor e consumidor mundial de grãos do feijoeiro comum, seu rendimento médio nacional está entre os mais baixos do mundo (HUNGRIA; MENDES; MERCANTE, 2013a). Porém, houve um ganho significativo de produtividade, devido à evolução das práticas culturais, aliada ao desenvolvimento de cultivares modernos e à adoção de tecnologias pelos agricultores brasileiros, que permitiram sair do patamar de 500 kg ha⁻¹ de média nacional, no final de década de 1970, para 866 kg ha⁻¹ na safra de 2015 (CONAB, 2015). Esse aumento de produtividade média nacional foi principalmente devido à maior participação dos grandes produtores, com lavoura tecnificada, com alta produtividade, plantio irrigado, para a produção da seca e de inverno (segunda e terceira safras) entre outras práticas agrônomicas. Entre os principais fatores limitantes da produtividade da cultura do feijoeiro comum no país, destacam-se aqueles relacionados ao baixo nível tecnológico empregado pelos pequenos produtores (GRANGE et al., 2007; CARBONELL et al., 2008), devido a sua baixa renda, associada às condições climáticas adversas, principalmente à falta de água, concentrando sua produção na época das águas (primeira safra) e cultivando o feijoeiro comum em solos de baixa fertilidade, especialmente pobres em N (HUNGRIA; MENDES; MERCANTE, 2013b).

O nitrogênio é o macronutriente requerido em maior quantidade pela cultura do feijoeiro comum e sua disponibilidade tem influência significativa na produtividade (HUNGRIA; VARGAS, 2000). Sendo uma planta C₃, o feijoeiro comum usa mais de 50% do N foliar para sintetizar a Rubisco, enzima responsável por promover a assimilação fotossintética de CO₂, o crescimento vegetal e, por consequência, a produção de grãos do feijão comum (FAGERIA; BALIGAR, 2005; PIMENTEL, 2006). Devido às grandes perdas desse nutriente nos solos tropicais, por diversos processos (lixiviação, desnitrificação, volatilização, etc), o uso racional do N é de fundamental importância para promover ganhos de rendimento, redução nos custos de produção e menor risco de poluição ambiental (STRALIOTTO et al., 2002; FAGERIA; SANTOS; STONE, 2003).

Assim como a maioria das leguminosas, o feijão comum pode se beneficiar da fixação biológica de nitrogênio (FBN), por meio de uma relação simbiótica com rizóbios fixadores de nitrogênio do ar (PINTO; HUNGRIA; MERCANTE, 2007; MULAS et al., 2011). Porém, a FBN no feijoeiro comum não é capaz de prover todas as suas exigências, para obtenção de elevada produtividade, sendo necessária a adição de fertilizante nitrogenado, para complementar as exigências do feijoeiro comum, que não foram supridas pelo N inorgânico do solo ou pela FBN (HUNGRIA; KASCHUK, 2014). No entanto, estudos têm demonstrado que o feijoeiro comum pode atingir rendimentos superiores a 4000 kg ha⁻¹ em condições de manejo e ambientais adequadas para a cultura, sem nenhuma complementação com fertilizante nitrogenado, apenas com o uso da inoculação (HUNGRIA et al., 2000).

Tendo em vista que os fertilizantes nitrogenados necessitam de um elevado consumo de energia na sua fabricação e, portanto, representam um elevado custo para a produção de alimentos, principalmente para os pequenos agricultores, é essencial implementar a eficiência do uso de N na agricultura (SPECHT; HUME; KUMUDINI, 1999). Visto que a nutrição

nitrogenada inadequada é um dos principais fatores limitantes para obtenção de altas produtividades no feijoeiro comum, é possível a adoção de tecnologias que levem ao aumento da produção, mas a baixos custos econômicos, como por exemplo, a utilização de cultivares com maior potencial de FBN ou com inoculação de estirpes de rizóbio mais competitivas e adaptadas às regiões tropicais (BRITO et al., 2015). O processo de FBN tem demonstrado sua importância para sustentabilidade da agricultura brasileira, pois fornece nitrogênio a um baixo custo econômico e com impacto ambiental reduzido quando comparado ao uso de fertilizantes nitrogenados (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007).

O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta do feijoeiro comum à inoculação com rizóbio, associada à suplementação com N mineral, no crescimento e produtividade da cultura. No intuito de se avaliar os efeitos das diferentes fontes de N (fertilizante mineral e FBN) sobre as plantas, fez-se uso da análise de crescimento que, por meio de sucessivas coletas, permite descrever as alterações no acúmulo de massa seca do vegetal em função do tempo (HUNT et al., 2002). Dentre as possibilidades da análise de crescimento, ela é muito útil na avaliação do efeito do crescimento na produtividade das espécies vegetais cultivadas, possibilitando a obtenção de bons resultados sem a necessidade de equipamentos sofisticados (PEREIRA; MACHADO, 1987).

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Descrição da Área Experimental e do Clima

O estudo foi conduzido na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil (latitude: 22°45'S, longitude: 43°41'W e altitude de 40 m). O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é Aw – com verão quente e chuvoso e inverno seco. Para isto, foram instalados dois experimentos de Campo, o primeiro no ano 2013 e o segundo em 2014, com semeadura no mês de maio, que corresponde ao plantio da seca.

O solo da área experimental utilizado foi um Argissolo Vermelho Amarelo, cuja análise química, na profundidade de 0-20 cm, revelou: pH em água 5,6; 1,8 cmol_c dm⁻³ de Ca; 1,3 cmol_c dm⁻³ de Mg; 0,0 cmol_c dm⁻³ de Al; 0,9 cmol_c dm⁻³ de H⁺ + Al; 77 mg dm⁻³ de P disponível; 92 mg dm⁻³ de K disponível; 10,1 g kg⁻¹ de matéria orgânica; 79% de saturação de bases (V) e textura franco-arenosa. Para o primeiro ano a precipitação total, a evaporação total e a temperatura média da máxima e mínima, durante o experimento, foram de 153,5 mm, 217,9 mm, 28°C e 18,1°C, respectivamente. No segundo experimento a precipitação total, a evaporação total e a temperatura média da máxima e mínima, durante o experimento, foram de 139,2 mm, 235,1 mm, 28,3°C e 18,6°C, respectivamente.

4.2.2 Manejo da Cultura

Para ambos os experimentos, foi utilizada a cultivar de feijoeiro comum Carioca que é proveniente do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Possui hábito de crescimento indeterminado tipo III, podendo também assumir comportamento tipo II, apresentando floração dos 30-35 DAE, com início da maturação dos 60-65 DAE, e sementes de cor bege com rajadas havaianas e pequenas e ciclo de vida intermediário, de 85 dias (SILVA, 1981). O preparo do solo foi constituído por uma aração e duas gradagens, seguido pela abertura dos sulcos mecanicamente. Todos os tratamentos, nas duas épocas de plantio, na semeadura receberam adubação de 30 kg P₂O₅ ha⁻¹ (superfosfato simples) e 45 kg K₂O ha⁻¹ (cloreto de potássio). Aos 25 DAE foram aplicados no sulco de plantio 40 kg N ha⁻¹ (ureia), com exceção do tratamento apenas inoculado sem adubação nitrogenada, que será descrito abaixo. A adubação seguiu os resultados da análise de solo, em concordância com a recomendação e exigência da cultura (VIEIRA et al., 2006). A semeadura foi realizada manualmente, para obter-se um estande final de 12 plantas por metro linear. Nos tratamentos com inoculação, as sementes foram inoculadas com a estirpe de *Rhizobium fleirei* (SEMIA 4080, com 1 x 10⁹ células viáveis por grama de inoculante), presentes no inoculante para feijoeiro comum produzido pela Embrapa Agrobiologia, sendo utilizado 50 g de inoculante turfoso mais 40 mL de solução de água açucarada a 10% por 10 kg de sementes. Após serem inoculadas, as sementes secaram à sombra e depois foram semeadas nos sulcos de plantio. Durante o desenvolvimento da cultura a área experimental foi mantida livre de plantas daninhas pelo controle manual.

Para realizar a análise de crescimento, foram coletadas três plantas ao acaso nas linhas ao lado da bordadura de cada parcela. As coletas foram iniciadas aos 14 DAE e espaçadas de sete dias uma da outra até o fim do ciclo da cultura. Todas as folhas foram separadas do restante da planta para determinação da área foliar por meio do integrador portátil de área foliar (Li-3000C, da LI-COR). Após a determinação da área foliar, as folhas e o restante da planta (caule e raízes) foram levados à estufa de ventilação forçada a 65°C até obter massa

constante. Os dados primários de massa seca e área foliar foram convertidos para biomassa por área de terreno e índice de área foliar (IAF) respectivamente. Os dados primários por área foram obtidos dos valores alcançados pelo valor médio três plantas, multiplicado pelo número de plantas em um m². A partir dos dados de massa seca total (massa seca de folíolos, massa seca de caule + ramos + pecíolos + massa seca de raiz, massa seca de flores e massa seca de vagens do início da sua formação até a maturação dos grãos) e IAF foram derivadas as taxas de crescimento da cultura (TCC) e de assimilação líquida (TAL) segundo a metodologia proposta por Hunt (1978).

Quanto a nodulação e acúmulo de massa seca da planta, no estágio de polinização, ocasião em que as parcelas apresentam 50% das plantas com botões florais (VIEIRA et al., 2006), que ocorreu aos 33 DAE e 31 DAE para o ano de 2013 e 2014 respectivamente, foram coletadas três plantas ao acaso na linha ao lado da bordadura, por parcela. As raízes foram separadas da parte aérea e lavadas e os nódulos foram separados das raízes e contados para determinação do número de nódulos por planta (NN), levados à estufa de ventilação forçada a 65°C até obter massa constante para determinar a massa seca de nódulos por planta (MSN). A parte aérea e raiz também foram secas em estufa de ventilação forçada, a 65°C até obter massa constante, para a determinação da massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR) por planta. Além disso, na maturação fisiológica, foram coletadas todas as plantas das duas linhas centrais de cada parcela, desprezando-se o meio metro final de cada extremidade, para determinação do número de vagens por planta (NV), número de grãos por vagem (NGV), massa seca de 100 grãos (MS100G) e produtividade de grãos (PG) que foi padronizada para 13 % de teor de umidade.

Além disto, em quatro estádios de desenvolvimento, descrito por Vieira et al. (2006): antes da adubação de cobertura (20 DAE), na polinização (quando aparecem os primeiros botões florais em 50% das plantas), o florescimento pleno (abertura da primeira flor em 50% das plantas) e no enchimento de grãos (primeiras vagens cheias de grãos em 50% das plantas), foi coletado o folíolo central da folha mais jovem totalmente expandida (folha em máxima atividade fotossintética) de três plantas por parcela, que foi imediatamente envolvido em papel alumínio e imerso em nitrogênio líquido. Nestas amostras de folhas foi realizada a análise do teor de proteínas solúveis foliar (TPSF), segundo o método de Bradford (1976).

4.2.3 Delineamento Experimental e Análise Estatística

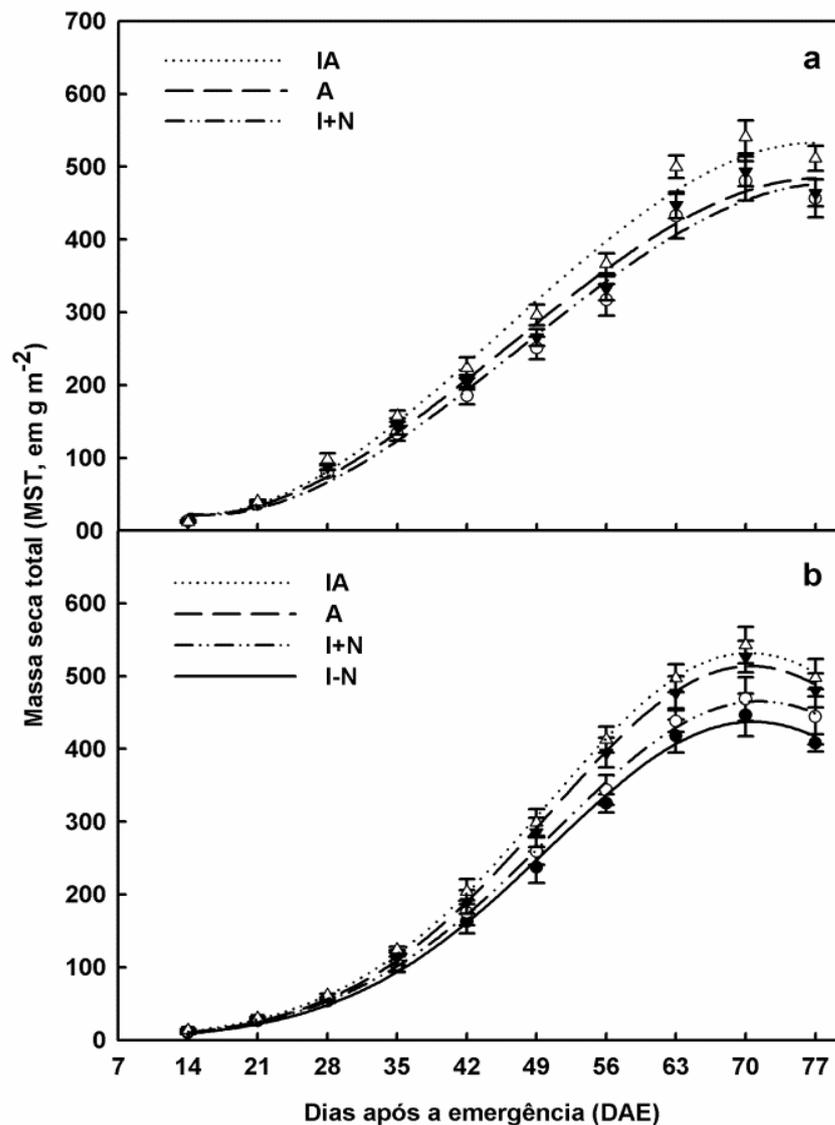
O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso, com três tratamentos no ano de 2013 e quatro tratamentos no ano de 2014 (inclusão de uma testemunha sem aplicação nenhuma de N), ambos com quatro repetições. Cada parcela foi constituída por seis linhas de 5 m de comprimento, com 0,5 m de espaçamento entre linhas por 2,5m de largura. Os três tratamentos, aplicados no primeiro ano, foram: inoculação e adubação nitrogenada com 40 kg N ha⁻¹ em cobertura aos 25 DAE (I+N); inoculação e adubação com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha⁻¹ em cobertura aos 25 DAE (IA); adubação com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha⁻¹ em cobertura aos 25 DAE (A). No segundo ano, um quarto tratamento foi aplicado: inoculação sem adubação nitrogenada na semeadura e em cobertura (I-N).

Os dados de todas as variáveis estudadas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F, e quando os tratamentos apresentaram significância, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com nível de significância fixado em p<0,05. A análise estatística dos dados foi realizada por meio do software Sisvar 5.1 Build 72 (FERREIRA, 2011), que é distribuído gratuitamente pela Universidade Federal de Lavras (UFLA).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Acúmulo de Massa Seca e Área Foliar

Analisando o acúmulo de massa das plantas ao longo do tempo, foram constatadas diferenças significativas ($p < 0,05$) para a massa seca total (MST) entre os tratamentos, nos dois anos de cultivo (Figura 1). Os tratamentos que receberam adubação nitrogenada na semeadura (A e IA) apresentaram maior acúmulo de MST em ambos os anos, fato que pode ser explicado pela nodulação ainda incompleta nos estádios iniciais de desenvolvimento da cultura, passando a FBN a contribuir efetivamente com N para as plantas, só a partir dos 15 a 20 DAE como já demonstrado por Hungria; Barradas; Wallsgrove (1991), ocasionando assim menor acúmulo de MST nos tratamentos só inoculados na semeadura (I+N e I-N, respectivamente, para o primeiro e segundo ano de cultivo), sem a dose inicial de N mineral. Nos dois anos de cultivo, o tratamento IA apresentou valores significativamente superiores aos demais tratamentos em grande parte das coletas, sendo observado o pico de acúmulo de MST aos 70 DAE, em ambos os anos de cultivo, estágio que corresponde ao enchimento de grãos, como já mostrado por Gomes et al. (2000).

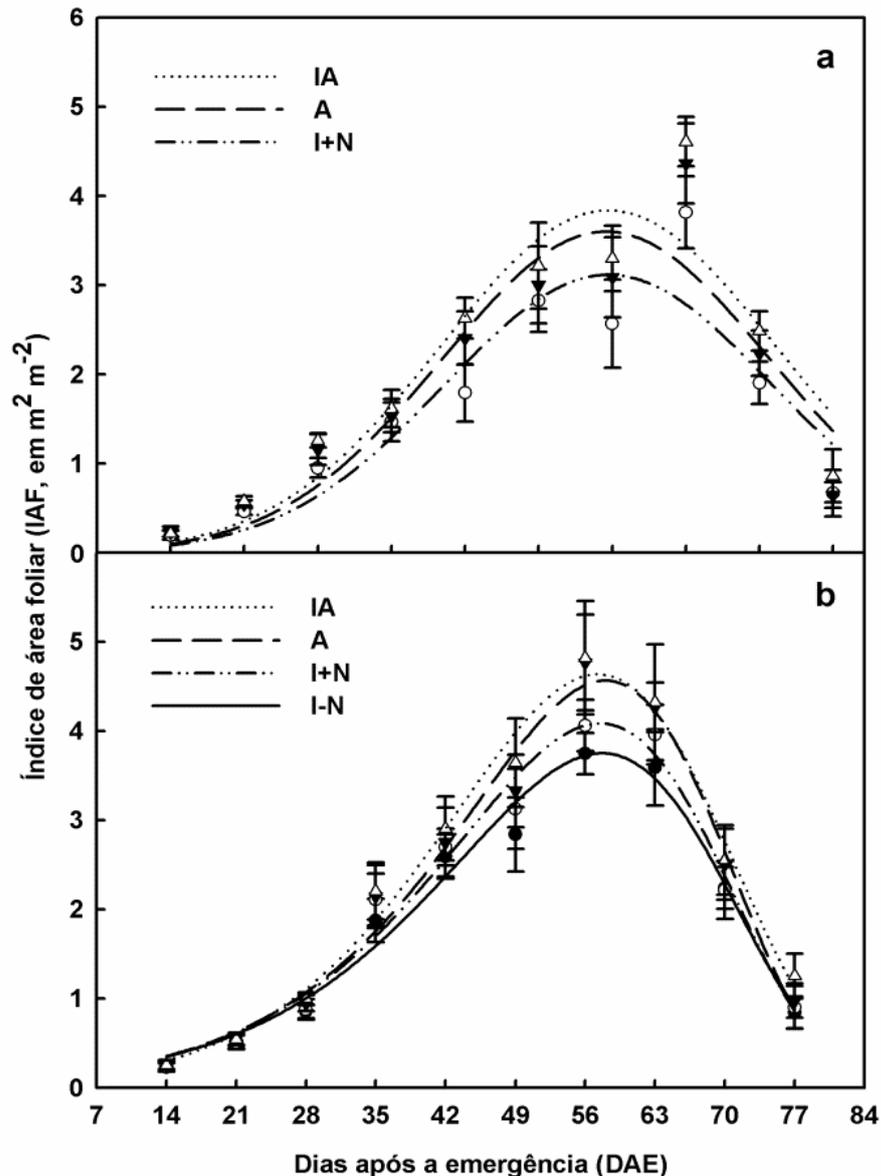


¹ Barra de erro padrão das médias, ^a ano de 2013 e ^b ano de 2014.

Figura 1: Massa seca total (MST, em g m^{-2}) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (A, \blacktriangledown), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (I+N, \circ), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (IA, Δ) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N, \bullet), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, maio de 2013 e 2014).

Em relação ao IAF, também foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos nos dois anos de cultivo (Figura 2), sendo que, o pico de IAF ocorreu aos 63 e 56 DAE para o primeiro e segundo ano respectivamente, coincidindo com o início do estágio de enchimento de grãos, no primeiro ano de cultivo e um pouco antes no segundo ano, assim como demonstrado por Gomes et al. (2000), indicando senescência foliar a partir destes picos, ou seja, no momento de maior demanda de fotoassimilados pela planta, que corresponde ao estágio de enchimento de grãos, a planta está reduzindo a área foliar e por conseguinte a fotossíntese, como pode ser constatado pelos baixos valores da TAL, com consequente redução nos fotoassimilados que seriam destinados para garantir o enchimento de grãos (PIMENTEL, 2006). No primeiro ano de cultivo, o IAF do tratamento I+N se manteve significativamente inferior aos demais tratamentos, principalmente entre o período compreendido dos 21 aos 70 DAE, onde justamente ocorreram as maiores diferenças em

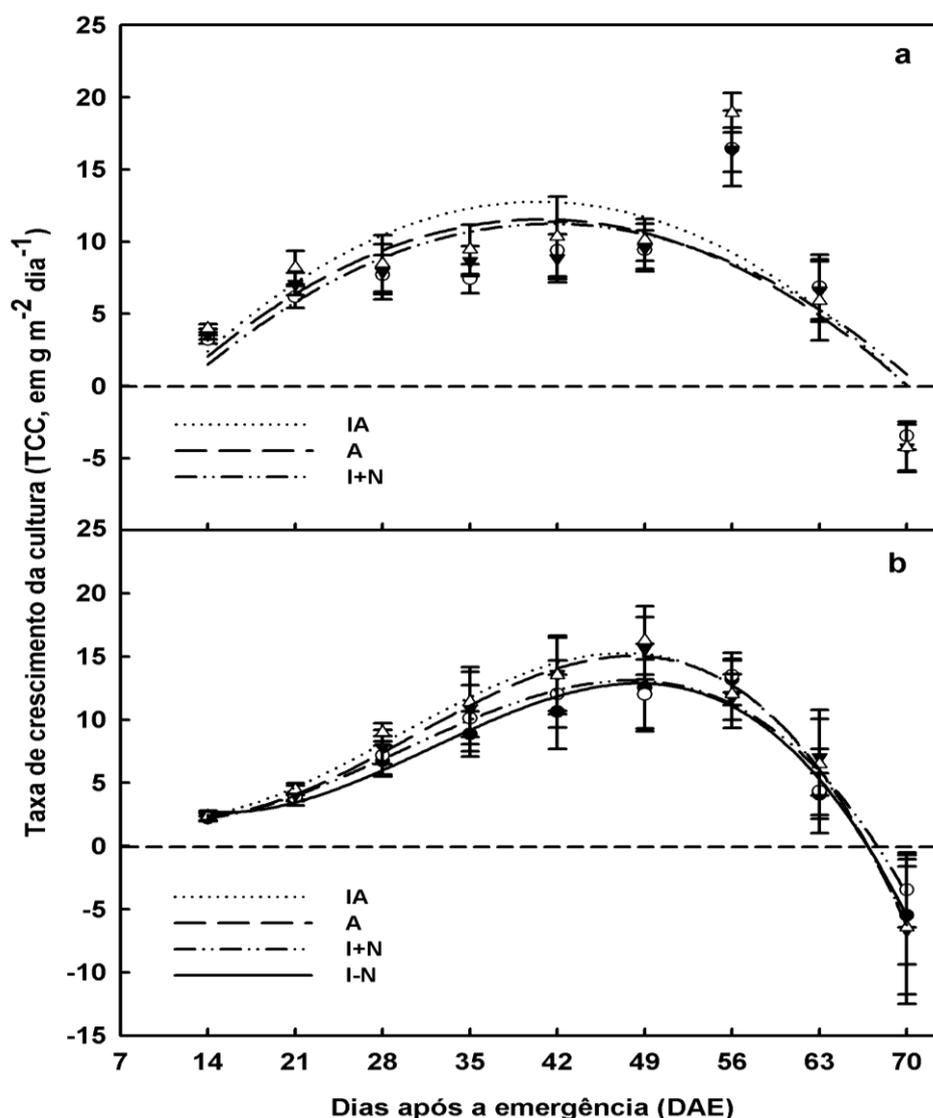
relação ao acúmulo de MST entre os tratamentos (Figura 1a). No segundo ano de cultivo, as diferenças significativas entre os tratamentos foi mais acentuada no período compreendido entre os 28 e 63 DAE, sendo o tratamento IA significativamente superior ao I-N. Portanto, o IAF no tratamento IA foi significativamente superior aos demais tratamentos para várias coletas (Figura 2), o que permitiu obter-se produtividade mais elevada neste tratamento IA, em ambos os anos de cultivo (Tabela 2). Por conseguinte, o alto IAF esteve correlacionado com alta MST (Figura 1) e, provavelmente, com uma fotossíntese líquida mais elevada, como indicado pela TAL (Figura 4), com conseqüente elevado acúmulo de fotoassimilados nas folhas, segundo Pimentel (2006), que por sua vez contribuiu para uma elevada produtividade (Tabela 2).



¹ Barra de erro padrão das médias, ^a ano de 2013 e ^b ano de 2014.

Figura 2: Índice de área foliar (IAF, em $m^2 m^{-2}$) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha^{-1} na semente e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (A, ▼), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (I+N, ○), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha^{-1} na semente e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (IA, Δ) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N, ●), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, maio de 2013 e 2014).

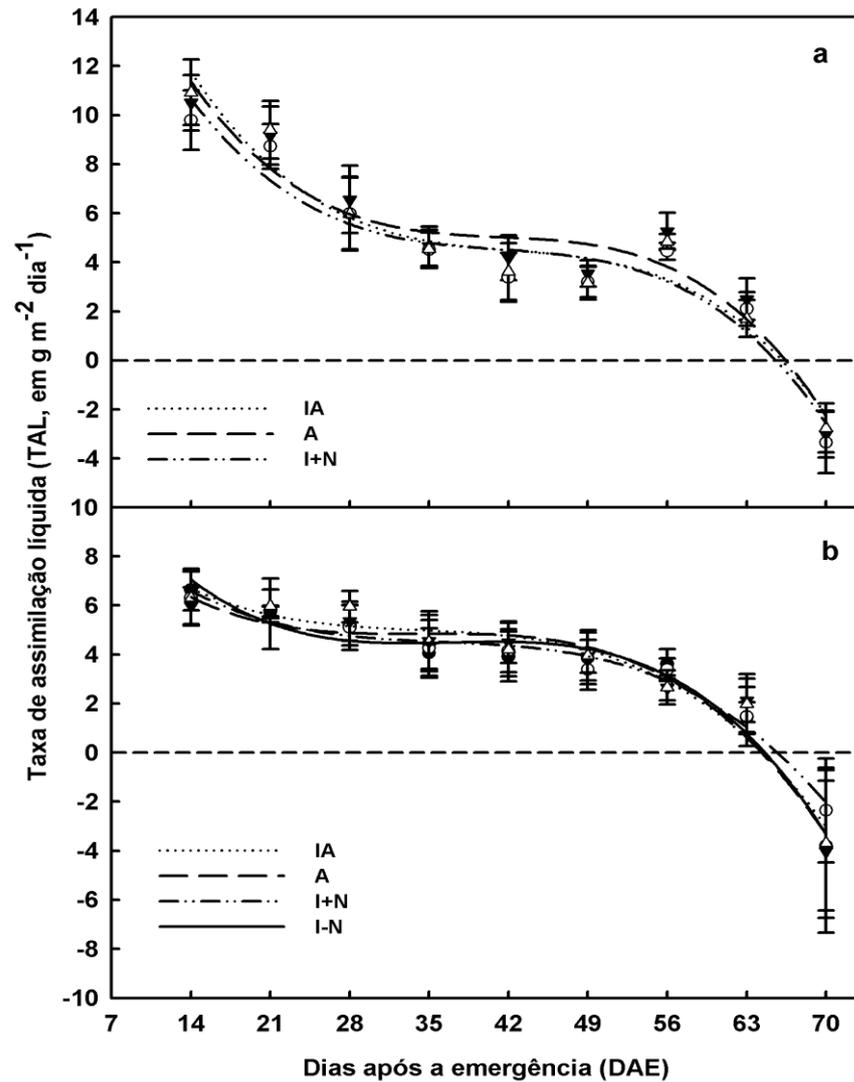
Por outro lado, o máximo acúmulo de massa seca por área de solo no tempo, a TCC, ocorreu antes do pico de IAF, aos 56 e 49 DAE para o primeiro e segundo ano respectivamente, ocorrendo diferenças significativas entre os tratamentos, nos dois anos de cultivo. No primeiro ano, a TCC do tratamento IA foi significativamente superior aos demais, nas coletas iniciais e finais. Para o segundo ano, houve diferenças significativas apenas aos 28 DAE e 42 DAE com IA significativamente superior a I-N, porém A e I+N não diferiram de ambos. O pico de acúmulo de MST ocorreu no final do ciclo, aos 70 DAE, quando a TCC atinge valores negativos, o que está relacionado ao fato do feijoeiro comum apresentar elevada taxa de senescência foliar já a partir do florescimento (PIMENTEL; LAFRAY; LOUGUET, 1999a). Isto causa uma redução da área foliar no estágio de enchimento de grãos, como pode ser observado na Figura 2, onde o IAF passa a decrescer a partir dos 63 e 56 DAE para o primeiro e segundo ano respectivamente, indicando senescência foliar a partir deste ponto (VIEIRA et al. 2008).



¹ Barra de erro padrão das médias, ^a ano de 2013 e ^b ano de 2014.

Figura 3: Taxa de crescimento da cultura (TCC, em g m⁻² dia⁻¹) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (A, ▼), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (I+N, ○), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (IA, Δ) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N, ●), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, maio de 2013 e 2014).

A variável da análise de crescimento, que indica a biomassa produzida por unidade de área foliar e por unidade de tempo, ou seja, o acúmulo de biomassa produzida a partir da fotossíntese é a TAL (PEREIRA; MACHADO, 1987), que foi elevada na primeira avaliação, aos 14 DAE para ambos os anos (Figura 4), reduzindo-se gradualmente depois disso. Porém, os tratamentos não diferiram entre si para a TAL, durante todas as avaliações e em ambos os anos de cultivo, chegando a valores perto de zero ou negativos, a partir de 63 DAE, o que coincide com o decréscimo do IAF a partir desta data, aproximadamente no início do estágio de enchimento de grãos. Este decréscimo da TAL e IAF, a partir de 63 DAE, provocar aborto dos últimos órgãos reprodutivos a se formar (VIEIRA et al. 2008), devido à redução da fotossíntese total da planta (PIMENTEL; LAFRAY; LOUGUET, 1999a).



¹ Barra de erro padrão das médias, ^a ano de 2013 e ^b ano de 2014.

Figura 4: Taxa de assimilação líquida (TAL, em g m⁻² dia⁻¹) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (A, ▼), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (I+N, ○), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (IA, Δ) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N, ●), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, maio de 2013 e 2014).

4.3.2 Nodulação e Acúmulo de Massa Seca das Plantas no Estádio de Polinização

No estágio de polinização aos 33 e 31 DAE para o primeiro e segundo ano, respectivamente, que é um estágio com uma alta demanda de N para síntese e atividade da Rubisco (PIMENTEL; LAFRAY; LOUGUET, 1999a), foram avaliadas as variáveis NN e MSN, e o acúmulo de massa seca das plantas, pela MSR e MSPA, para cada tratamento, em ambos os experimentos (Tabela 1). Em relação ao NN e MSN, houve diferença significativa entre os tratamentos, nos dois anos de cultivo. No primeiro ano, o tratamento I+N foi significativamente superior para o NN e MSN em relação aos outros dois tratamentos adubados com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura (A e IA) e, no segundo ano a MSN foi significativamente superior para I-N em relação a A com I+N e IA não diferindo de ambos. Porém a MSPA, no primeiro ano, foi significativamente superior para o tratamento IA, em relação a I+N, mas o tratamento A não diferiu de ambos (Tabela 1a). Já, no segundo ano, não houve diferença entre os tratamentos para MSPA. Isso evidencia que a aplicação de 20 kg N ha⁻¹ na semeadura inibiu apenas parcialmente o processo de nodulação da população de rizóbios inoculados, como também observado por Hungria; Campo; Mendes (2003) com a aplicação de 15 kg N ha⁻¹ na semeadura do feijoeiro comum a campo, sendo que estes autores observaram redução na nodulação com uma dose de 30 kg N ha⁻¹ na semeadura. Por outro lado, estes resultados referentes à nodulação contradizem alguns encontrados na literatura, relatando que, mesmo baixas quantidades de N são capazes de inibir a nodulação em feijoeiro comum (ROMANINI JUNIOR et al., 2007). Já em relação à MSPA, neste mesmo estágio de polinização, foi observada diferença significativa entre os diferentes tratamentos, apenas para o primeiro ano de cultivo (Tabela 1a), onde o tratamento IA foi significativamente superior ao tratamento I+N, porém não diferiu do tratamento A, como também foi observado para a MST (Figura 1), o IAF (Figura 2) e a TCC (Figura 3), em ambos os anos. No entanto, para a MSR não houve diferenças significativas entre os tratamentos em ambos os anos (Tabela 1), como já relatado por Pimentel (2006) para culturas anuais.

Tabela 1: Número de nódulos por planta (NN), massa seca de nódulos por planta (MSN), massa seca da parte aérea por planta (MSPA) e massa seca de raiz por planta (MSR), do feijoeiro comum, cultivar Carioca, avaliados no estágio de polinização, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha⁻¹ na sementeira e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (A), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (I+N), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha⁻¹ na sementeira e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (IA) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, maio de 2013 e 2014).

Primeiro ano de cultivo				
Tratamentos	NN	MSN (mg)	MSPA (g)	MSR (g)
I+N	57,75 a	170,19 a	7,37 b	0,640 a
A	38,00 b	129,03 b	7,67 ab	0,537 a
IA	40,50 b	130,24 b	8,85 a	0,594 a
Pr>Fc	0,0071	0,0109	0,0348	0,2467
CV%	12,98	10,52	7,87	14,05
Segundo ano de cultivo				
Tratamentos	NN	MSN (mg)	MSPA (g)	MSR (g)
I-N	70,25 a	182,75 a	6,74 a	0,70 a
I+N	65,00 a	165,50 ab	7,45 a	0,63 a
A	41,75 b	111,78 b	7,86 a	0,58 a
IA	54,64 ab	158,52 ab	8,22 a	0,61 a
Pr>Fc	0,0107	0,0151	0,1089	0,1317
CV%	17,21	15,91	10,23	10,04

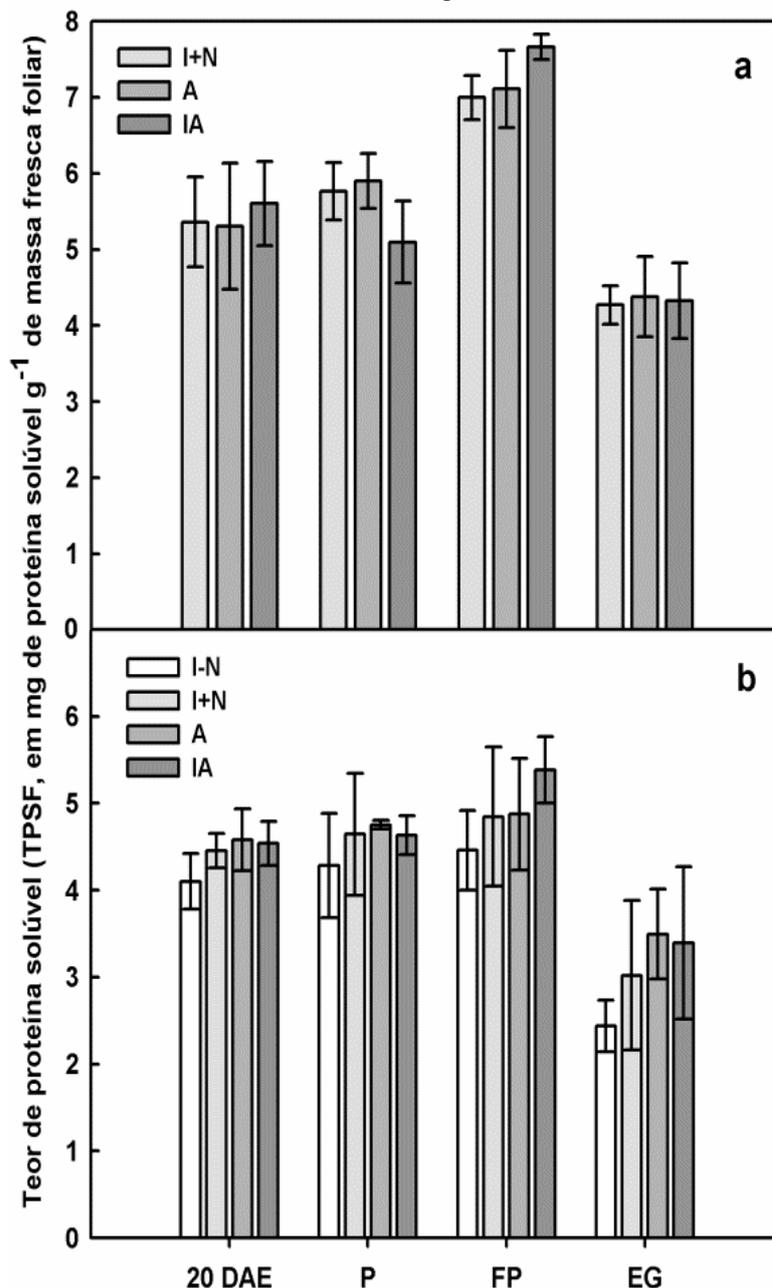
Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (P < 0,05).

4.3.3 Teor Foliar de Proteína Solúvel em Quatro Estádios Fenológicos

O teor de proteína solúvel foliar (TPSF) é proporcional ao conteúdo e atividade da Rubisco, o que influencia a taxa fotossintética líquida e, conseqüentemente, o rendimento da cultura (LONG et al., 2006). O TPSF foi quantificado no estágio vegetativo, antes da fertilização adicional de 40 kg N ha⁻¹ de N; no estágio de polinização, quando o TPSF e a fotossíntese líquida são máximos (PIMENTEL; LAFRAY; LOUGUET, 1999a; PIMENTEL, 2006); no estágio de florescimento pleno e no estágio de enchimento de grãos. Não houve diferença significativa para o TPSF entre os tratamentos no estágio vegetativo, antes da fertilização adicional e também na polinização, para ambos os anos. Já no estágio de florescimento pleno, que ocorreu aos 39 e 38 DAE para o primeiro e segundo ano, respectivamente, ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos em ambos os anos, com o tratamento IA significativamente superior ao tratamento I+N, sendo que o tratamento A que não diferiu dos tratamentos IA e I+N no primeiro ano, mas no segundo ano, o tratamento IA foi significativamente superior ao I-N, e os tratamentos A e I+N não diferiram dos tratamentos IA e I-N, ainda no florescimento pleno.

Os valores de TPSF não foram comparados estatisticamente entre os diferentes estádios de desenvolvimento da planta, mas ele tende a aumentar no estágio de florescimento pleno e a cair no estágio de enchimento de grãos (Figura 5), provavelmente para permitir a elevação da taxa fotossintética nesse período, como observado por Pimentel; Lafray; Louguet, (1999a); Pimentel; Hérbet; Vieira (1999b), para que ocorra aumento no conteúdo foliar de

carboidratos, que são as reservas a serem remobilizadas para manter que o crescimento do embrião até a maturação fisiológica (KRAMER; BOYER, 1995). Assim, os tratamentos com maior TPSF (Figura 5) terão, portanto, maior conteúdo de Rubisco, garantindo provavelmente maior produção de fotoassimilados, primeiro para o crescimento da parte aérea (Figura 1) e depois para o desenvolvimento do grão (PIMENTEL; HÉRBET; VIEIRA, 1999b), o que permitirá uma maior produtividade (Tabela 2) dos tratamentos (I+N e IA) que apresentaram maior TPSF nesse estágio de desenvolvimento (Figura 5).



¹ Barra de erro padrão das médias, ^a ano de 2013 e ^b ano de 2014.

Figura 5: Teor de proteína solúvel (TPSF, em mg de proteína solúvel g⁻¹ de massa fresca foliar), quantificadas aos 20 dias após a emergência (20 DAE), polinização (P), florescimento pleno (FP) e enchimento de grãos (EG) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semente e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (A), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (I+N), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semente e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (IA) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, maio de 2013 e 2014).

4.3.4 Componentes de Produção

Quanto aos componentes de produção, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos nos dois anos de cultivo para o NV, NGV e MS100G (Tabela 2). Ocorreu diferença significativa entre os tratamentos apenas para PG, que representa a produtividade da cultura, com o tratamento IA apresentando rendimentos mais elevados em ambos os anos. Porém, no primeiro ano de cultivo o tratamento IA foi significativamente superior a A com I+N não diferindo de ambos, enquanto no segundo ano, o tratamento IA foi significativamente superior a I-N, com I+N e A não diferindo de ambos (Tabela 2). Portanto, o NV, que é considerado uma importante característica genotípica para uso em programas de melhoramento de feijão comum, como informado por Carbonell et al. (2008) não foi uma boa variável para discriminar o efeito do N na produtividade do feijoeiro comum. Assim sendo, o tratamento IA apresentou a MST (Figura 1), o IAF (Figura 2), a TCC (Figura 3), e a MSPA (Tabela 1) significativamente superiores, sendo que a MSPA se correlacionou com uma alta PG, nas duas épocas (Tabela 2).

Tabela 2: Número de vagens por planta (NV), número de grãos por vagem (NGV), massa seca de 100 grãos (MS100G) e produtividade de grãos (PG), do feijoeiro comum, cultivar Carioca, avaliados na maturação dos grãos, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (A), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (I+N), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (IA) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, maio de 2013 e 2014).

Primeiro ano de cultivo				
Tratamentos	NV	NGV	MS100G (g)	PG (Kg ha ⁻¹)
I+N	13,75 a	5,75 a	25,55 a	2346,00 ab
A	13,25 a	5,50 a	25,76 a	2248,69 b
IA	15,0 a	5,50 a	25,69 a	2509,42 a
Pr>Fc	0,7327	0,9190	0,7609	0,2437
CV%	22,51	17,66	1,55	15,64
Segundo ano de cultivo				
Tratamentos	NV	NGV	MS100G (g)	PG (Kg ha ⁻¹)
I-N	15,00 a	5,25 a	25,68 a	2207,52 b
I+N	18,50 a	6,50 a	26,44 a	2529,85 ab
A	17,25 a	6,00 a	26,17 a	2474,77 ab
IA	20,00 a	5,50 a	26,00 a	2642,58 a
Pr>Fc	0,3178	0,7733	0,1059	0,0137
CV%	20,35	19,25	1,47	17,97

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (P <0,05).

Nos dois anos de cultivo foi observado que a aplicação de 20 kg N ha⁻¹ na semeadura, juntamente com a inoculação, permitiu um acréscimo de produtividade, corroborando com Hungria; Campo; Mendes (2003); Pelegrin et al. (2009). Por outro lado, a produtividade dos tratamentos I-N e I+N não diferiram do tratamento A (Tabela 2), como já observado por Bellaver; Fagundes, (2009), mostrando que a inoculação pode substituir a dose de 20 kg de N ha⁻¹ na semeadura, mantendo a mesma produtividade (GRANGE et al., 2007).

Hungria; Mendes; Mercante (2013a) relatam que a resposta do feijoeiro comum à

inoculação, em condições de campo, pode variar em função de fatores bióticos e abióticos. Entre os principais fatores limitantes ao sucesso da inoculação a campo podem ser citados a presença de estirpes nativas nos solos brasileiros, que pode ser comprovada pela nodulação do tratamento que não recebeu inoculação (Tabela 1), a susceptibilidade do feijoeiro comum ao estresse hídrico e térmico e a variabilidade de resposta das diferentes cultivares a inoculação (GRANGE; HUNGRIA, 2004; VIEIRA et al., 2005). Porém, apesar das limitações edafoclimáticas, ganhos de até 1500 Kg de grãos ha⁻¹ em relação à testemunha não inoculada já foram relatados em cultivares responsivas à inoculação (PERES et al., 1994). Assim, como pode ser comprovado com os resultados obtidos nestes experimentos, há uma indicação que apenas o uso da inoculação forneceu um aporte de N capaz de gerar produtividade semelhante aos tratamentos que utilizaram N mineral em 20 kg N ha⁻¹ na semeadura mais 40 kg N ha⁻¹ em cobertura aos 25 DAE, e tudo isso a um baixo custo quando comparado aos adubos nitrogenados.

4.4 CONCLUSÃO

A inoculação de rizóbio na semeadura pode substituir a adubação nitrogenada com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura, sem perda de produtividade.

A adubação com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura, juntamente com a inoculação inibiu parcialmente a nodulação do feijoeiro comum, mesmo assim propiciou acréscimos de massa seca total e produtividade de grãos.

A avaliação do teor de proteínas solúveis no tecido foliar no florescimento pleno se correlacionou com uma maior produtividade de grãos, sendo, portanto, uma variável fisiológica que poderá servir para discriminar genótipos de feijão comum mais produtivos.

5 CAPÍTULO II

CRESCIMENTO E PRODUTIVIDADE DE GRÃOS DO FEIJOEIRO COMUM SOB INOCULAÇÃO COM *RHIZOBIUM* E ADUBAÇÃO NITROGENADA NA ÉPOCA DAS ÁGUAS

RESUMO

Para avaliar os efeitos da fixação biológica de nitrogênio (FBN) e, ou, a adubação nitrogenada de sementeira no crescimento e produtividade do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) usando a análise de crescimento, dois experimentos de campo foram conduzidos, durante a época das águas, dos anos de 2013 e 2014, no campo experimental da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Brasil. Além disto, em ambos os experimentos, o teor de proteínas solúveis foliar (TPSF) foi avaliado em quatro estádios de desenvolvimento. Os tratamentos inoculado e adubado com 20 kg N ha⁻¹ (ureia, CH₄N₂O) na sementeira e 40 kg N ha⁻¹ 25 dias após a emergência (DAE) (IA) e o tratamento apenas adubado com 20 kg N ha⁻¹ na sementeira e 40 kg N ha⁻¹ 25 DAE (A) apresentaram valores significativamente superiores de taxa de crescimento da cultura (TCC) e índice de área foliar (IAF) que os tratamentos apenas inoculados com *Rhizobium* sem adubação nitrogenada na sementeira. Além disto, nos estádios de polinização e floração, em ambos os anos, o TPSF foi significativamente superior para o tratamento IA, que também teve uma maior produtividade de grãos (PG), em comparação com o restante dos tratamentos, para ambos os anos. Desta forma, a adubação com 20 kg N ha⁻¹ na sementeira junto com a inoculação e 40 kg N ha⁻¹ 25 DAE (tratamento IA) pode ser recomendada para o cultivo do feijão comum com alta tecnologia e produtividade, mas por outro lado, o tratamento apenas inoculado com *Rhizobium* na sementeira e adubado com 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (I+N) teve a mesma produtividade que o tratamento A e pode ser recomendado e empregado pelo baixo custo da tecnologia, pelos pequenos produtores. Porém, mais estudos são necessários para recomendação dessas práticas agrônomicas.

Palavras-chave: Eficiência no uso de nutrientes, Fixação biológica de nitrogênio, *Phaseolus vulgaris* L., Proteína solúvel foliar, *Rhizobium fleirei*.

ABSTRACT

An evaluation of the effects of biological nitrogen fixation (BNF) and/or sowing N fertilization on the growth and yield of *Phaseolus vulgaris* L., using a growth analysis, was done in two field experiments conducted during the rainy seasons of 2013 and 2014 at the Federal Rural University of Rio de Janeiro (UFRRJ), Brazil. In addition, in both experiments, leaf soluble protein content (TSPF) was measured at four growth stages. The treatments inoculated and fertilized with 20 kg N ha⁻¹ (urea, CH₄N₂O) at sowing with 40 kg N ha⁻¹ at 25 days after emergence (DAE) (IA) and the treatment only fertilized with 20 kg N ha⁻¹ at sowing with 40 kg N ha⁻¹ at 25 DAE (A) had significantly higher values of crop growth rate (TCC) and leaf area index (IAF) than the treatments only inoculated with *Rhizobium* without N fertilization at sowing. In addition, at the pollination and flowering stages for both years, TSPF was significantly higher for the IA treatment, which had also a highest final yield (PG) compared with the remaining treatments, for both years. Therefore, the fertilization with 20 kg N ha⁻¹ at sowing together with inoculation and 40 kg N ha⁻¹ at 25 DAE (IA treatment) can be recommended for bean cultivation with high technology and yield. However, the treatment only inoculated with *Rhizobium* at sowing and fertilized with 40 kg N ha⁻¹ at 25 DAE (I+N) had the same PG as the A treatment and it can be recommended for small farmers due to its a low cost technology. Nevertheless, more studies are required before recommending these agronomic practices.

Keywords: Nutrient use efficiency, Symbiotic nitrogen fixation, *Phaseolus vulgaris* L., Leaf soluble protein, *Rhizobium fleirei*.

5.1 INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é a mais importante leguminosa de grãos cultivada para o consumo humano (MULAS et al., 2011) e a maior e mais barata fonte de proteínas na América latina, África e partes da Ásia (CARDOSO; HUNGRIA; ANDRADE, 2012). Contudo, sua produtividade é baixa, pois grande parte da produção de feijão comum está concentrada em pequenas propriedades, variando de 1 a 10 ha, sem tecnologias caras, geralmente em áreas marginais para a agricultura com baixo teor de nitrogênio (N) no solo (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2003; ALKAMA; OUNANE; DREVON, 2012). Dessa forma, sem uma correta fertilização nitrogenada (BROUGHTON et al., 2003), o rendimento do feijão comum nessas áreas é baixo. Portanto, dentro do contexto de agricultura com baixo custo tecnológico, com pouco uso de insumos, destaca-se a necessidade do desenvolvimento de tecnologias modernas de baixo custo, como a fixação biológica de nitrogênio (FBN), além de uma adubação com N mais eficiente (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2003), que é essencial para melhorar o rendimento e produção do feijoeiro comum nestas áreas agrícolas marginais, em especial devido ao rápido aumento da população e conseqüentemente a demanda por alimentos, que é maior nestas áreas marginais para a agricultura (BROUGHTON et al., 2003; PIMENTEL, 2006).

Assim como a maioria das leguminosas, o feijão comum pode se beneficiar da FBN por meio de uma relação simbiótica com rizóbios fixadores de nitrogênio (MULAS et al., 2011; CARDOSO; HUNGRIA; ANDRADE, 2012; HUNGRIA; KASCHUK, 2014). Dessa forma, o suprimento de N em quantidades adequadas pode aumentar o conteúdo de N nas folhas e, por conseqüência, a fotossíntese e o rendimento (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2003; PIMENTEL, 2006), uma vez que, de acordo com Long et al. (2006), mais de 50% do teor de N solúvel nas folhas é usado na síntese da proteína Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase /oxigenase (Rubisco), enzima responsável pela fixação do CO₂ e síntese de carboidratos (KRAMER; BOYER, 1995). Portanto, se as plantas possuem elevado teor de proteínas nas folhas (TPSF), no estágio de florescimento, quando a fotossíntese é máxima, elas poderão ter um alto potencial de rendimento (PIMENTEL; LAFRAY; LOUGUET, 1999a; PIMENTEL; HÉRBET; VIEIRA, 1999b).

O feijoeiro comum geralmente tem uma baixa capacidade de FBN em relação a outras leguminosas, como a soja (GRAHAM; VANCE, 2003). Assim sendo, as pesquisas em biotecnologia deverão procurar estabelecer estratégias para melhorar a eficiência da FBN para o feijão comum por seleção de genótipos e de estirpes de rizóbios mais eficientes para simbiose (GRANGE et al., 2007; MULAS et al., 2011; CARDOSO; HUNGRIA; ANDRADE, 2012). A recomendação usual a campo é a inoculação das sementes com estirpes de *Rhizobium* e uma adubação adicional de 20 a 40 kg N ha⁻¹ aos 25 dias após a emergência (DAE) (VIEIRA et al., 2006).

No entanto, estudos em solos ricos em matéria orgânica e nutrientes, da região central dos Estados Unidos (EUA), cultivados com soja, tem demonstrado que o aumento contínuo da produtividade da soja ao longo dos anos, com novos cultivares, tem como uma de suas causas, o aumento da capacidade de FBN dos novos cultivares com rizóbios nativos, mesmo nesses solos ricos em N e matéria orgânica (SPECHT; HUME; KUMUDINI, 1999). Além disso, Voisin et al. (2003), mostraram que a adição de fertilizante nitrogenado na semeadura reduz o número de nódulos por planta (NN) formados em *Pisum sativum*, porém a atividade específica da nitrogenase aumentou (isto é, a FBN por massa seca de nódulos), gerando uma complementação significativa de N. No entanto, caso a FBN não forneça N em quantidade necessária para assegurar elevado rendimento do feijoeiro comum, uma fertilização complementar de N é necessária para se obter alta produtividade (VIEIRA et al., 2008).

Consequentemente, para alcançar um maior rendimento no feijão comum, mesmo a um custo elevado, uma adubação nitrogenada na sementeira, além da de cobertura, poderá ser recomendada para iniciar fornecimento de N e crescimento, até que ocorra a infecção, os processos de nodulação e fixação e as plantas comecem a produzir N pela FBN (GRANGE et al., 2007). No entanto, se a adubação com N na sementeira for excessiva, isto pode reduzir a FBN, embora a adubação com N em pequenas doses na sementeira possa melhorar a produtividade do feijoeiro comum (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2003). Portanto, esta pesquisa teve como objetivo avaliar o efeito da interação do potencial FBN com a adubação nitrogenada de sementeira, no crescimento e na produtividade do feijoeiro comum, em comparação com plantas que foram apenas inoculadas com *Rhizobium*, ou que apenas receberam adubação com N na sementeira. Para esta avaliação, a análise de crescimento da cultura foi utilizada (HUNT, 1978) para investigar os efeitos da interação destas diferentes fontes de N sobre processos internos que envolvendo toda a planta e seu rendimento final (HUNT et al., 2002).

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Descrição da Área Experimental e do Clima

Para avaliar os efeitos da interação entre a inoculação da semente com *Rhizobium* e adubação nitrogenada de semeadura em feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L) foram instalados dois experimentos no Campo Experimental do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ, Brasil. O clima da região é do tipo Aw, segundo a classificação de Köppen, com verão quente e chuvoso e inverno seco, e a UFRRJ está situada a 22°45'S, 43°41'W e 40 m de altitude. O tipo de solo da área experimental é um Argissolo Vermelho Amarelo (SANTOS et al., 2013), cuja análise química na profundidade de 0-20 cm, revelou: pH em água 5,8; 1,5 cmol_c dm⁻³ de Ca; 1,4 cmol_c dm⁻³ de Mg; 0,0 cmol_c dm⁻³ de Al; 0,6 cmol_c dm⁻³ de H⁺ Al; 65 mg dm⁻³ de P disponível; 115 mg dm⁻³ de K disponível; 10,7g kg⁻¹ matéria orgânica; e 84% de saturação de bases (V). O primeiro experimento foi instalado na época das águas (outubro, 2013). Durante o experimento, a precipitação total, a evaporação total e a temperatura média da máxima e mínima, foram de 331,9 mm, 301,8 mm, 29,46°C e 18,9°C, respectivamente. O segundo experimento foi também instalado na época das águas (outubro, 2014) e a precipitação total foi 297,8 mm, a evaporação total foi 311,50 mm e a temperatura média da máxima e mínima foram de 28°C e 17,93°C, respectivamente durante o ciclo da planta.

5.2.2 Manejo da Cultura

Para ambos os experimentos, foi utilizado o cultivar de feijoeiro comum Carioca, que é proveniente do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), que possui hábito de crescimento indeterminado tipo III, podendo também assumir comportamento tipo II, apresentando floração de 30-35 DAE, com início da maturação aos 60-65 DAE, sementes de cor bege com rajadas havaianas e pequenas, ciclo de vida intermediário (85 dias) (SILVA 1981) e amplamente cultivado no Brasil. O experimento teve três tratamentos no primeiro ano de cultivo: apenas adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha⁻¹ em cobertura aos 25 DAE (A), inoculação com *Rhizobium* e adubação com 40 kg N ha⁻¹ em cobertura aos 25 DAE (I+N), inoculação com *Rhizobium* e adubação com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha⁻¹ em cobertura aos 25 DAE (IA). Além de um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* sem adubação nitrogenada em nenhum estágio (I-N), apenas avaliada no segundo ano de cultivo. Todos os tratamentos, nas duas épocas de cultivo, receberam adubação de 30 kg P₂O₅ ha⁻¹ (superfosfato simples) e 45 kg K₂O ha⁻¹ (cloreto de potássio), conforme a recomendação de campo (VIEIRA et al., 2006). Para inoculação, foi usado a estirpe de *Rhizobium fleirei* (SEMIA 4080, com 1 x 10⁹ células viáveis por grama de inoculante), presentes no inoculante para feijoeiro comum produzido pela Embrapa Agrobiologia, sendo utilizado 50 g de inoculante turfoso mais 40 mL de solução de água açucarada a 10% por 10 kg de sementes, após serem inoculadas, as sementes secaram a sombra e depois foram semeadas manualmente nos sulcos de plantio, para obter-se um estande final de 12 plantas por metro linear. Durante o desenvolvimento da cultura a área experimental foi mantida livre de plantas daninhas pelo controle manual.

Em ambos os cultivos, foi realizada uma análise de crescimento coletando-se três plantas ao acaso, nas linhas ao lado da bordadura de cada parcela. As coletas foram iniciadas aos 14 DAE e espaçadas sete dias uma da outra, até o fim do ciclo da cultura. A área foliar (AF) foi determinada por meio do integrador portátil de área foliar (Li-3000C, da LI-COR) e

a massa seca de parte aérea e raiz foram obtidas após a secagem em estufa de ventilação forçada, a 65° até obter massa constante. Os dados primários de massa seca (MS) e área foliar (AF) foram convertidos para biomassa por área de terreno e índice de área foliar (IAF) pela extrapolação para o número de plantas por m² de área de solo explorado. Os dados de MS por área foram usados para calcular a taxa de crescimento da cultura (TCC) e associado com os dados de IAF, foi calculada a taxa de assimilação líquida (TAL), segundo a metodologia proposta por Hunt (1978).

Nos dois experimentos, durante a época das águas, com 32 e 33 DAE (estádio de polinização) para o primeiro ano e segundo ano respectivamente, ocasião em que as plantas das parcelas apresentavam 50% de botões florais (VIEIRA et al., 2006), foram coletadas três plantas por parcela, de modo que as raízes das plantas fossem extraídas ao máximo do solo. Os nódulos foram separados das raízes, contados e secos a 65°C em estufa de ventilação forçada até obter massa constante, para determinação do número de nódulos (NN) e massa seca de nódulos (MSN) por planta. A parte aérea e raiz também foram secas em estufa de ventilação forçada a 65°C até obter massa constante, para a determinação da massa seca destas.

Além disto, para ambos os experimentos, o folíolo central da folha mais jovem completamente expandida de três plantas por parcela foi coletado para quantificação do teor de proteínas solúveis (TPSF) usando o método de Bradford (BRADFORD, 1976). O TPSF foi avaliado em quatro estádios de desenvolvimento, assim como descrito por Vieira et al. (2006): vegetativo (20 DAE), antes da fertilização com N aos 25 DAE; polinização (32 e 33 DAE); florescimento (37 e 39 DAE) e enchimento de vagens (63 e 65 DAE) para primeiro e segundo ano de cultivo, respectivamente. Para o segundo ano de cultivo, o teor de amido foliar (TAF), açúcares solúveis (TASF) e aminoácidos livres (TALF) foram mensurados no folíolo central da folha mais jovem completamente expandida de três plantas por parcela, seguindo os mesmos procedimentos adotados para a amostragem do tecido foliar para dosagem do TPSF. Amostras de 100 mg de massa fresca foliar foram coletadas e imediatamente envolvidas em papel alumínio e emergidas em nitrogênio líquido. Os conteúdos de açúcares solúveis e amido foram determinados segundo a proposta de Farrar (1995) e aminoácidos livres foram determinados de acordo com Yemm; Cooking (1955), usando um espectrofotômetro (Spectronic, Milton Roy, USA).

Quando a maturação fisiológica foi atingida, 85 e 83 DAE (para primeiro e segundo ano respectivamente), todas as plantas das duas linhas centrais de cada parcela foram coletadas, desprezando-se o meio metro final de cada extremidade, para determinação dos componentes de produção: número de vagens por planta (NV), número de grãos por vagem (NGV), massa de 100 grãos (MS100G), e massa seca de sementes por área explorada, ou seja, a produtividade de grãos (PG) que foi padronizada para 13 % o teor de umidade.

5.2.3 Delineamento Experimental e Análise Estatística

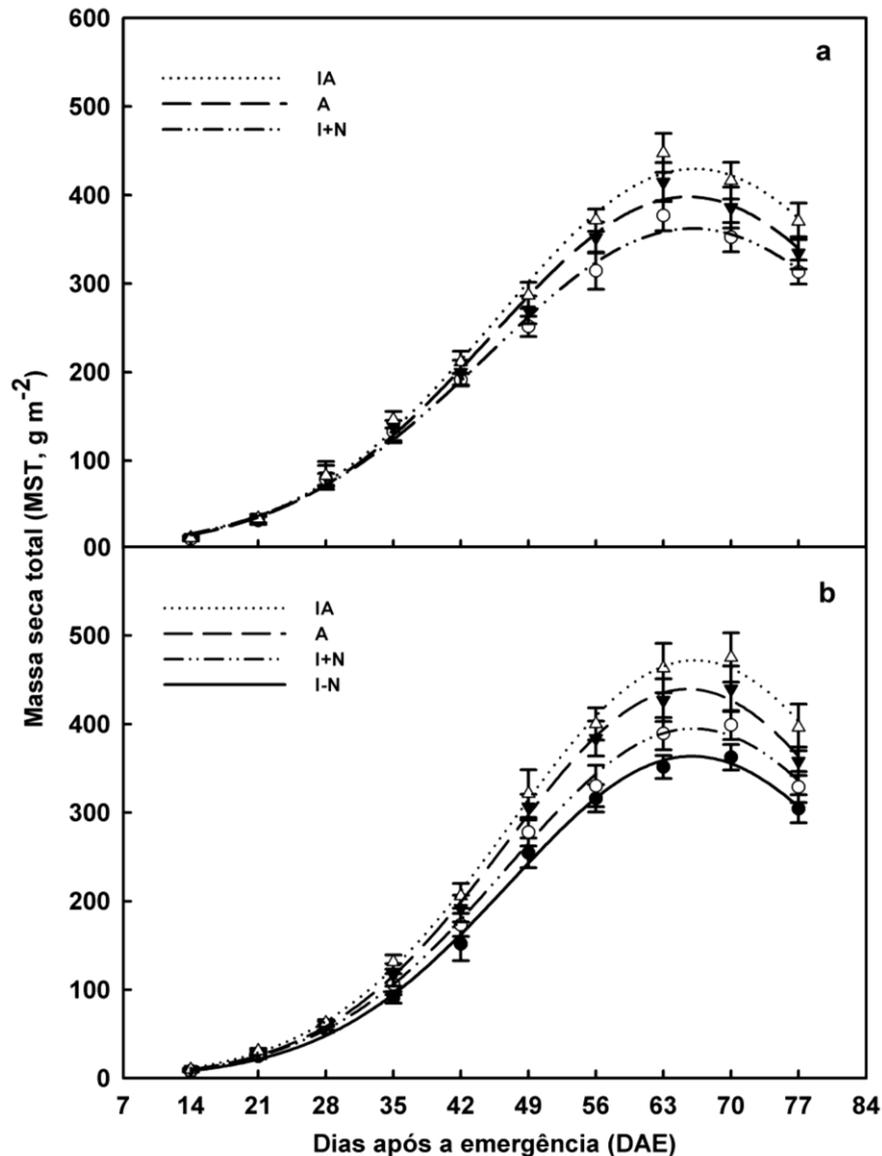
O delineamento experimental utilizado nos dois experimentos foi em blocos ao acaso, com três tratamentos para o primeiro ano e quatro tratamentos para o segundo ano, ambos com quatro repetições. Cada parcela foi constituída por 6 linhas de 5 m espaçadas de 0,5 m de distância, com uma área total de 12,5 m² por parcela.

Os dados de todas as variáveis analisadas, em ambas as épocas de cultivo, foram submetidos separadamente à análise de variância (ANOVA) pelo teste F, e quando os tratamentos apresentaram significância, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com nível de significância fixado em $p < 0,05$. A análise estatística dos dados foi realizada por meio do software Sisvar 5.1 Build 72 (FERREIRA, 2011), que é distribuído gratuitamente pela Universidade Federal de Lavras (UFLA).

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Acúmulo de Massa Seca e Área Foliar

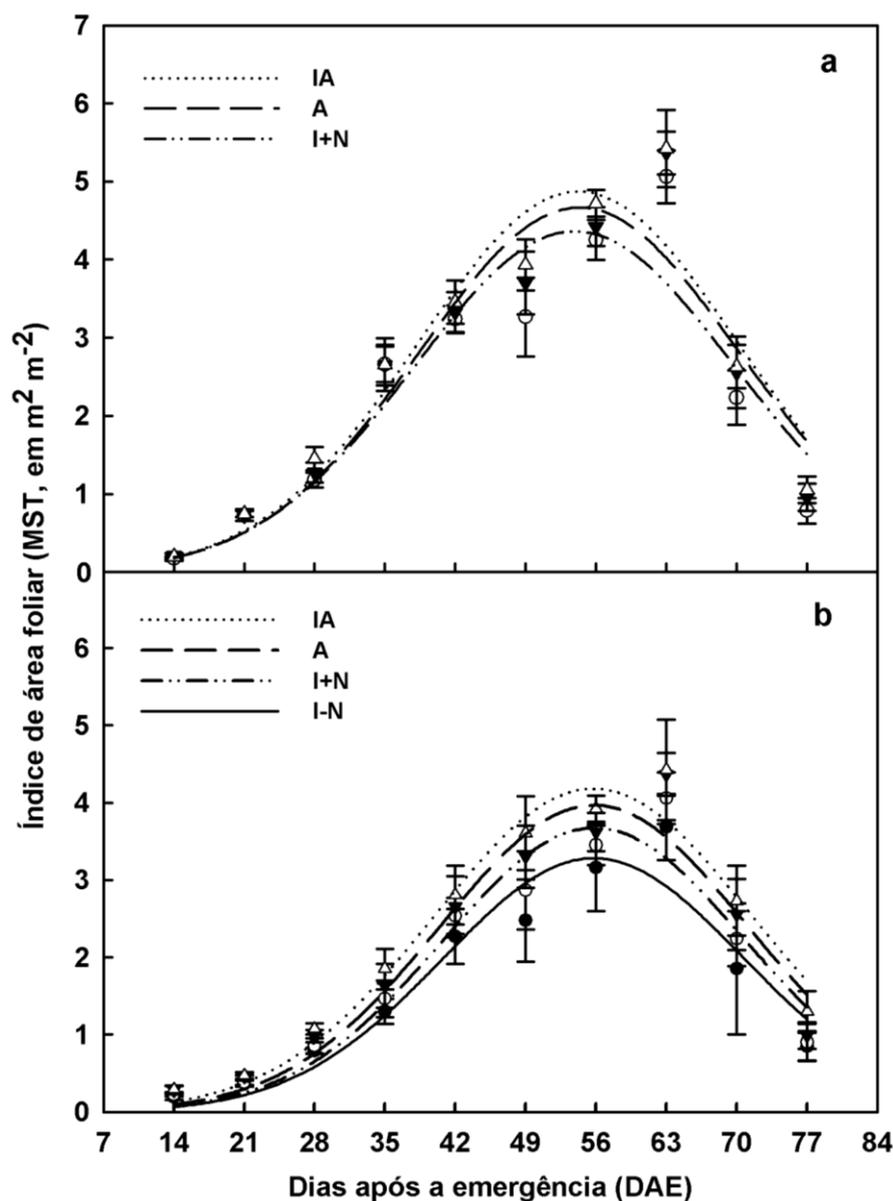
A análise de crescimento foi realizada pelo monitoramento da massa seca total da planta (MST) (parte aérea, raiz e vagem) (Figura 6) e acúmulo de área foliar no tempo (dados não mostrados). Houve diferença significativa para MST entre os tratamentos, em ambos os anos. No primeiro ano de cultivo (Figura 6a), as diferenças significativas entre os tratamentos foram observadas a partir dos 21 DAE, ficando os tratamentos IA e A, com valores significativamente superiores aos demais tratamentos no período que compreendeu dos 56 até 77 DAE. No final do enchimento de vagens, a MST do tratamento IA foi significativamente superior à dos demais, sendo que o pico de acúmulo de MST, em todos os tratamentos, ocorreu aos 70 DAE, com os tratamentos IA e A apresentando-se significativamente superiores aos demais. Para o segundo ano de cultivo (Figura 6b), foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos já a partir dos 42 DAE, período que sucede o florescimento, permanecendo o tratamento IA com valores superiores aos demais, com o pico de acúmulo de MST aos 63 DAE, quando o tratamento IA se torna significativamente superior ao A, que por sua vez foi superior ao I+N, mantendo-se assim até o final do ciclo, com uma única diferença na última coleta, onde os tratamentos A e I+N passam a não diferir significativamente entre si, permanecendo o IA superior a ambos.



¹ Barra de erro padrão das médias, ^a ano de 2013 e ^b ano de 2014.

Figura 6: Massa seca total (MST, em g m⁻²) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (A, ▼), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (I+N, ○), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (IA, Δ) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N, ●), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, outubro de 2013 e 2014).

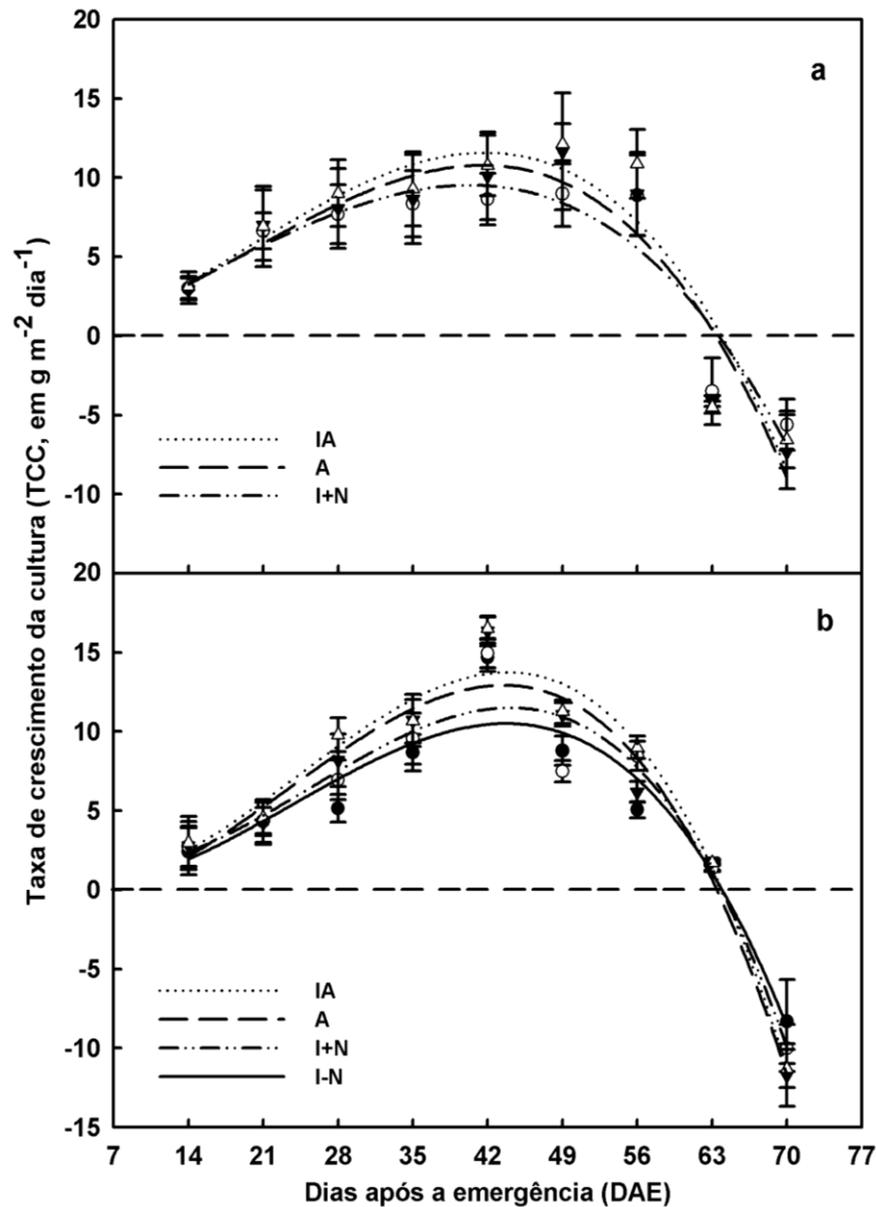
Em relação ao IAF, foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos nos dois anos de cultivo (Figura 7), com o pico de IAF aos 63 DAE, para ambos os anos, o que coincidiu com o início do enchimento de vagem no primeiro ano de cultivo e um pouco antes no segundo ano. No primeiro ano de cultivo, o tratamento I-N se manteve significativamente inferior aos demais tratamentos durante grande parte do ciclo, mas principalmente no período compreendido entre os 49 e 70 DAE (Figura 7a), onde justamente ocorreram as maiores diferenças no acúmulo de MST entre os tratamentos (Figura 6a). No segundo ano de cultivo, a significância entre os tratamentos foram mais acentuadas no período compreendido entre os 49 e 56 DAE (Figura 7b), sendo o tratamento IA significativamente superior a I+N, porém não diferindo de A, que por sua vez não diferiu de I+N aos 49 DAE, e aos 56 DAE o tratamento IA foi significativamente superior aos demais.



¹ Barra de erro padrão das médias, ^a ano de 2013 e ^b ano de 2014.

Figura 7: Índice de área foliar (IAF, em m² m⁻²) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (A, ▼), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (I+N, ○), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (IA, Δ) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N, ●), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, outubro de 2013 e 2014).

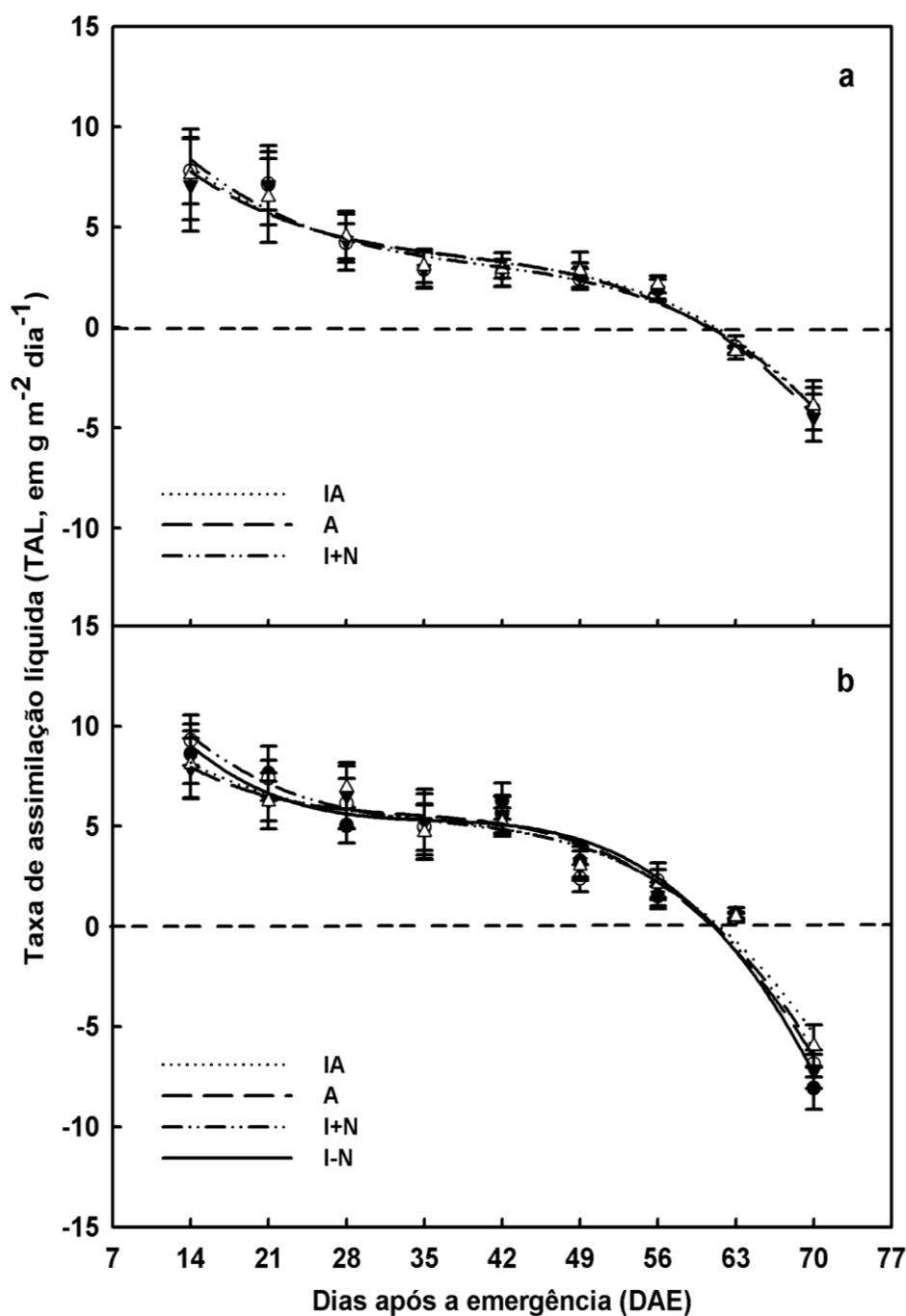
Em relação ao acúmulo de MST por unidade área de solo no tempo, ou seja, a taxa de crescimento da cultura (TCC), esta teve seus máximos valores ocorrendo no final da floração, dos 42 e 49 DAE respectivamente para o primeiro e segundo ano de cultivo (Figura 8). No primeiro ano, houve diferenças significativas entre os tratamentos apenas aos 49 DAE, quando IA foi significativamente superior a I+N, enquanto A foi semelhante a ambos. No segundo ano, os tratamentos A e IA foram significativamente superiores a I-N e I+N dos 28 aos 63 DAE.



¹ Barra de erro padrão das médias, ^a ano de 2013 e ^b ano de 2014.

Figura 8: Taxa de crescimento da cultura (TCC, em $\text{g m}^{-2} \text{dia}^{-1}$) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (A, \blacktriangledown), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (I+N, \circ), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (IA, Δ) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N, \bullet), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, outubro de 2013 e 2014).

Finalmente, em termos de análise de crescimento, a TAL, ou seja, a biomassa produzida por unidade de área foliar e por unidade de tempo teve seu pico aos 14 DAE, e a partir daí diminuiu sucessivamente até atingir valores negativos no final do ciclo nos dois anos de cultivo. No enchimento de grãos, a TAL foi mínima com valores próximos de zero no primeiro ano (figura 9a) e negativa no segundo ano (figura 9b), característica típica do feijão comum, que apresenta um número inferior de vagens, quando comparado ao número inicial de flores.



¹ Barra de erro padrão das médias, ^a ano de 2013 e ^b ano de 2014.

Figura 9: Taxa de assimilação líquida ($\text{g m}^{-2} \text{dia}^{-1}$) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (A, \blacktriangledown), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (I+N, \circ), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (IA, Δ) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N, \bullet), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, outubro de 2013 e 2014).

5.3.2 Nodulação e Acúmulo de Massa Seca das Plantas no Estádio de Polinização

O potencial de FBN foi avaliado pelo NN e MSN e o crescimento da planta pela MSPA e MSR, para cada tratamento, em ambos os experimentos, avaliados no estágio de polinização (32 e 33 DAE, para o primeiro ano e segundo ano, respectivamente). Em relação

ao NN, houve diferença significativa entre os tratamentos, nas duas épocas de cultivos (Tabela 3), sendo que I+N, no primeiro ano, e I-N e I+N, no segundo ano, foram superiores a A e IA.

Tabela 3: Número de nódulos por planta (NN), massa seca de nódulos por planta (MSN), massa seca da parte aérea por planta (MSPA) e massa seca de raiz por planta (MSR) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, avaliados no estágio de polinização, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (A), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (I+N), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (IA) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, outubro de 2013 e 2014).

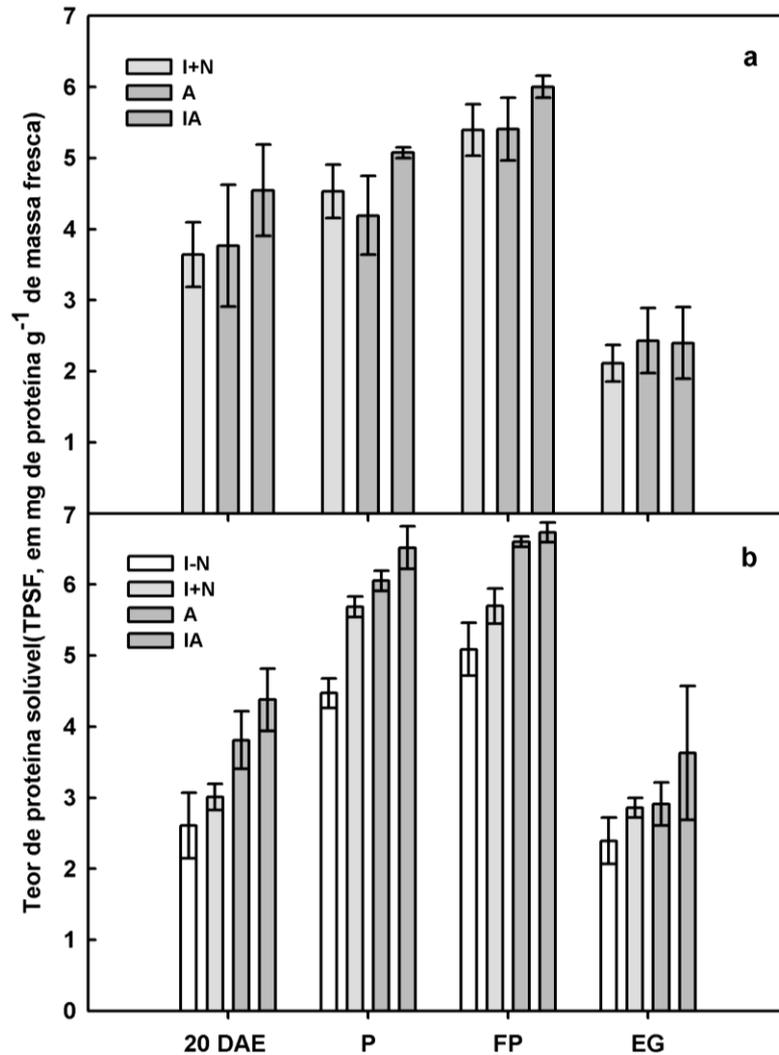
Tratamentos	Primeiro ano de cultivo			
	NN	MSN (mg)	MSPA (g)	MSR (g)
I+N	100,00 a	201,92 a	6,28 a	0,64 a
A	52,00 b	110,01 b	6,19 a	0,59 a
IA	65,50 b	153,72 ab	7,09 a	0,63 a
Pr>Fc	0,0024	0,0054	0,1315	0,3655
CV%	15,35	18,81	8,96	9,40
Tratamentos	Segundo ano de cultivo			
	NN	MSN (mg)	MSPA (g)	MSR (g)
I-N	81,00 a	166,32 a	4,72 b	0,58 a
I+N	78,00 a	172,25 a	5,69 b	0,59 a
A	32,70 b	80,16 b	5,48 b	0,62 a
IA	42,00 b	93,47 b	7,48 a	0,63 a
Pr>Fc	0,0002	0,0005	0,0017	0,8699
CV%	18,63	16,25	11,61	14,88

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (P < 0,05).

A massa seca de nódulos por planta (MSN) não mostrou o mesmo padrão de significância que o NN. No primeiro ano de cultivo, I+N e A apresentaram valores para MSN semelhantes, ao passo que no segundo ano, a MSN foi significativamente superior para I-N e I+N em relação a A e IA (Tabela 3). Quanto à produção de MSPA, foi observada diferença significativa entre os diferentes tratamentos, mas não para MSR. A MSPA foi grande para IA no primeiro ano, porém não diferiu significativamente de I+N e A. No segundo ano, a MSPA de IA foi significativamente superior a dos outros três tratamentos, e novamente I+N e A não diferiram significativamente entre si (Tabela 3b).

5.3.3 Teores Foliar de Proteína Solúvel, Aminoácidos Livres, Amido e Açúcares Solúveis em Quatro Estádios Fenológicos

Para ambos os anos de cultivo, houve diferenças significativas no TPSF entre os tratamentos, para alguns dos quatro estádios avaliados (Figura 10). No primeiro ano, no estágio vegetativo (20 DAE), antes da adubação com 40 kg N ha⁻¹, não houve diferença significativa entre os tratamentos no TPSF. No entanto, no segundo ano no estágio vegetativo, o TPSF de IA foi significativamente superior comparado a I-N e I+N (Figura 10b), porém foi similar ao de A.



¹ Barra de erro padrão das médias, ^a ano de 2013 e ^b ano de 2014.

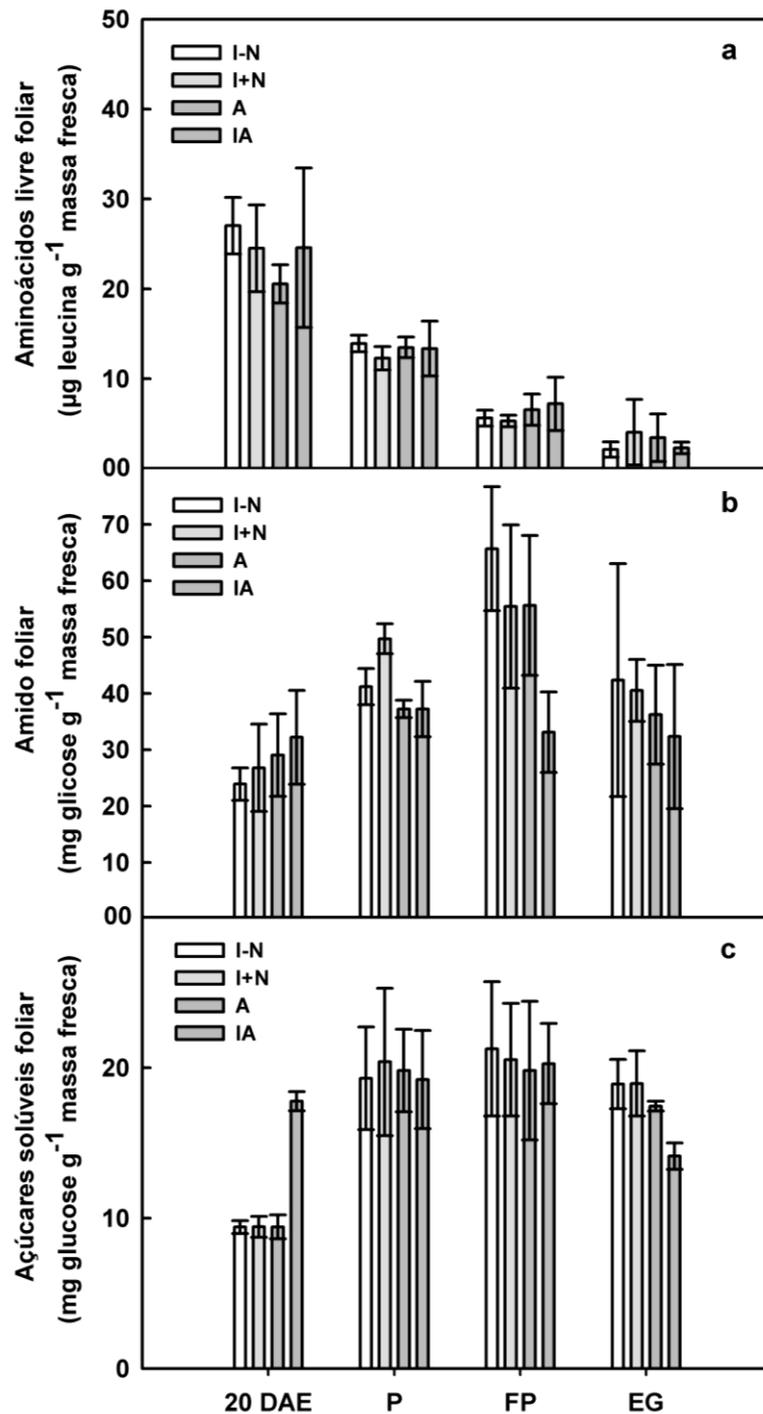
Figura 10: Teor de proteína solúvel (TPSF, em mg de proteína solúvel g⁻¹ de massa fresca foliar), quantificadas aos 20 dias após a emergência (20 DAE), polinização (P), florescimento pleno (FP) e enchimento de grãos (EG) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semente e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (A), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (I+N), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semente e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (IA) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, maio de 2013 e 2014).

Para a segunda coleta, que foi realizada no estágio de polinização (32 e 33 DAE para o primeiro e segundo ano, respectivamente), no primeiro ano ocorreu significância entre os tratamentos, e o tratamento IA foi significativamente superior aos demais (Figura 10a). No segundo ano de cultivo, o tratamento IA manteve-se significativamente superior aos demais tratamentos, porém I+N e A não diferiram entre si, mas que por sua vez foram significativamente superiores a I-N (Figura 10b). Na terceira coleta, que ocorreu no estágio de florescimento pleno (37 e 39 DAE, para o primeiro ano e segundo ano, respectivamente), no primeiro ano o tratamento IA foi significativamente superior aos demais (Figura 10a), enquanto que no segundo ano, os tratamentos IA e A foram significativamente superiores a I+N e I-N (Figura 10b). Na quarta e última coleta, no estágio de enchimento de vagens (63 e 65 DAE, para o primeiro e segundo ano, respectivamente), não houve diferença significativa entre os tratamentos em ambos os anos.

Os valores de TPSF não foram comparados estatisticamente entre os diferentes estádios de desenvolvimento da planta, mas tende a ser maior no estágio de florescimento pleno e a cair no estágio de enchimento de vagens (Figura 10), que é tão importante para garantir a produção.

Durante o segundo experimento o TALF, o TAF e o TASF foram avaliados nos estádios vegetativo, polinização, florescimento e enchimento de vagens (Figura 11). Para o TALF, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos, sendo observados valores mais elevados aos 20 DAE, que estiveram em torno de 25 μg de leucina g^{-1} massa fresca foliar. Nas coletas posteriores houve tendência de queda (Figura 11a). Quanto ao TAF (Figura 11b) não foi observada diferença significativa entre os tratamentos no estágio vegetativo (20 DAE), mas na polinização, aos 32 DAE, os tratamentos IA e A foram significativamente inferiores a I+N, que por sua vez não diferiu do I-N (Figura 11b). Na terceira coleta no estágio de florescimento pleno (39 DAE), o tratamento IA foi significativamente inferior aos demais, enquanto que na quarta coleta, no estágio de enchimento de vagens (65 DAE), não houve diferença significativa entre os tratamentos, porém houve tendência de maior acúmulo de amido no estágio de florescimento pleno comparado aos demais estádios (Figura 11b).

Quanto ao TASF (Figura 11c), foi observada diferença significativa entre os tratamentos, sendo o tratamento IA significativamente superior aos demais aos 20 DAE, que corresponde à primeira coleta. Para segunda e terceira coletas que correspondem, respectivamente à polinização e florescimento pleno, não houve diferença significativa entre os tratamentos. Na quarta coleta os tratamentos I-N e I+N foram significativamente superiores ao IA, sendo que o tratamento A não diferiu dos demais (Figura 11c).



¹ Barra de erro padrão das médias, ^a ano de 2013 e ^b ano de 2014.

Figura 11: Teor de aminoácidos livres no tecido foliar (TALF, em $\mu\text{g leucina g}^{-1}$ massa fresca), teor de amido no tecido foliar (TAF, em $\text{mg de glicose g}^{-1}$ massa fresca) e açúcares solúveis no tecido foliar (TASF, em $\text{mg de glicose g}^{-1}$ massa fresca) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, quantificados aos 20 dias após a emergência (20 DAE), polinização (P), florescimento pleno (FP) e enchimento de grãos (EG), nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semente e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (A), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (I+N), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semente e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (IA) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, maio de 2013 e 2014)

5.3.4 Componentes de Produção

Na maturação fisiológica, foram avaliados os componentes de produção NV, NGV, MS100G e PG, em ambos os anos de cultivo. Para o NV, NGV e MS100G, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos nos dois anos (Tabela 4). Já em relação à PG, o tratamento IA foi significativamente superior a I+N e A, para o primeiro ano de cultivo, entretanto, no segundo ano IA foi significativamente superior a I-N e I+N, porém não diferiu do A, que por sua vez não diferiu do tratamento I+N.

Tabela 4: Número de vagens por planta (NV), número de grãos por vagem (NGV), massa seca de 100 grãos (MS100) e produtividade de grãos (PG) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, avaliados na maturação dos grãos, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (A), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (I+N), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (IA) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, outubro de 2013 e 2014).

Primeiro ano de cultivo				
Tratamentos	NV	NGV	MS100G (g)	PG (Kg ha⁻¹)
I+N	6,8 a	4,7 a	26,015 a	1277,42 b
A	6,0 a	5,5 a	25,307 a	1181,16 b
IA	9,0 a	5,0 a	25,468 a	1717,94 a
Pr>Fc	0,1664	0,6232	0,3425	0,0081
CV%	27,49	20,99	2,56	17,91
Segundo ano de cultivo				
Tratamentos	NV	NGV	MS100G (g)	PG (Kg ha⁻¹)
I-N	5,0 a	5,0 a	24,412 a	918,14 c
I+N	6,5 a	5,0 a	25,272 a	1159,35 bc
A	6,2 a	5,5 a	24,985 a	1277,99 ab
IA	7,7 a	5,2 a	25,268 a	1594,91 a
Pr>Fc	0,1959	0,9293	0,5897	0,0003
CV%	25,48	24,10	2,81	10,28

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (P <0,05).

5.4 DISCUSSÃO

No primeiro ano de cultivo, foram avaliados três tratamentos (I+N, A e IA) e um tratamento adicional, sem adubação nitrogenada durante todo o ciclo, I-N, que só foi avaliado no segundo ano de cultivo, de modo a proporcionar um tratamento controle total sem adubação nitrogenada. No entanto, no campo, a fertilização com 20 a 40 kg N ha⁻¹ é recomendada, pelo menos, aos 25 DAE (VIEIRA et al., 2006), e, portanto, é um tratamento não comumente utilizado por agricultores.

5.4.1 Acúmulo de Massa Seca e Área Foliar

A análise de crescimento do feijoeiro comum no campo apresentou diferenças significativas para MST entre os tratamentos (Figura 6). No primeiro ano de cultivo, A e IA tiveram valores significativamente superiores aos outros tratamentos no estágio de enchimento de vagens (Figura 6a), enquanto que no segundo ano, IA apresentou MST significativamente superior aos outros tratamentos do estágio de florescimento até a maturação, com o pico de MST ocorrendo no final do estágio de enchimento de vagens (Figura 6b), corroborando os resultados de Gomes et al. (2000).

Além disso, o pico de IAF ocorreu no início do estágio de enchimento de grãos, em ambos os anos (Figura 7), coincidindo com os valores máximos de MST no primeiro experimento (Figura 6), enquanto que no segundo experimento, o pico IAF ocorreu antes do pico MST (70 DAE). Ambos os picos ocorreram no início do estágio de enchimento de grãos das plantas em ambos os experimentos, em concordância com Gomes et al. (2000). Semelhante a MST, foram verificados valores de IAF significativamente superiores para IA em ambos os anos (Figura 7). No primeiro ano, o IAF de A e IA foram significativamente superiores a I+N, para praticamente todo o estágio reprodutivo (Figura 7a), justamente onde as diferenças significativas para MST ocorreram (Figura 6). No segundo ano, o IAF de A e IA foi significativamente superior ao do restante dos tratamentos em grande parte do período experimental (Figura 7b). O alto IAF de A e IA esteve correlacionado com alta MST (Figura 6), provavelmente aumentando a fotossíntese da planta, que por sua vez resultou em maior PG para estes tratamentos (Tabela 4). Os picos de MST e IAF ocorreram no estágio de enchimento de grãos, justamente quando as plantas requerem altas taxas fotossintéticas para garantir o acúmulo de fotoassimilados de reserva e consequentemente alta PG (PIMENTEL; LAFRAY; LOUGUET, 1999a) e a adubação com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura aumentou MST e IAF, garantindo alta PG no final do ciclo.

A máxima TCC ocorreu no final do estágio de florescimento, para ambos os anos de cultivo (Figura 8), antes do pico de MST (Figura 6) e IAF (Figura 7). Após os máximos valores de TCC no final do período de florescimento, o crescimento das plantas foi reduzido, mas a MST continuou a aumentar, porém lentamente, até o estágio de enchimento de grãos, para todos os tratamentos em ambos os anos (Figura 6). No primeiro ano, não foram significativas as diferenças para TCC dos tratamentos na grande maioria das coletas, e apenas aos 49 DAE, o IA foi significativamente superior a I+N, porém semelhante a A (Figura 8). No segundo ano, a TCC de IA e A foram significativamente superiores a I+N dos 28 a 63 DAE. Assim, os tratamentos fertilizados com N na semeadura (A e IA) apresentaram maior MST, IAF e TCC, provavelmente devido à dose inicial de N antes da formação de nódulos e o início de FBN, pois a FBN no feijoeiro comum só passa a contribuir efetivamente com N para as plantas a partir dos 15 a 20 DAE das plantas (HUNGRIA; BARRADAS; WALLSGROVE, 1991), o que por sua vez contribuiu para o aumento de N nas folhas mais jovens, da fotossíntese e finalmente da PG.

A variável de análise de crescimento que indica a biomassa produzida por unidade de área foliar, por unidade de tempo, ou seja, o acúmulo de biomassa da fotossíntese é a TAL, que foi elevada aos 14 DAE para ambos os anos (Figura 9), reduzindo gradualmente depois disso, chegando a valores perto de zero ou negativos no início do estágio de enchimento de grãos (GOMES et al., 2000), quando as plantas apresentam máxima MST e IAF e necessitam de alta remobilização de fotoassimilados das folhas para os grãos (PIMENTEL 2006). É bem conhecido que o feijoeiro comum apresenta senescência precoce, o que causa abortamento floral (VIEIRA et al., 2006), como mostrado pelos valores negativos da TAL no estágio de enchimento de grãos (Figura 9).

5.4.2 Nodulação e Acúmulo de Massa Seca das Plantas no Estádio de Polinização

No estágio de polinização (32 e 33 DAE, para o primeiro e segundo ano, respectivamente), que é um estágio com a máxima fotossíntese líquida durante o ciclo do feijoeiro comum (PIMENTEL; LAFRAY; LOUGUET, 1999a), a planta necessita de um alto conteúdo de N nas folhas para síntese e atividade da Rubisco (PIMENTEL 2006), sendo neste estágio avaliado o potencial de FBN, por meio do NN e MSN e o crescimento das plantas pela MSR e MSPA, para cada tratamento em ambos os experimentos (Tabela 3). Houve diferença significativa entre os tratamentos para o NN em ambos os anos (Tabela 3) com I+N, no primeiro ano, e I+N e I-N no segundo apresentando valores significativamente superiores aos tratamentos que receberam adubação nitrogenada na semeadura (IA e A). A MSN não mostrou o mesmo padrão de significância do NN, no primeiro ano, I+N e IA tiveram valores muito semelhantes de MSN, enquanto no segundo ano, a MSN de I-N e I+N foram superiores as de IA, que por sua vez foi superior a A (Tabela 3). Diferenças significativas também foram verificadas para MSPA, mas não para a MSR, em ambos os anos, como demonstrado anteriormente por sua MST (Figura 6). Assim, a dose inicial de 20 kg N ha⁻¹ antes da formação dos nódulos e início da FBN reduziu, porém não inibiu a nodulação e aumentou a MSPA (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2003).

5.4.3 Teores Foliar de Proteína Solúvel, Aminoácidos Livres, Amido e Açúcares Solúveis em Quatro Estádios Fenológicos

Um alto TPSF, que é proporcional ao conteúdo e atividade da Rubisco, pode aumentar a fotossíntese líquida, e conseqüentemente o rendimento (LONG et al., 2006). Assim, o TPSF foi avaliado em quatro estádios de desenvolvimento (Figura 10): no estágio vegetativo, antes da fertilização adicional N; no estágio de polinização, quando o conteúdo de N foliar (GRAHAM; VANCE, 2003) e a fotossíntese líquida é máxima (PIMENTEL; LAFRAY; LOUGUET, 1999a; PIMENTEL; HÉRBET; VIEIRA, 1999b) para garantir o acúmulo de fotoassimilados nas folhas para, posteriormente, serem exportados e manter o crescimento do embrião no grão (KRAMER; BOYER, 1995); no estágio de florescimento, quando os embriões estão crescendo e no estágio de enchimento de vagens.

No primeiro ano de cultivo, no estágio vegetativo, antes da fertilização adicional com 40 kg N ha⁻¹, não foram verificadas diferenças no TPSF (Figura 10a). No entanto, no segundo ano de cultivo, o TPSF de A e IA foram significativamente superiores a I-N e I+N (Figura 10b). No estágio de polinização, o TPSF de IA foi significativamente superior aos demais tratamentos para ambos os anos (Figura 10), como foi observado para MSPA (Tabela 3), o que pode assegurar uma alta fotossíntese e acumulação de carboidratos para o florescimento e crescimento reprodutivo.

No primeiro ano de cultivo, no estágio de florescimento pleno, o IA continuou mostrando valores significativamente superiores aos outros dois tratamentos para o TPSF

(Figura 10a), mas no segundo ano, o IA não foi significativamente superior a A, porém ambos foram significativamente superiores a I+N e I-N. Finalmente, no estágio de enchimento de vagens, não houve diferenças significativas entre os tratamentos para ambos os anos (Figura 10), provavelmente devido ao aumento da senescência das folhas do feijão comum, o que causa o abortamento das vagens (VIEIRA et al., 2006). Portanto, o TPSF de IA foi superior aos tratamentos não adubados com N na semeadura (I-N e I+N), em comparação com os outros estádios, principalmente no estágio de polinização, quando o IA teve também uma maior MSPA (Tabela 3).

No segundo experimento, envolvendo quatro tratamentos (A, I+N, IA e I-N), o TAF, o TASF e o TALF) foram avaliados nos mesmos quatro estádios, das medições do TPSF. Não houve diferença significativa para TALF entre os tratamentos (Figura 11a), com valores elevados (cerca de 25 μg de aminoácidos g^{-1} de massa fresca foliar) no estágio vegetativo (20 DAE), e com valores reduzidos no estágio de florescimento, quando o crescimento aumentou. Os valores de TAF (Figura 11b) não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos no estágio vegetativo (20 DAE) e enchimento de grãos (65 DAE), no entanto, no estágio de polinização (33 DAE), a TAF de A e IA foram significativamente inferior a I+N, porém muito semelhantes a I-N (Figura 11b). No estágio de floração (39 DAE), apenas o TAF de IA foi significativamente inferior aos outros três tratamentos (Figura 11b) e os valores de TAF no estágio de floração (Figura 11b) foram aumentados em comparação com o restante dos tratamentos (Figura 11b). O baixo TAF dos tratamentos A e IA pode ser devido a um aumento na exportação açúcares para órgãos reprodutivos (PIMENTEL, 2006). Por outro lado, o TASF de IA foi significativamente superior aos demais tratamentos no estágio vegetativo (Figura 11c), mas nos estádios de polinização e floração, TASF não mostrou diferenças significativas entre os tratamentos e no estágio de enchimento de grãos, o TASF foi superior para I-N e I+N (Figura 11c). Os valores de TAF e TASF mais baixos para IA (Figura 11b e c) contrasta com o maior TPSF deste tratamento (Figura 10b), o que é provavelmente devido à remobilização de açúcar a partir da folha, induzindo a hidrólise do amido e exportação de açúcar solúvel a partir da folha para sustentar o crescimento da planta e depois do embrião no grão, que começou no estágio de polinização (KRAMER; BOYER, 1995).

5.4.4 Componentes de Produção

Quanto aos componentes de produção, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos nos dois anos de cultivo para o NV, NGV e MS100G (Tabela 4). Ocorreu diferença significativa entre os tratamentos apenas para PG, com o tratamento IA apresentando rendimentos mais elevados em ambos os anos, embora a PG foi muito semelhante à de A no primeiro ano (Tabela 4). Assim sendo, a PG foi o único componente de produção da cultura capaz de discriminar os efeitos dos tratamentos. O NV não se correlacionou com a maior PG em ambos os experimentos (Tabela 4) e não foi uma boa característica para a seleção de genótipos, como informado por Carbonell et al., (2008). No segundo ano de cultivo, o I-N mostrou-se significativamente inferior para PG que o restante dos tratamentos, seguido por A e I+N, que foi muito similar em ambos os anos. Portanto, para os dois anos de cultivo, a adubação com 20 kg N ha^{-1} na semeadura sustentou uma alta MSPA e IAF dos tratamentos A e IA, juntamente com um elevado TPSF, permitido uma mais elevada PG destes tratamentos e, assim, a PG foi a melhor característica de discriminação do desempenho do feijoeiro comum neste ambiente.

5.5 CONCLUSÃO

Nos dois experimentos, o tratamento inoculado e adubado com 20 Kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 Kg N ha⁻¹ aos 25 dias após a semeadura (IA) obteve a maior produtividade de grãos e, portanto, pode ser recomendada para o cultivo de feijão comum com alta tecnologia e, conseqüentemente, alta produtividade de grãos. Por outro lado, o tratamento inoculado e adubado com 40 Kg N ha⁻¹ aos 25 dias após a semeadura (I+N) teve a mesma PG que o tratamento adubado com 20 Kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 Kg N ha⁻¹ aos 25 dias após a semeadura (A) e pode ser recomendado como tecnologia de baixo custo para os pequenos produtores na agricultura familiar. Porém, mais estudos são necessários antes de recomendar estas práticas agronômicas de inoculação com ou sem adubação com N na semeadura para melhorar a produtividade de grãos do feijoeiro comum, na estação chuvosa.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a baixa produtividade da cultura do feijoeiro comum no cenário nacional, pode-se lançar mão da tecnologia da FBN, pois já é sabido que o uso dessa técnica com estirpes selecionadas é capaz de resultar em altos rendimentos sem a suplementação com fertilizantes nitrogenados como foi demonstrado por Hungria; Campo; Mendes (2003), utilizando a estirpe SEMIA 4080. Vários outros ensaios têm confirmado a viabilidade do uso de inoculantes contendo estirpes elites (SEMIA 4080, SEMIA 4088 e SEMIA 4077) com a cultura do feijoeiro comum, com resultados positivos. Fato este que também pode ser comprovado pelos resultados obtidos no presente estudo, onde o tratamento apenas inoculado sem a suplementação com fertilizantes nitrogenados na semeadura e em cobertura (I-N) apresentou produtividade superior em quase duas vezes à média nacional, considerando a época da seca, pois durante a época das águas as condições climáticas não favorecem o cultivo do feijoeiro comum, nas condições do local de realização dos experimentos, principalmente pela ocorrência de altas temperaturas durante o estágio de florescimento, proporcionando muitas vezes uma baixa produtividade no plantio das águas. Sendo recomendado o plantio de feijão comum, na região da baixada fluminense do Rio de Janeiro, na época da seca, a fim de se obter alta produtividade.

A recomendação de adubação nitrogenada para o cultivo do feijoeiro comum, independente da expectativa da safra, é a aplicação de 20 a 40 kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 a 60 kg N ha⁻¹ antes do florescimento (VIEIRA et al., 2006), porém nos últimos anos essa recomendação vem sendo revisada, passando a não ser mais recomendado adubação com fertilizante nitrogenado na semeadura. Após a semeadura, devem ser realizadas visitas às lavouras, verificando se há nodulação e presença de sintomas de deficiência de N. segundo Barbosa; Gonzaga (2012) o fertilizante nitrogenado deve ser aplicado somente se o número de nódulos na região da coroa da raiz for inferior a 15 por planta ou o interior deles não apresentar coloração avermelhada, no estágio V4, ou seja, quando o feijoeiro comum estiver com a terceira folha trifoliolada expandida. Após o estágio V4 há poucas chances de resposta positiva da planta ao N aplicado. Porém o tema ainda demanda mais estudos devidos à variabilidade nos resultados.

Assim, segundo os resultados obtidos nestes experimentos, há uma indicação que o uso da inoculação nos tratamentos I-N e I+N forneceu um aporte de N capaz de gerar produtividade semelhante ao tratamento que utilizou N mineral em 20 kg N ha⁻¹ na semeadura mais 40 kg N ha⁻¹ em cobertura aos 25 DAE e, isso a um menor custo, podendo ser recomendado para pequenos produtores, que utilizam poucos recursos tecnológicos na agricultura familiar. Por outro lado, a adubação com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura, junto com a inoculação, mais 40 kg N ha⁻¹ em cobertura aos 25 DAE, do tratamento IA, permitiu obter-se maior produtividade, podendo ser recomendado para uma agricultura de maior nível tecnológico, que visa alta produtividade. Contudo, mais estudos, com outros cultivares e em outros locais, são necessários para estas recomendações.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALKAMA, N.; OUNANE, G.; DREVON, J. J. Is genotypic variation of H⁺ efflux under P deficiency linked with nodulated-root respiration of N₂ - Fixing common-bean (*Phaseolus vulgaris* L.)? *Journal of Plant Physiology*, Rockville, v. 169, p. 1084-1089, 2012
- AMINIAN, M.; NABATCHIAN, F.; VAISIRAYGANI, A.; TORABI, M. Mechanism of Coomassie Brilliant Blue G-250 binding to cetyltrimethylammonium bromide: An interference with the Bradford assay. *Analytical Biochemistry*, Bethesda, v. 434, p. 287-291, 2013
- ANDRADE, A. C.; FONSECA, D. M.; QUEIROZ, D. S.; SALGADO, L. T.; CECON, P. R. Adubação nitrogenada e potássica em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier). *Ciência e Agrotecnologia*, Edição Especial, Lavras, v. 8, p.1643-1651, 2003.
- ARAÚJO, F. F.; MUNHOZ, R. E. V.; HUNGRIA, M. Início da nodulação em sete cultivares de feijoeiro comum inoculadas com estirpes de *Rhizobium*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 31, p. 435-443, 1996.
- BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A. C. O. Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014. Santo Antônio de Goiás, GO: Embrapa Arroz e Feijão, 2012. 247 p. (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos, 272).
- BELLAVER, A.; FAGUNDES, R. S. Inoculação com *Rhizobium tropici* e uso do nitrogênio na base e por cobertura na cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cultivando o Saber*, Cascavel, v. 2, p. 1-10, 2009.
- BENICASA, M. M. P. Análise de crescimento de plantas (noções básicas). Jaboticabal. Funep, 2003, 41p.
- BINOTTI, F. F. D. S.; ARF, O.; SÁ, M. E. D.; BUZETTI, S.; ALVAREZ, A. C. C.; KAMIMURA, K. M. Fontes, doses e modo de aplicação de nitrogênio em feijoeiro no sistema plantio direto. *Bragantia*, Campinas, v. 68, p. 473-481, 2009.
- BORÉN, A.; CARNEIRO, J. E. S. A cultura. In: VIEIRA, C.; PAULA JUNIOR, T. J.; BORÉN, A. (Eds.). *Feijão 2ª edição atualizada e ampliada*. Viçosa: UFV, p. 13-18, 2006.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, Bethesda, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRITO, F. L.; PACHECO, R. S.; SOUZA FILHO, B. F.; FERREIRA, E. P. B.; STRALIOTTO, R.; ARAÚJO, A. P. Resposta do feijoeiro comum à inoculação com rizóbio e suplementação com nitrogênio mineral em dois biomas brasileiros. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 39, p. 981-992, 2015.
- BROUGHTON, W. J.; HERNÁNDES, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPT, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) model food legumes. *Plant and Soil*, London, v. 252, p. 55-128, 2003.

CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P.M. Plant genetic control of nodulation. Annual Reviews in Microbiology, San Francisco, v. 45, p. 345-382, 1991.

CARBONELL, S. A. M.; CHIORATO, A. F.; ITO, M. F.; PERINA, E. F.; GONCALVES, J. G. R.; SOUZA, P. S.; GALLO, P. B.; TICELLI, M.; COLOMBO, C. A.; AZEVEDO FILHO, J. A. IAC-Alvorada and IAC-Diplomata: news common bean cultivars. Crop Breeding and Applied Biotechnology, Viçosa, v. 8, p. 163-166, 2008.

CARDOSO, J. D.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S. Polyphasic approach for the characterization of rhizobial symbionts effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, v. 93, p. 2035-2049, 2012.

CASSINI, S. T. A.; FRANCO, M. C. Fixação biológica de nitrogênio: microbiologia, fatores ambientais e genéticos. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, J.; BORÉM, A. (Ed.). Feijão. Viçosa: UFV, 2006. p. 143-170.

CHO, M.; HARPER, J. E. Effect of localized nitrate application on isoflavonoid concentration and nodulation in split-root systems of wildtype and nodulation-mutant soybeans plants. Plant Physiology, Rockville, v. 95, p.1106-1112, 1991.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (Conab). Acompanhamento safra brasileira de grãos, v. 3 - Safra 2015/16, n. 1 - Primeiro levantamento, Brasília, p. 1-140, outubro 2015. Disponível em http://www.conab.gov.br/uploads/arquivos/boletim_graos_outubro_2015.pdf. Acesso em 26\03\2016.

DEL, P. M. J.; MELO, L. C. Potencial de rendimento da cultura do feijoeiro comum. Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, 2005, 131p.

DUQUE, F. F.; NEVES, M. C. P.; FRANCO, A. A.; VICTORIA, R. L. BODDEY, R. M. The response of field grown *Phaseolus vulgaris* to *Rhizobium* inoculation and quantification of N₂ fixation using ¹⁵N. Plant and Soil, London, v.88, p.333-343, 1985.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. Mineral nutrition of plants: principles and perspective. 2° ed. Sunderland, Sinauer Associates, 2005. 400 p.

EVANS, G. C. The quantitative analysis of plant growth. Oxford, Blackwell, 1972, 734p.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C. Enhancing nitrogen use efficiency in crop plants. Advances in Agronomy, Omaha, v. 88, p. 97-185, 2005.

FAGERIA, N. K.; SANTOS, A. B.; STONE, L. F. Manejo de nitrogênio em arroz irrigado. Santo Antônio de Goiás: Embrapa, 2003, (Circular Técnica, 58).

FARRAR, J. F. 1995. Carbon partitioning. In: Photosynthesis and Production in a Changing Environment. (Eds.: HALL, D. O.; SCURLOCK, J. M. O.; BOLHAR-NORDENKAMPF, H. R.; LEEGOOD, R. C.; LONG, S. P.). A field and laboratory manual: Chapman and Hall. Cap. 5, p. 222-246, 1995.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v.35, p. 1039-1042, 2011.

FIDÉLIS, R. R.; MRANDA, G. V.; SANTOS, I. C.; GALVÃO, J. C. C.; PELUZIO, J. M.; LIMA, S. O. Fontes de Germoplasma de milho para Estresse de Baixo Nitrogênio. Pesquisa Agropecuária Tropical, Goiânia, v. 37, p. 147-153, 2007.

FRANCO, A. A.; PEREIRA, J. C.; NEYRA, C. A. Seasonal patterns of nitrate reductase and nitrogenase activities in (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant physiology, Rockville; v. 63, p. 421-424, 1979.

GEPTS, P. e DEBOUCK, D. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: SCHOONHOVEN, A. VAN e VOYSES, O. (eds.). Common Beans: Research for crop improvement Cali. C.A.B. International, CIAT. 1991. p. 7-53.

GIBSON, A. H.; HARPER, J. E. Nitrate effect on nodulation of soybean by *Bradyrhizobium japonicum*. Crop Science, Madison, v. 25, p. 497-501, 1985.

GOMES, A. A.; ARAÚJO, A. P.; ROSSIELLO, R. O. P.; PIMENTEL, C. Acumulação de biomassa, características fisiológicas e rendimento de grãos em cultivares de feijoeiro irrigado e sob sequeiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 35, p. 1927-1937, 2000.

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. Plant Physiology, Rockville, v. 131, p. 872-877, 2003.

GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Soil Biology and Biochemistry, Brisbane, v. 36 p. 1389-1398, 2004.

GRANGE, L.; HUNGRIA, M.; GRAHAM, P. H.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Brazil. Soil Biology e Biochemistry, Brisbane, v. 39, p. 867-876, 2007.

GUIMARÃES, D. S. P. S. F.; SOUZA, M. R. M.; HIRANO, R. T.; PEREIRA, P. R. G.; BARACT-PEREIRA, M. C. Concentração de proteína solúvel por bradford revela diferenças no metabolismo de plantas de ora-pro-nobis em diferentes doses de nitrogênio. Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS), Viçosa, v.3, p.40-44, 2013.

HEIDSTRA, R.; GEURTS, R.; FRANSSEN, H.; SPAINK, H. P., VAN KAMMEN, A.; BISSELING, T. Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Vicia sativa*. Plant Physiology, Rockville; v.105, p. 787-797, 1994.

HEIDSTRA, R.; NILSEN, G.; MARTINEZ-ABARCA, F.; VAN KAMMEN, A.; BISSELING, T. Nod factor-induced expression of leghemoglobin to study the mechanism of NH_4NO_3 inhibition on root hair deformation. Molecular Plant-Microbe Interactions, Lancaster, v. 10, p. 215-220, 1997.

HUNGRIA, M., STACEY, G. Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: basic aspects and potential application in agriculture. Soil Biology and Biochemistry. Oxford, v. 29, p. 819-830, 1997.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; CHUEIRE, L.M.O.; PROBANZA, A.; GUTIERREZ-MAÑERO, F.J. e MEGIAS, M. Isolation and characterization of new efficient

and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biology and Biochemistry*, Florença, v. 32, p. 1515-1528, 2000.

HUNGRIA, M.; BARRADAS, C. A.; WALLSGROVE, R. M. Nitrogen fixation, assimilation and transport during the initial growth stage of *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 42, p. 839-844, 1991.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. A importância do processo de fixação biológica de nitrogênio para cultura da soja: componente essencial para competitividade do produto brasileiro. Londrina, PR: Embrapa Cerrados, 2007. 80p. (Embrapa soja. Documentos, 283).

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. *Biology and Fertility of Soils*, Florença, v. 39, p. 88-93, 2003.

HUNGRIA, M.; KASCHUK, G. Regulation of N₂ fixation and NO₃⁻/NH₄⁺ assimilation in nodulated and N-fertilized *Phaseolus vulgaris* L. exposed to high. *Environmental and Experimental Botany*, Oulu, v.98, p.32-39, 2014.

HUNGRIA, M.; MENDES, I. C.; MERCANTE, F. M. Tecnologia de fixação biológica do nitrogênio com o feijoeiro: viabilidade em pequenas propriedades familiares e em propriedades tecnificadas. Londrina, PR: Embrapa Soja, 2013a, 30 p. (Embrapa soja. Documentos, 338).

HUNGRIA, M.; MENDES, I.C.; MERCANTE, F.M. A fixação biológica do nitrogênio como tecnologia de baixa emissão de carbono para as culturas do feijoeiro e da soja. Londrina, PR: Embrapa soja, 2013b. (Embrapa soja. Documentos, 337).

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

HUNT, R. *Plant growth analysis*. London: Eduard Arnold, 1978.

HUNT, R.; CAUSTON, D. R.; SHIPLEY, B.; ASKEW, A. P. A modern tool for classical plant growth analysis. *Annals of Botany*, London, v. 90, p.485-488, 2002.

KJELDAHL, J. Neue methode zur bestimmung des stick-stoffs in organischen korpern. *Zeitschrift für Analytische Chemie*, v.22, p.366-382, 1883.

KRAMER, P. J.; BOYER, J. S. *Water relations of plants and soils*. San Diego: Academic Press, 1995.

KWON, D. I. C.; Beevers, H. Adverse effects of nitrate on stem nodules of *Sesbania rostrata* BREM. *New Phytology*, v. 125, p. 345-350, 1993.

LATIMORE, M.; GIDDENS, J.; ASHLEY, D. A. Effect of ammonia and nitrate nitrogen upon photosynthate supply and nitrogen fixation by soybean. *Crop Science*, Madison, v. 17, p.399-404, 1977.

LAWN, R. J.; BRUN, W. A. Symbiotic nitrogen fixation in soybeans. I. Effect of photosynthetic source sink manipulations. *Crop Science*, Madison, v. 14, p. 11-16, 1974.

LIAO, C.; PENG, Y.; MA, W.; LIU, R.; LI, C.; LI, X. . Proteomic analysis revealed nitrogen-mediated metabolic, developmental, and hormonal regulation of maize (*Zea mays* L.) ear growth. *Journal of Experimental Botany*. v.66, p.5275-5288, 2012.

LONG, S. P.; ZHU, X. Z.; NAIDU, S. L.; ORT, D. Can improvement in photosynthesis increase crop yields? *Plant, Cell and Environment*, Malden, v. 29, p. 315-330, 2006.

MALAVOLTA, E. Manual de nutrição mineral de plantas. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2006. 638p.

MALIK, N. S.; CALVERT, H. E.; BAUER, W. D. Nitrate induced regulation of nodule formation in Soybean. *Plant Physiology*, Rockville, v. 84, p.266-271, 1987.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Instrução normativa Nº 13, de 24/03/2011. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/vegetal/registros-autorizacoes/registro/registro_de_produtos. Acesso em 12 de outubro de 2016.

MARTINEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MARTINS, F.M.; FRANCO, A.A.; GRAHAM, P.H.; PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v. 41, p. 417-426, 1991.

MULAS, D.; GARCÍA-FRAILE, P.; CARRO, L.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; CASQUERO, P.; VELÁZQUEZ, E.; GONZÁLEZ-ANDRÉS, F. Distribution and efficiency of *Rhizobium leguminosarum* strains nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in Northern Spanish soils: Selection of native strains that replace conventional N fertilization. *Soil Biology and Biochemistry*, Florença, v. 43, p. 2283-2293, 2011.

MUNNS, D. N. Nodulation of *Medicago sativa*. If. Compensating effects of nitrate and of prior nodulation. *Plant and Soil*, London, v.28, p.246-257, 1968.

NODARI, R. O.; TSAI, S. M.; GUZMAN, P.; GILBERTSON, R. L.; GEPTS, P. Toward an integrated linkage map of common bean. III. Mapping genetic factors controlling host-bacteria interactions. *Genetics*, California, v. 134, p. 341-350, 1993.

NORMAN, M.J.T.; CRAIG, J. P.; SEARLE, P.G.E. The ecology of tropical food crops. New York, Cambridge University Press, 1995. p. 185-192.

PARENT, S. É.; PARENT, L. E.; EGOZCUE, J. J.; ROZANE, D. E.; HERNANDES, A.; LAPOINTE, L.; HÉBERT-GENTILE, V.; NAESS, K.; MARCHAND, S.; LAFOND, J.; MATTOS, D.; BARLOW, F.; NATALE, W. The plant ionome revisited by the nutrient balance concept. *Frontiers in Plant Science*, v.4, p.1-10, 2013.

PATRIARCA, E. J., TATÉ, R.; IACCARINO, M. Key role of bacterial NH₄⁺ metabolism in *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiology and molecular biology reviews*, v. 66, p. 203-222, 2002.

PELEGRIN, R.; MERCANTE, F. M.; OTSUB, I. M. N.; OTSUB, A. A. Resposta da cultura do feijoeiro à adubação nitrogenada e à inoculação com rizóbio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 33, p. 219-226, 2009.

PEREIRA, A. R.; MACHADO, E.C. Análise quantitativa do crescimento de comunidades vegetais. Campinas: IAC, 1987, (IAC. Boletim Técnico, 114).

PEREIRA, P. A. A.; BURRIS, R. H.; BLISS, F. A. ¹⁵N determined dinitrogen fixation potential of genetically diverse bean lines (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant and Soil*, London, v.120, p. 171-179, 1989.

PERRES, J. R. R.; SUHET, A. R.; MENDES, I. C.; VARGAS, M. A. T. efeito da inoculação com rizóbio e da adubação nitrogenada em sete cultivares de feijão em um solo de cerrados. *Revista Brasileira de Ciência dos Solos*, Brasília, v. 18, p. 415-420, 1994.

PIMENTEL, C. Efficiency of nutrient use by crops for low input agro-environments. In: SINGH, R. P.; SHANKAR, N.; JAIWAL, P. K. (eds.). Nitrogen nutrition in plant productivity. Houston: Studium Press, 2006. p. 277-328.

PIMENTEL, C.; HÉBERT, G.; VIEIRA, S. J. Effects of drought on O₂ evolution and stomatal conductance of beans at the pollination stage. *Environmental and Experimental Botany*, Florença, v. 42, p. 155-162, 1999b.

PIMENTEL, C.; LAFFRAY, D.; LOUGUET, P. Intrinsic water use efficiency at the pollination stage as a parameter for drought tolerance selection in *Phaseolus vulgaris* L. *Physiology Plantarum, Scandinavica*, v. 106, p. 184-198, 1999a.

PINTO, F. G. S.; HUNGRIA, M.; MERCANTE, F. M. Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 39, p. 1851-1864, 2007.

ROMANINI JUNIOR, A.; ARF, O.; BINOTTI, F. F. S.; SÁ, M. E.; BUZETTI, S.; FERNADES, F. A. Avaliação da inoculação de rizóbio e adubação nitrogenada no desenvolvimento do feijoeiro, sob sistema plantio direto. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v. 23, p. 74-82, 2007.

SANTOS, H. G.; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C.; OLIVEIRA, V. A.; LUMBRELAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A.; CUNHAS, T. J. F.; OLIVEIRA, J. B. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. 3a ed. revisada e ampliada. Brasília-DF: Centro Nacional de Pesquisa de Solos. 2013, 353 p.

SANTOS, J.B.; GAVILANES, M.L. Botânica. In: VIEIRA, C. JÚNIOR, T.J.P.; BORÉM, A. Feijão. 2. ed. Viçosa, Minas Gerais: Editora UF, 2006. p. 41-65.

SILVA, H. T. Caracterização morfológica, agrônômica e fenológica de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) comumente plantadas em diversas regiões do Brasil. Goiânia: Embrapa-CNPAP, 1981. (Embrapa-CNPAP. Circular técnica, 15).

SPECHT, J. E.; HUME, D. J.; KUMUDINI, S. V. Soybean yield potential-a genetic and physiological perspective. *Crop Science*, Madison, v. 39, p.1560-1570, 1999.

STRALIOTTO, R. A importância da inoculação com rizóbio na cultura do feijoeiro. Seropédica: EMBRAPA Agrobiologia (CNPAB), 2002. p. 6.

TIRICHINE, L.; JAMES, E. K.; SANDAL, N.; STOUGAARD, J. Spontaneous root-nodule formation in the model legume *Lotus japonicus*: a novel class of mutants nodulates in the absence of rhizobia. *Molecular plant-microbe interactions*, Lancaster, v. 19, n. 4, p. 373-382, 2006.

TRUCHET, G.; BARKER, D. G.; CAMUT, S.; BILLY, F.; VASSE, J.; HUGUET, T. Alfalfa nodulation in the absence of *Rhizobium*. *Molecular and General Genetics*, v. 219, p. 65-68, 1989.

VIEIRA, C., DE PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. Feijão. 2ª Edição revisada e ampliada. Viçosa: Editora UFV, Universidade Federal de Viçosa, 2006, 600p.

VIEIRA, N. M. B.; ANDRADE, M. J. B.; CARVALHO, J. G. C.; ALVES JUNIOR, J.; MORAIS, A. R. Altura de planta e acúmulo de matéria seca do feijoeiro cvs. BRS MG talismã e ouro negro em plantio direto e convencional. *Ciência Agrotécnica*, Lavras, v. 32, p. 1687-1693, 2008.

VIEIRA, R. F.; TSAI, S. M.; TEXEIRA, M. A. Nodulação e fixação simbiótica de nitrogênio em feijoeiro com estirpes nativas de rizóbio, em solo tratado com lodo de esgoto. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 40, p. 1047-1050, 2005.

VOISIN, A. S.; SALON, C.; JEUDY, C.; WAREMBOURG, F. R. Symbiotic N₂ fixation activity in relation to C economy of *Pisum sativum* L. as a function of plant phenology. *Journal of Experimental Botany*, Lancaster, v. 54, p. 2733-2744, 2003.

WAHAB, A. M. A.; ZAHARAN, H. H.; ABD-ALLA, M. H. Root-hair infection and nodulation of four grain legumes as affected by the form and the application time of nitrogen fertilizer. *Folia Microbiology*, v. 41, p.303-308, 1996.

WENRICH, R.B.; TRUMBO, T.A. Interaction of nucleic acids with Coomassie Blue G-250 in the Bradford assay. *Analytical Biochemistry*, Bethesda, v.428, p.93-95, 2012.

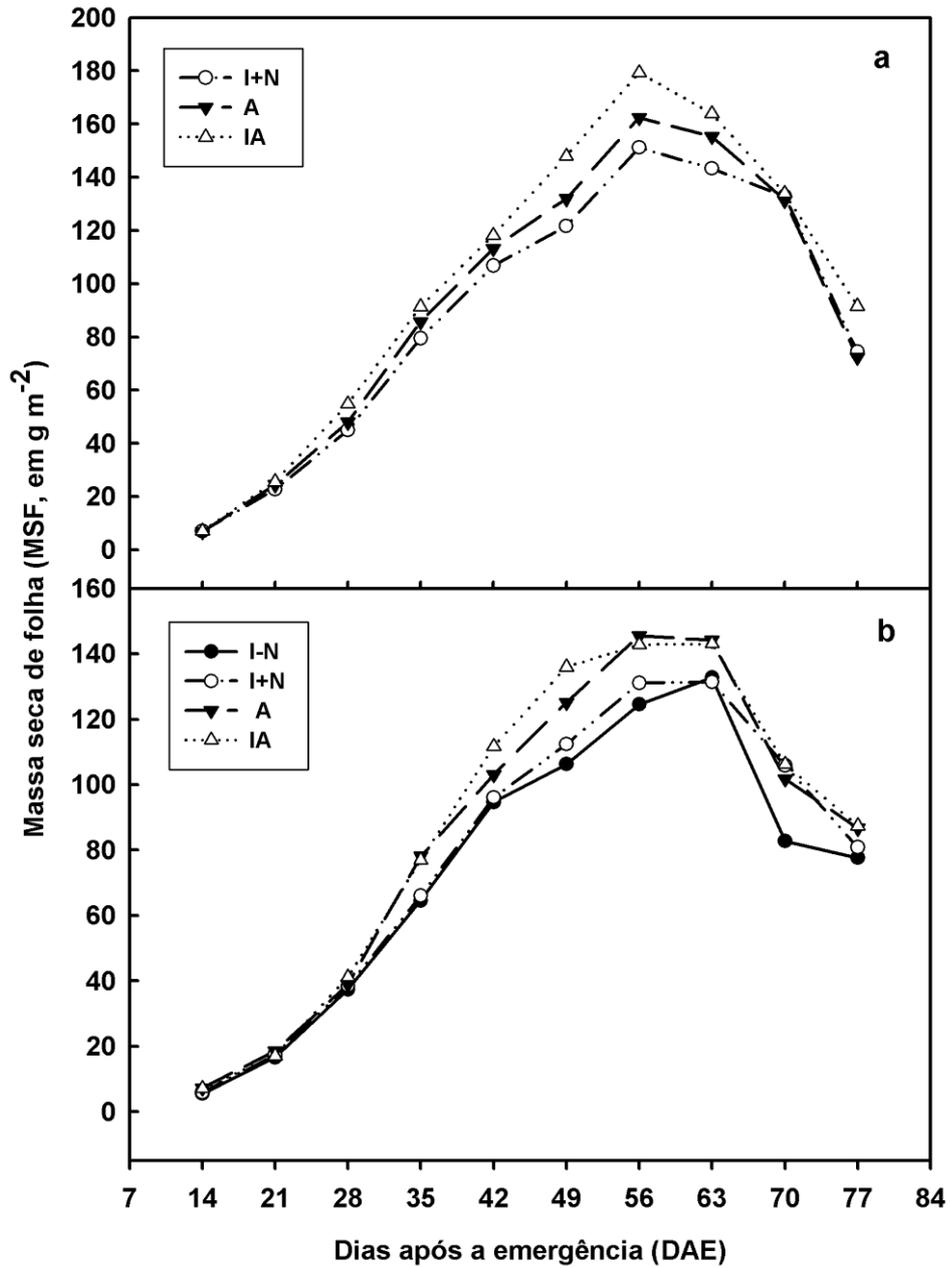
WOLYN, D. J.; ATTEWELL, J. LUDDEN, P. W.; BLISS, F. A. Indirect measures of N₂-fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under field conditions: The role of lateral root nodules. *Plant and Soil*, London, v.113, 181-187, 1989.

YEMM, E. W.; COOCKING, E .C. The determination of amino acids with ninhydrin. *Analyst*, Strathclyde, v. 80, p. 209-213, 1995.

ZHOU, Y.; ZHANG, Y.; WANG, X.; CUI, J.; XIA, X.; SHI, K.; YU, J. Effects of nitrogen form on growth, CO₂ assimilation, chlorophyll fluorescence, and photosynthetic electron allocation in cucumber and rice plants. *Journal of Zhejiang University-Science B*, Hangzhou, v. 12, p. 126-134, 2011.

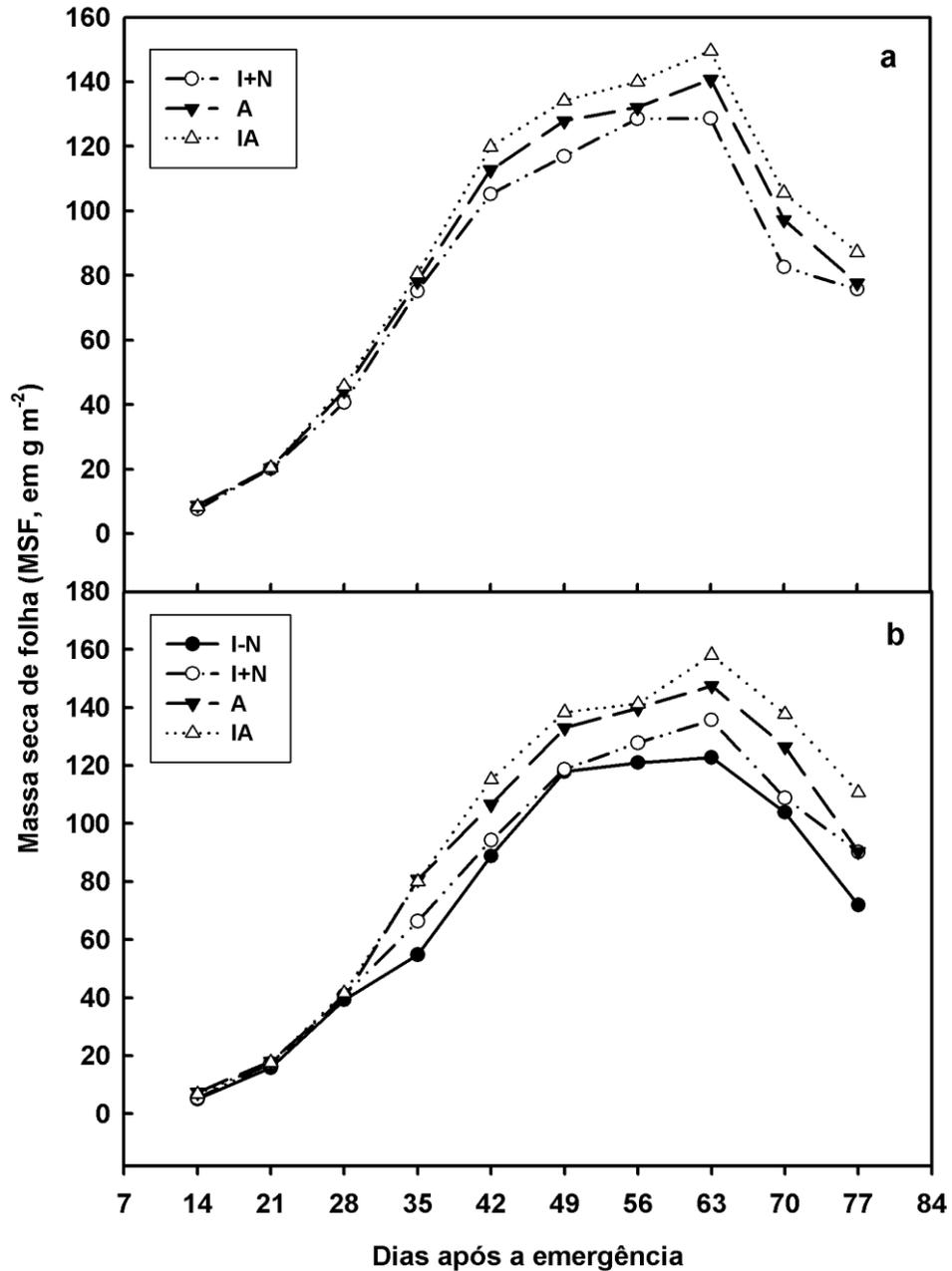
8 ANEXOS

Anexo 8.1: Massa seca de folhas (MSF, em g m^{-2}) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (A), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (I+N), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (IA) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, maio de 2013 e 2014).



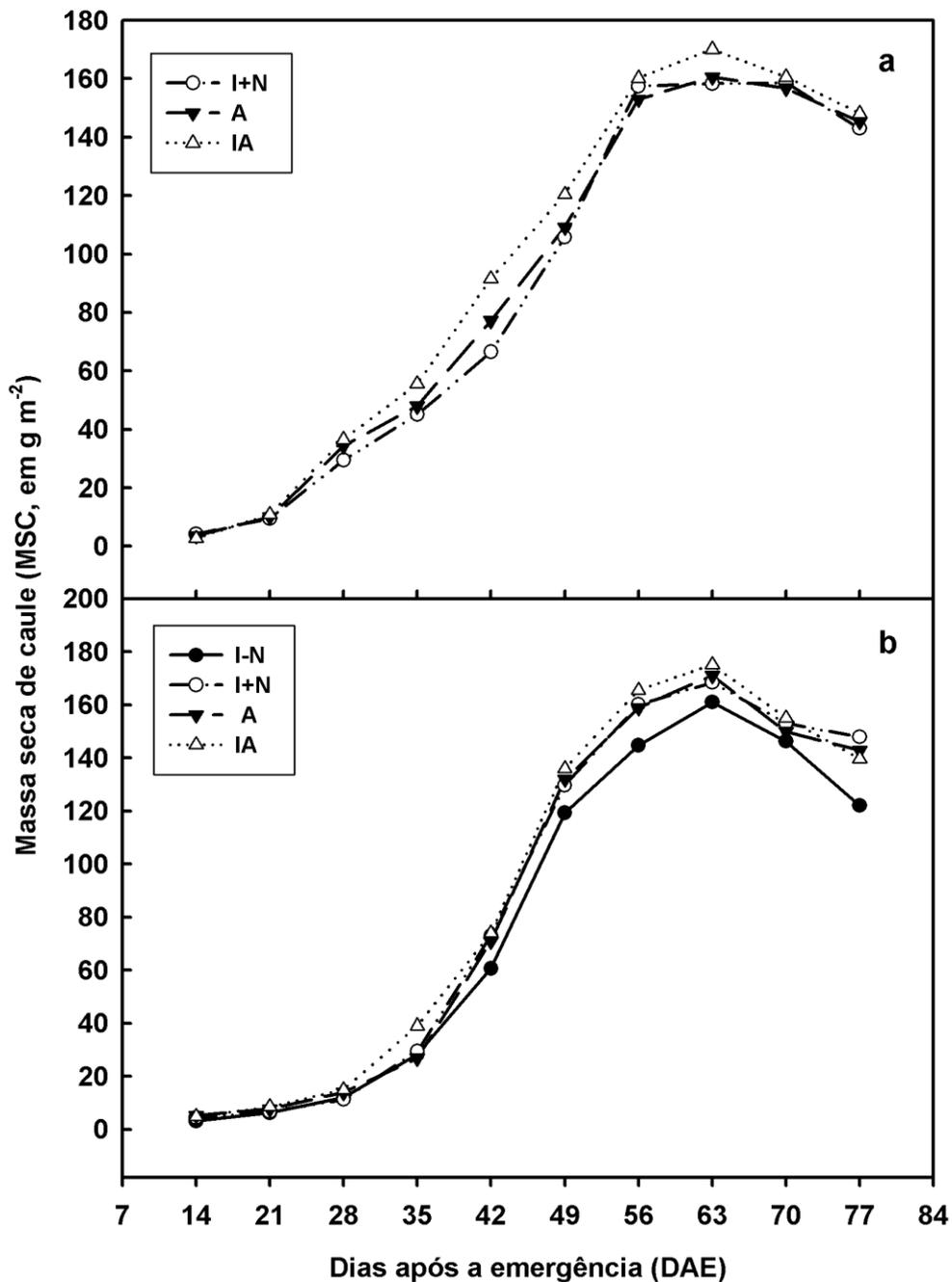
^a ano de 2013 e ^b ano de 2014.

Anexo 8.2: Massa seca de folha (MSF, em g m^{-2}) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (A), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (I+N), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (IA) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, outubro de 2013 e 2014).



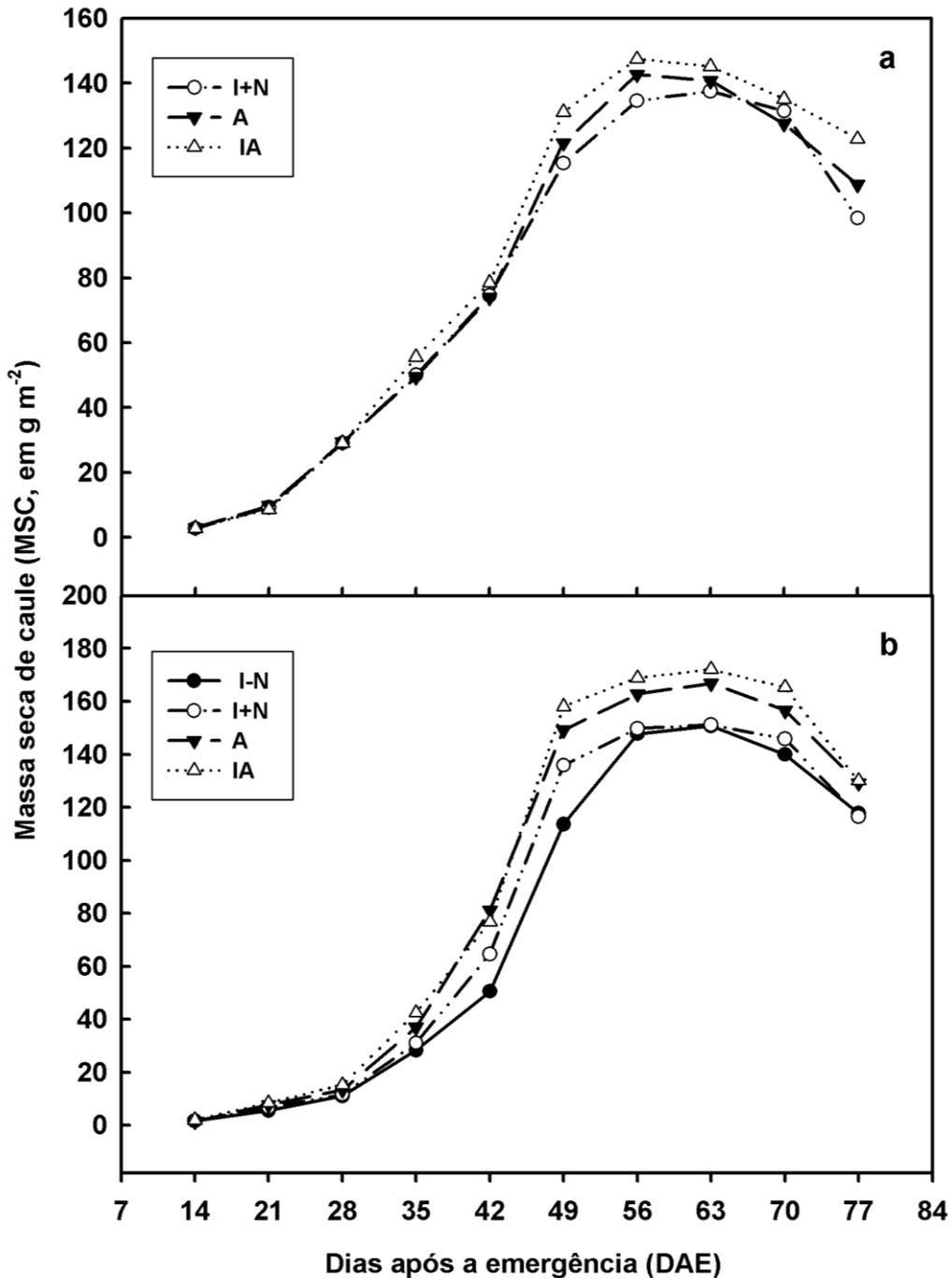
^a ano de 2013 e ^b ano de 2014.

Anexo 8.3: Massa seca de caule (MSC, em g m⁻²) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha⁻¹ na sementeira e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (A), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (I+N), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha⁻¹ na sementeira e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (IA) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, maio de 2013 e 2014).



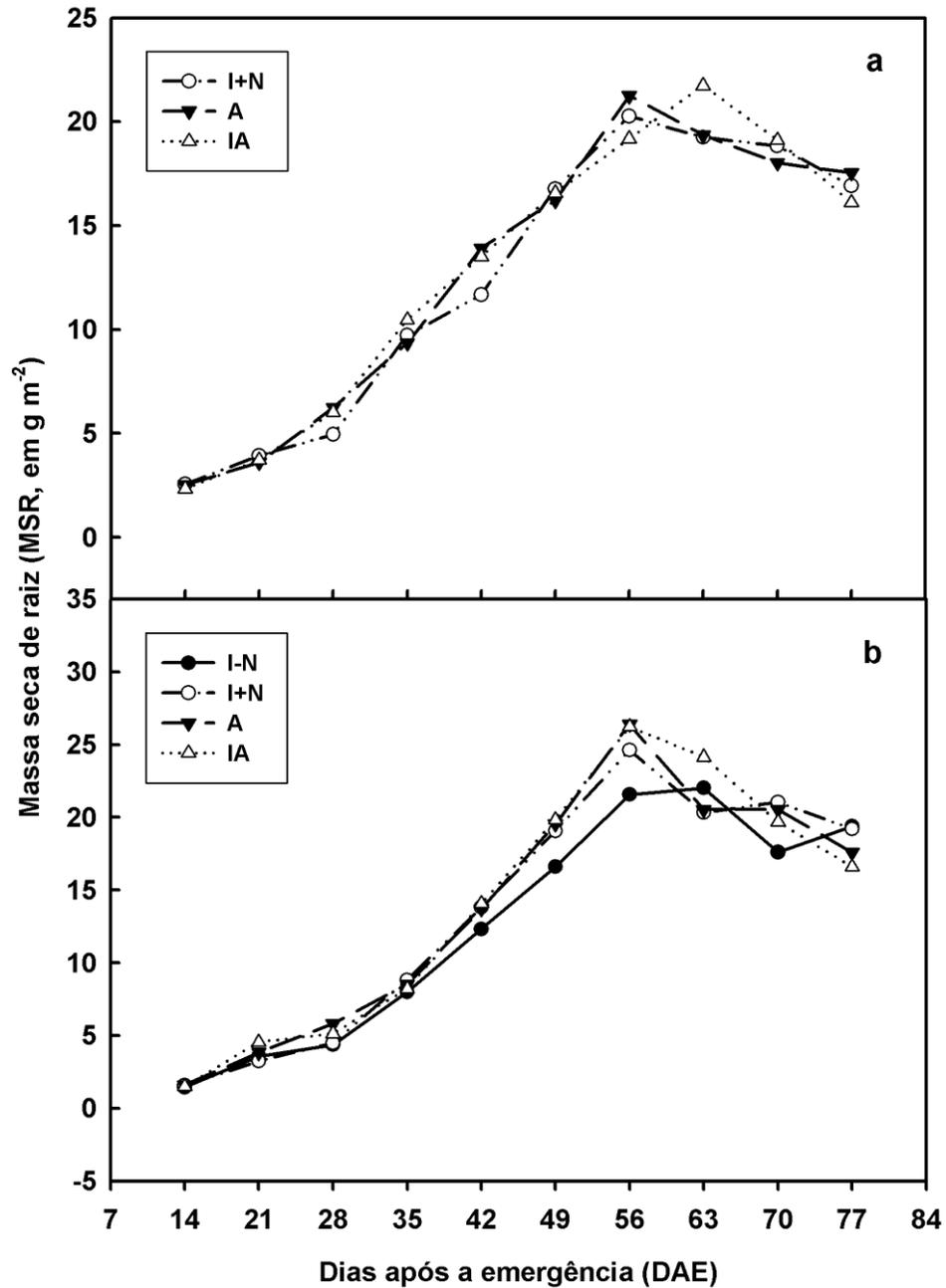
^a ano de 2013 e ^b ano de 2014.

Anexo 8.4: Massa seca de caule (MSC, em g m^{-2}) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha^{-1} na sementeira e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (A), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (I+N), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha^{-1} na sementeira e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (IA) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, outubro de 2013 e 2014).



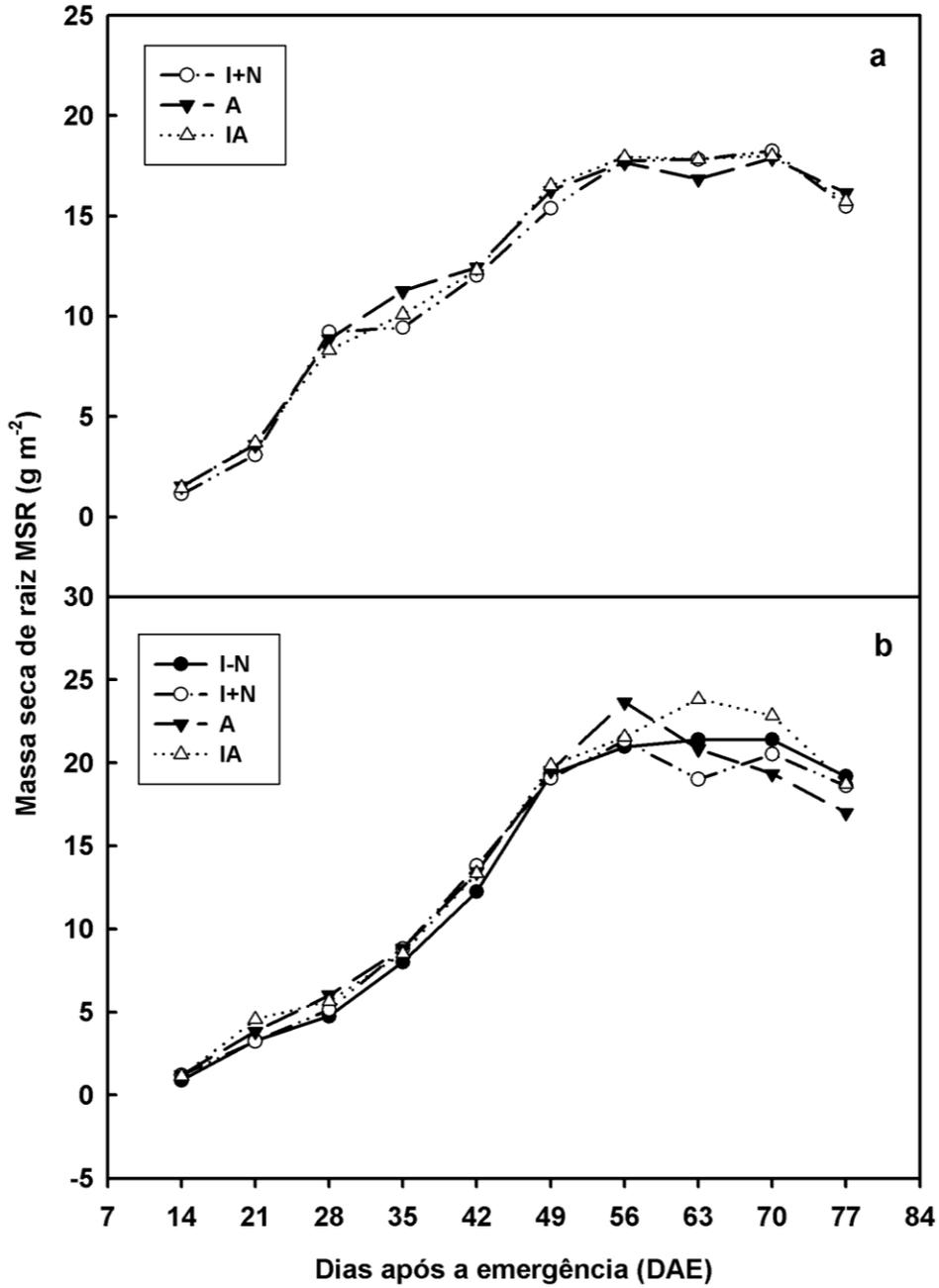
^a ano de 2013 e ^b ano de 2014.

Anexo 8.5: Massa seca de raiz (MSR, em g m^{-2}) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (A), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (I+N), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (IA) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, maio de 2013 e 2014).



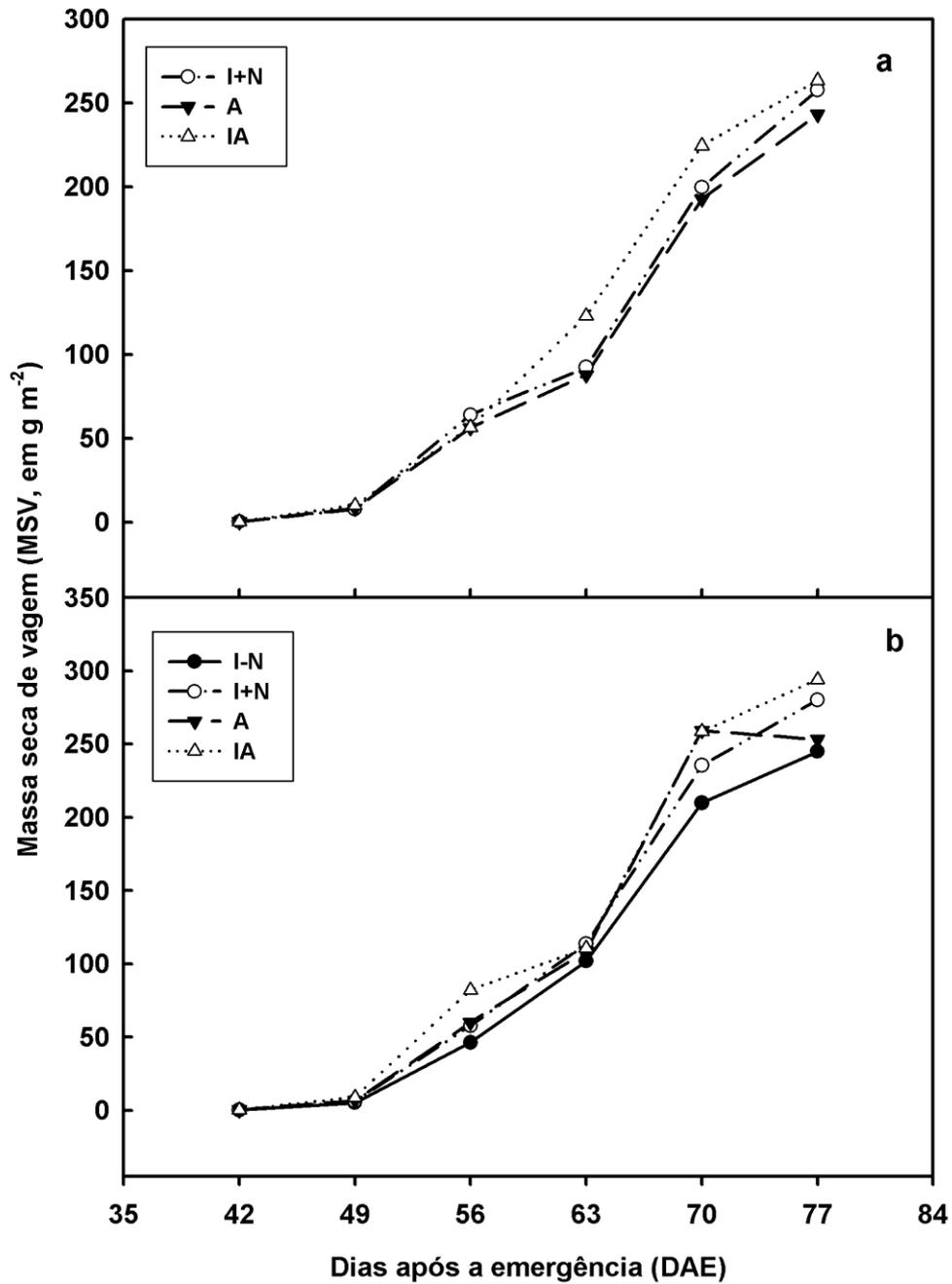
^a ano de 2013 e ^b ano de 2014.

Anexo 8.6: Massa seca de raiz (MSR, em g m^{-2}) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (A), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (I+N), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (IA) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, outubro de 2013 e 2014).



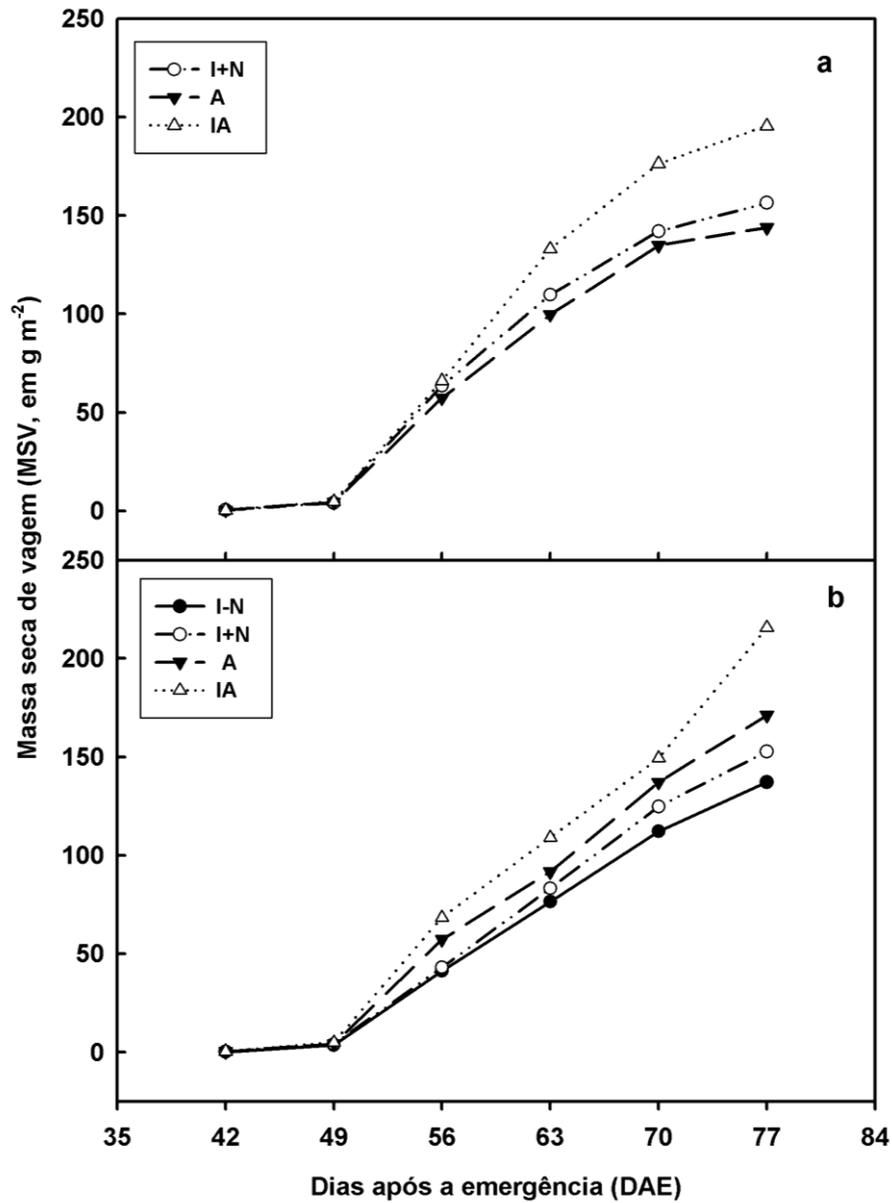
^a ano de 2013 e ^b ano de 2014.

Anexo 8.7: Massa seca de vagem (MSV, em g m^{-2}) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (A), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (I+N), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (IA) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, maio de 2013 e 2014).



^a ano de 2013 e ^b ano de 2014.

Anexo 8.8: Massa seca de vagem (MSV, em g m^{-2}) do feijoeiro comum, cultivar Carioca, nos tratamentos, apenas adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (A), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (I+N), inoculado com *Rhizobium* e adubado com 20 kg N ha^{-1} na semeadura e 40 kg N ha^{-1} aos 25 DAE (IA) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* (I-N), apenas avaliada no segundo ano de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, outubro de 2013 e 2014).



^a ano de 2013 e ^b ano de 2014.

Anexo 8.9: DOSAGEM DE METABÓLITOS PRIMÁRIOS, PARA CARACTERIZAR O “STATUS FISIOLÓGICO” DA FOLHA E DA PLANTA.

Segundo proposta de Carlos Pimentel (Professor Titular do Dep. de Fitotecnia, IA, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Km 47 da BR 465, Seropédica, RJ, 23851-970) e Marcos Paulo Santos da Fonseca (Assistente do laboratório de Fisiologia da Produção).

A) PREPARAÇÃO DOS DOIS EXTRATOS PARA AS DOSAGENS:

A1) EXTRAÇÃO PARA AÇÚCARES SOLÚVEIS, AMIDO E AMINOÁCIDOS:

1. Coletar cerca de 100 a 200 mg de folhas frescas (ou 10 mg de folhas secas), embrulhar em papel alumínio e armazenar imediatamente em nitrogênio líquido (pode ser também em sacos plásticos armazenados em gelo comum, gelo seco ou gelo com NaCl, mas isso é inadequado para publicações internacionais) e levar para pesagem (no gelo, levar para pesagem o mais rápido possível). Na hora da preparação do 1º extrato, em amostras acondicionadas no gelo, retirar rapidamente o material de folhas frescas, pesar e picar a folha (em pedaços pequenos de 5mm), colocando o material foliar em 10 mL de etanol 90%, para armazenagem do extrato. (Caso seja feita à armazenagem em nitrogênio líquido colocar a amostra coletada em almofariz gelado e macerar com nitrogênio líquido até virar pó fino como talco, para pesar em seguida, antes de colocar a amostra no etanol 90%. Usando o nitrogênio líquido, podem-se reduzir as amostras para a análise, usando somente 10 a 20 mg de folhas em 1 mL de etanol 90%, depois extrair de novo com outro mL de etanol 90%, e completar para 2,5 mL, como descrito no item 2 abaixo).

2. Para a extração de açúcares solúveis, aminoácidos e amido em seguida (esse último no precipitado), colocar os 10 mL do 1º extrato (item 1), em banho-maria por uma hora, a 60°C (podendo, depois, centrifugar a 10.000 g por 10 min e retirar cuidadosamente o sobrenadante). Transferir o sobrenadante para um frasco de 25 mL, e re-extrair o resíduo (precipitado), com mais 10 mL de etanol 90% a 60°C (podendo novamente centrifugar a 10.000 g por 10 min e retirar cuidadosamente o segundo sobrenadante). Combinar os dois extratos (ou sobrenadantes) e completar para 25 mL (extrato 1 para dosagem de açúcares solúveis e aminoácidos). Armazenar em frascos na geladeira, para dosagens posteriores. Guardar o resíduo (precipitado) das 100 a 200 mg de folhas frescas (ou 10 mg de folhas secas) restante das extrações de açúcares solúveis e aminoácidos, para fazer a dosagem de amido nele.

A2) EXTRAÇÃO PARA PROTEÍNAS:

1. Coletar cerca de 20 a 50 mg de folhas frescas (ou 2 a 5 mg de folhas secas), embrulhar em papel alumínio e imediatamente armazenar em nitrogênio líquido (pode ser também em gelo seco ou gelo com NaCl, mas isso é inadequado para publicações internacionais, como dito anteriormente). Na hora da extração, retirar rapidamente o material de folhas frescas e pesar para então colocar em almofariz gelado para macerar, ou com nitrogênio líquido até virar pó fino como talco, ou caso não haja uso do nitrogênio líquido, macerar em almofariz gelado o material pesado de folhas, com 5 mL do tampão de extração gelado, citado abaixo.

A) No caso do material macerado em 5 mL do tampão de extração, armazenar na geladeira até realizar as leituras ou centrifugar a 15.000 g por 10 minutos a 4° C, e retirar cuidadosamente o sobrenadante, para fazer a dosagem de proteínas.

B) No caso do macerado com nitrogênio líquido (ideal para publicações internacionais), transferir todo o pó fino de folha para tubo de centrifuga de 2 mL e adicionar tampão de extração no volume de 3 vezes a massa do material macerado (se foi usado 50 mg de folha, usar 1,5 mL de tampão de extração). Agitar e centrifugar a 15.000 g por 10 minutos a 4° C.

Ao final da centrifugação, retirar cuidadosamente o sobrenadante, para fazer logo a dosagem de proteínas ou armazenar em freezer a -20° C.

a) Um tampão de extração, segundo MÉDICI et al. (2004), é:

100 mM TRIS/HCl pH 7,8;

1 mM DTT (DiTioTreitol);

10% (v/v) glicerol;

0,2% (p/v) PVPP (PoliVinilPoliPirrolidona).

b) Outro tampão de extração mais simples, modificado de PHAM THI et al. (1982), é:

50 mM TRIS/HCl pH 7,8;

0,2% (p/v) PVP (PoliVinilPirrolidona);

1 mM DTT (DiTioTreitol), ou 5% (v/v) beta-Mercaptoetanol.

Referência para cada tampão:

MÉDICI, L.O.; AZEVEDO, R.A.; SMITH, R.J., LEA, P.J. The influence of nitrogen supply on antioxidant enzymes in plant roots. *Functional Plant Biology*, v.31, p.1-9, 2004.

PHAM THI, A.T.; PIMENTEL, C.; SILVA, V. Effects of Water Stress on Photosynthesis and Photorespiration of *Atriplex nummularia*, a C₄ plant. *Photosynthetica*, v.16, p.334-342, 1982.

B) DOSAGENS DE AÇÚCARES SOLÚVEIS E AMIDO (segundo Farrar, 1995; e para o amido, também pode ser segundo McCready et al., 1950):

Procedimento:

1. Se desejar extrair amido segundo proposta de FARRAR (1995), siga este passo, caso contrário prossiga a partir do item 2 desse procedimento, para dosagem de açúcares solúveis somente. Para a extração e análise de amido, após os itens 1 e 2 da extração de açúcares solúveis e aminoácidos (procedimento anterior), preparar 20 unidades enzimáticas da enzima amiloglucosidase (Sigma, A3514), por 10 mL de tampão acetato 0,2 M, pH 4,5 (0,03030 mL da enzima A3514 em 10 mL do tampão). Adicionar 10 mL do reagente (tampão + enzima) sobre o resíduo das 100 a 200 mg de folhas frescas (ou 10 mg de folhas secas) restante da extração de açúcares solúveis e aminoácidos, e colocar em banho-maria a 40°C por 24 horas. Após este período, adicionar mais 10 mL de tampão acetato pH 4,5 sobre a amostra de tecido, esperar decantar e em seguida, retirar o sobrenadante, juntando este ao primeiro, e completar para 25 mL (extrato 2 para dosagem de amido) com tampão acetato, e guardar na geladeira em frascos de plástico (Pode-se reduzir as amostras conservadas no nitrogênio líquido, usando o resíduo de 10 mg de folhas em 1 mL de tampão acetato pH 4,5, e completar para 2,5 mL de tampão).

1.1. Se desejar extrair amido, segundo proposta de MCCREADY et al. (1950), siga este passo, caso contrário prossiga a partir do item 2 desse procedimento, para dosagem de açúcares solúveis somente. Para a extração e análise de amido, após os itens 1 e 2 da extração de açúcares solúveis e aminoácidos (procedimento anterior), adicionar 3 mL de HClO₄ (ácido perclórico) a 35% ao precipitado (resíduo) obtido no item 2 do processo de extração de açúcares solúveis, amido e aminoácidos, em banho de gelo (0°C) por 15 minutos. Centrifugase por 10 minutos a 4500 rpm e separa-se o sobrenadante (3 mL). Repete-se essa operação por mais duas vezes e, portanto, os três sobrenadantes perfazem 9 mL no total. Como o HClO₄ estava a 35% adiciona-se 6 mL de H₂O, para diluí-lo para 21% (para a leitura também, se houver necessidade, dilui-se com HClO₄ a 21%), ficando com 15 mL (extrato 2 para dosagem de amido).

2. Transferir 1 mL da solução problema, do extrato 1 (para dosar açúcares solúveis) ou 2 (para dosagem de amido), contendo 20 a 100 µg de açúcar, para um tubo de ensaio grande. Adicionar 1 mL de fenol (5% p/v).

3. Adicionar cuidadosamente com um “dispenser”, mais não lentamente, 5 mL de ácido sulfúrico PA. Misture completamente, por agitação vertical, com auxílio de um bastão de vidro, utilizando luvas de borracha, pois o conjunto de vidro irá esquentar. Deixar ao ar livre por 10 minutos após a agitação do último tubo.

4. Fazer a leitura de absorvância em 485 nm no espectrofotômetro, e contraste com um branco contendo: 1 mL de etanol 90 % ou do reagente enzima + tampão ou ainda HClO₄ a 21% (na metodologia do MCCREADY et al., 1950), mais 1 mL de fenol 5%, mais 5 mL ácido sulfúrico sulfúrico. A curva de calibração deve ser feita com glicose (0 - 100 µg de glicose mL⁻¹ de etanol 90%, com 0, 20, 40, 60, 80, 100 µg de glicose mL⁻¹).

Preparo da curva padrão de glicose:

Preparar uma solução estoque, com 10 mg de glicose 100 mL⁻¹ de Etanol 90% (100 µg glicose mL⁻¹). 0 µg mL⁻¹: 1 mL de Etanol 90%; 20 µg mL⁻¹: pipetar 2 mL do estoque e diluir para 10 mL com etanol 90%; 40 µg mL⁻¹: pipetar 4 mL do estoque e diluir para 10 mL com etanol 90%; 60 µg mL⁻¹: pipetar 6 mL do estoque e diluir para 10 mL com etanol 90%; 80 µg mL⁻¹: pipetar 8 mL do estoque e diluir para 10 mL com etanol 90%; 100 µg mL⁻¹: pipetar 10 mL do estoque.

Observações:

1 Ao colocar o ácido sulfúrico, a mistura aquece e pode provocar jatos para fora do tubo, especialmente se a temperatura do laboratório estiver elevada. Deve-se usar um “dispenser” para adicionar o ácido, que deve escorrer junto à parede do tubo de ensaio, que deverá suportar altas temperaturas (Pyrex).

2. Diluições com etanol 90% ou tampão acetato pH 4,5, podem ser necessárias, caso as leituras sejam muito altas.

3. Preparo de 2 litros de tampão acetato pH 4,5: 91,31 mL de acetato de sódio 0,2 M + 159,00 mL de ácido acético 0,2 M + 1749,00 mL de água deionizada.

Referências:

FARRAR, J. F. 1995. Carbon partitioning. In: Photosynthesis and Production in a Changing Environment. Eds.: HALL, D.O.; SCURLOCK, J.M.O.; BOLHAR-NORDENKAMPF, H.R.; LEEGOOD, R.C.; LONG, S.P. Cap. 15, p. 222-246. ISBN – 0-412-42910-1. 464 p.

MCCREADY, R.M.; GUGGOLZ, J.; SILVEIRA, V.; OWENS, H.S. 1950. Determination of starch and amylase in vegetables. Analytical Chemistry, v.22, p.1156- 1158, 1950.

C) DOSAGENS DE AMINOÁCIDOS LIVRES (segundo YEMM; COCKING, (1955)):

Preparo dos reagentes:

1. Tampão citrato 0,2M - pH 5,0: Pesar 21,008 g de ácido cítrico e dissolver em 200 mL de água. Adicionar a 200 mL de NaOH N (8g 200 mL⁻¹) e corrigir o pH para 5,0, com NaOH 2N. Diluir para 500 mL, adicionando 1 gota ou pedrinha de timol, para evitar o crescimento de fungos, e guardar na geladeira.

2. Cianeto de potássio 0,01M: Pesar 0,1628 g de KCN e diluir a 250 mL de água (válido por 3 meses).

3. Etanol a 60%

4. MetilGlicol (EtilenoGlicol MonoMetil Éter) com ninidrina: Preparar ninidrina 5% (p/v) com metilglicol (5 g 100 mL⁻¹ de metilglicol ou 1 g 20 mL⁻¹ de metilglicol). Guardar em frasco escuro (válido por pouco tempo).

5. Cianeto de potássio com metilglicol: Pipetar 5 mL do reagente 2 e completar a 250 mL com metilglicol, ou 0,5 mL do reagente 2 completando a 25 mL com metilglicol (válido por pouco tempo)

6. Metilglicol + cianeto de potássio + ninidrina. Adicionar 50 mL do reagente 4 a 250 mL do reagente 5 ou 5 mL do reagente 4 em 25 mL do reagente 5, (válido por 1 semana). Usar esse reagente 6 após estocar por 1 noite.

Procedimento:

1. Colocar em tubo de ensaio Pyrex alto, 0,5 mL do tampão de citrato, 1 mL da solução problema (retirada dos 25 mL do extrato 1 separados no item 2 da extração para a dosagem de açúcares solúveis e aminoácidos), ou branco e a curva padrão, e 1,2 mL do reagente 6. Fechar os tubos com papel alumínio e agitar;
2. Aquecer em banho-maria a 100°C por 15 minutos;
3. Esfriar em água corrente por 5 minutos e diluir com 3 mL de etanol 60%;
4. Agitar e fazer a leitura em 570 nm.

Preparo da curva padrão de leucina:

Preparar uma curva padrão de amino-N com leucina (PM = 131) nas seguintes concentrações: 0,0 – 0,1 – 0,2 – 0,3 – 0,4 – 0,5 mM de leucina (As leituras de ABS (DO) para as concentrações de 0,3 a 0,5 mM, em um espectrofotômetro visível podem ficar muito altas e neste caso, a curva deverá ser feita com 0,0 – 0,02 – 0,05 – 0,1 – 0,15 – 0,2 mM.

Preparar uma solução estoque de 2 mM ($0,262\text{ g L}^{-1}$ ou 0,131g em 500 mL), com HCl 0,1N (8,5mL de HCl conc PA), em 1 L de água. Dissolver 0,262g de leucina em 500 mL de água, adicionar 8,5 mL de HCl PA e completar a 1000 mL com água (ou dissolver 0,132 g em 400 mL de água mais 4,24 mL de HCl e completar a 500 mL com água). Fazer as outras concentrações diluindo a solução estoque em tampão de citrato (pH = 5,0): 0,0mM, com 1 mL do tampão citrato; 0,02mM, com 0,1 mL do estoque mais 9,9 mL do tampão citrato; 0,05 mM, com 0,25 mL do estoque mais 9,75 mL do tampão citrato; 0,1 mM, com 0,5 mL do estoque mais 9,5 mL do tampão citrato; 0,15 mM, com 0,75 mL do estoque mais 9,25 mL do tampão citrato; 0,2 mM, com 1 mL do estoque mais 9 mL do tampão citrato.

Referência:

YEMM, E.W.; COOCKING, E.C. The determination of amino acids with ninhydrin. Analyst, v.80, p.209-213, 1995.

D) DOSAGENS DE PROTEÍNAS (método de Bradford):

Preparo dos reagentes:

Reagente de Bradford: Dissolver 0,111 g (111 mg) de Coomassie Brilliant Blue G-250 (90%) (ou 0,154 g de Coomassie 65%) em 50 mL de etanol 95% com agitação constante (agitador e massa magnética), sem aquecimento, durante 1 h. Em seguida, transferir a solução para balão volumétrico de 1000 mL, adicionar 100 mL de H₃PO₄ concentrado (85%) e completar o volume com água deionizada. Preparada a solução, realizar duas filtrações em papel de filtro qualitativo e guardar o reagente em frasco escuro á temperatura ambiente. As concentrações finais no reagente são: Coomassie Brilliant Blue G-250 (0,01%), etanol (4,75%) e ácido fosfórico (8,5%).

Preparo da curva padrão de Albumina Bovina:

Preparar uma solução estoque, com BSA (Bovine Serum Albumin), a 1 g de BSA L⁻¹ ou 100 mg BSA 100 mL⁻¹: Dissolver 0,1g de BSA em cerca de 70 mL de água deionizada e completar o volume para 100 mL (A curva padrão pode ser de 0 a 100 µg BSA 100 µL⁻¹; mas com nosso equipamento foi feita de 0 a 35 µg BSA 100 µL⁻¹): 0 g BSA L⁻¹, pipetar o volume (100 µL) desejado em água; 0,1 g BSA L⁻¹, pipetar 1 mL da solução estoque e completar a 10 mL com água; 0,15 g BSA L⁻¹, pipetar 1,5 mL da solução estoque e completar a 10 mL com água; 0,2 g BSA L⁻¹, pipetar 2 mL da solução estoque e completar a 10 mL com água; 0,25 g BSA L⁻¹, pipetar 2,5 mL da solução estoque e completar a 10 mL com água; 0,3 g BSA L⁻¹, pipetar 3 mL da solução estoque e completar a 10 mL com água; 0,35 g BSA L⁻¹, pipetar 3,5 mL da solução estoque e completar a 10 mL com água;

Procedimento:

1. Adicionar aos tubos de ensaio 100 µl da solução problema, 5,0 mL do “reagente de Bradford” e agitar em agitador de tubos de ensaio;
2. Após 15 minutos, fazer a leitura em espectrofotômetro à 595nm, em cubetas de plástico ou de vidro, tendo como “branco” um tubo de ensaio contendo 100 µl de água deionizada e 5,0 mL do “reagente de Bradford”. A cor permanece estável por cerca de 1h;
3. De posse das leituras espectrofotométricas da amostra, fazer os cálculos da concentração de proteína solúvel, tendo como referência a equação obtida para a curva padrão;
4. Expressar a concentração em mg proteína solúvel. g⁻¹ massa fresca (ou seca).

Observações:

1. Não utilizar cubetas de quartzo, devido à tendência de ligação do complexo corante-proteína à mesma. O complexo azul nas cubetas de quartzo pode ser removido através de lavagem com detergente, seguida por água e acetona ou colocando-se as cubetas de molho em HCl 0,1 M.
2. Realizar as determinações em alguns extratos, para verificar se a concentração de proteína nos mesmos encontra-se dentro da faixa de concentração da curva padrão (faixa ótima de leitura entre 0,0 e 0,40). Se necessário, proceder a diluição dos extratos (por exemplo: pipetar para tubos de ensaio 250 µl de extrato e 750 µl de água deionizada → fd =4).

Referência:

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, Bethesda, v.72, p.248-254, 1976.

Anexo 8.10. Correlação entre o teor de proteína solúvel e a produtividade de grãos do feijoeiro comum, cultivar carioca, cultivado nas épocas da seca e das águas sob três tratamentos no primeiro ano da época da seca e das águas: apenas adubado com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (A), inoculado com *Rhizobium* e adubação com 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (I+N), inoculado com *Rhizobium* e adubação com 20 kg N ha⁻¹ na semeadura e 40 kg N ha⁻¹ aos 25 DAE (IA) e um tratamento adicional somente inoculado com *Rhizobium* sem adubação nitrogenada em nenhum estágio (I-N), apenas avaliada no segundo ano das épocas de cultivo (Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, maio e outubro de 2013 e 2014).

Época de cultivo	Ano	Valores	20 DAE	P	FP	EG
Seca	2013	Correlação	0,999	0,999	0,946	0,791
		R ²	0,865	0,943	0,971	0,885
		p-valor	0,043*	0,152	0,108	0,219
	2014	Correlação	0,803	0,970	0,989	0,838
		R ²	0,657	0,915	0,938	0,831
		p-valor	0,189	0,044*	0,031*	0,088
Águas	2013	Correlação	0,709	0,971	0,985	0,940
		R ²	0,999	0,999	0,896	0,032
		p-valor	0,003*	0,004*	0,208	0,885
	2014	Correlação	0,810	0,956	0,968	0,911
		R ²	0,645	0,449	0,980	0,703
		p-valor	0,196	0,329	0,010	0,161

* Valores diferem entre si a p<0,05