

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**  
**CIÊNCIA DO SOLO**

**DISSERTAÇÃO**

**Avaliação da Fixação Biológica de Nitrogênio em  
Plantios Tecnificados de Feijão-Caupi na Região  
Centro-Oeste do Brasil**

**Elson Barbosa da Silva Júnior**

**2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
CIÊNCIA DO SOLO**

**AVALIAÇÃO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM  
PLANTIOS TECNIFICADOS DE FEIJÃO-CAUPI NA REGIÃO  
CENTRO-OESTE DO BRASIL**

**Elson Barbosa da Silva Júnior**

*Sob a Orientação do Pesquisador*  
**Robert Michael Boddey**

*e Co-orientação do Pesquisador*  
**Gustavo Ribeiro Xavier**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2012

635.65209817

S586a

T

Silva Júnior, Elson Barbosa da, 1987-

Avaliação da fixação biológica de nitrogênio em plantios tecnificados de feijão-caupi na Região Centro-Oeste do Brasil / Elson Barbosa da Silva Júnior – 2012.

57 f.: il.

Orientador: Robert Michael Boddey.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia.

Bibliografia: f. 45-55.

1. Feijão-caupi – Inoculação – Brasil, Centro-Oeste - Teses. 2. Feijão-caupi – Cultivo – Brasil, Centro-Oeste - Teses. 3. Nitrogênio – Fixação – Teses. I. Boddey, Robert Michael, 1948-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta dissertação, desde que seja citada a fonte.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – CIÊNCIA DO SOLO**

**ELSON BARBOSA DA SILVA JÚNIOR**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 24/02/2012

---

Robert Michael Boddey. Ph.D. Embrapa Agrobiologia  
(Orientador)

---

Lúcia Helena Cunha dos Anjos. Ph.D. UFRRJ

---

Luís Henrique B. Soares. D.Sc. Embrapa Agrobiologia

---

Jerri Édson Zilli. D.Sc. Embrapa Agrobiologia

## DEDICATÓRIA

À minha família pelo apoio durante todos estes anos, em especial a minha mãe Maria Ferreira da Silva, pelo sonho realizado.

A minha companheira Maiza Gabrielle Ribeiro Pereira pelo amor inestimável e ao meu filho Arthur Marx Ribeiro Barbosa.

*“Há homens que lutam um dia e são bons,  
há outros que lutam um ano e são melhores,  
há os que lutam muitos anos e são muito bons.  
Mas há os que lutam toda a vida e estes são imprescindíveis”*  
(Bertold Brecht)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela saúde e proteção diária da minha vida e de todos os meus entes queridos.

A todos da minha família, em especial a minha mãe, que sempre acreditou em uma vida melhor por meio dos estudos, mesmo com o pouco conhecimento sobre eles.

A meus irmãos irmãs Jenevaldo, Ivânia, Dirceu, Darci, Luciana e Benevaldo. Ao meu pai pela vida de trabalho e dedicação.

À UFRRJ e ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo, pela estrutura e organização que me deu toda a segurança e confiança nesta trajetória.

A CAPES pela concessão da bolsa.

À Embrapa Agrobiologia pelo apoio e infraestrutura recebidos para realização desse trabalho.

Aos meus orientadores Drs. Robert Boddey e Gustavo Xavier, pela paciência, incentivo, críticas, sugestões e dedicação. E principalmente por acreditarem na minha capacidade. Muito Obrigado.

A Suzinei de Oliveira por toda dedicação e prazer em ajudar na implantação e condução dos experimentos em Sinop e Primavera do Leste no Mato Grosso, sem o seu compromisso nada disso seria possível.

Ao João Luiz Bastos no qual não tenho palavras que possa expressar minha gratidão, foi técnico de laboratório, motorista, técnico de campo e amigo nas incansáveis viagens para o Mato Grosso, sendo importantíssimo neste trabalho.

A Embrapa Agrossilvipastoril pelo espaço e funcionários cedidos para a realização dos experimentos.

A empresa *Sementes Tomazetti* pelo espaço cedido, pelo apoio e por acreditarem no desenvolvimento da pesquisa.

A Dra. Lindete Mírian Vieira Martins e ao Dr. Jerri Édson Zilli por toda atenção, na elaboração dos croquis experimentais.

Aos bolsistas do Laboratório de Ecologia Microbiana (LEMI): Andréa (doutoranda), Dra. Anelise, Beatriz, Carlos, Cláudia, Dani, Débora, Fernanda (mestranda), Jackson (doutorando), Samuel (doutorando), Silvana, Sumaya (mestranda) e Vinicius. Em especial a Fernanda e Sumaya que ajudaram diretamente na produção dos inoculantes nos momentos de necessidade.

Aos alunos do CAEL, Lorena, Wendrel e Isabeli pela ajuda nas análises de nitrogênio.

Aos pesquisadores do Laboratório de Ecologia Microbiana (LEMI) Dra. Márcia, Dr. Luc e ao analista Bruno.

Aos colegas do curso, obrigada pelos momentos de descontração e convivência harmoniosa.

A minha companheira Maiza, pelo amor, apoio, carinho e cumplicidade na construção desta vitória, que agora se torna nossa.

A todos aqueles que direta e indiretamente, contribuíram para a execução do presente trabalho, sem estas colaborações o objetivo não teria sido alcançado.

## **BIOGRAFIA**

Elson Barbosa da Silva Júnior, filho de Elson Barbosa da Silva e Maria Ferreira da Silva, nasceu em 19 de fevereiro de 1987, na cidade de Varzelândia, estado de Minas Gerais. Em 2001 concluiu o ensino fundamental na Escola Estadual Padre José Silveira e ingressou na antiga Escola Agrotécnica Federal de Januária para concluir o ensino médio e Técnico em Agropecuária em 2004. No ano 2005 cursou o Tecnólogo em Irrigação e Drenagem no Centro Federal de Educação Tecnológica de Januária, deixando o incompleto para em 2006 adentrar na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, graduando-se em Licenciatura em Ciências Agrícolas em 2009. No início de sua graduação dedicou-se a estudar sobre sociologia rural, estagiando na Pós Graduação em Desenvolvimento e Agricultura - CPDA/UFRRJ, depois então entrou na Embrapa Agrobiologia, sendo bolsista Iniciação Científica atuando diretamente nos projetos de pesquisa de 2007 a 2009. Ingressou no curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo da UFRRJ em março de 2010, como bolsista da CAPES, desenvolvendo sua dissertação “Avaliação da Fixação Biológica de Nitrogênio em Plantios Tecnificados de Feijão-caupi na Região Centro-Oeste do Brasil”, junto aos laboratórios de Ciclagem de Nutrientes e Ecologia Microbiana da Embrapa Agrobiologia, concluindo-a na presente data.

## RESUMO

SILVA JÚNIOR, Elson Barbosa. **Avaliação da fixação biológica de nitrogênio em plantios tecnificados de feijão-caupi na região centro-oeste do Brasil.** 2012. 57f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica- RJ, 2012.

O plantio de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] vem crescendo no Centro-Oeste do Brasil, que se caracteriza por uma agricultura tecnificada, com média de produtividade de 1000 kg ha<sup>-1</sup>. Novas tecnologias de inoculação, como veículos e uma prática agrícola de pré inoculação apresentam-se como alternativa as tecnologias atuais. Assim o objetivo deste trabalho foi avaliar tecnologias de inoculação de feijão-caupi na região Centro-Oeste do Brasil. Foi avaliada a qualidade do inoculante polimérico IPC 2.2, quanto à sobrevivência de células aos 180 dias de armazenamento e quanto à capacidade de manter células viáveis após cinco semanas de inoculação. O desempenho agrônômico do inoculante polimérico e da pré inoculação foi comparado com as tecnologias já recomendadas em três experimentos distintos com a mesma cultivar BRS Guariba nas áreas da Embrapa Agrobiologia (Seropédica-RJ), Embrapa Agrossilvipastoril (Sinop-MT) e na fazenda Novo Horizonte- Sementes Tomazetti (Primavera do Leste-MT). Foi quantificada a contribuição da fixação biológica de nitrogênio pela abundância natural do delta 15N (‰) nos dois experimentos no Mato Grosso. No experimento na Embrapa Agrobiologia o inoculante polimérico IPC 2.2 foi comparado com os veículos turfoso e líquido, mais os tratamentos nitrogenados com 50 e 80 kg N ha<sup>-1</sup> e o absoluto. No experimento na Embrapa Agrossilvipastoril os tratamentos foram pré inoculados com inoculante polimérico IPC 2.2 e turfoso com 0, 1, 2 e 5 semanas antes do plantio para ambos inoculantes, mais o tratamento nitrogenado (70 kg N ha<sup>-1</sup>) e o absoluto. O ensaio na fazenda Novo Horizonte foi em área de pivô central de 60 ha, com as estirpes: BR3267 em veículo polimérico e líquido; BR3262 em veículo polimérico; e o consórcio das quatro estirpes recomendadas (BR3267, BR3262, BR3301 e BR3302) em veículo polimérico. A formulação IPC 2.2 manteve concentração de células superior a 10<sup>9</sup> células por grama após 180 dias e no campo ela proporcionou uma produtividade superior ao tratamento absoluto e igual a dos tratamentos nitrogenados, veículos turfoso e líquido. A pré-inoculação com a mistura polimérica com cinco semanas obteve a maior massa de nódulos secos, porém não diferiu do controle nitrogenado e absoluto, assim como na produtividade os tratamentos não diferiram entre si. No ensaio na fazenda Novo Horizonte a inoculação com o consórcio das quatro estirpes obteve a maior massa de nódulos secos e diferiu da BR3267 em veículo líquido e da BR3262. A contribuição da fixação biológica de nitrogênio não ultrapassou os 50%, obtidas as maiores médias com 48% e 39% do N oriundo da fixação biológica respectivamente nos ensaios de pré-inoculação (14 dias no veículo turfa) e com a BR3262, na fazenda Novo Horizonte e em veículo polimérico. Assim, se conclui que o inoculante polimérico pode ser recomendado para inoculação tradicional do feijão caupi e que a inoculação da cultura deve ser uma prática corriqueira, uma vez que foi comprovado que com sementes não inoculadas não houve fixação biológica de nitrogênio.

**Palavras-chave:** Inoculação. Estirpes. Veículos.

## ABSTRACT

SILVA JÚNIOR, Elson Barbosa. **Evaluation of biological nitrogen fixation in technified crops of cowpea in the Midwest region of Brazil.** 2012. 57p. Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica- RJ, 2012.

The planting of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] is growing in the Midwest of Brazil, which is characterized by a technified agriculture, with an average yield of 1000 kg ha<sup>-1</sup>. New technologies of inoculation as carriers and the agricultural practice of pre inoculation are presented as alternative to current technologies. Thus the objective of this study was to evaluate technologies for cowpea inoculation in the Midwest region of Brazil. The quality of the polymeric IPC 2.2 inoculant was evaluated for the cells survival at 180 days of storage and the ability to maintain viable cells after five weeks of inoculation. The agronomic performance of the polymeric inoculant and the pre inoculation were compared with technologies already recommended, in three different experiments with the same cultivate (BRS Guariba) in areas of Embrapa Agrobiologia (Seropédica-RJ), Embrapa Agrossilvipastoril (Sinop-MT) and in the New Horizon farm – Seeds Tomazetti (Primavera do Leste, MT). The contribution of biological nitrogen fixation was quantified by <sup>15</sup>N natural abundance delta (‰) in the two experiments in Mato Grosso State. In the experiment at Embrapa Agrobiologia the polymeric inoculant IPC 2.2 was compared with peat and liquid carriers, plus nitrogen treatments with 50 and 80 kg N ha<sup>-1</sup> and the absolute treatment. In the experiment at Embrapa Agrossilvopastoril the treatments were pre inoculated with polymeric inoculant IPC 2.2 and peat carrier, with 0, 1, 2 and 5 weeks before planting for both inoculants plus addition of nitrogen (70 kg N ha<sup>-1</sup>), and the absolute treatment. The assay at the New Horizon farm was in a central pivot area of 60 ha with the strains: BR3267 in the polymeric and liquid carriers; BR3262 in polymeric; and a consortium of four recommended strains (BR3267, BR3262, and BR3301 BR3302) in the polymeric carrier. The polymer showed inoculant cell concentration higher than 10<sup>9</sup> cells per gram after 180 days, and in the field experiment the formulation IPC 2.2 provided yield above the reference treatment and equal to the N treatment, and the peat and liquid carriers. The pre-inoculation with the polymeric blend with five weeks had the highest nodule dry mass, however it did not differ from the N control and the absolute, and the treatments did not differ for the productivity. In the essay at the Novo Horizonte farm the inoculation with the consortium of four strains had the highest nodule dry mass, and it differed from the BR3267 in liquid carrier and the BR3262. The contribution of biological nitrogen fixation did not exceed 50%, and the highest averages were obtained with 48% and 39% of N originated from biological fixation, respectively in the pre inoculation essay (14 days in the peat carrier), and with the BR3262 at the New Horizon farm with the polymeric carrier. Thus, it is concluded that the polymer inoculant might be recommended for the traditional form inoculation of the cowpea crop, and inoculation should be a common practice, since it was proven that with the no inoculated seeds there was no biological nitrogen fixation.

**Key words:** Inoculation. Strains. Carriers.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa generalizado das classes de solos do Estado do Mato Grosso.....	6
<b>Figura 2.</b> Precipitação pluvial (mm) mensal registrada durante a condução do experimento.	17
<b>Figura 3.</b> Precipitação pluvial (mm) mensal registrada durante a condução do experimento.	19
<b>Figura 4.</b> Sobrevivência de rizóbios (BR3267) inoculadas com o inoculante polimérico em sementes de feijão-caupi IPA 206 no decorrer de 35 dias após a inoculação e armazenadas em temperatura ambiente em laboratório ( $24 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ). 5% de significância.....	29
<b>Figura 5.</b> Massa de nódulos secos de feijão caupi BRS Guariba, 32 dias após a emergência de sementes inoculadas com o inoculante polimérico (BR3276) no dia do plantio, 7 dias antes do plantio, 14 dias antes do plantio e 35 dias antes do plantio, com as sementes armazenadas em temperatura ambiente em laboratório ( $24 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ). 5% de significância.....	31
<b>Figura 6.</b> Massa de nódulos secos de feijão caupi BRS Guariba, 32 dias após a emergência de sementes inoculadas com o inoculante turfoso (BR3276) no dia do plantio, 7 dias antes do plantio, 14 dias antes do plantio e 35 dias antes do plantio, com as sementes armazenadas em temperatura ambiente em laboratório ( $24 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ). 5% de significância. 5% de significância.....	32
<b>Figura 7.</b> Produtividade de feijão caupi BRS Guariba, 35 dias após a emergência de sementes inoculadas com o inoculante polimérico (BR3276) no dia do plantio, 7 dias antes do plantio, 14 dias antes do plantio e 35 dias antes do plantio, com as sementes armazenadas em temperatura ambiente em laboratório ( $24 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ). 5% de significância. 5% de significância.....	33
<b>Figura 8.</b> Produtividade de feijão caupi BRS Guariba, 35 dias após a emergência de sementes inoculadas com o inoculante turfoso (BR3276) no dia do plantio, 7 dias antes do plantio, 14 dias antes do plantio e 35 dias antes do plantio, com as sementes armazenadas em temperatura ambiente em laboratório ( $24 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ). 5% de significância. 5% de significância.....	34
<b>Figura 9.</b> Plantio de feijão-caupi (BRS guariba). Embrapa Agrossilvipastoril, Sinop- MT. ..	56
<b>Figura 10.</b> Coleta de plantas e nódulos de feijão-caupi (BRS guariba), 32 dias após a emergência. Embrapa Agrossilvipastoril, Sinop- MT. ....	56
<b>Figura 11.</b> Coleta da produção de grãos de feijão-caupi (BRS guariba), 74 dias após a emergência. Embrapa Agrossilvipastoril, Sinop- MT. ....	56
<b>Figura 12.</b> Coleta de plantas e nódulos de feijão-caupi (BRS guariba), 35 dias após a emergência. Fazenda Novo Horizonte- Sementes Tomazetti, Primavera do Leste- MT. ....	57

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Identificação e características das estirpes de rizóbio. ....	4
<b>Tabela 2.</b> Estimativa da área cultivada, produção e produtividade do feijão-caupi no Brasil, média do período de 2004 a 2008. ....	7
<b>Tabela 3.</b> Produção de grãos (Mil toneladas) de Feijão no Brasil de 1999 a 2005. ....	7
<b>Tabela 4.</b> Área e comercialização de inoculante no Brasil. ....	9
<b>Tabela 5.</b> Características da cultivar de feijão-caupi BRS Guariba (FREIRE FILHO et al., 2007). ....	18
<b>Tabela 6.</b> Número de unidades formadoras de colônia (UFC) presentes no inoculante polimérico produzido contendo cinco estirpes individuais (BR3267, BR3262, BR3301, BR3302 e BR3299*) com um dia e com seis meses após a produção. ....	25
<b>Tabela 7.</b> Massa de nódulos secos, massa de matéria da parte aérea (folhas, caules e ramos) seca e nitrogênio acumulado na parte aérea de plantas de feijão-feijão BRS Guariba, 31 dias após a emergência, nitrogênio acumulado nos grãos e produtividade de grãos a os 70 DAE. ....	27
<b>Tabela 8.</b> Sobrevivência de rizóbio (BR3267), presença de contaminantes e (%) de germinação de sementes de feijão-caupi IPA 206 inoculadas com inoculante polimérico 7, 14, 21, 28 e 35 dias antes da avaliação de recuperação de rizóbios das sementes. ....	28
<b>Tabela 9.</b> Massa de nódulos secos, massa de raiz seca, massa de matéria da parte aérea seca (caule, ramos e folhas) e massa total seca (nódulos, raiz e parte aérea) de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba), 32 dias após a emergência. Sementes inoculadas com 0, 7, 14 e 35 dias antes do plantio com inoculante polimérico e turfoso, armazenadas em temperatura ambiente em laboratório ( $24 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ). ....	31
<b>Tabela 10.</b> Teores e acúmulo de nitrogênio na parte aérea e nos grãos secos, mais a produtividade de grãos de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba). Sementes inoculadas com 0, 7, 14 e 35 dias antes do plantio com inoculante polimérico e turfoso, com as sementes armazenadas em temperatura ambiente em laboratório ( $24 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ). ....	32
<b>Tabela 11.</b> Delta $\delta^{15}\text{N}$ (‰), nitrogênio proveniente da FBN (%Ndfa), nitrogênio derivado da FBN na parte aérea ( $\text{mg planta}^{-1}$ ) e nitrogênio fixado ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba), 35 dias após a emergência. ....	35
<b>Tabela 12.</b> Massa de nódulos secos, massa de raiz seca, massa de matéria da parte aérea seca (caule, ramos e folhas) e massa total (nódulos, raiz e parte aérea) de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba), 35 dias após emergência. ....	37
<b>Tabela 13.</b> Teores e acúmulo de nitrogênio na parte aérea e nos grãos, mais a produtividade de grãos de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba). *Dias após a emergência-DAE. .	39
<b>Tabela 14.</b> Delta $\delta^{15}\text{N}$ (‰), nitrogênio proveniente da FBN (%Ndfa), nitrogênio derivado da FBN na parte aérea e nitrogênio fixado ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba), 35 dias após a emergência. ....	40

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
	2.1 Caracterização da Agricultura Tecnificada .....	3
	2.2 Estirpes Recomendadas para Feijão-caupi no Brasil.....	4
	2.3 Feijão-Caupi no Centro-Oeste .....	5
	2.4 Veículos de Inoculação.....	7
	2.5 Inoculação do Feijão-Caupi no Centro-Oeste .....	9
	2.6 Formulações e Tecnologias de Inoculação .....	11
	2.7 Quantificação da FBN .....	11
	2.7.1 Técnicas isotópicas: uso da abundância natural do $\delta^{15}\text{N}$ para quantificação da FBN.....	12
	2.7.2 Contribuição da FBN para produção do feijão-caupi.....	13
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
	3.1 Controle de Qualidade do Inoculante de Composição Polimérica (IPC 2.2) .....	15
	3.2 Avaliação em Campo do Inoculante de Composição Polimérica (IPC 2.2).....	16
	3.3 Avaliações da FBN no Centro-Oeste.....	18
	3.3.1 Avaliação da pré-inoculação de rizóbios em sementes de feijão-caupi .....	19
	3.3.2. Avaliação do inoculante polimérico com diferentes estirpes na região Centro-Oeste.....	21
	3.4 Quantificação da Contribuição da FBN em Feijão-caupi.....	23
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>25</b>
	4.1 Controle de Qualidade do Inoculante de Composição Polimérica (IPC 2.2) .....	25
	4.2 Avaliações em Condições de Campo do Inoculante de Composição Polimérica (IPC 2.2) .....	25
	4.3 Avaliação da Pré-inoculação de Rizóbios em Sementes de feijão-caupi na Região Centro-Oeste.....	27
	4.3.1 Teste de pré-inoculação de rizóbios em sementes de feijão-caupi em laboratório.....	27
	4.3.2 Avaliação da pré-inoculação de rizóbios em sementes de feijão-caupi em campo na região Centro-Oeste .....	29
	4.4 Avaliação do inoculante polimérico com diferentes estirpes na região Centro-Oeste.....	37
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>45</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>56</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo natural, realizado por organismos procariotos (bactérias) que possuem a enzima nitrogenase e explorado pelas plantas, em principal por espécies leguminosas por meio da simbiose. A utilização de inoculantes rizobianos específicos para as culturas passaram a intensificar este processo de fixação de nitrogênio. No Brasil a produção de inoculantes vem sendo feita desde a década de 50 e atualmente o mercado brasileiro de inoculantes é um dos maiores do mundo alcançando mais de 25 milhões de doses vendidas anualmente (HUNGRIA et al., 2007).

Dentre os esforços empregados para otimizar tecnologia e aumentar o uso da FBN em feijão-caupi nos últimos anos, destacam-se a seleção de novas estirpes de rizóbio (MARTINS et al., 2003; LACERDA et al., 2004; ZILLI et al., 2009 e GUALTER et al., 2011) e o desenvolvimento de novas formulações de inoculantes (FERNANDES JÚNIOR et al., 2009). Essas pesquisas têm resultado na ampliação da área plantada com feijão-caupi e inoculada com rizóbio, alcançando 114.200 doses de inoculantes comercializados para a cultura no ano de 2011 (ANPII- Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculante, comunicação pessoal).

Na produção de inoculantes vem crescendo as pesquisas visando veículos alternativos a turfa, que é o principal veículo utilizado para feijão-caupi, que apesar do amplo uso em diversos países, apresenta uma série de limitações como a sua escassez no mercado, o alto impacto ambiental da extração e o custo elevado. Outro veículo que está sendo utilizado são as formulações líquidas, que também apresenta limitações relacionadas ao seu transporte, necessitando de refrigeração, além da dificuldade para formar mistura homogênea com as sementes (DEAKER et al., 2004). Assim misturas poliméricas desenvolvidas a base de polímeros naturais mostram-se como uma importante alternativa, pois apresentam elevada compatibilidade com diferentes microrganismos de importância agrícola (SCHUH, 2005; FERNANDES JÚNIOR et al., 2009; SILVA et al., 2009), demonstrando o potencial destes materiais no desenvolvimento de novas formulações de inoculantes.

Em um trabalho de dissertação de mestrado desenvolvido com a parceria entre a Embrapa Agrobiologia e o curso de pós-graduação Agronomia- Ciência do Solo/UFRRJ uma mistura polimérica a base de carboximetilcelulose (CMC) e o amido (FERNANDES JÚNIOR, 2006) foi desenvolvida, cuja formulação está protegida por patente (nº PI0506338-8) no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual, com a seguinte denominação: IPC 2,2 na forma de gel. Este veículo foi utilizado para produção de inoculantes para feijão caupi neste trabalho, sendo considerado como uma nova tecnologia e comparado com as tecnologias recomendadas.

A formulação dos inoculantes necessita mais estudos, principalmente para a cultura do feijão-caupi que embora em expansão no Centro-Oeste, não possui recomendações específicas para a cultura junto ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a forma de uso de inoculantes. Para a recomendação de inoculantes e/ou outras tecnologias, estas devem resultar em resposta igual ou superior à inoculação padrão e/ou às tecnologias já utilizadas, respectivamente, e superior ao controle sem inoculação e adubação nitrogenada (BRASIL, 2011). Apesar do comércio de inoculantes para feijão-caupi já ser uma realidade, esta prática é mais difundida entre os agricultores tecnificados, assim, uma prática agrícola de pré-inoculação poderia também garantir a pequenos agricultores a possibilidade de adquirir sementes já inoculadas e aumentar o prazo entre a inoculação e o plantio em suas áreas.

No Brasil a safra 2010/2011 (Plano Agrícola e Pecuária 2011/2012) levou o país a um novo recorde na produção de grãos: 161,5 milhões de toneladas. O resultado está 8,2% acima

da safra anterior, com variação positiva de 3,8% na área plantada e de 4,2% na produtividade. Tal desempenho coloca o país entre os mais competitivos do mundo, com capacidade de atender ao aumento da demanda por alimentos. O Brasil já é um dos principais fornecedores de proteínas no mercado internacional de alimentos, sendo que a região Centro-Oeste é uma das que mais contribuem para essa elevação.

O aumento de produtividade só é possível com o emprego de tecnologia, e a cultura do feijão-caupi está se desenvolvendo na região Centro-Oeste exatamente em virtude da tecnologia. Nesta região a média de produtividade está em torno de 1000 kg ha<sup>-1</sup>, enquanto que a média nacional é de 366 kg ha<sup>-1</sup> (DAMASCENO e SILVA, 2009), porém considera-se este valor abaixo da capacidade produtiva da cultura, que pode chegar até 6 Mg ha<sup>-1</sup> (FREIRE FILHO et al., 1998). Ainda existe muito a desenvolver em termos tecnológicos para a cultura. A inoculação de sementes é uma tecnologia que pode apresentar resultados mais expressivos da FBN com a recomendação e utilização exata das exigências nutricionais e hídricas para a cultura.

O desenvolvimento do feijão-caupi no Centro-Oeste é expressivo, principalmente no Mato Grosso, onde se tem mais de 150.000 ha plantados da cultura (Bonchila, comunicação pessoal), sendo que as lavouras são conduzidas com diferentes patamares tecnológicos, quanto ao uso de adubos, pesticidas, maquinários, irrigação e inoculantes, gerando diferentes níveis de produtividade, variando de 200 kg ha<sup>-1</sup> até 2000 kg ha<sup>-1</sup> de grãos de feijão-caupi. Esta variabilidade pode estar sendo influenciada pela fixação biológica de nitrogênio, mas não existem dados de FBN desta região, que pode ser mensurada através da quantificação da FBN, que entre as técnicas que podem ser utilizadas a abundância natural do isótopo de  $\delta^{15}\text{N}$  merece destaque.

De acordo o último Plano Agrícola e Pecuário 2011/2012 do Ministério da Agricultura o feijão-caupi não apresentou variação do preço mínimo, tanto em 2010/2011 quanto em 2011/2012, com R\$ 53,00 /60 kg. Por outro lado o feijão comum obteve uma variação de -10% passando de R\$ 80,00 /60 kg para R\$ 72,00 /60 kg, isto mostra que a cultura do feijão-caupi tem estabilidade de preços no mercado. Porém, quando se faz menção a produção do feijão comum no país, englobam-se as regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste, Norte e Nordeste e no caso do feijão-caupi apenas as regiões Norte e Nordeste, pela sua história de produção de feijão-caupi. Porém, hoje existe a expansão de feijão-caupi na região Centro-Oeste que deve ser considerada de forma diferenciada, em virtude dos níveis de produtividades obtidos e da área colhida.

O cenário apresentado da relação da cultura do feijão-caupi com a região Centro-Oeste e da falta de resultados referente à FBN e a própria prática da inoculação, justificam a necessidade de estudo que abrangessem esses temas. Assim esse trabalho tem como objetivo geral avaliar tecnologias de inoculação de feijão-caupi na região Centro-Oeste do Brasil.

Os objetivos específicos são:

a) Avaliar o desempenho da mistura polimérica IPC 2.2 como veículo de inoculação para a cultura do feijão-caupi com resposta igual ou superior à inoculação padrão e/ou às tecnologias já recomendadas no Sudeste e Centro-Oeste;

b) Avaliar o desempenho da prática agrícola de pré-inoculação de rizóbios em sementes de feijão-caupi em comparação à inoculação padrão e/ou às tecnologias já recomendadas no Centro-Oeste; e

c) Quantificar a contribuição da fixação biológica de nitrogênio na cultura do feijão-caupi inoculado na região Centro-Oeste.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Caracterização da Agricultura Tecnificada

No desenvolvimento da agricultura brasileira o uso de tecnologia foi e é fator preponderante, em função da diversidade e heterogeneidade em sua aplicação nos estabelecimentos agrícolas (SOUZA FILHO et al., 2011). Indicadores de modernização da agricultura ainda indicam concentração nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, em detrimento de outras regiões como o Norte e Nordeste (DELGADO, 2005).

De acordo com SOUZA FILHO et al. (2011), o censo agropecuário de 2006 indica que 36% dos estabelecimentos agropecuários no Brasil usam adubação e 16% fazem aplicação de calcário e/ou outro corretivo de pH do solo. No entanto, quando se comparam esses indicadores entre as macrorregiões brasileiras, as diferenças são evidentes. Para os indicadores uso de adubação, aplicação de corretivo de pH de solo e uso de serviços de orientação técnica, as regiões Sul (72%, 39% e 48% dos estabelecimentos rurais daquela região, respectivamente), Sudeste (53%, 31% e 31%, respectivamente) e Centro-Oeste (28%, 18% e 30%, respectivamente) ainda apresentam o maior número de estabelecimentos agropecuários com acesso a esses itens. Em contrapartida, na região Nordeste, 20% dos estabelecimentos rurais utilizam adubação, apenas 3% utilizam algum corretivo de pH de solo e 8% recebem orientação técnica.

Dentro da região Centro-Oeste, o estado do Mato Grosso local de estudo, teve a incorporação de modernas técnicas de produção agrícola influenciada direta e indiretamente pela “Revolução Verde”, a partir da década de 70, que levou a uma série de importantes transformações na economia local, sobretudo, com a chegada dos sulistas para a região. Estes descobriram que o cerrado da região centro-oeste era altamente produtivo, ao adotar insumos e tecnologias adequados (SILVA et al., 2006).

De acordo dados do IPEA (2005) a mobilidade populacional em alguns municípios do Mato Grosso foi elevada. Por exemplo, nos municípios de experimentação deste estudo como Sinop, obteve um aumento populacional de 95% e em Primavera do Leste, o aumento foi de 218%, muito em função da modernização do setor produtivo rural aliado ao desenvolvimento dos setores secundário e terciário no espaço urbano (SILVA et al., 2006). Segundo SILVA et al. (2006), apesar da agricultura tecnificada no Mato Grosso ter ocorrido bem depois do avanço dos principais polos agrícolas tecnificados das regiões sul e sudeste, os grandes grupos de empresas nacionais e multinacionais de comercialização e industrialização de alimentos e rações animais e as fazendas mais modernas do país se localizam no estado hoje.

A agricultura tecnificada faz uso e incorporam tecnologias de caráter biológico, químico e físico, que tem como principais referências o uso de maquinário para o plantio e colheita; aplicação de corretivos, fertilizantes e suas combinações; emprego de técnicas de cultivo e práticas agrícolas recomendadas (inoculação); aplicação de agrotóxicos; utilização da irrigação quando necessário e aquisição de sementes melhoradas.

Segundo NOGUEIRA et al. (2009) o uso de máquinas agrícolas é uma representação clássica da modernização do campo e da elevação de níveis de produtividade da agricultura em várias culturas. Esse fator apresenta dados correlacionados entre aumento da área plantada, produtividade e uso de máquinas na agricultura. O Estado de Mato Grosso, em termos de mecanização, cresceu mais de 12 vezes em 20 anos, passando de 2.643 para 32.000 tratores, no período de 1975-1995/1996, conforme último censo realizado pelo IBGE (NOGUEIRA et al., 2009).

Segundo VEGRO E FERREIRA (2004), a participação do Mato Grosso no total de fertilizantes consumido no País tem crescido em grandes proporções, em 1987, participava com apenas 4,4%, passando para 16,6% em 2002.

De acordo com o Sindicato das Indústrias de Defensivos Agrícolas (SINDAG, 2007) e segundo NOGUEIRA et al. (2009) o Mato Grosso é o principal consumidor de agrotóxicos do país, cerca de 20%, das 210 mil toneladas de agrotóxicos consumidas pelo Brasil anualmente, são aplicadas sobre os solos, a água e o ar de Mato Grosso.

## 2.2 Estirpes Recomendadas para Feijão-caupi no Brasil

De acordo com o MAPA, baseado na última instrução Normativa nº 13, de 25 de março de 2011, fazem parte da relação dos microrganismos autorizados para produção de inoculantes comerciais na cultura do feijão-caupi no Brasil quatro estirpes de *Bradyrhizobium sp*: SEMIA 6461 (=UFLA 3-84), SEMIA 6462 (=BR3267), SEMIA 6463 (=INPA 03-11B) e BR3262 (SEMIA 6464). Oriundas dos trabalhos de MARTINS et al., 2003 (SEMIA 6462), LACERDA et al. (2004) e SOARES et al. (2006) com a (SEMIA 6461) e (SEMIA 6463) e ZILLI et al., 2008 (SEMIA 6464) respectivamente. Sendo que estas estirpes substituíram a antiga estirpe recomendada a BR 2001.

De acordo a Tabela 1 adaptada de GUALTER (2010) nota-se que cada estirpe apresenta características diferentes.

**Tabela 1.** Identificação e características das estirpes de rizóbio.

Estirpe	MAPA	Característica cultural				Local de Origem e Referência
		TC <sup>(1)</sup>	D <sup>(2)</sup>	pH <sup>(3)</sup>	COR <sup>(4)</sup>	
BR3262	SEMIA 6464	5	1	Alcalino	Branca	SIPA, Seropédica-RJ (ZILLI et al., 1999)
BR3267	SEMIA 6462	5	1-2	Ácido	Branca	Semi-Árido Nordeste (MARTINS et al., 1997)
INPA 03-11 B/ BR3301	SEMIA 6463	7	1	Alcalino	Branca	Amazônia, Manaus-AM (MOREIRA, 2005)
UFLA 03-84/ BR3302	SEMIA 6461	6	1-2	Alcalino	Branca	Amazônia, Jí-Paraná-RO (LACERDA et al., 2004)

<sup>(1)</sup> Tempo em dias de crescimento de colônias isoladas. <sup>(2)</sup> Diâmetro da colônia (mm). <sup>(3)</sup> Alteração do pH meio de cultivo. <sup>(4)</sup> Coloração das colônias. Adaptado GUALTER, 2010.

A estirpe BR3267 (MARTINS et al., 2003) foi selecionada e isolada de nódulos de plantas de feijão-caupi, cultivadas em solos do Nordeste do Brasil, em ambiente de Floresta Atlântica transicional para o semiárido, localizado nos estados de Pernambuco e Sergipe. O experimento foi instalado em Petrolina (PE), em 1998 e 1999, com inoculação na cultivar IPA 206, tendo uma produtividade de 693 kg ha<sup>-1</sup>, similar ao controle com fertilizante nitrogenado. Esta estirpe está no banco de germoplasma da Embrapa Agrobiologia, RJ.

As estirpes INPA3-11B e UFLA3-84 foram isoladas de solos da Amazônia, respectivamente de Manaus e Rondônia, sendo, portanto, adaptadas a altas temperaturas e as condições de acidez predominantes nos solos brasileiros (MOREIRA, 2005). A INPA3-11B, isolada de nódulos de *Centrosema* sp., foi selecionada num primeiro estádio, em 1982, no INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia), e em estádios posteriores em Minas Gerais, na UFLA, assim como a UFLA3-84, isolada através do projeto ASB (*Alternatives for Slash and Burn*) de solo de pastagem usando feijão-caupi como planta isca (MOREIRA, 2005). INPA3-11B e UFLA 3-84 foram testadas nas variedades BR14-Mulato, BR08-Caldeirão e Poços de Caldas. Os experimentos de eficiência agrônômica no campo foram feitos com adubação de 70 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 40 kg ha<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>O usando como fontes o superfosfato simples e o cloreto de potássio. Nestas condições, com aplicação relativamente baixa de insumos e em solos com pH variando de 4,9 a 5,9, foram obtidas produções de grãos de 950 a 1.340 kg ha<sup>-1</sup>, equivalentes ao tratamento com adubação nitrogenada de 70 a 80 kg ha<sup>-1</sup> N-uréia (LACERDA et al., 2004). Os experimentos de campo foram realizados nos Municípios de Perdões e Iguatama no sul de Minas Gerais.

No ano de 2008 a estirpe BR3262 foi recomendada para inoculação em feijão-caupi. Esta foi isolada do Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA) em Seropédica, RJ (ZILLI et al., 1999), apresentando resultados positivos no estado de Roraima e garantindo ganhos de produtividade expressivos. A estirpe BR3262 (ZILLI et al., 2009) foi testada nos meses de julho e setembro de 2005 e 2006 (safra agrícola de Roraima) onde foram conduzidos quatro experimentos de campo, inoculando-se sementes de feijão-caupi (cv BRS Mazagão) com estirpes de bactérias do grupo rizóbio. Dois dos experimentos foram implantados no Campo Experimental Água Boa (CEAB), da Embrapa Roraima. Foram obtidos em 2005 os maiores rendimentos de grãos, em que a estirpe BR3262 proporcionou rendimentos superiores a 2300 kg ha<sup>-1</sup>, ou seja, em termos absolutos a produtividade da cultura inoculada foi cerca de 34% maior que o controle. A estirpe BR3262 mostrou-se a mais adequada para a inoculação de sementes de feijão-caupi em área do cerrado de Roraima.

### 2.3 Feijão-Caupi no Centro-Oeste

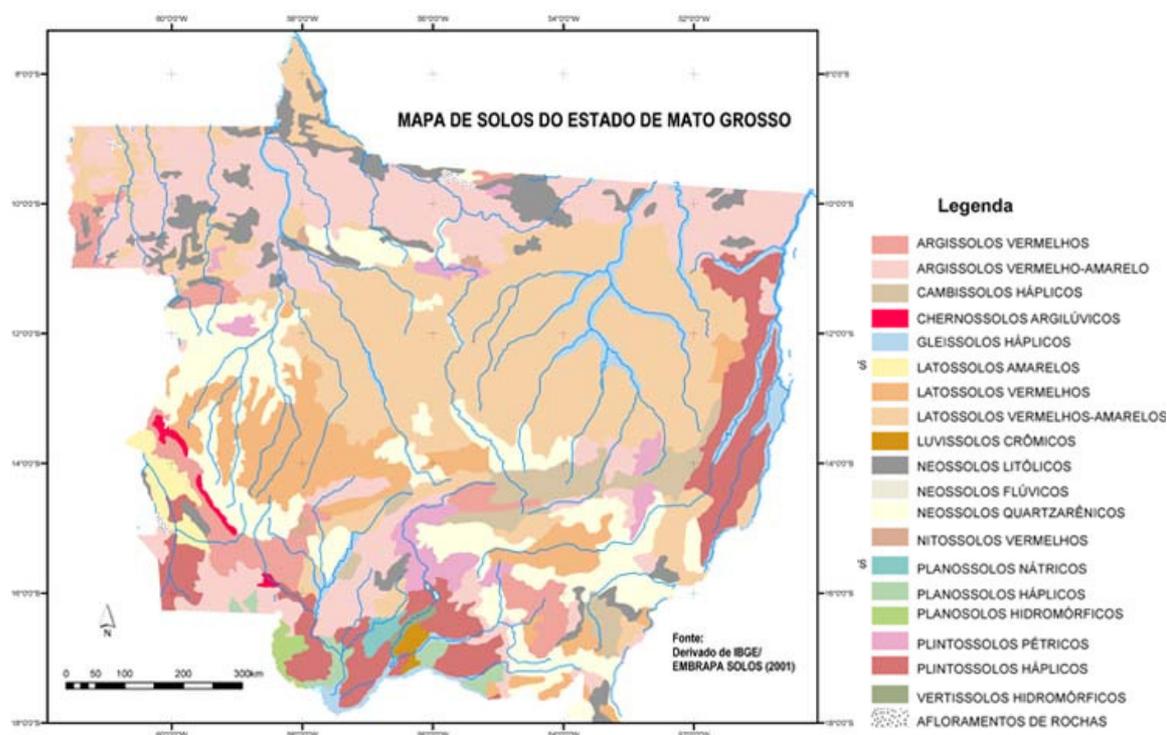
O feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) é uma leguminosa oriunda da África do Sul, e no Brasil as condições edafoclimáticas são favoráveis ao seu cultivo. Está cultura já é bastante difundida nas regiões Nordeste e Norte do país e constitui uma das principais fontes de subsistência alimentar no semiárido brasileiro (FREIRE FILHO et al., 2005), contendo de 23 a 25% de proteína (ANDRADE JÚNIOR et al., 2003). Nessas regiões predomina a agricultura familiar pouco tecnificada, com baixa produtividade. Mas a cultura tem se expandido para a região Centro-Oeste, onde a agricultura é tecnificada e busca altas produtividades.

A região Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás e Mato Grosso do Sul) concentra no Brasil as principais áreas tecnificadas de feijão-caupi e poucos estudos sobre a eficiência agrônômica da cultura foram feitos para esse sistema de produção. O cenário dessas áreas é diferente do das regiões Norte e Nordeste, em que predomina a agricultura de subsistência de pequenos agricultores de base familiar. No Centro-Oeste a cultura é conduzida após a safra da soja, devido seu ciclo curto (65 a 70 dias), se beneficiando dos adubos antes usados na soja e ainda se emprega todo o maquinário da soja para o feijão-caupi.

As cultivares melhoradas, bem como as estirpes de rizóbio recomendadas para o feijão-caupi, foram originalmente desenvolvidas para as regiões Norte e Nordeste, que apresentam distintas características climáticas bem como de solos da região Centro-Oeste. Com relação aos tipos de solos este fator não é tão determinante, pois o feijão-caupi pode ser cultivado em quase todos os tipos de solos, como por exemplo, Latossolos Amarelos, Latossolos Vermelho-Amarelos, Argissolos Vermelho-Amarelos e Neossolos Flúvicos. De

modo geral, o feijão-caupi desenvolve-se bem em solos com regular teor de matéria orgânica, soltos, leves e profundos, arejados e dotados de média a alta fertilidade. Entretanto, outros solos como Neossolos Quartzarenicos com baixa fertilidade podem ser utilizados, mediante aplicações de fertilizantes químicos e/ou orgânicos (EMBRAPA, 2003).

Na região Centro-Oeste predominam Latossolos Vermelho-Amarelos e Argissolos Vermelho-Amarelos. No estado do Mato Grosso a produção de grãos, entre eles o feijão-caupi, é favorecida em virtude das áreas planas, ideais para o cultivo de lavouras temporárias; a disponibilidade do principal insumo para correção dos solos do cerrado (calcário); duas estações do ano definidas – o verão, que se define como o período das chuvas e do plantio e o inverno, que se caracteriza como um período seco, propício para a colheita. O Mato Grosso tem vasta extensão de Latossolos (Figura 1) disponível em <http://www.zsee.seplan.mt.gov.br> e complementadas pelo Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (SiBCS), onde o feijão-caupi vem se desenvolvendo.



**Figura 1.** Mapa generalizado das classes de solos do Estado do Mato Grosso.

Fonte: compilado de IBGE/Embrapa Solos (2001).

Em 2009 o estado do Mato Grosso teve safra recorde de sementes e grãos de feijão-caupi, com 130 mil toneladas, em sistemas de produção tecnificada. A área plantada nos 22 municípios que cultivam a lavoura nesse sistema é estimada em 120 mil hectares, sendo destaque Primavera do Leste, município situado a 240 quilômetros ao sudeste de Cuiabá, no cerrado Mato-grossense, com cerca de 30 mil hectares e produtividade média de 1,2 toneladas ([www.embrapa.br/noticias/safra-recorde-de-feijao-caupi/2009](http://www.embrapa.br/noticias/safra-recorde-de-feijao-caupi/2009)), muito acima da média das regiões Norte e Nordeste, em torno de 317 kg ha<sup>-1</sup> (FREIRE FILHO & RIBEIRO, 2005). A média nacional também está muito abaixo do potencial da cultura (Tabela 2). Esse aumento de produtividade é devido, principalmente, ao uso de cultivares melhoradas e de tecnologias que propiciam a expressão do potencial produtivo da cultura. A cultivar que predomina na produção é a BRS Guariba, desenvolvida pela Embrapa Meio Norte.

**Tabela 2.** Estimativa da área cultivada, produção e produtividade do feijão-caupi no Brasil, média do período de 2004 a 2008.

Região	Área cultivada (ha)	Produção (t)	Produtividade (kg ha <sup>-1</sup> )
<b>Norte</b> <sup>1</sup>	76.000	67.000	765
<b>Nordeste</b> <sup>2</sup>	1.285.826	421.199	328
<b>Centro-Oeste</b> <sup>3</sup>	17.852	22.017	1.233
<b>Brasil</b>	1.319.168	482.324	366

<sup>1</sup>FONTE: ZILLI, et al. (2009)

<sup>2</sup>Dados de feijão-caupi estimados a partir de dados do IBGE (LEVANTAMENTO, 2004-2008); <sup>3</sup>Média do período de 2006 a 2008. Fonte: DAMASCENO, K. J. 2010.

A falta de separação das estatísticas oficiais da produção do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) e feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*), ainda é um limitante a expansão das exportações brasileiras de feijão-caupi. No entanto, com os esforços de alguns produtores e de empresas, o feijão-caupi do Brasil iniciou as exportações, abrindo outra alternativa de comercialização para o produtor. De acordo com dados (Tabela 3) da Conab, confirmam-se os dados incompletos para o feijão-caupi, porém com o seu crescente desenvolvimento na região em estudo, estes terão que ser individualizados para separar a cultura. De acordo os dados disponíveis no site da FAO (FAO, 2008) sobre a produção mundial de feijão-caupi, no ano de 2007, a cultura do feijão-caupi atingiu 3,6 milhões de toneladas em 12,5 milhões de hectares, sendo o Brasil o terceiro maior produtor com 411.832 toneladas, valor este abaixo do que mostra a Tabela 2, pois pela FAO a área cultivada no Brasil é de 1.286.380 ha, diferindo dos levantamentos nacionais.

**Tabela 3.** Produção de grãos (Mil toneladas) de Feijão no Brasil de 1999 a 2005.

Produto	1999/00	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05
Feijão (total)	3.098	2.592	2.983	3.205	3.003	2.977
Feijão (1ª safra)	1.412	1.156	1.303	1.241	1.235	1.209
Feijão (2ª safra)	1.456	864	1.027	1.246	1.061	1.061
Feijão (3ª safra)	230	572	653	719	707	707

FONTE: [www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br)

#### 2.4 Veículos de Inoculação

Os benefícios da inoculação junto com a pressão produtiva para aumentar os resultados desta prática culminaram na necessidade de aprimorar os inoculantes. Por um lado os trabalhos de seleção de estirpes continuaram a progredir e recomendar novas cepas para diversas culturas (cana de açúcar, milho, arroz, trigo, eucalipto e etc.), mas os trabalhos envolvendo veículos de inoculação não seguiram a mesma evolução, sendo comercializado inoculantes apenas na forma sólida, líquida ou oleosa. Motivo este, que até hoje o inoculante turfoso é comercializado, mesmo sendo um recurso limitado e ausente em alguns países.

Os inoculantes turfosos se destacam pela sua capacidade de retenção de umidade, em torno de 40 a 50%, essencial para a proliferação e viabilidade das células rizobianas, é de fácil esterilização, tem capacidade de tamponamento de seu pH, além da facilidade de manufatura

e alta superfície específica que suporta o desenvolvimento e elevada sobrevivência de células (SMITH, 1992). Porém as melhores fontes de turfa são da Argentina e do Canadá, com conteúdo de matéria orgânica variando entre 40-50% e em alguns países devido às políticas de preservação, a exploração de turfeiras é controlada ou proibida (TEMPRANO et al. 2002). Este recurso natural requer longo período geológico de formação, sendo limitado e com possibilidades de se tornar escasso futuramente (BUCHER & REIS, 2008).

Um dos fatores limitadores para uso da turfa é sua dificuldade de manuseio em equipamentos de plantio, isso fez o surgimento dos inoculantes líquidos com a facilidade de homogeneização e de uso nos equipamentos agrícolas, tendo eficácia equivalente aos encontrados com a turfa (ALBAREDA et al. 2008). Estes inoculantes líquidos condicionam os microrganismos com alta sobrevivência de células em ambientes refrigerados, com substâncias que favorecem a estabilização osmótica da célula, com alta atividade de água e de potencial hídrico, mas não suportam o aumento de temperatura, tendo dificuldades de manter a população de microrganismos e proporcionar resultados equivalentes a turfa em condições de campo (STEPHENS e RASK 2000; ZILLI et al. 2010a).

Em nível de laboratório muitas substâncias foram estudadas como possíveis veículos de inoculantes entre eles têm-se gomas naturais, alginatos, poliacrilamida, lignina, argila, carvão vegetal, fosfato de rocha e até serragem, entre outras. Neste contexto os polímeros naturais ou sintéticos têm sido apontados como veículos ecologicamente seguros, por serem degradados pela ação de microrganismos sem causar danos ao meio ambiente e capazes de manter sobrevivência de células no inoculante durante o período recomendado.

O veículo utilizado para este trabalho, a base carboximetilcelulose (CMC) e amido denominado de mistura polimérica IPC 2,2 oriundo de trabalhos anteriores (FERNANDES JÚNIOR. 2006; ROHR, 2007; SILVA, 2009) é um polímero aniônico obtido através da reação da celulose com monocloroacetato de sódio, sendo um hidrocolóide que contribui para formação de gel e na retenção de água (ROHR, 2007), além de apresentar propriedades de polieletrólito (KÄISTNER, 1996). O carboximetilcelulose (CMC) apresenta propriedades ideais para a formulação de inoculantes, como: solubilidade na água fria e quente, aumento da viscosidade na solução, habilidade para formar filme, adesividade, características de suspensão e retenção da água (ROHR, 2007). O amido é um homopolissacarídeo (carboidrato), formado de monossacarídeos ligados entre si e composto por amilose e amilopectina, o que corresponde a 99% da massa de matéria seca dos grânulos (SILVA, 2009). Uma das propriedades mais importantes do amido é a gelatinização, que lhe permite absorver, no aquecimento, até 2500 vezes o seu peso em água (ROHR, 2007). E sendo uma característica desejável para sobrevivência de células, quando resfriadas, as cadeias poliméricas do amido se reagrupam, liberando água e quebrando a estrutura do gel formado (TESTER, 2004).

Os trabalhos com utilização de misturas poliméricas apontam que em sua maioria são imiscíveis, havendo a necessidade da compatibilização do par polimérico misturado para se obter o sinergismo de propriedades. Para se conseguir a compatibilidade de misturas poliméricas, são utilizados agentes compatibilizantes, esses agentes são moléculas que atuam na interface da mistura, permitindo que haja uma maior interação na mistura (FERNANDES JÚNIOR. 2006). Os agentes compatibilizantes podem ser polímeros ou copolímeros, moléculas orgânicas de baixo peso molecular com abundância de grupos reativos, por exemplo, carboxilas e hidroxilas (KONING, et al., 1998).

Na intenção de se encontrar esse agente compatibilizante, tanto (FERNANDES JÚNIOR. 2006; ROHR, 2007) estudaram a adição de íons de zinco de magnésio na mistura polimérica a base carboximetilcelulose (CMC) e amido. ROHR, 2007 concluiu que a presença de íons  $Mg^{+2}$  e  $Zn^{+2}$  conferem uma força adicional intermolecular permitindo que essas cadeias fiquem mais estruturadas adquirindo uma maior estabilidade dimensional. Neste

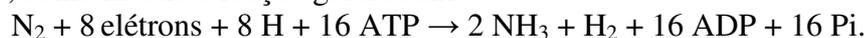
mesmo estudo ROHR, 2007 pode identificar que os íons  $Mg^{+2}$  atuam fortemente estabelecendo interações com ambas as fases, CMC e amido, enquanto que o íon  $Zn^{+2}$  estabelece interações preferencialmente com a fase CMC.

No estudo de FERNANDES JÚNIOR. 2006 utilizando como agentes compatibilizantes o óxido de zinco (ZnO) óxido de magnésio (MgO) ambos a 1%, foi constatado que altas concentrações de ZnO podem resultar em grande quantidade de ZnO não complexado, ficando livre na mistura, deixando de atuar como compatibilizante, além do ZnO ter ação bactericida sobre alguns microrganismos (LIU e YANG, 2003). Levando FERNANDES JÚNIOR. 2006 a concluir que a inoculação de bactérias em meios contendo elevadas concentrações de ZnO, pode reduzir a sobrevivência das células.

No trabalho de (FERNANDES JR et al., 2012) avaliando a inoculação em feijão-caupi, tendo como veículo a mistura polimérica IPC 2,2 a base carboximetilcelulose (CMC) e amido, compatibilizada com óxido de magnésio (MgO) a 1%, foi observado que o inoculante com o veículo IPC 2.2 foi superior ao inoculante com a turfa, quanto a massa de nódulos e de parte aérea seca. Ambos os inoculantes proporcionaram uma produtividade de grãos superior ao controle absoluto (sem nitrogênio e inoculação) e similar ao controle adubado com nitrogênio. Em termos absolutos o inoculante com o veículo IPC 2.2 obteve uma produtividade de 1441 kg ha<sup>-1</sup>, enquanto o inoculante com a turfa obteve 1335 kg ha<sup>-1</sup>.

## 2.5 Inoculação do Feijão-Caupi no Centro-Oeste

A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) é uma característica de leguminosas como o feijão-caupi que se associa simbioticamente com bactérias fixadoras do N<sub>2</sub> atmosférico do grupo rhizobium (FERNANDES et al., 2003; ZILLI et al., 2006; COSTA et al., 2006; XAVIER et al., 2007), permitindo que a cultura tenha grande potencial de crescimento em solos deficientes em nitrogênio. Este processo (FBN) é caracterizado pela conversão do nitrogênio gasoso (N<sub>2</sub>) em nitrogênio amoniacal (NH<sub>4</sub>), passando a forma disponível às plantas, como mostra a reação geral abaixo:



A FBN é maximizada quando se faz uso da inoculação, como mostrado em diversos trabalhos. O melhor exemplo é o da cultura da soja, que pode ter no campo aporte de nitrogênio entre 60 e 90% oriundo da FBN, não sendo mais recomendados fertilizantes nitrogenados para a lavoura no Brasil (HUNGRIA et al., 1994; VARGAS & HUNGRIA, 1997). A indústria de inoculantes hoje concentra o desenvolvimento de produtos e tecnologias para a soja, sendo essa produção de 95% para soja, 4% para feijão comum e 1% para as outras culturas (MOREIRA, 2005), entre elas o feijão-caupi, o que pode, entretanto ter seu panorama alterado pelo seu aumento de produção em sistemas tecnificados. Na (Tabela 4) temos um quadro de dados da indústria de inoculantes no Brasil.

**Tabela 4.** Área e comercialização de inoculante no Brasil.

Ano	Área ha (1)	Inoculante comercializado doses (2)
1999	12.995.000	12.060.913
2000	13.508.000	12.285.395
2001	13.970.000	13.953.944
2002	16.329.000	18.309.678
2003	18.475.000	23.748.056
2004	21.376.000	25.966.977
2005	23.301.000	18.067.506

(1) FONTE: CONAB- [www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br) (2) FONTE: ANPII- [www.anpii.org.br](http://www.anpii.org.br)

Entretanto, diferentemente da cultura da soja, a prática de inoculação ainda é pouco explorada para o feijão-caupi, sendo as principais razões o fato de a cultura ser cultivada em sistemas de subsistência, com baixo aporte tecnológico, e a falta de respostas positivas dos inoculantes no mercado até pouco tempo atrás (ZILLI et al., 2006). Mais recentemente, com a expansão da cultura no Centro-Oeste e com sistemas tecnificados, a prática da inoculação torna-se mais usual.

No entanto ainda são restritos ou inexistentes estudos avaliando os benefícios da prática da inoculação do feijão caupi na região Centro-Oeste até o momento. Os trabalhos desenvolvidos foram especialmente no semiárido nordestino, com aumento no rendimento de grãos significativo com a utilização de inoculantes com estirpes eficientes (MARTINS et al., 2003), no caso a BR3267. Nesses experimentos de campo, os tratamentos inoculados obtiveram produção semelhante ao uso da adubação nitrogenada na dose de 50 kg ha<sup>-1</sup>, dose utilizada quando se aplica nitrogênio na região, prática que não é comum. Em outro estudo quatro locais na região Nordeste, em Teresina (PI) com a cultivar BR 17 – Gurguéia; em Recife (PE) com a cultivar Canapú; em Petrolina (PE) com a cultivar IPA 206; em Imbaúba (PB) com a cultivar Corujinha; e em dois locais na região Norte, em Água Boa e em Confiança (RR) com a cultivar Mazagão; foram testadas as estirpes recomendadas para feijão-caupi (SEMIA 6461, SEMIA 6462 e SEMIA 6463), as estirpes BR3262 e BR3299 comparadas a duas doses com N-uréia (40 e 80 kg/ha<sup>-1</sup>) e com uma parcela de controle absoluto. Foi observado incremento de produtividade no feijão-caupi inoculado de até 250% para a estirpe BR3299 e em Recife (XAVIER et al., 2006b). Os autores atribuíram esta diferença em relação às estirpes inoculadas a especificidade em relação às cultivares e das condições edafoclimáticas nos diferentes locais de experimentação.

Na região Norte ZILLI et al. (2009) avaliaram os efeitos da inoculação do feijão-caupi pelas estirpes recomendadas INPA 03-11B, UFLA 3-84 e BR3267, além das estirpes BR3262 e BR3299, em área de cerrado e de mata no estado de Roraima. Entre as três estirpes recomendadas (BR3267, INPA 03-11B e UFLA 3-84), todas proporcionaram rendimento de grãos com valor estatisticamente igual ao obtido nos tratamentos nitrogenados (50 e 80 kg/ha<sup>-1</sup>). Foi observado em termos absolutos, que estas estirpes propiciaram rendimento maior que o controle em cerca de 150 kg ha<sup>-1</sup> de grãos. MELO & ZILLI (2009), também avaliando a eficiência de estirpes para a região Norte, constataram que maiores rendimentos de grãos foram obtidos com o tratamento nitrogenado e com inóculo da estirpe BR3262, com valores significativamente superiores aos do tratamento controle. Já a estirpe BR3267, apesar de ter proporcionado rendimento igual ao da BR3262, produziu menos que o tratamento com adubo nitrogenado, corroborando informações anteriores para a região com a estirpe 3262 (ZILLI et al., 2007). Concluindo assim que, embora tenha havido restrição da nodulação das plantas no campo, a inoculação, especialmente com a BR3262, foi viável e capaz de substituir a adubação nitrogenada.

Na região sudeste a estirpe BR3267 foi testada com resultados favoráveis (SILVA JUNIOR et al., 2009), porém foi comparada apenas ao tratamento controle sem nitrogênio, sem a comparação com as demais estirpes.

Estima-se que a contribuição da fixação biológica de nitrogênio para o feijão-caupi pode ser superior a 100 kg N ha<sup>-1</sup> (WANI et al., 1995). Mas estes dados são pouco precisos quando se trata de testes de campo. Assim, não se sabe ainda se em modelo de agricultura empresarial a FBN será capaz de suprir todo o nitrogênio exigido pela cultura, pois os dados referentes a feijão-caupi são oriundos de modelos de agricultura familiar, onde o nível de produção da cultura não exige altas doses de nutrientes. Nesse sentido alguns trabalhos informam que a produtividade de grãos aumenta com o uso da inoculação junto com a adubação de 20 kg ha<sup>-1</sup> de N (XAVIER et al., 2008).

## 2.6 Formulações e Tecnologias de Inoculação

Não só os trabalhos usando diferentes veículos de inoculação vêm aumentando, como também sobre as formas de aplicação. VIEIRA NETO et al. (2008) avaliaram a viabilidade da aplicação de inoculante na cultura da soja, via semente e sulco de semeadura, em solo já cultivado e em solo não cultivado com a cultura da soja. Os autores constataram que, apesar da praticidade da aplicação de inoculante via sulco de semeadura, em áreas onde o cultivo da soja se dá pela primeira vez, a aplicação de inoculante turfoso associado a fungicida e micronutriente via semente possibilitou maior nodulação. Já, após vários anos de cultivo com soja, a melhor resposta à nodulação ocorreu com aplicação de inoculante líquido no sulco de semeadura. Ainda, pelos resultados observados nos tratamentos que envolveram a aplicação de micronutriente na semente, essa aplicação não afetou a sobrevivência do *Bradyrhizobium*.

Nesta mesma ótica ZILLI et al. (2008) avaliaram os benefícios da inoculação de *Bradyrhizobium* na cultura da soja pela pulverização em cobertura. Pelos resultados obtidos, a inoculação por pulverização em cobertura não deve substituir a inoculação tradicional nas sementes, haja vista que o melhor resultado ocorreu com a inoculação tradicional. Porém, a técnica mostrou-se viável como método complementar, para situações emergenciais em que pode ocorrer falha na nodulação das plantas e, como consequência, deficiência de nitrogênio.

Assim ZILLI et al. (2010b) também compararam a inoculação da cultura da soja no sulco de semeadura e a inoculação tradicional nas sementes, sendo essas tratadas ou não com fungicidas, em solo arenoso e com baixo teor de matéria orgânica no Cerrado de Roraima. A aplicação do inoculante no sulco de semeadura mostrou-se uma alternativa viável para a inoculação da soja quando as sementes forem tratadas com fungicidas. A inoculação em sulco proporcionou desempenho da FBN igual ao da inoculação realizada diretamente nas sementes.

Visando de fato a pré-inoculação ZILLI et al. (2010a) avaliaram essa prática na soja, porém chamando-a de inoculação de pré-semeadura. Os experimentos mostraram que a inoculação com inoculante turfoso com a dose de 1,2 milhões UFC semente<sup>-1</sup> e com cinco dias de antecedência resultou em produção de valores estatisticamente similares a inoculação padrão e a adubação com 200 kg N ha<sup>-1</sup>, e em valores absolutos obteve a maior produtividade. Porém quando se fez uso de fungicida a produtividade ficou abaixo da inoculação padrão com fungicida também, sendo que a inoculação com cinco dias de antecedência na presença de fungicida obteve número e massa de matéria seca de nódulos similar ao controle sem inoculação e adubação, mostrando que está prática se limita diante da presença de fungicidas.

## 2.7 Quantificação da FBN

A quantificação da FBN é uma metodologia que vem contribuindo para interpretação dos resultados da inoculação em experimentos de campo. A quantificação do nitrogênio pode ser obtida por quatro técnicas aplicadas aos estudos da fixação biológica do N<sub>2</sub> atmosférico: (a) análise da seiva; (b) redução de acetileno; (c) aumento no conteúdo do N-total – método de Kjeldahl; e (d) técnicas isotópicas.

A técnica de análise da seiva (HERRIDGE et al., 1982; 1988) é rápida e simples de ser aplicada e não utiliza equipamentos sofisticados. Ela também é de avaliação instantânea, mas somente pode ser utilizada em grupo restrito de leguminosas, principalmente aquelas que produzem ureídeos (alantoina e ácido alantóico) como produtos da FBN exportados dos nódulos (PEOPLES et al., 1989), que é o caso do feijão-caupi.

A análise da seiva é uma importante técnica, pois plantas como o feijão e soja transportam o N proveniente da fixação biológica do N<sub>2</sub> dos nódulos principalmente na forma de N-ureídeo (alantoina e ácido alantóico), assim a análise destes compostos nitrogenados pode revelar nas plantas a presença de nitrogênio oriundo da fixação atmosférica, pois de acordo com ARRUDA, et al., 2001, que cita (HERRIDGE, 1982 e HUNGRIA et al., 1985)

existe uma correlação positiva e significativa entre concentração de ureídeos na seiva do xilema e as estimativas do N<sub>2</sub> proveniente da fixação obtidas pelas técnicas de redução do acetileno, diluição isotópica de <sup>15</sup>N e acúmulo de N total nos tecidos.

A redução de acetileno baseia-se na habilidade da enzima nitrogenase em reduzir outros substratos além do N<sub>2</sub>, como o acetileno (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) ao etileno (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) (TRIVELIN, 2001). Já a determinação da fixação do N<sub>2</sub> atmosférico pela diferença no N-total é o método mais convencional e antigo, e baseia-se no método de Kjeldahl (TRIVELIN, 2001).

### 2.7.1 Técnicas isotópicas: uso da abundância natural do δ<sup>15</sup>N para quantificação da FBN

O átomo é caracterizado com o centro (núcleo), carregado positivamente (prótons) e de partículas sem carga elétrica, que são os nêutrons e em torno do núcleo, giram partículas de carga negativa (elétrons). O número de prótons e nêutrons no núcleo define a massa dos átomos. Átomos que possuem diferentes números de nêutrons no núcleo, mas contém mesmo número de prótons são chamados de isótopos, pois possuem o mesmo número atômico e diferentes números de massa (BOARETTO et al., 2004), no caso do nitrogênio é o elemento com o número atômico 7, assim independente da massa, todo elemento com esse número atômico comportara-se como nitrogênio.

De acordo com TRIVELIN (2001), Burris em 1940 foi o primeiro a indicar o uso de <sup>15</sup>N em estudos de fixação biológica do N<sub>2</sub>, após a descoberta da existência do isótopo de <sup>15</sup>N, em 1930 por Naudé, e da obtenção de compostos químicos enriquecidos no isótopo pesado.

Segundo BOARETTO et al. (2004) a principal técnica de análise para isótopos estáveis é a espectrometria de massas, baseada na separação de moléculas gasosas ionizadas de acordo com suas massas, quando essas atravessam um campo magnético. De acordo o exemplo de BOARETTO et al. (2004), quando uma amostra de N<sub>2</sub> é introduzida no aparelho, as espécies moleculares neutras <sup>14</sup>N<sup>14</sup>N (A=28), <sup>14</sup>N<sup>15</sup>N (A=29) e <sup>15</sup>N<sup>15</sup>N (A=30) são forçadas a perderem um elétron por impacto eletrônico na fonte de ionização. Em seguida, as espécies moleculares ionizadas (normalmente monoionizadas) são aceleradas e um feixe delas é introduzido perpendicularmente num campo magnético intenso, onde ocorre a separação das diferentes massas, que são coletadas e suas intensidades medidas (I). Com os valores decorrentes devido à revelação das espécies ionizadas (I<sub>28</sub>, I<sub>29</sub> e I<sub>30</sub>) é possível determinar a porcentagem de <sup>15</sup>N de uma amostra, por exemplo, de parte aérea de feijão-caupi.

O nitrogênio é alvo em estudos de sistemas simbióticos com leguminosas e a melhor forma de quantificar o nitrogênio de origem simbiótica é com o uso do <sup>15</sup>N. Existem basicamente três métodos isotópicos para se quantificar a FBN, o método de redução do <sup>15</sup>N<sub>2</sub>, método de marcação do solo com <sup>15</sup>N ou de diluição isotópica com <sup>15</sup>N e o método com uso das variações naturais de <sup>15</sup>N (TRIVELIN, 2001). Estimativas da fixação do N<sub>2</sub> atmosférico em leguminosas com uso de variação natural de <sup>15</sup>N requerem uma diferença mensurável na abundância de <sup>15</sup>N entre as duas maiores fontes de N para a planta fixadora, ou seja, entre o N do solo e da atmosfera (TRIVELIN, 2001).

Para quantificar a contribuição da FBN para uma cultura em experimentos de campo as técnicas mais adequadas são a diluição isotópica de <sup>15</sup>N utilizando substrato enriquecido com este isótopo (BODDEY et al., 1995) ou simplesmente utilizando a sua abundância natural no <sup>15</sup>N disponível do solo (BODDEY et al., 2000; 2001). Esta última possibilidade tem sido largamente utilizada nos últimos anos devido ao menor custo e a possibilidade de aplicação imediata em sistemas naturais ou agrícolas. No entanto, a análise da abundância natural do <sup>15</sup>N demanda equipamentos sofisticados e, dependendo do local de estudo, a variabilidade na marcação natural do solo e os processos de discriminação isotópica podem mascarar os resultados (BODDEY et al., 2000; 2001).

A técnica da abundância natural do isótopo <sup>15</sup>N toma por base o fato de que o N mineral do solo é normalmente um pouco enriquecido com <sup>15</sup>N (SHEARER e KOHL, 1986).

Assim uma planta não fixadora do N<sub>2</sub> da atmosfera, crescendo nessas condições, terá sua composição em <sup>15</sup>N semelhante a do N disponível do solo, as quais são totalmente dependentes do solo para o seu crescimento e que estão crescendo próximo à leguminosa que fixa nitrogênio (SHEARER e KOHL, 1986; BODDEY, 1987). Por outro lado, uma planta fixadora do N<sub>2</sub> da atmosfera apresentará teores menores de <sup>15</sup>N, devido ao efeito de diluição que esse N<sub>2</sub> causará, uma vez que o <sup>15</sup>N em excesso da atmosfera é zero por definição (MIRANDA et al., 2003), já que a maior parte do N virá do ar e o padrão da técnica possui 0,3663 % de <sup>15</sup>N. Contudo as espécies não fixadoras crescendo no mesmo solo apresentarão abundância de <sup>15</sup>N semelhante ao solo e maior do que uma planta fixadora. Assim, usando-se uma planta não fixadora como marcadora do <sup>15</sup>N do N mineral do solo, a taxa de fixação pode ser determinada pela proporção com que este <sup>15</sup>N foi diluído (SHEARER e KOHL, 1986).

Segundo MIRANDA et al. (2003) na prática, é impossível saber se uma dada planta não obtém algum N oriundo de fixação, por mecanismos associados ou não à planta e além disso, idealmente, uma planta não fixadora deveria explorar volume de solo semelhante ao da fixadora, apresentando, ainda, padrões de absorção e assimilação do N parecidos. Como tal condição é praticamente impossível de ser atendida, usa-se o valor médio do <sup>15</sup>N de algumas plantas, reconhecidamente de espécies para as quais não há histórico comprovado de fixação biológica associada, que estão crescendo nas mesmas condições das fixadoras.

O uso do valor da abundância natural do <sup>15</sup>N torna-se adequado, pois as culturas fixadoras como o feijão-caupi apresentam menores valores de % de átomos de <sup>15</sup>N do que as plantas-controle, demonstrando, assim, diluição do N absorvido do solo (N-nativo do solo + <sup>15</sup>N-fertilizante) pelo N proveniente da fixação simbiótica, o que é a base do método da diluição isotópica para a quantificação do N<sub>2</sub> proveniente da atmosfera (HARDARSON et al., 1988; ALVES et al., 2005).

### 2.7.2 Contribuição da FBN para produção do feijão-caupi

A importância de quantificar a FBN em feijão-caupi deve-se a grande variação de dados (HUNGRIA et al., 1991; FRANCO et al., 2002; SILVA et al., 2006; RUMJANEK et al., 2005). Segundo esses autores, as estimativas da FBN no campo correspondem de 40 a 90 % do total de N acumulado pela cultura. Essa variabilidade pode ser atribuída às diferenças do genótipo da planta e da estirpe de rizóbio usada na inoculação (RUMJANEK et al., 2005; XAVIER et al., 2006a).

CASTRO et al. (2004) em estudo com adubos verdes em pré-cultivo e consorciados com berinjela em sistema orgânico observaram que as maiores contribuições da FBN foram no consórcio com o feijão-caupi, tendo entrada de N no sistema de 68 kg ha<sup>-1</sup> quando o pré-cultivo foi o milheto. Sendo que o valor de N oriundo da FBN no feijão-caupi ultrapassou 90% e gerou balanço de N positivo no sistema, devido à maior entrada de N derivado da fixação biológica do nitrogênio.

Dois fatores importantes o gênero de bactéria usado e a cultivar. ALVES et al. (2003) mostraram que o sucesso da soja brasileira foi alcançado com o trabalho direcionado entre as áreas de FBN e melhoramento. Hoje a cultura alcança o patamar de 70- 85% do N requerido sendo oriundo da FBN, podendo ultrapassar os 90%, com uma produtividade de 1500 kg ha<sup>-1</sup> a 4000 kg ha<sup>-1</sup>, em que a FBN pode contribuir com 70 a 250 kg N ha<sup>-1</sup>.

Com relação às bactérias ZILLI et al. (2006) reporta a MOREIRA e SIQUEIRA (2002) em que os estudos de FBN em feijão-caupi têm sido com as espécies *B. japonicum* e *B. elkanii*, pelo fato delas apresentarem maiores contribuições para a FBN, na maioria das leguminosas herbáceas, em regiões de clima tropical. Como exemplo, no passado para a cultura da soja foi atribuído à espécie *B. elkanii* a característica de maior capacidade de competir contra estirpes nativas e ocupar os nódulos (BODDEY e HUNGRIA, 1997; NEVES

e RUMJANEK, 1997) e a espécie *B. japonicum* tem contribuído para maior acúmulo de N (NEVES e RUMJANEK, 1997).

Esta diferenciação entre as estirpes foi atribuída a presença da enzima hidrogenase, ativa na associação das estirpes de *B. japonicum* com a soja (SANTOS et al., 1996), ao passo que as estirpes de *B. elkanii* apresentam muitos nódulos fisiologicamente inativos (BODDEY e HUNGRIA, 1997). Em feijão-caupi este fato não foi averiguado por ZILLI et al. (2006), que concluíram não existir diferença quanto à eficiência simbiótica e ocupação nodular entre estirpes de *Bradyrhizobium* sp. ou *Bradyrhizobium elkanii*. PAUFERRO et al. (2010) observaram que quando foram inoculadas quatro cultivares de soja com as estirpes separadas, SEMIA 5080 (*B. japonicum*) e SEMIA 5019 (*B. elkanii*), a média da massa de matéria seca de nódulos das quatro cultivares inoculadas com *B. elkanii* foi superior a do *B. japonicum*, porém quando avaliadas quanto ao %Ndfa e a quantidade N na planta provindo da FBN o tratamento com a inoculação com *B. japonicum* foi superior ao da inoculação com *B. elkanii*.

De acordo com dados da FAO (FAO, 2008) a lavoura de feijão-caupi ocupa 9,2 milhões de hectares, porém sua produção é de 4,6 milhões de kg, sendo estimado que a FBN contribua com 63% do nitrogênio requerido pela cultura (HERRIDGE et al., 2008). Para PEOPLES et al. (2009), em Breeza e na Austrália a contribuição da fixação simbiótica chega a apenas 38% do nitrogênio requerido pela cultura, sendo que nestas mesmas regiões a soja tem 90% do nitrogênio oriundo da FBN. No sul da Ásia estima-se uma variação de 33-77% do nitrogênio para a lavoura proveniente da FBN (média 58%). Para a África, centro de origem do feijão-caupi, esta variação aumenta para 15 - 89% do nitrogênio proveniente da FBN (média 52%) e na América do Sul essa variação é de 32 - 74% do nitrogênio proveniente da FBN (média 53%), com a média geral em todo o mundo de 54% do nitrogênio oriundo da FBN (PEOPLES et al., 2009). Estima-se que os valores de N fixado biologicamente (dados de parte aérea) na América do Sul variem de 9 a 51 kg ha<sup>-1</sup> com média de 29 kg ha<sup>-1</sup> (PEOPLES et al., 2009). Para comparação, a soja tem a contribuição da fixação de nitrogênio via simbiótica na América do Sul de 78%, com média 136 kg N ha<sup>-1</sup> fixado biologicamente, levando ainda em consideração que o Brasil e a Argentina representam 41% da área cultivada com soja no mundo (PEOPLES et al., 2009).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Controle de Qualidade do Inoculante de Composição Polimérica (IPC 2.2)

A mistura polimérica em forma de gel a base carboximetilcelulose (CMC) e amido, compatibilizada com óxido de magnésio (MgO) a 1%, denominada de IPC 2.2, com pedido de depósito de patente (IP 0506338-8) no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual, foi desenvolvida na Dissertação de Mestrado de FERNANDES JÚNIOR, 2006 com a parceria entre a Embrapa Agrobiologia e o Curso de Pós-graduação em Agronomia- Ciência do Solo da UFRRJ.

O veículo polimérico IPC 2.2 foi produzido na UFRRJ, no Instituto de Tecnologia (Seropédica, RJ, Brasil) de acordo com métodos previamente estabelecidos pelo grupo de pesquisa (FERNANDES JÚNIOR et al., 2006).

A segunda etapa de preparação do inoculante foi realizada na Embrapa Agrobiologia/Laboratório de Ecologia Microbiana (Seropédica, RJ, Brasil) seguindo os métodos oficiais emitidos pela RELARE (Rede de Laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbiológicos de interesse agrícola) e recomendados pelo MAPA (BRASIL, 2011). Sendo que a INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 13, DE 24 DE MARÇO DE 2011, em seu artigo 1º estabelece as especificações para a produção de inoculantes:

Art. 1º Os inoculantes produzidos, importados ou comercializados no país, de acordo com as suas características e para fins de registro, deverão observar as seguintes condições e especificações:

I - os produtos que contenham bactérias fixadoras de nitrogênio para simbiose com leguminosas deverão apresentar concentração mínima de  $1,0 \times 10^9$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama ou mililitro de produto, mantendo a garantia registrada até a data de seu vencimento;

II - para os demais inoculantes, formulados com bactérias associativas e micro-organismos promotores de crescimento de plantas, a concentração de micro-organismos será a informada no processo de registro do produto, de acordo com a recomendação específica emitida por órgão brasileiro de pesquisa científica oficial ou credenciado pelo MAPA;

III - serem elaborados em suporte esterilizado, e, quando sólido, livre de micro-organismos em fator de diluição  $1 \times 10^{-2}$ ;

IV - estarem livres de micro-organismos não especificados em fator de diluição  $1 \times 10^{-5}$ ;

V - serem elaborados em suporte que forneça todas as condições de sobrevivência ao micro-organismo;

VI - apresentarem prazo de validade de, no mínimo, seis meses a partir da data de fabricação; e

VII - serem elaborados somente com micro-organismos relacionados no Anexo II desta Instrução Normativa.

As estirpes de *Bradyrhizobium* utilizadas foram as recomendadas para produção dos inoculantes comerciais para feijão-caupi especificadas no anexo na instrução normativa: UFLA 3-84= BR3302 (SEMIA 6461); INPA 03-11B= BR3301 (SEMIA 6463), BR 3267 (SEMIA 6462) e BR 3262 (SEMIA 6464), mais a estirpe BR3299 em processo de recomendação. Cada inoculante produzido continha apenas uma estirpe, sendo estas crescidas separadamente em meio de cultura 79 líquido YM- Yeast, Manitol (FRED e WAKSMAN, 1928) até atingir o pico de crescimento, apresentando uma concentração de  $10^9$  unidades formadoras de colônia- UFC (3 a 7 dias) e adicionado a mistura polimérica autoclavada na

proporção de 1:3 (suspensão de células e veículo) e homogeneizada (FERNANDES JÚNIOR et al., 2009).

Após o preparo dos inoculantes foram retiradas amostras do inoculante denominadas A e B para a quantificação da concentração rizobiana final do inoculante e presença de contaminante seguindo as recomendações emitidas pelo MAPA (BRASIL, 2010). Foram retiradas 10,0 g de inoculante de cada amostra em frasco esterilizado de 250-300 mL e adicionar 90,0 mL de solução fisiológica ( $8,5 \text{ g L}^{-1}$ ), homogeneizado em agitador orbital por um período de 20 minutos para depois ser coletada, com pipeta uma alíquota de 1,0 mL que foi transferida para um tubo contendo 9,0 mL de solução fisiológica, formando a diluição  $10^{-2}$ . Do tubo com a diluição  $10^{-2}$  foram retirados 1,0 mL com uma nova pipeta e transferido para outro tubo contendo 9,0 mL de solução fisiológica para formar a diluição  $10^{-3}$  e assim, sucessivamente, até formar a diluição  $10^{-9}$ . Estas foram inoculadas 0,1 mL em triplicata distribuído na superfície do meio, usando-se a alça de Drigalski pelo método do “espalhamento” em placas de Petri contendo o meio de cultura CRYMA- Congo Red, Yeast, Manitol, Ágar (FRED e WAKSMAN, 1928) para avaliação da concentração do inoculante e para quantificação da presença de contaminantes usou-se os meios de cultivo batata- dextrose-ágar -BDA e ágar nutritivo- NA (FRED e WAKSMAN, 1928) com a finalidade de verificar a qualidade do inoculante conforme recomendação do MAPA. Sendo incubadas em posição invertida a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  por um período de 3 a 7 dias de acordo a estirpe contida no inoculante e após este período realizadas contagens de unidades formadoras de colônia- UFC (BRASIL, 2010). Este mesmo procedimento de avaliação foi realizado após 24 horas de preparação dos inoculantes e também aos 180 dias de armazenamento.

Em seguida a contagem da placa foi calculado o número de bactérias pela seguinte fórmula (BRASIL, 2010):

$N \text{ o de célula/grama ou mililitro de inoculante} = f \times N$ , em que:

$f$  = fator de diluição e

$N$  = número médio de colônias das três placas na diluição selecionada entre 30 -300 UFC;

O fator de diluição é dado pela recíproca da diluição na placa multiplicada por dez, no caso de inoculação de 0,1 mL. Em uma contagem da diluição  $10^{-3}$  o fator de diluição é  $10^4$ .

O objetivo deste experimento foi assegurar que o inoculante a base da composição polimérica IPC 2.2 estava de acordo às normas exigidas para produção de inoculantes.

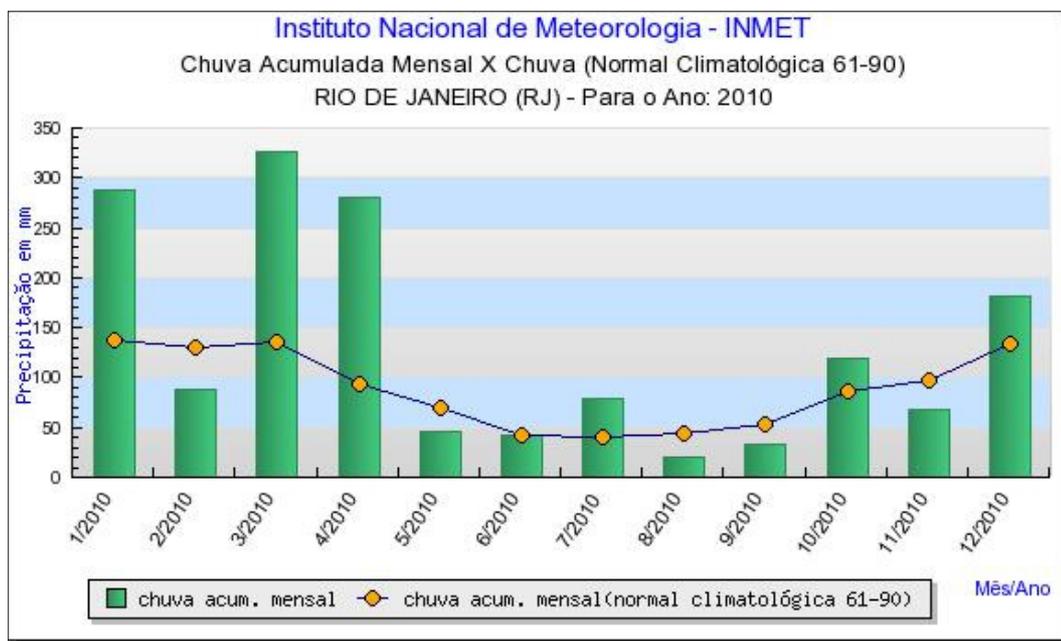
### **3.2 Avaliação em Campo do Inoculante de Composição Polimérica (IPC 2.2)**

Após o controle de qualidade o experimento foi instalado no campo experimental da Embrapa Agrobiologia, Seropédica (RJ), em solo classificado como Argissolo Vermelho-Amarelo (EMBRAPA, 1997), em parceria com a empresa de inoculantes TURFAL no dia 05 de maio de 2010, utilizando apenas uma estirpe (BR3267), tradicionalmente a mais comercializada no mercado (TURFAL, 2010)

A localização geográfica do experimento foi de  $22^\circ45'S$ ,  $43^\circ40'W$  e 30 m de altitude ao nível do mar. O clima predominante é o quente e úmido sem inverno pronunciado, identificado como do tipo Aw na classificação de Köppen. A estação chuvosa estende-se de outubro a fevereiro, com precipitação pluviométrica mínima em julho. As temperaturas mais altas são registradas nos meses de janeiro e fevereiro e as mais baixas em julho. A precipitação pluviométrica mensal, durante o ciclo da cultura, pode ser observada na Figura 2.

A fertilidade do solo do local de plantio foi previamente avaliada, na camada de 0 a 20 cm, segundo EMBRAPA (1997). Em função dos dados obtidos, foi feita a correção da acidez do solo com  $1,5 \text{ t ha}^{-1}$  de calcário calcítico e  $80 \text{ kg K}_2\text{O ha}^{-1}$  (Superfosfato Triplo), e posteriormente refeita a análise do solo, que apresentou as seguintes características: pH, 5,2;

Al trocável, 0 cmolc dm<sup>-3</sup>; K, 100 cmolc dm<sup>-3</sup>; Ca, 1,1 cmolc dm<sup>-3</sup>; Mg, 1,3 cmolc dm<sup>-3</sup>; matéria orgânica, 16,7 g kg<sup>-1</sup>; P, 13,3 mg dm<sup>-3</sup> e N, 0,79 g kg<sup>-1</sup>.



**Figura 2.** Precipitação pluviométrica (mm) mensal registrada durante a condução do experimento.

Fonte: INMET, 2011.

O delineamento experimental foi distribuído em blocos casualizados, tendo cada parcela 4x6 metros (com distância de 1,5 metros entre parcelas). Cada tratamento teve 6 repetições (com 2 metros de distância entre blocos), em área total de 1750 m<sup>2</sup> (50 x 35 m).

O tratamento teste do inoculante polimérico foi comparado a um tratamento controle negativo (sem adubação e sem inoculação), dois tratamentos controle positivo (sem inoculação) com diferentes níveis de adubação nitrogenada (50 e 80 kg N ha<sup>-1</sup>), tratamento controle com inoculante tradicional comercial à base de turfa e um tratamento comparativo com um inoculante líquido comercial, estes da empresa Turfal Ltda. A adubação nitrogenada foi feita no plantio e no início da floração (aproximadamente 20-25 dias após a emergência das plantas), na proporção de ¼ do total de N na primeira administração e o restante na segunda. A fonte de N utilizada foi a uréia (45% de N).

Foram usadas no experimento sementes do cultivar BRS Guariba, inoculadas com a estirpe de *Bradyrhizobium japonicum* BR3267 (SEMIA 6462) para os três veículos (líquido, turfoso e polimérico). As sementes foram inoculadas no dia do plantio, sendo considerada a densidade de população de plantas de 150.000 ha<sup>-1</sup>. As inoculações, com os inoculantes, polimérico, turfoso e líquido, foram realizadas em frascos estéreis mantendo a proporção de recomendação da empresa TURFAL (100g /15 kg de sementes de feijão-caupi).

As variáveis analisadas foram: massa seca dos nódulos (mg planta<sup>-1</sup>), matéria seca da parte aérea, % N na parte aérea, % N no grão e produtividade de grãos secos (13% de umidade). A nodulação foi avaliada a partir de cinco plantas coletadas 31 dias após a emergência- DAE (09 de junho) e a produtividade avaliada aos 70 DAE, baseada na amostragem de área útil (8 m<sup>2</sup>) de cada parcela, tendo-se considerado as quatro fileiras centrais. A massa de matéria seca dos nódulos e a matéria seca foram avaliadas de acordo com metodologia da EMBRAPA (1997), após secagem (em estufa de circulação forçada a

65°C até massa constante. Determinaram-se, também, os teores de nitrogênio total na parte aérea e no grão pelo método Kjeldahl (URQUIAGA et al., 1992). O acúmulo de nitrogênio nos grãos e na parte aérea foi calculado multiplicando-se o peso da matéria seca da parte aérea (g) ou dos grãos \* (% de N)/100.

Essa fase avaliou a eficiência da mistura polimérica como veículo de inoculação do feijão-caupi em condições de campo.

Os dados foram analisados através do programa Sisvar v. 4.5 (FERREIRA, 2008), sendo realizada a análise de variância e a comparação das médias através do teste T de Student (LSD) ao nível de probabilidade de 0,05.

### 3.3 Avaliações da FBN no Centro-Oeste

A segunda parte da dissertação foi desenvolvida na região Centro-Oeste, onde se concentram no Brasil as principais áreas tecnificadas de feijão-caupi. O projeto faz parte do plano de ação coordenado pela Embrapa Agrobiologia, instituição cuja origem está associada aos históricos nas linhas de pesquisa em FBN no Brasil e conta com parcerias e colaborações institucionais de três unidades da Embrapa (Roraima, Meio-Norte e Agrossilvipastoril) e cinco universidades (UFRRPE, UNEB, UFRSA, UFC e UFRRJ).

Os experimentos foram conduzidos nas cidades de Primavera do Leste (maior produtora de feijão-caupi do Mato Grosso) e em Sinop-MT com a colaboração da Embrapa Agrossilvipastoril. O experimento em Primavera do Leste foi instalado na área da empresa (Sementes Tomazetti), na fazenda Novo Horizonte no período da safrinha (abril/2011) e o experimento em Sinop foi realizado na área da unidade de pesquisa da Embrapa Agrossilvipastoril (dezembro/2010).

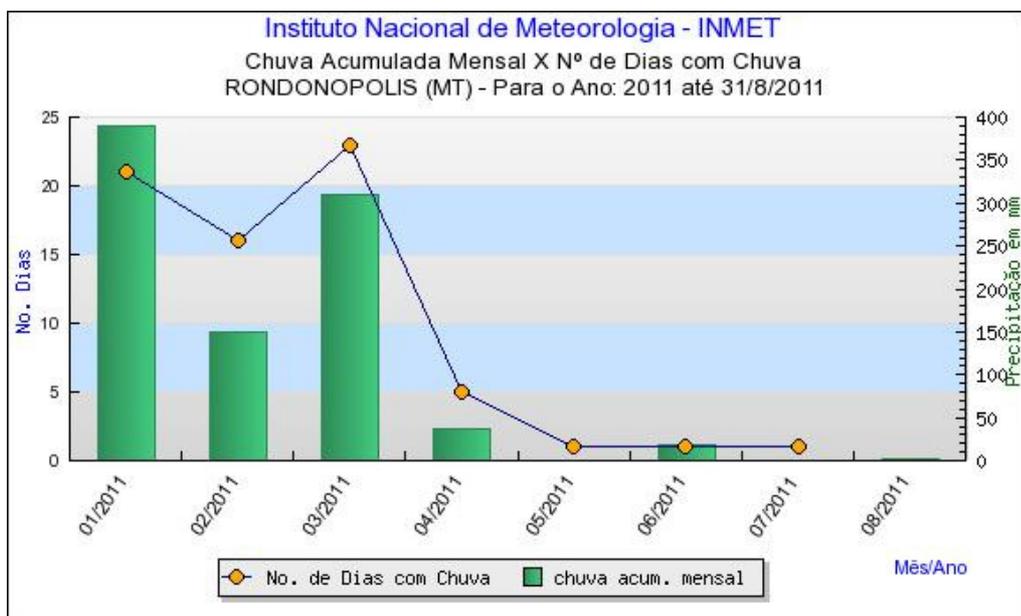
A cultivar utilizada de feijão-caupi foi a BRS Guariba (Tabela 6), que é recomendada para todo o Brasil (FREIRE FILHO et al., 2007). Foi utilizada uma população de plantas de 200.000 ha<sup>-1</sup> no experimento de Sinop- MT de pré inoculação, e para o experimento de Primavera do Leste- MT foi utilizada uma população de 240.000 plantas ha<sup>-1</sup>, sendo as características dessa cultivar apresentadas na Tabela 5.

**Tabela 5.** Características da cultivar de feijão-caupi BRS Guariba (FREIRE FILHO et al., 2007).

<b>Caráter</b>	<b>Característica</b>
Hábito de crescimento	Indeterminado
Porte	Semi-ereto
Cor da flor	Branca
Cor da vagem imatura	Roxa
Cor da vagem madura	Roxa
Cor da vagem seca	Roxa
Comprimento da vagem	17,8 cm
Nº de grãos por vagem	12
Nível de inserção das vagens	Acima da folhagem
Forma da semente	Arredondada
Cor do tegumento	Branca
Cor do halo	Sem halo
Peso de 100 grãos	19,5 g
Classe comercial	Branca
Subclasse comercial	Branca
Nº de dias para floração	41 dias
Ciclo	65-70 dias

Adaptado GUALTER, 2010.

De acordo com a Figura 3 a precipitação pluviométrica da região do Mato Grosso se concentra nos meses de janeiro a março. Dados da estação meteorológica de Rondonópolis que engloba a precipitação tanto para a cidade de Sinop quanto para a cidade de Primavera do Leste, exemplificam a diferença de culturas de safra e de safrinha. Na Figura 3 nota-se que a partir de abril a falta de chuvas passa a ser um fator limitante para produção, sendo possível o cultivo apenas com uso de irrigação.



**Figura 3.** Precipitação pluvial (mm) mensal registrada durante a condução do experimento. Fonte: INMET, 2011.

### 3.3.1 Avaliação da pré-inoculação de rizóbios em sementes de feijão-caupi

#### a) Teste de pré-inoculação de rizóbios utilizando o veículo IPC 2.2 em sementes de feijão-caupi em laboratório

Sementes de feijão-caupi (cv IPA 206) foram inoculadas com o inoculante polimérico na concentração da ordem  $10^9$  UFC  $g^{-1}$  de inoculante, contendo a BR3267 em dois experimentos. O primeiro seguiu a proporção de 10 g de inoculante polimérico em 1 kg semente e o segundo foi utilizado 1 g de inoculante polimérico por semente. No primeiro experimento as sementes inoculadas foram subdivididas em 15 alíquotas e no segundo em 18, em ambos as alíquotas foram de 20 g de sementes, em placas de Petri (aproximadamente 100 sementes). Essas amostras foram armazenadas em placas de Petri estéreis na temperatura ambiente em laboratório ( $24 \pm 3^\circ C$ ). No primeiro experimento, a cada semana foi quantificada a presença de rizóbios (BR3267) e contaminantes de três alíquotas de 20 g até o total de cinco semanas. Essas mesmas sementes também foram germinadas em agár-água e em vasos de Leonard em casa de vegetação a cada semana, durante cinco semanas. O segundo experimento foi quantificado apenas a concentração e rizóbios uma hora após a inoculação e no decorrer das cinco semanas seguintes.

A avaliação da concentração de rizóbios e células não rizobianas foi feita semanalmente durante cinco semanas, em triplicata seguindo as recomendações do MAPA (BRASIL, 2010) de recuperação e quantificação de *Bradyrhizobium* em sementes inoculadas (RELARE, 2007). As alíquotas com amostras de 100 sementes foram colocadas em erlenmeyer (A) esterilizado, com 90 mL de solução fisiológica (NaCl a 0,85%) e adicionadas 2 a 3 gotas de Tween 80 (polioxietilenorbitano monolaurato) e o material agitado por 15

minutos (primeira lavagem), isso apenas no segundo experimento, pois no primeiro experimento não houve uso de Tween. A suspensão no Erlenmeyer (A) foi transferida para o Erlenmeyer (B), também esterilizado, com capacidade mínima de 250 mL. Outros 90 mL de solução fisiológica com 3 gotas de Tween 80 foram adicionadas ao Erlenmeyer (A), agitado por 15 minutos (segunda lavagem) e novamente transferida a suspensão para o Erlenmeyer (B) e completado o volume do Erlenmeyer (B) com solução fisiológica, totalizando 200 mL. Foi tomado 10 mL da suspensão (Erlenmeyer B) e colocado em Erlenmeyer (C) esterilizado contendo 90 mL de solução fisiológica e o volume agitado para obter a diluição  $10^{-1}$ . Então foram pipetados 1 mL da diluição  $10^{-1}$  em frasco estéril com 9 mL de solução fisiológica, obtendo assim a diluição  $10^{-2}$ , seguindo assim sucessivamente até obter a diluição  $10^{-9}$ . A contagem foi realizada em placas de Petri inoculadas com 0,1 mL distribuído na superfície do meio, usando a alça de Drigalski por meio da técnica do “drop plat” no primeiro experimento nos meios de cultura: semi seletivo Ikuta (IKUTA, 1995) para avaliar a concentração de rizóbios; agar nutritivo (AN) para avaliar a concentração de bactérias não-rizobianas e o meio batata-dextrose-ágar (BDA) para avaliar a concentração de fungos, e no segundo experimento fez-se uso da técnica do “espalhamento” no meio de cultura Ikuta. Estas placas foram incubadas em posição invertida em estufa a 28-30°C por 3- 7 dias, após então foi feita a contagem das colônias nas placas.

Em seguida a contagem foi calculado o número de bactérias recuperadas das sementes. Dado pela seguinte fórmula (BRASIL, 2010):

$N^{\circ}$  de células recuperadas/semente =  $f \times N \times 200 / 100$ , na qual:

f = fator de diluição;

N = número médio de colônias das três placas na diluição selecionada entre 30- 300 UFC;

200 = volume total da solução de lavagem;

100 = número de sementes;

O fator de diluição é dado pela recíproca da diluição na placa multiplicada por dez, no caso de inoculação de 0,1 mL. Em uma contagem da diluição  $10^{-3}$  o fator de diluição é  $10^4$ .

Os dados do primeiro experimento foram analisados através do programa Sisvar v. 4.5 (FERREIRA, 2008), sendo realizada a análise de variância e a comparação das médias através do teste de Scott- Knott T ao nível de probabilidade de 0,05 e para o segundo experimento foi feita a análise de regressão.

Este experimento avaliou a capacidade do polímero IPC 2.2 de manter células rizobianas viáveis na semente por um período de cinco semanas após a inoculação.

## **b) Avaliação da pré-inoculação de rizóbios em sementes de feijão-caupi em campo na região Centro-Oeste**

O experimento foi realizado em Sinop-MT na área experimental da Embrapa Agrossilvipastoril sem uso de irrigação em um Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico (EMBRAPA, 1997), em altitude 368m (11° 51' 29" S e 55° 36' 1,6" W). A análise de fertilidade do solo antes do plantio foi realizada na profundidade de 0 a 20 cm, com as seguintes características: pH, 5,2; alumínio trocável, 0,17 cmolc  $dm^{-3}$ ; K, 72 cmolc  $dm^{-3}$ ; Ca, 1,88 cmolc  $dm^{-3}$ ; Mg, 0,40 cmolc  $dm^{-3}$ ; matéria orgânica, 34,9 g  $kg^{-1}$ ; P, 6,71 mg  $dm^{-3}$  e N, 2,1 g  $kg^{-1}$ . O plantio foi realizado em 08 de dezembro de 2010, a primeira coleta para massa de nódulos secos, massa de matéria seca da parte aérea seca, N-total da parte aérea e abundância natural de  $^{15}N$  foi em 12 de janeiro de 2011 (32 DAE) e a segunda coleta para avaliar a produtividade e N-total nos grãos foi em 23 de fevereiro de 2011 (73 DAE).

Os inoculantes utilizados neste experimento foram produzidos com o veículo turfoso e o veículo polimérico 2.2. Para a produção do inoculante turfoso, a turfa oriunda do Paraná,

obtida do estoque da Embrapa Agrobiologia, foi moída, peneirada, ajustada o pH entre 6,9 – 7,0 e autoclavada, então sim foi adicionado o inoculo na proporção de 1/3 (1 parte de inoculo e 3 partes de veículo). Para o inoculante polimérico IPC 2.2, o veículo a base carboximetilcelulose (CMC) e amido, compatibilizada com óxido de magnésio (MgO) a 1%, foi produzido na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/ Instituto de Tecnologia (Seropédica, RJ, Brasil), sendo em seguida autoclavada para a adição do inoculo na proporção de 1/3 (1 parte de inoculo e 3 partes de veículo). Para ambos os inoculantes foi utilizada a estirpe BR3267 e realizados os testes do controle de qualidade, preconizando a recomendação do MAPA, concentração mínima de  $10^9$  UFC  $g^{-1}$  de inoculante e não apresentar contaminantes até a diluição de  $10^{-5}$  (BRASIL, 2011).

O experimento constituiu de dez tratamentos: pré inoculação com inoculante polimérico IPC 2.2 com 0 semana, 1 semana, 2 semanas e com 5 semanas; e pré inoculação com inoculante a base de turfa com 0 semana, 1 semana, 2 semanas e com 5 semanas, por fim os tratamentos sem inoculante e sem N (testemunha absoluta) e a testemunha sem inoculação e com dose de N ( $70 \text{ kg ha}^{-1}$ ) recomendada para a cultura. As semente pré inoculadas foram armazenadas em temperatura ambiente em laboratório ( $24 \pm 3^\circ\text{C}$ ). A adubação nitrogenada foi feita no plantio e no início da floração (aproximadamente 20-25 dias após a emergência das plantas), na proporção de  $\frac{1}{4}$  do total de N na primeira administração e o restante na segunda. A fonte de N utilizada foi à uréia (45% de N). O delineamento foi em blocos ao acaso, com 4 repetições, com parcelas contendo 8 linhas de plantio tendo cada parcela  $4 \times 6$  metros (com distância de 1,5 metros entre parcelas).

As variáveis analisadas foram: massa de matéria seca dos nódulos ( $\text{mg planta}^{-1}$ ), matéria seca da parte aérea, massa seca total ( $\text{g planta}^{-1}$ ), % N na parte aérea, abundância natural de  $^{15}\text{N}$ , % N no grão, produtividade de grãos secos (13% de umidade), acúmulo de nitrogênio na parte aérea- ANPA ( $\text{mg planta}^{-1}$ ), sendo (ANPA = matéria seca da parte aérea x % N na parte aérea/100) e acúmulo de nitrogênio nos grãos- ANG ( $\text{kg ha}^{-1}$ ), sendo (ANG = produtividade x % N no grão/100). A nodulação foi avaliada a partir de cinco plantas coletadas 32 dias após a emergência e a produtividade avaliada aos 73 DAE, baseada na amostragem de área útil ( $8 \text{ m}^2$ ) de cada parcela, tendo-se considerado as quatro fileiras centrais. A massa de matéria seca dos nódulos e a matéria seca foram de acordo com metodologia da EMBRAPA (1997), após secagem (em estufa de circulação forçada a  $65^\circ\text{C}$  até massa constante). Determinaram-se, também, os teores de nitrogênio total na parte aérea e no grão pelo método Kjeldahl (URQUIAGA et al., 1992).

Os dados foram analisados através do programa Sisvar v. 4.5 (FERREIRA, 2008), sendo realizada a análise de variância e a comparação das médias através do teste T de Student (LSD) ao nível de probabilidade de 0,05.

Nessa fase foi avaliada por até quantos dias a prática da pré inoculação pode ser recomendada.

### **3.3.2. Avaliação do inoculante polimérico com diferentes estirpes na região Centro-Oeste**

O experimento foi instalado na cidade de Primavera do Leste-MT em parceria com a Empresa (Sementes Tomazetti), na fazenda Novo Horizonte em área de Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico (EMBRAPA, 1997). Essa empresa foi uma das pioneiras no plantio de feijão-caupi na região Centro-Oeste e nos últimos anos tem usado inoculantes em toda a produção.

O inoculante comumente utilizado pela empresa na inoculação das sementes de feijão-caupi é o na forma líquida Legumax com a estirpe BR3267 da Empresa Turfal. Como teste foi utilizado o inoculante polimérico IPC 2.2, o veículo a base carboximetilcelulose (CMC) e amido, compatibilizada com óxido de magnésio (MgO) a 1%, produzido na Universidade

Federal Rural do Rio de Janeiro/ Instituto de Tecnologia (Seropédica, RJ, Brasil), sendo em seguida autoclavada para a adição do inoculo na proporção de 1/3 (1 parte de inoculo e 3 partes de veículo). Para o inoculante polimérico IPC 2.2 foi realizado os testes do controle de qualidade, preconizando a recomendação do MAPA, concentração mínima de  $10^9$  UFC  $g^{-1}$  de inoculante e não apresentar contaminantes até a diluição de  $10^{-5}$  (BRASIL, 2011), tendo o inoculante líquido da empresa Turfal também apresentada estas recomendações de acordo a embalagem.

O ensaio foi instalado em área de pivô central de  $60 \text{ ha}^{-1}$  com a cultivar BRS Guariba, nos dias 05, 06, 07 e 08/04/2011, a primeira coleta para massa de nódulos secos, massa de matéria seca da parte aérea seca, N-total da parte aérea e abundância natural de  $^{15}\text{N}$  foi em 15 de maio de 2011 (35 DAE) e a segunda coleta para avaliar a produtividade e N-total nos grãos foi em 25 de junho de 2011 (75 DAE).

Para este ensaio cada tratamento teve área de 15 ha, sendo as estirpes usadas as seguintes: BR3267 em veículo polimérico, BR3262 em veículo polimérico, consórcio das quatro estirpes recomendadas (BR3267, BR3262, BR3301 e BR3302) em veículo polimérico e o quarto tratamento a estirpe BR3267 em veículo líquido (inoculante da Turfal Ltda.) usado pela propriedade.

A fertilidade do solo no local de plantio foi avaliada previamente, para a camada de 0 a 20 cm, de acordo com metodologia da EMBRAPA (1997), com as seguintes características: pH, 5,55; alumínio trocável,  $0,02 \text{ cmolc dm}^{-3}$ ; K,  $128 \text{ cmolc dm}^{-3}$ ; Ca,  $3,30 \text{ cmolc dm}^{-3}$ ; Mg,  $0,53 \text{ cmolc dm}^{-3}$ ; matéria orgânica,  $25,5 \text{ g kg}^{-1}$ ; P,  $7,79 \text{ mg dm}^{-3}$  e N,  $1,2 \text{ g kg}^{-1}$ . A área utilizada para o ensaio tinha cultivo anterior com arroz, que foi colhido para o plantio do feijão-caupi. Nesse ensaio não foi possível o teste com os controles positivo (adubação nitrogenada) e absoluto (sem inoculação e adubação nitrogenada), pois a propriedade tem toda a sua produção a partir de semente inoculada, ou seja, não é usado fertilizante nitrogenado na lavoura do feijão-caupi.

O inoculante com a estirpe BR3267 em veículo líquido- Legumax (inoculante da Turfal Ltda.) foi aplicado nas sementes na proporção de  $300 \text{ ml ha}^{-1}$  ( $300 \text{ ml}/ 50 \text{ kg}$  semente). Os inoculantes poliméricos com as estirpes BR3267, BR3262 e o consórcio foram aplicados na proporção de  $100 \text{ ml ha}^{-1}$  ( $100 \text{ ml}/ 50 \text{ kg}$  semente), sendo que o inoculante líquido foi usado em dose três vezes superior a do inoculante polimérico.

As variáveis analisadas foram: massa seca dos nódulos ( $\text{mg planta}^{-1}$ ), massa seca de raiz ( $\text{mg planta}^{-1}$ ) matéria seca da parte aérea ( $\text{mg planta}^{-1}$ ), massa seca total ( $\text{g planta}^{-1}$ ), % N na parte aérea, abundância natural de  $^{15}\text{N}$ , % N no grão, produtividade de grãos secos (13% de umidade), acúmulo de nitrogênio na parte aérea- ANPA ( $\text{mg planta}^{-1}$ ), sendo (ANPA = matéria seca da parte aérea x % N na parte aérea/100) e acúmulo de nitrogênio nos grãos-ANG ( $\text{kg ha}^{-1}$ ), sendo (ANG = produtividade x % N no grão/100). A nodulação foi avaliada a partir de cinco plantas coletadas 30-35 dias após a emergência, a massa seca dos nódulos e a matéria seca foi avaliada de acordo com metodologia da EMBRAPA (1997), após secagem (em estufa de circulação forçada a  $65^\circ\text{C}$  até massa constante). Determinaram-se, também, os teores de nitrogênio total na parte aérea e no grão pelo método Kjeldahl (URQUIAGA et al., 1992).

Para a coleta das plantas, cada tratamento de 15 ha foi dividido em 10 áreas de 1,5 ha e nesta área 0,5 ha foi considerado bordadura, assim dentro de 1,0 ha foram retiradas cinco plantas/ponto em um total de 10 pontos equidistantes. Sendo considerado o ensaio com quatro tratamentos, com dez repetições cada.

Os dados foram analisados através do programa Sisvar v. 4.5 (FERREIRA, 2008), sendo realizada a análise de variância e a comparação das médias através do teste T de Student (LSD) ao nível de probabilidade de 0,05.

Nessa fase foi avaliada em condições de campo a indicação de utilização do inoculante polimérico com diferentes estirpes para produção de inoculantes para feijão-caupi na região Centro-Oeste, comparando o veículo polimérico com o líquido produzido a nível empresarial.

### 3.4 Quantificação da Contribuição da FBN em Feijão-caupi

A quantificação da FBN foi realizada nos experimentos descritos anteriormente, sendo eles: a) Avaliação da pré-inoculação de rizóbios em sementes de feijão-caupi na região Centro-Oeste: Sinop- MT (Embrapa Agrossilvopastoril); e b) Desempenho produtivo do inoculante polimérico com diferentes estirpes para feijão-caupi no Centro-Oeste: Primavera do Leste - MT (Sementes Tomazetti);

Para a quantificação da contribuição da FBN foi utilizada a técnica de abundância natural do isótopo de nitrogênio  $^{15}\text{N}$ .

No experimento (a) as plantas de feijão-caupi foram coletadas no período de floração, 35 dias após a emergência, sendo cinco plantas por parcela. Na mesma oportunidade foram coletadas plantas de pé-de-galinha (*Eleusine indica*) invasoras não fixadoras de  $\text{N}_2$  que se estabeleceram nas respectivas parcelas mais plantas de feijão não nodulante (*Phaseolus vulgaris*) NORH 54 e sorgo BRS 306 (*Panicum maximum*) que foram plantadas entre cada bloco para serem utilizadas como plantas de referência. Para o ensaio (b) as plantas foram coletadas no período de floração, 35 dias após a emergência e cada tratamento de  $15 \text{ ha}^{-1}$  foi dividido em 10 áreas de  $1,5 \text{ ha}^{-1}$  e nesta área  $0,5 \text{ ha}^{-1}$  foi considerado bordadura, assim dentro de  $1,0 \text{ ha}^{-1}$  foram retiradas cinco plantas/ponto em um total de 10 pontos equidistantes. Sendo considerado o ensaio com quatro tratamentos, com dez repetições cada. Neste ensaio foram coletadas apenas as plantas de pé-de-galinha (*Eleusine indica*) como plantas de referência, invasoras não fixadoras de  $\text{N}_2$  que se estabeleceram na área.

Todas as plantas foram secas a  $65^\circ\text{C}$  em estufa de circulação forçada até massa constante, moídas e analisadas quanto à abundância natural do isótopo  $^{15}\text{N}$  (OKITO et al., 2004) por espectrômetro de massa de razão isotópica, modelo Delta Plus (Finnigan MAT, Bremen, Germany) no “Laboratório John M. Day de Isótopos Estáveis” da Embrapa Agrobiologia.

A composição do isótopo  $^{15}\text{N}$  foi mensurada através da diferença do número de átomos de  $^{15}\text{N}$  para  $^{14}\text{N}$ , usando a atmosfera como padrão de acordo (JUNK e SVEC 1958; MARIOTTI et al., 1981):

$$\delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = \frac{[^{15}\text{N}/^{14}\text{N}]_{\text{amostra}} - [^{15}\text{N}/^{14}\text{N}]_{\text{padrão}}}{[^{15}\text{N}/^{14}\text{N}]_{\text{padrão}}} \times 1000$$

Para o cálculo da estimativa da FBN por meio da abundância natural utiliza-se a seguinte expressão %Ndfa de SHEARER e KOHL (1986):

$$\% \text{Ndfa} = 100 \left( \frac{(\delta^{15}\text{N ref}) - (\delta^{15}\text{N planta fixadora})}{(\delta^{15}\text{N ref} - \text{B})} \right)$$

$^{15}\text{N ref}$  – Valor de  $\delta^{15}\text{N}$  do solo obtido através de plantas não fixadoras, utilizadas como testemunha e coletadas em cada parcela experimental (Sorgo e Feijão não nodulante);

$\delta^{15}\text{N planta fixadora}$  – Valor de  $\delta^{15}\text{N}$  da planta fixadora de  $\text{N}_2$  (feijão-caupi);

**B** – Valor da discriminação isotópica de  $^{15}\text{N}$ , sendo B a proporção de  $^{15}\text{N}$  da planta fixadora crescida totalmente dependente da FBN.

Para este trabalho foi estimado o valor B para a parte aérea de feijão-caupi de -1,66 deltas (BODDEY et al., 2000).

Também foi estimada a quantidade de nitrogênio na parte aérea oriunda da FBN, de acordo (SHEARER E KOHL 1986; MASKEY et al., 2001):

**N derivado FBN na parte aérea (mg planta<sup>-1</sup>) = (%Ndfa / 100) x N acumulado massa seca parte aérea).**

**N fixado kg ha<sup>-1</sup> = N derivado FBN (kg planta<sup>-1</sup>) x população plantas ha<sup>-1</sup>**

Os dados foram analisados através do programa Sisvar v. 4.5 (FERREIRA, 2008), sendo realizada a análise de variância e a comparação das médias através do teste Tukey ao nível de probabilidade de 0,05.

Nessa fase foi quantificada a contribuição da fixação biológica de nitrogênio na cultura do feijão-caupi na região Centro-Oeste.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Controle de Qualidade do Inoculante de Composição Polimérica (IPC 2.2)

Os inoculantes preparados apresentaram a concentração na ordem de  $10^9$  UFC (unidades formadoras de colônia)  $g^{-1}$  de inoculante nos períodos de 24 horas e seis meses após a fabricação, conservados em geladeira ( $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), nas cinco estirpes. O inoculante polimérico manteve as características recomendadas pelo MAPA (BRASIL, 2011), que preconiza uma concentração mínima de  $1 \times 10^9$  UFC  $g^{-1}$  até seis meses de armazenamento e que não haja crescimento de contaminantes na diluição de  $10^{-5}$ . Não foi observado crescimento de contaminantes, estando, portanto de acordo o MAPA (BRASIL, 2011) e na faixa aceitável que é inferior a  $10^5$   $g^{-1}$ . A BR3267 foi a estirpe que apresentou a maior concentração, após 24 horas de fabricação apresentou  $7,0 \times 10^9$  UFC  $g^{-1}$  e depois de seis meses de  $2,0 \times 10^9$  UFC  $g^{-1}$  (Tabela 6). As estirpes apresentaram queda na concentração de UFC  $g^{-1}$  aos seis meses, porém ainda dentro do limite de  $10^9$  UFC  $g^{-1}$ .

**Tabela 6.** Número de unidades formadoras de colônia (UFC) presentes no inoculante polimérico produzido contendo cinco estirpes individuais (BR3267, BR3262, BR3301, BR3302 e BR3299\*) com um dia e com seis meses após a produção.

Sobrevivência	$\times 10^9$ UFC $g^{-1}$ de inoculante				
	BR 3267	BR 3262	BR 3301	BR 3302	BR 3299
Rizóbio (após 24 horas)	7,0	6,5	6,0	5,0	4,0
Rizóbio (após seis meses)	2,0	2,5	1,5	1,0	1,2
Contaminante (fungo)	0	0	0	0	0
Contaminante (não rizobiano)	0	0	0	0	0

\*Estirpe em processo de recomendação

### 4.2 Avaliações em Condições de Campo do Inoculante de Composição Polimérica (IPC 2.2)

Na avaliação da massa de nódulos secos (Tabela 7), os tratamentos não diferiram entre si, porém é aceitável que em condições de campo ocorra elevada nodulação em tratamentos não inoculados, uma vez que naturalmente os solos apresentam estirpes nativas, porém elas são muito variáveis quanto à eficiência simbiótica (NEVES & RUMJANEK, 1997).

NASCIMENTO et al. (2008) mostraram que os maiores valores de matéria seca de nódulos foram obtidos nos tratamentos com população nativa (sem inoculação), indicando que a população nativa foi tão eficiente na nodulação quanto às estirpes utilizadas. Neste mesmo trabalho não houve diferença significativa na produtividade do feijão-caupi entre os tratamentos inoculados, com exceção daqueles com a mistura de estirpes BR3301 + BR3302 (recomendadas) com valor significativamente inferior aos dos demais tratamentos.

ZILLI et al. (2010) avaliaram o uso de inoculantes líquido e turfoso para cultura da soja e observaram que o turfoso foi superior ao líquido quanto ao número e massa seca de nódulos na média de duas safras (2005 e 2006). Porém para a produtividade e a quantidade de nitrogênio acumulado no grão os inoculantes não diferiram entre si e foram estatisticamente iguais ao tratamento nitrogenado ( $200\text{ kg N ha}^{-1}$ ), apesar de que numericamente o tratamento nitrogenado apresentou valor superior ao dos inoculantes líquido e turfoso.

Na avaliação da massa da parte aérea seca (Tabela 7), o tratamento com a adubação de  $80\text{ kg N ha}^{-1}$  foi superior ao controle negativo, justificado pelo aporte de nitrogênio as plantas,

propiciado pela adubação acima do recomendado para a cultura (70 kg N ha<sup>-1</sup>). No nitrogênio acumulado na parte aérea, os tratamentos não diferiram entre si. Mas no nitrogênio acumulado no grão o tratamento com o polímero foi superior ao controle negativo e ao inoculante líquido, mostrando que apesar do tratamento com 80 kg N ha<sup>-1</sup> ter possibilitado aumento de fitomassa, este não proporcionou maior acúmulo de nitrogênio na planta. GUALTER et al., 2011, verificaram que no parâmetro acúmulo de nitrogênio na parte aérea, a adubação nitrogenada (80 kg N ha<sup>-1</sup>) foi superior as estirpes recomendadas (BR3262 e INPA 03-11B) e no parâmetro produtividade as estirpes recomendadas foram similares ao tratamento nitrogenado, sendo que estas estirpes foram inoculadas com o veículo turfoso.

O aporte de nitrogênio oriundo da adubação nitrogenada aumentou a produtividade dos tratamentos nitrogenados (50 e 80 kg de N ha<sup>-1</sup>), que foram maiores em valores absolutos que a dos inoculantes líquido e turfoso, devido ao aporte de nitrogênio, que beneficia a produção de massa vegetativa e conseqüentemente a produtividade (OLIVEIRA et al., 2003). Segundo MENDES et al. (2008) sempre que a disponibilidade de N no solo é abundante, este é absorvido em detrimento do N da fixação, enquanto o N-fixado é a maior fonte do nutriente quando o N do solo torna-se limitante.

O nitrogênio acumulado na parte aérea não diferiu entre os tratamentos, o que evidencia que o tratamento sem inoculação e adubação, absorveu nitrogênio do solo, mais precisamente oriundo da matéria orgânica com 16,7 g dm<sup>-3</sup>. Para a cultura do feijão-caupi a adição de nitrogênio é recomendada para solos com teor de matéria orgânica inferior a 10 g dm<sup>-3</sup>. Assim como a alta produtividade do tratamento sem inoculação e adubação também pode ser atribuída em decorrência da disponibilidade de nutrientes no solo. Para efeitos de parâmetro para a recomendação de fertilidade do solo para feijão-caupi, consideraram-se as quantidades de fósforo (P) mg dm<sup>-3</sup> (0,0 a 5,0 – baixo; 6 a 10 – médio e >10 – alto) e para potássio (K) mg dm<sup>-3</sup> (0,0 a 25,0 – baixo; 26,0 a 50,00 - médio e > 50,0 – alto), e no somatório de Ca + Mg mmolc dm<sup>-3</sup> (0,0 a 2,0 – baixo; 2,1 a 5,0 – médio e >5,0 – alto), assim nota-se que tanto P com 13,3 mg dm<sup>-3</sup>, quanto K 100 mg dm<sup>-3</sup> apresentaram alta concentração no solo, e o somatório de Ca + Mg com 2,4 mmolc dm<sup>-3</sup> estão em concentração média.

Os inoculantes apresentaram produtividades similares a dos tratamentos nitrogenados (50 e 80 kg de N ha<sup>-1</sup>), porém apenas o inoculante com o veículo polimérico e o tratamento com adubação de 80 kg N ha<sup>-1</sup> foram superiores ao controle negativo (Tabela 7). O veículo de inoculação a base de mistura polimérica IPC 2.2 possibilitou um incremento de produtividade de mais de 200 kg ha<sup>-1</sup> em relação às tecnologias já recomendadas (inoculantes líquido e turfoso), superior ao controle negativo (sem inoculação e adubação) e igual ao tratamento com 80 kg N ha<sup>-1</sup>.

Em outro estudo também foi observado efeito significativo da aplicação do inoculante polimérico IPC 2.2, sobre a produtividade de colmos em cana de açúcar. Em média, o aumento da produtividade de colmos foi de 50 Mg ha<sup>-1</sup> em relação ao controle negativo sendo igual ao controle nitrogenado, adubação com 120 kg ha<sup>-1</sup> de N (SILVA, et al., 2009). Estes resultados podem estar ligados a proteção das estirpes de *Bradyrhizobium* frente ao estresse hídrico e altas temperaturas possibilitadas pelos polímeros em géis (SCHUH, 2005). HUNGRIA e VARGAS (2000) evidenciaram que temperaturas do solo elevadas têm, limitado a FBN em regiões tropicais, afetando as etapas de crescimento do rizóbio e das plantas hospedeiras, sendo os efeitos ainda mais drásticos na simbiose. Também consideram a precipitação pluvial, como um fator climático limitante a FBN.

A produtividade nos tratamentos foi acima de 1000 kg ha<sup>-1</sup>, superior a média nacional (300 a 400 kg ha<sup>-1</sup>) e ao patamar de 500 kg ha<sup>-1</sup> estabelecido pelo MAPA como resultado para que o experimento seja considerado válido para recomendação de novos procedimentos para serem adotados no uso e aplicação de inoculantes. Em estudos anteriores em condições de

campo também foi observado efeito significativo do uso do polímero IPC 2.2 sobre a produtividade de colmos em cana-de-açúcar (SILVA et al., 2009).

O veículo de inoculação IPC 2.2 apresentou resultados dentro das especificações estabelecidas pelo MAPA (BRASIL, 2010; 2011) para o controle de qualidade do produto, em relação a sobrevivência de células e ausência de contaminantes durante o período de 180 dias. A eficiência agrônômica apresentou resposta igual às tecnologias recomendadas, com produtividade superior ao controle absoluto e igual a dos inoculantes líquido, turfoso e ao tratamento com 80 kg N-uréia ha<sup>-1</sup>.

**Tabela 7.** Massa de nódulos secos, massa de matéria da parte aérea (folhas, caules e ramos) seca e nitrogênio acumulado na parte aérea de plantas de feijão-feijão BRS Guariba, 31 dias após a emergência, nitrogênio acumulado nos grãos e produtividade de grãos a os 70 DAE.

Tratamento	*Nódulos secos (mg planta <sup>-1</sup> )	Matéria da parte aérea seca (g planta <sup>-1</sup> )	N acumulado parte aérea (mg planta <sup>-1</sup> )	N acumulado grãos (kg ha <sup>-1</sup> )	Produtividade (kg ha <sup>-1</sup> )
Controle negativo	24,6 A	4,9 B	182,7 A	44 B	1.132 B
Controle positivo (50 kg N ha <sup>-1</sup> )	33,6 A	5,4 BA	206,4 A	50 BA	1.319 BA
Controle positivo (80 kg N ha <sup>-1</sup> )	23,8 A	6,2 A	234,7 A	54 BA	1.395 A
Inoculante (Turfa)	35,2 A	5,2 BA	213,1 A	46 BA	1.214 BA
Inoculante (Líquido)	59,4 A	4,9 BA	200,0 A	45 B	1.195 BA
Inoculante (Mistura Polimérica IPC 2.2)	60,2 A	5,3 BA	211,3 A	56 A	1.431 A
CV%	58,03	19,60	21,92	16,92	16,18

Médias de seis repetições seguidas por letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de T de Student (LSD), a 5% de probabilidade. (\*Dados transformados pela raiz quadrada de Y + 1.0)

### 4.3 Avaliação da Pré-inoculação de Rizóbios em Sementes de feijão-caupi na Região Centro-Oeste

#### 4.3.1 Teste de pré-inoculação de rizóbios em sementes de feijão-caupi em laboratório

A inoculação de bactérias nas sementes deve anteceder horas antes do plantio para assegurar a sobrevivência e viabilidade das bactérias na semente. No Brasil, a técnica da inoculação em sulco é usada para a cultura da soja como forma de viabilizar a inoculação junto com a aplicação de fungicidas nas sementes (HUNGRIA et al., 2007; ZILLI et al., 2010), sendo essa prática recomendada tecnicamente (EMBRAPA, 2008). O uso dessas técnicas de inoculação poderia ser estratégico no caso de atrasos nos plantios causados por intempéries climáticas ou ainda a distribuição de sementes já inoculadas.

No primeiro experimento de pré-inoculação (Tabela 8) a recuperação manteve-se constante no decorrer dos 35 dias de armazenamento, comprovando a capacidade do polímero em manter viáveis as bactérias após a inoculação. Resultados semelhantes foram encontrados por FERNANDES JÚNIOR (2006) que avaliou a sobrevivência de células em sementes de feijão-caupi inoculadas com a estirpe BR3267 usando diferentes veículos de inoculante a base de CMC e amido, indicando a capacidade das misturas poliméricas em proteger as células em sementes inoculadas e armazenadas. KIM et al. (1988) também comprovaram essa capacidade do CMC trabalhando com bactérias do gênero *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Streptococcus*.

JUNG e MUNGNIER (1982) ressaltam que os biopolímeros são eficientes para o crescimento e incubação de bactérias, devido à capacidade de limitar a transferência de calor, propriedades reológicas e alta atividade de água.

Com relação à contaminação por fungos, foi observada presença de fungos na ordem de  $10^4$  apenas na 3ª semana de estocagem das sementes pré-inoculadas (Tabela 8) o que sugere ter havido problemas na estocagem apenas das alíquotas usadas nesta avaliação. Ao avaliar a germinação de sementes logo após a inoculação, foi constatado que a inoculação não afetou a germinação. Em vasos de Leonard a porcentagem de germinação foi de 100% e em placas de Petri contendo ágar-água foi de 97%. Na avaliação da germinação em vasos de Leonard ao longo dos 35 dias (Tabela 8), também foi observado que não houve efeito negativo do inoculante na germinação, não diferindo estatisticamente a germinação (%) em função dos dias de armazenamento em temperatura ambiente em laboratório ( $24 \pm 3^\circ\text{C}$ ).

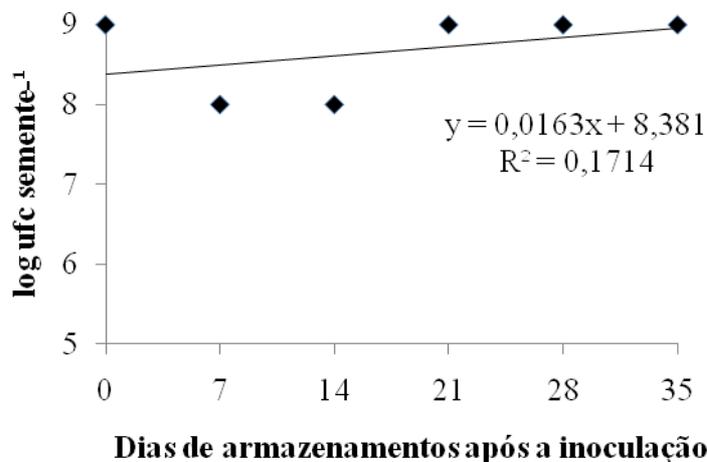
**Tabela 8.** Sobrevivência de rizóbio (BR3267), presença de contaminantes e (%) de germinação de sementes de feijão-caupi IPA 206 inoculadas com inoculante polimérico 7, 14, 21, 28 e 35 dias antes da avaliação de recuperação de rizóbios das sementes.

Variáveis	Dias de armazenamento após a inoculação				
	7	14	21	25	35
<sup>1</sup> Log UFC semente <sup>-1</sup>	7.15a	7.19a	7.33a	7.40a	7.34a
<sup>2</sup> Contaminante ( bactéria)	0	0	0	0	0
<sup>2</sup> Contaminante (fungo)	0	0	$10^{-4}$	0	0
<sup>1</sup> (%) Germinação sementes	100a	100a	98a	100a	98a

<sup>1</sup>Médias seguidas por letras iguais, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Scott- Knott a 5% de probabilidade.

<sup>2</sup>Quantificado de acordo a diluição com presença de contaminante.

A partir das sementes de feijão-caupi inoculadas no segundo experimento (Figura 4) foi possível avaliar que nas 1ª e 2ª semanas de armazenamento a concentração de rizóbios esteve abaixo de  $10^9$  UFC semente<sup>-1</sup>, provavelmente em virtude do prazo de estabilização bacteriana. Segundo FERNANDES JÚNIOR et al., 2006 entender essa dinâmica pode auxiliar na determinação de diferentes estratégias de manuseio e armazenamento, bem como avaliar os efeitos das concentrações de agentes compatibilizantes e de polímeros utilizados para alcançar condições mais estáveis. Não foi observada recuperação de rizóbios de forma linear, exatamente porque nas duas primeiras semanas a concentração de rizóbios esteve abaixo de  $10^9$  UFC semente<sup>-1</sup>, mais nos dias 21, 28 e 35 observou-se a estabilização com a concentração de  $10^9$  UFC semente<sup>-1</sup>. Independente dessa alteração, essa densidade de células do inoculante nas sementes está acima da recomendada, por exemplo, para a soja que é de  $6 \times 10^5$  UFC semente<sup>-1</sup>, o que seria permitido de acordo o MAPA para uma prática agrícola.



**Figura 4.** Sobrevivência de rizóbios (BR3267) inoculadas com o inoculante polimérico em sementes de feijão-caupi IPA 206 no decorrer de 35 dias após a inoculação e armazenadas em temperatura ambiente em laboratório ( $24 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ). 5% de significância.

Os resultados do presente estudo mostram que o inoculante desenvolvido a base de composições poliméricas CMC/amido pode ser usado para a inoculação em pré-semeadura, estando de acordo com resultados anteriores (FERNANDES JÚNIOR et al., 2009). Porém é interessante ressaltar que não foi quantificada a concentração inicial de rizóbios nas sementes utilizadas, pois estudos evidenciaram dispersão de rizóbios via sementes de feijão-caupi (LEITE et al., 2009). Fato que pode ser comprovado uma vez que no primeiro experimento a inoculação na proporção de 10 g de inoculante para 1 kg de semente levaria a uma densidade na ordem de  $10^6$ , e foi recuperada uma concentração de rizóbios na ordem de  $10^7$ . Assim pode-se inferir que no segundo experimento mesmo tendo inoculado uma concentração na ordem de  $10^9$  por semente, a recuperação poderia ter sido influenciada pela presença inicial de rizóbios já contida nas sementes.

Apesar do presente potencial do inoculante polimérico em manter a viabilidade de rizóbios após a inoculação por até 35 dias, este potencial não foi testado na presença de fungicidas, que comumente são utilizados no tratamento de sementes e que afetam negativamente a sobrevivência dos rizóbios nas sementes (VIEIRA NETO et al., 2008; ZILLI et al., 2010).

#### 4.3.2 Avaliação da pré-inoculação de rizóbios em sementes de feijão-caupi em campo na região Centro-Oeste

Na avaliação da inoculação com antecedência, a massa de nódulos secos é um parâmetro fundamental. De acordo com a Tabela 9, a maior massa de nódulos secos foi obtida com o inoculante polimérico com 35 dias de antecedência ao plantio, sendo superior à inoculação com o inoculante turfoso no dia do plantio, com 7 e 35 dias de antecedência ao plantio. Também se verificou que a utilização do inoculante polimérico com 35 dias de antecedência ao plantio foi superior à com 14 dias de antecedência ao plantio. Foi observado que o valor inferior da nodulação quando utilizado o inoculante polimérico com 14 dias de antecedência ao plantio, em comparação à inoculação com 35 dias de antecedência ao plantio, estava relacionado aos resultados obtidos em laboratório. Nestes as recuperações de rizóbios com 7 e

14 dias após a inoculação apresentavam concentração inferior a  $10^9$  UFC semente<sup>-1</sup>, considerando este ser o período de estabilização dos microorganismos no meio de sobrevivência.

De acordo as figuras 5 e 6 nota-se que o inoculante polimérico tem um coeficiente de correlação de ( $R^2= 0,93$ ), com uma equação de regressão polinomial para massa de nódulos, enquanto que o inoculante turfoso têm um coeficiente de correlação de ( $R^2= 0,89$ ), com uma equação de regressão polinomial, porém com características diferentes, o inoculante polimérico com o passar dos dias da inoculação tende a aumentar a massa de nódulos, por outro lado o inoculante turfoso tende de diminuir a massa de nódulos. Neste mesmo sentido porém com uma prazo curto ZILII et al. (2010) avaliaram o efeito da inoculação de *Bradyrhizobium* em pré semeadura de soja e constataram que a inoculação realizada com inoculante turfoso com antecedência de cinco dias da semeadura proporcionou número e massa de nódulos estatisticamente igual à inoculação padrão. Porém quando houve tratamento de sementes com fungicida antes da aplicação do inoculante, verificou-se que, no tratamento com a inoculação em pré-semeadura, houve redução no número e massa de nódulos, com valores semelhantes aos observados no controle sem inoculação.

VIEIRA NETO et al. (2008) relatam a viabilidade da aplicação de inoculantes na cultura da soja, via semente e sulco de semeadura com inoculante líquido, em solo já cultivado ou não com soja. Estes autores perceberam que em áreas de primeiro cultivo a inoculação em sulco apresentou resultado similar a inoculação padrão quanto a massa de nódulos, porém em áreas já cultivadas a inoculação padrão foi melhor, exceto quando feita em valor igual a três vezes a dose recomendada para a inoculação. ZILLI et al. (2008) observaram que a utilização de inoculante líquido de *Bradyrhizobium* em soja, usando pulverização em cobertura, proporcionou massa de nódulos e de parte aérea inferior a inoculação padrão.

Neste mesmo sentido, porém com um prazo curto ZILLI et al. (2010) avaliaram o efeito da inoculação de *Bradyrhizobium* em pré semeadura de soja e constataram que a utilização do inoculante turfoso com antecedência de cinco dias da semeadura proporcionou número e massa de nódulos estatisticamente igual à inoculação padrão. Porém quando houve tratamento de sementes com fungicida antes da aplicação do inoculante, verificou-se que, no tratamento com a inoculação em pré-semeadura, houve redução no número e massa de nódulos, com valores semelhantes aos observados no controle sem inoculação.

Foi notada relação entre as variáveis de massa de matéria de raiz seca e massa de matéria da parte aérea seca (Tabela 9). O tratamento com maior massa de raiz, a inoculação com 14 dias de antecedência ao plantio com o inoculante turfoso obteve a maior massa da parte aérea, sendo similar ao controle nitrogenado. Quanto à massa de matéria da parte aérea seca, a inoculação no dia do plantio com inoculante turfoso foi inferior ao tratamento nitrogenado e a inoculação com inoculante turfoso com 14 dias de antecedência ao plantio. Os valores da massa total seguiram o mesmo padrão da massa de matéria da parte aérea, com superioridade do tratamento nitrogenado e inoculado com o inoculante turfoso com 14 dias de antecedência ao plantio.

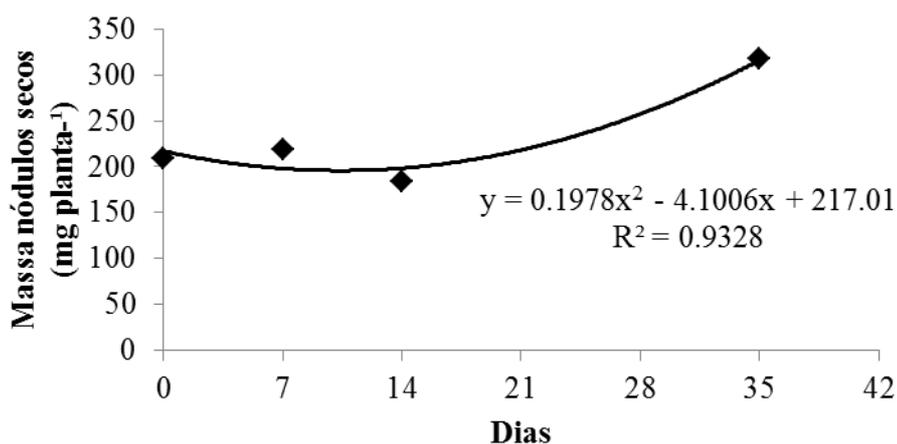
Podem se observar na Tabela 10 que os tratamentos não diferiram entre si no teor de nitrogênio nos grãos, mas quanto ao teor de nitrogênio na parte aérea o tratamento nitrogenado foi superior a todos os tratamentos exceto aos inoculados com o polímero no dia do plantio e com 35 dias de antecedência. Já no acúmulo de nitrogênio na parte aérea o tratamento nitrogenado foi superior apenas a os tratamentos inoculados com a turfa no dia do plantio e com 35 dias de antecedência e o tratamento inoculado com o polímero com 14 dias de antecedência. No acúmulo de nitrogênio nos grãos o tratamento inoculado com o polímero no dia do plantio foi superior numericamente até ao tratamento nitrogenado e estatisticamente sendo superior a os tratamentos inoculados com a turfa com 14 e 35 dias de antecedência ao plantio e ao tratamento inoculado com o polímero com 14 dias de antecedência.

**Tabela 9.** Massa de nódulos secos, massa de raiz seca, massa de matéria da parte aérea seca (caule, ramos e folhas) e massa total seca (nódulos, raiz e parte aérea) de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba), 32 dias após a emergência. Sementes inoculadas com 0, 7, 14 e 35 dias antes do plantio com inoculante polimérico e turfoso, armazenadas em temperatura ambiente em laboratório ( $24 \pm 3^\circ\text{C}$ ).

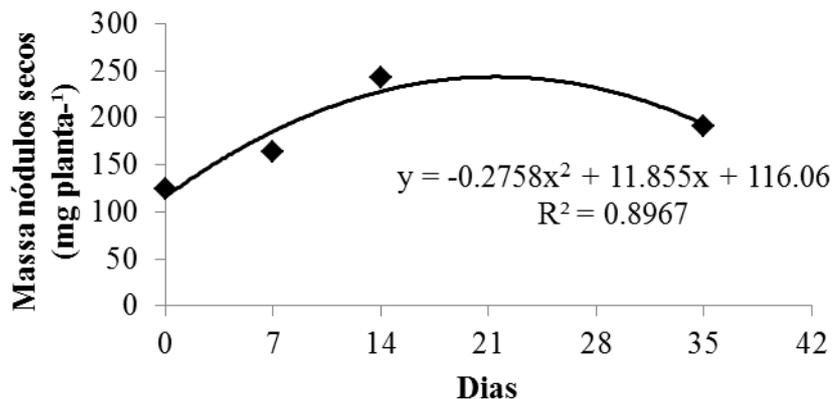
Tratamento	*MS nódulos	MS raiz	MS parte aérea	MS total
	-----mg planta <sup>-1</sup> -----		-----g planta <sup>-1</sup> -----	
Controle S/N	248,1BA	409,0CB	3,6BA	4,2BA
Controle C/N- 70 kg ha <sup>-1</sup>	230,3CBA	503,8BA	4,6A	5,3A
Turfa (dia do plantio)	124,7C	370,5CB	2,8B	3,3B
Turfa (7 dias)	163,8CB	429,2CB	3,7BA	4,3BA
Turfa (14 dias)	242,4CBA	581,8A	4,6A	5,4A
Turfa (35 dias)	191,6CB	393,3CB	3,4BA	4,0BA
Polímero (dia do plantio)	208,7CBA	353,3C	3,4BA	4,0BA
Polímero (7 dias)	218,6CBA	419,7CB	3,9BA	4,5BA
Polímero (14 dias)	184,6CB	476,2CBA	3,6BA	4,3BA
Polímero (35 dias)	317,1A	374,2CB	3,6BA	4,3BA
CV%	38,93	23,97	26,11	24,76

Médias de quatro repetições seguidas por letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de T de Student (LSD), a 5% de probabilidade.

\*MS= massa seca



**Figura 5.** Massa de nódulos secos de feijão caupi BRS Guariba, 32 dias após a emergência de sementes inoculadas com o inoculante polimérico (BR3276) no dia do plantio, 7 dias antes do plantio, 14 dias antes do plantio e 35 dias antes do plantio, com as sementes armazenadas em temperatura ambiente em laboratório ( $24 \pm 3^\circ\text{C}$ ). 5% de significância.



**Figura 6.** Massa de nódulos secos de feijão caupi BRS Guariba, 32 dias após a emergência de sementes inoculadas com o inoculante turfoso (BR3276) no dia do plantio, 7 dias antes do plantio, 14 dias antes do plantio e 35 dias antes do plantio, com as sementes armazenadas em temperatura ambiente em laboratório ( $24 \pm 3^\circ\text{C}$ ). 5% de significância. 5% de significância.

**Tabela 10.** Teores e acúmulo de nitrogênio na parte aérea e nos grãos secos, mais a produtividade de grãos de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba). Sementes inoculadas com 0, 7, 14 e 35 dias antes do plantio com inoculante polimérico e turfoso, com as sementes armazenadas em temperatura ambiente em laboratório ( $24 \pm 3^\circ\text{C}$ ).

Tratamento	Teor N parte aérea	Teor N grãos	N acumulado parte aérea	N acumulado grãos	Prod.
	32 *DAE	74 DAE	32 DAE	74 DAE	
	------(%)-----	-----	-(mg planta <sup>-1</sup> )-	------(kg ha <sup>-1</sup> )-----	
Controle S/N	4,17EDC	3,83A	150,96CBA	50,51BA	1.311,4A
Controle C/N- 70 kg ha <sup>-1</sup>	4,60A	3,80A	209,62A	54,41BA	1.431,4A
Turfa (dia do plantio)	4,25DC	3,54A	118,90C	49,77BA	1.406,4A
Turfa (7 dias)	4,29DC	3,63A	159,51CBA	50,51BA	1.385,8A
Turfa (14 dias)	4,15EDC	3,57A	192,80BA	48,89B	1.365,5A
Turfa (35 dias)	4,10ED	3,72A	136,60CB	48,71B	1.311,4A
Polímero (dia do plantio)	4,58BA	3,79A	158,20CBA	60,40A	1.585,2A
Polímero (7 dias)	4,30DCB	3,72A	167,00CBA	54,31BA	1.468,9A
Polímero (14 dias)	3,97E	3,73A	143,42CB	48,76B	1.306,8A
Polímero (35 dias)	4,42CBA	3,74A	158,20CBA	56,90BA	1.549,8A <sup>1</sup>
CV%	4,44	6,11	25,62	14,18	14,60

Médias de quatro repetições seguidas por letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de T de Student (LSD), a 5% de probabilidade.

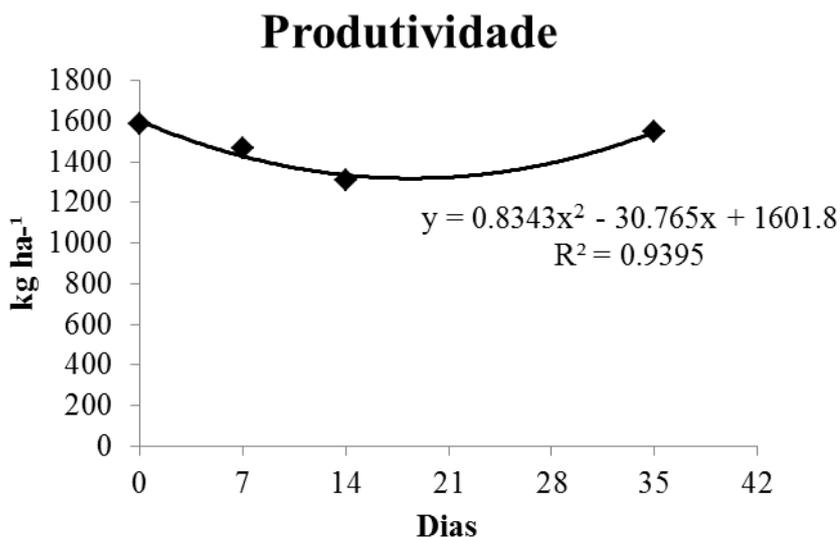
\*DAE= Dias após a emergência

<sup>1</sup>Tratamento difere dos tratamentos inoculados com o polímero com 14 dias de antecedência, com a turfa com 35 dias de antecedência e do controle sem inoculação e adubação pelo teste T de Student (LSD), a 8% de probabilidade.

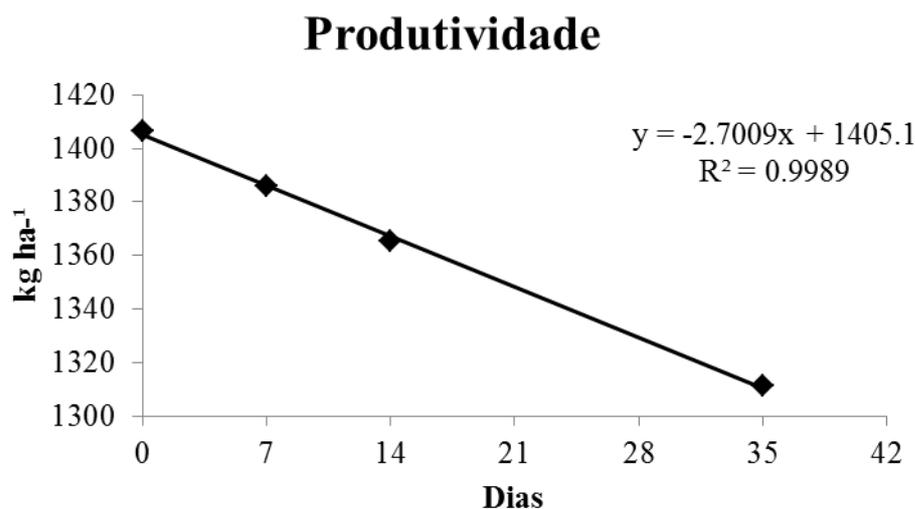
Na avaliação da produtividade (Tabela 10) os tratamentos não diferiam entre si, mas os tratamentos inoculados com o inoculante polimérico no dia do plantio e com 35 dias de antecedência apresentaram valores absolutos de produtividades, com 1585, 2 Kg ha<sup>-1</sup> e 1549,8 kg ha<sup>-1</sup> respectivamente. Possivelmente não foi observada diferença estatística em virtude da alta produtividade do controle negativo. Este fato evidencia a presença de estirpes nativas eficientes e indica que o nitrogênio não era o fator limitante, pois o tratamento adubado com N também não se diferiu dos demais. Porém quando passa a probabilidade para 0,08 nota-se que a inoculação com 35 dias de antecedência é superior a os tratamentos inoculados com o polímero com 14 dias de antecedência, com a turfa com 35 dias de antecedência e do controle sem inoculação e adubação. ZILLI et al. (2010) em trabalho com inoculação de soja com cinco dias de antecedência encontraram que para o inoculante turfoso a inoculação padrão não diferiu da inoculação com antecedência, exceto quando se fez uso de fungicidas, em que a inoculação com antecedência mostrou produtividade abaixo da inoculação padrão.

Nas figuras 7 e 8 mostraram claramente a diferença entre os veículos de inoculação, mostrando que a inoculação com o polímero matem-se quase constante a produtividade no decorrer dos dias de antecedência ao plantio, com um coeficiente de correlação de (R<sup>2</sup>= 0,93), com uma equação de regressão polinomial, mostrando uma queda na produtividade com 7 e 14 dias da inoculação com antecedência, dias estes que parecem ser o período de estabilização do rizóbio no veículo. Porém fica evidente que a prática da inoculação com antecedência só é possível com o inoculante polimérico, pois na figura 8 tem-se um alto coeficiente de correlação negativa (R<sup>2</sup>= 0,99) indicando uma redução linear da produtividade em função do aumento de dias da inoculação antes do plantio com o inoculante turfoso.

VIEIRA NETO et al. (2008) observaram a viabilidade da aplicação de inoculantes na cultura da soja, via semente e sulco de semeadura, em solo já cultivado e não com soja. Os resultados mostraram que, apesar da praticidade da aplicação de inoculante via sulco de semeadura, em áreas onde o cultivo da soja se dá pela primeira vez, ao contrário do que se observou para áreas já cultivadas com essa leguminosa, é necessário promover maior contato do inoculante com a semente, o que parece ser obtido com a aplicação de inoculante turfoso via semente.



**Figura 7.** Produtividade de feijão caupi BRS Guariba, 35 dias após a emergência de sementes inoculadas com o inoculante polimérico (BR3276) no dia do plantio, 7 dias antes do plantio, 14 dias antes do plantio e 35 dias antes do plantio, com as sementes armazenadas em temperatura ambiente em laboratório (24 ± 3°C). 5% de significância. 5% de significância.



**Figura 8.** Produtividade de feijão caupi BRS Guariba, 35 dias após a emergência de sementes inoculadas com o inoculante turfoso (BR3276) no dia do plantio, 7 dias antes do plantio, 14 dias antes do plantio e 35 dias antes do plantio, com as sementes armazenadas em temperatura ambiente em laboratório ( $24 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ). 5% de significância. 5% de significância.

ZILLI et al. (2008) avaliaram um método de inoculação de *Bradyrhizobium* em soja, por meio de pulverização, tendo este método de inoculação proporcionado rendimento superior ao controle absoluto e igual ao tratamento nitrogenado. Porém, os autores verificaram que inoculação por pulverização em cobertura não deve ser uma prática para substituir a inoculação tradicional nas sementes, pois o melhor resultado ocorreu com a inoculação padrão, tendo produtividade de grãos superior ao tratamento com inoculação em cobertura e do controle. ZILLI et al. (2010) estudaram a inoculação da soja com *Bradyrhizobium* no sulco de semeadura com a inoculação tradicional nas sementes. Concluindo que a inoculação no sulco de semeadura foi tecnicamente viável, especialmente para áreas desprovidas de bactérias nodulantes de soja e com baixos teores de matéria orgânica. Porém quando se fez aplicação do fungicida carbendazim+tiram, houve redução superior a  $500 \text{ kg ha}^{-1}$ , comparada aos tratamentos sem fungicida e com inoculação no sulco de plantio com o fungicida. O efeito negativo da aplicação de fungicidas junto com a inoculação já tinha sido comprovado (ZILLI et al., 2009).

A FBN mensurada pela técnica da abundância natural do  $^{15}\text{N}$ , fazendo uso de plantas de referência de espécies não fixadoras de nitrogênio, conforme a Tabela 11 mostra que as plantas usadas apresentaram valores de deltas próximos (Pé de galinha- *Elseusine indica*= 6,351 e Feijão não nodulante- *Phaseolus vulgaris* NORH 54= 6,348). Seguindo BODDEY et al. (1995), que recomendam o uso de pelo menos duas espécies não fixadoras para melhor análise. ALVES et al. (2005) fazem referência ao uso de genótipos não nodulantes das leguminosas como plantas de referência, desde que explorem o mesmo volume de solo e tenham a mesma distribuição de raízes das plantas testes (BODDEY et al., 1996).

**Tabela 11.** Delta  $\delta^{15}\text{N}$  (‰), nitrogênio proveniente da FBN (%Ndfa), nitrogênio derivado da FBN na parte aérea ( $\text{mg planta}^{-1}$ ) e nitrogênio fixado ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba), 35 dias após a emergência.

Tratamento	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	Ndfa (%)	N derivado FBN na parte aérea ( $\text{mg planta}^{-1}$ )	Kg $\text{ha}^{-1}$ N fixado
BR3267- polímero (dia do plantio)	4,13edcba	21ba	33,02ba	6,3ba
BR3267- polímero (7 dias)	2,60ba	41a	67,85ba	12,9ba
BR3267- polímero (14 dias)	4,77fedcb	28ba	46,84ba	8,9ba
BR3267- polímero (35 dias)	4,98fed	13ba	24,00ba	4,5ba
BR3267- turfa (dia do plantio)	4,89fedc	18ba	23,19ba	4,4ba
BR3267- turfa (7 dias)	3,82dcba	31ba	50,12ba	9,5ba
BR3267- turfa (14 dias)	2,50a	48a	88,21a	16,7a
BR3267- turfa (35 dias)	2,72cba	45a	61,76ba	11,7ba
Controle absoluto	6,41f	0b	0,0b	0,0b
Plantas de Referência $\delta^{15}\text{N}$ (‰)				
Pé de galinha ( <i>Eleusine indica</i> ) 6,35ef				
Feijão não nodulante ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L. NORH 54) 6,34ef				
CV%	19,99	57,43	68,01	68,04

Médias de quatro repetições seguidas por letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Sementes inoculadas com a BR3267 com 0, 7, 14 e 35 dias antes do plantio com inoculante polimérico e turfoso, com as sementes armazenadas em temperatura ambiente em laboratório ( $24 \pm 3^\circ\text{C}$ ), mais o controle absoluto sem inoculação e fonte de nitrogênio mineral em Sinop- MT.

Os dados na Tabela 11 mostram que em todos os tratamentos ocorreu diluição isotópica, exceto para o controle absoluto, onde mostra que o feijão-caupi não inoculado apresenta um valor de delta similar as plantas usadas como referência de espécies não fixadoras de nitrogênio. Observa-se uma variação nos valores de deltas entre os tratamentos inoculados de 2,50‰ a 4,98‰.

É assumido que a planta usada como referência terá enriquecimento com  $^{15}\text{N}$  similar ao do solo e tomados como base para solos brasileiros valores de 5 a 10 deltas (ALVES et al., 2005). Assim as plantas usadas como referência estão dentro de uma faixa aceitável. Outro ponto relevante é o valor assumido para B (-1,66 deltas) (BODDEY et al., 2000), já que não foi feito experimento para se chegar a este índice. NYEMBRA e DAKORA (2010) em estudo em zona agroecológica da Zambia utilizaram para o valor B -2,2‰, já BELANE e DAKORA (2009 e 2010) utilizaram -1,759‰.

Os tratamentos pré inoculados com veículo turfoso (Tabela 11) apresentaram um aumento na fixação com 18%, 31% e 48% com a inoculação no dia do plantio, 7 dias antes e 14 dias antes respectivamente e praticamente se mantendo com 35 dias antes do plantio com 45% do nitrogênio proveniente da fixação biológica de nitrogênio. Diferentemente do que ocorreu com a produtividade que decaiu linearmente com o aumento de dias após a inoculação. Em veículo polimérico a inoculação no dia do plantio proporcionou uma fixação de 26% , enquanto que com 7 dias antes foi de 41%, 14 dias antes foi de 28% e 35 dias antes de 13%. Estatisticamente o tratamento de inoculação com a turfa com 14 e 35 dias de

antecedência ao plantio foi superior ao controle absoluto, assim como a inoculação com o polímero com 7 dias de antecedência.

BRITO et al. (2009) avaliaram a contribuição da FBN em feijão-caupi comparando com feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) em experimento com vasos, tendo observado que a partir dos 31 dias o feijão-caupi já tinha atingindo um valor de FBN acima dos 70%. Ainda, foi verificado que na maturação fisiológica (78 DAS), o feijão-caupi obteve 93% do nitrogênio proveniente da fixação simbiótica, apontando o tempo maior para se atingir a máxima da fixação biológica, tendo o autor utilizado a cultivar CNC x 284-4E e plantas de arroz e soja não nodulante como plantas de referência.

Observa-se que nas variáveis massa de raiz e de nódulos analisadas anteriormente (Tabela 9), a maior massa de raiz foi obtida no tratamento inoculado com a turfa com 14 dias de antecedência, que também apresentou a maior massa de nódulos entre os tratamentos inoculados com veículo turfoso, tendo este o tratamento a maior fixação de nitrogênio via simbiótica, com 48%. Isto indica uma relação favorável entre massa de raiz e nódulos para fixação biológica de nitrogênio.

O tratamento inoculado com o polímero com 35 dias de antecedência apesar de ter apresentado a maior massa de nódulos, obteve apenas 21% do nitrogênio fixado por via simbiótica, mas por outro lado, o tratamento inoculado com o polímero com 7 dias de antecedência obteve 41% do nitrogênio fixado por via simbiótica.

O acúmulo de nitrogênio na parte aérea e a quantidade de nitrogênio fixado pela cultura apresentaram valores estatisticamente similares ao da fixação biológica com relação ao comportamento dos tratamentos.

Sabendo que em feijão-caupi por volta de 15 dias após a emergência começam a surgir os primeiros nódulos e considerando o início do processo de fixação biológica de nitrogênio a partir de 20 dias, nota-se que em apenas de 15 dias de fixação biológica o feijão-caupi apresentou uma variação entre os tratamentos inoculados de 4,4 a 16,7 kg de nitrogênio fixado ha<sup>-1</sup> (Tabela 11), já que a coleta da parte aérea foi realizada com 35 dias após a emergência. Observa-se a importância da inoculação em feijão-caupi, enquanto o tratamento inoculado com a turfa com 14 dias de antecedência atingiu 16,7 kg de nitrogênio fixado ha<sup>-1</sup>, o tratamento não inoculado não obteve nitrogênio proveniente da fixação biológica.

Em feijão-caupi a aplicação de fertilizantes nitrogenados apresenta baixa eficiência, segundo estudos que mostraram que o feijão-caupi absorveu mais N do solo e da fixação simbiótica do que de fertilizantes como ureia e sulfato de amônio (ALFAIA, 1997 e BRITO et al., 2009). Assim mesmo que o tratamento não inoculado tenha obtido uma produtividade estatisticamente similar a os demais tratamentos inoculados (Tabela 10), é possível que neste tratamento o nitrogênio absorvido seja oriundo do solo, pois nas áreas de plantio direto o teor de matéria orgânica no solo é maior, como neste experimento que o solo apresentou 34,9 g dm<sup>-3</sup> de MO e 2,1 g dm<sup>-3</sup> do próprio nitrogênio, assim esgotando este nutriente no solo. Embora ALVES et al. (2005) mostraram que o plantio direto, entre outros benefícios, parece estimular o processo simbiótico, provavelmente pela menor disponibilidade de N no solo que, de acordo KESSEL e HARTLEY (2000), se deve a maior imobilização da população microbiana do solo.

Os estudos sobre o potencial de fixação biológica de nitrogênio do feijão-caupi têm sido intensificados, mas ainda não se podem generalizar os níveis de fixação obtidos de forma pontual. UNKOVICH et al. (2010) mostraram que na Austrália o feijão-caupi teve 2% do nitrogênio derivado da fixação biológica, com apenas 1kg N fixado ha<sup>-1</sup>, mas em uma avaliação mais global de dados já publicados e dados inéditos também na Austrália foi verificada uma média de fixação de 56%, com o valor mínimo de 38% e o máximo de 74% e tendo fixado apenas 24 kg N ha<sup>-1</sup>. Estes dados confirmam a variação dos valores de fixação de nitrogênio em feijão-caupi, não podendo atribuir a cultura valor de fixação média acima de

60%. Outros trabalhos, a serem realizados, devem considerar esta variação em função da região de estudo e de características do sistema solo-planta.

Normalmente, em solos pobres em nutrientes os valores de %Ndfa chegam aos 90% e até mais. Deve-se ter em vista que o modelo de cultura tecnificada nesse estudo não é o comumente encontrado nos estudos já realizados, assim, no solo com aplicação de fertilizante nitrogenado e alto teor de matéria orgânica no solo a %Ndfa foi baixa (< 50%), e não se compara o feijão-caupi a soja. Já que a soja demanda uma quantidade de nitrogênio bem maior que o feijão-caupi, assim fazendo usos frequente da FBN para atingir as quantidades de nitrogênio requeridas. ALVES et al. (2003) mostram que em lavoura de soja com produtividades de 1,5 a 4,0 toneladas ha<sup>-1</sup> a FBN contribuiu com 70 a 350 kg ha<sup>-1</sup>, isso devido a grande quantidade de N exportado pela cultura, de até 200 kg N ha<sup>-1</sup> (ALVES et al., 2006), levando a um balanço negativo da entrada e de saída de nitrogênio no sistema. Comparativamente, a recomendação de adubação nitrogenada para feijão-caupi é de 70 kg ha<sup>-1</sup>. O teor de nitrogênio no grão de feijão-caupi é próximo de 4% e hoje a produtividade média de feijão-caupi tecnificado é de 1000 kg ha<sup>-1</sup>, logo ao final do ciclo são exportados em torno de 40 kg N ha<sup>-1</sup>.

#### 4.4 Avaliação do inoculante polimérico com diferentes estirpes na região Centro-Oeste

Observa-se na Tabela 12, que a inoculação com o conjunto das quatro estirpes obteve a maior massa de nódulos secos, diferindo da BR3267 em veículo líquido e da BR3262, levando em consideração que a BR3267 em veículo líquido foi inoculada com dose três vezes superior a usada nas estirpes em veículo polimérico. CHAGAS JÚNIOR et al. (2010) avaliaram as estirpes para feijão-caupi e encontraram o menor valor, entre as estirpes inoculadas, para a estirpe BR3262 quanto à massa de nódulos secos, corroborando esses resultados.

Na avaliação da massa de matéria da parte aérea seca, a BR3262 foi superior a BR3267 em veículo líquido, mas não diferiu da BR3267 em veículo polimérico e do consórcio das quatro estirpes recomendadas. Como em ZILLI et al. (2009), que testaram cinco estirpes (BR3267, BR3262, BR3301, BR3302 e BR3299) e observaram que a estirpe BR3262 proporcionou acúmulo da massa de matéria da parte aérea seca superior ao controle, ao passo que entre as demais estirpes, apenas a BR3267 apresentou valores iguais ao tratamento como a estirpe BR3262.

**Tabela 12.** Massa de nódulos secos, massa de raiz seca, massa de matéria da parte aérea seca (caule, ramos e folhas) e massa total (nódulos, raiz e parte aérea) de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba), 35 dias após emergência.

Tratamento	Massa nódulos secos (mg planta <sup>-1</sup> )	Massa raiz seca (mg planta <sup>-1</sup> )	Massa parte aérea seca (g planta <sup>-1</sup> )	Massa total seca (g planta <sup>-1</sup> )
BR3267 (líquido)	101,4B	612,6B	4,4B	5,1B
BR3262 (polímero)	91,4B	934,8A	5,7A	6,7A
BR3267 (polímero)	167,2BA	587,2B	4,6BA	5,3B
Consórcio (polímero)	186,8A	709,0B	5,1BA	6,0BA
CV%	64,68	22,58	27,86	22,54

Médias de dez repetições seguidas por letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de T de Student (LSD), a 5% de probabilidade.

É relevante ressaltar que a superioridade de massa de matéria da parte aérea seca pode ser consequência da superioridade de massa de raiz seca (Tabela 12) do tratamento com a BR3262 diante dos demais tratamentos. Neste caso tem-se uma relação visível com o tratamento inoculado com BR3262, que teve a menor nodulação, porém apresentou o maior crescimento radicular e conseqüentemente aumento da massa de matéria da parte aérea seca, diferindo da BR3267 em veículo líquido. Mais não diferiu da BR3267 em veículo polimérico e do consórcio das quatro estirpes.

O tratamento inoculado com BR3262 também obteve a maior massa total seca, diferindo da BR3267 tanto em inoculante líquido, quanto polimérico. Estes resultados podem indicar que o crescimento radicular aumentou a absorção e assimilação de nitrogênio e outros nutrientes aumentando o crescimento vegetativo, ou por outro passo a BR3262 mesmo com baixa nodulação apresentou alta eficiência simbiótica acarretando no alto crescimento vegetativo, como confirmado adiante na Tabela 13.

Em avaliação das estirpes recomendadas CHAGAS JÚNIOR et al. (2010) notaram que para a cultivar de feijão-caupi Nova a estirpe BR3262 foi a única que se mostrou superior quanto à massa de raiz seca, em relação ao tratamento com adubação, porém ela apresentou resultados inferiores quando comparada as outras estirpes na produtividade, assim como foi observado neste experimento (Tabela 12).

Em recente estudo ZILLI et al. 2011 avaliaram a nodulação de feijão-caupi da cultivar BRS guariba em casa de vegetação pelas estirpes recomendadas para soja: SEMIA 5079 (= CPAC 15) e SEMIA 5080 (= CPAC 7) de *Bradyrhizobium japonicum*; SEMIA 587 e SEMIA 5019 (= BR 29) de *B. elkanii*; duas das estirpes atualmente recomendadas para a cultura do feijão-caupi: SEMIA 6462 (= BR3267) de *Bradyrhizobium japonicum* e SEMIA 6464 (= BR3262) de *Bradyrhizobium elkanii*. Neste estudo constataram que as estirpes recomendadas para soja obtiveram número de nódulos similar as estirpes recomendadas para feijão-caupi, indicando capacidade destas em nodular feijão-caupi, porém as estirpes CPAC 7, CPAC 15 e BR 29 quando avaliado a eficiência nodular ficaram abaixo das estirpes recomendadas para caupi (BR3262 e BR3267), tendo que apenas a estirpe SEMIA 587 foi similar às estirpes de feijão-caupi.

Esses resultados levam a inferir que a nodulação do feijão-caupi na região Centro-Oeste pode estar sendo realizada pelas estirpes de soja, conduzindo a baixos valores de fixação biológica de nitrogênio Ndfa(%) na cultura, pois nas áreas do Centro-Oeste onde está sendo inserida a cultura do feijão-caupi, eram e são comumente cultivadas com soja e, portanto, apresentam alta densidade de rizóbios no solo com população já estabelecida (MENDES et al. 2004), devido a inoculação destas quatro estirpes recomendadas para soja, especialmente as tradicionais SEMIA 587 e a BR29. Assim não se têm uma relação de competitividade das estirpes de feijão-caupi com as de soja. A estirpe de feijão-caupi mais utilizada a BR3267 foi isolada da região Nordeste e está sendo inserida no Centro-Oeste. Em áreas de soja apesar da alta eficiência simbiótica existem dificuldades em se introduzir novas estirpes mais eficientes, em virtude da estabilização das estirpes tradicionalmente inoculadas, podendo deduzir que a inserção das estirpes de feijão-caupi também enfrentou esse problema.

Notou-se a maior produtividade em valores absolutos (Tabela 13) foi obtida pela BR3267 no veículo líquido, provavelmente em função da alta dosagem utilizada na inoculação. Os três tratamentos inoculados com o polímero apresentaram valores de produtividade muito próximos. A BR3267 no veículo polimérico mesmo com uma densidade de inoculação inferior a usada no veículo líquido ficou apenas 27,1 kg abaixo, mostrando a capacidade do veículo polimérico em manter células viáveis da inoculação até a nodulação. O fator densidade de rizóbios na inoculação é bastante relevante já que para a cultura do feijão-caupi não existe recomendação definida. A produtividade média da região Centro-Oeste é de 1000 kg ha<sup>-1</sup> assim estando estes resultados dentro da faixa aceitável para a região.

Percebe-se na Tabela 13, que o N acumulado na parte aérea no tratamento inoculado com a estirpe BR3262 foi superior ao do inoculante líquido com a estirpe BR3267 e similar ao tratamento com o consórcio e a BR3267, ambos em veículo polimérico. Assim, nota-se que o inoculante polimérico mesmo inoculado em baixa densidade de células semente<sup>-1</sup> promoveu os maiores valores de N acumulado na parte aérea. Nos parâmetros de N acumulado nos grãos, teor de N na parte aérea e nos grãos os tratamentos apresentaram valores similares.

**Tabela 13.** Teores e acúmulo de nitrogênio na parte aérea e nos grãos, mais a produtividade de grãos de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba). \*Dias após a emergência-DAE.

Tratamento	Teor N parte aérea	Teor N grãos <sup>(2)</sup>	N acumulado parte aérea	N acumulado grãos <sup>(3)</sup>	Prod. <sup>(1)</sup>
	35 *DAE	75DAE	35DAE	-----75DAE-----	
	-----(%)-	-----	--(mg planta <sup>-1</sup> )--	-----kg ha <sup>-1</sup> -----	
BR3267 (líquido)	4,77A	3,45	211,91B	33,9	982,5
BR3262 (polímero)	5,03A	3,41	292,03A	32,4	949,3
BR3267 (polímero)	4,79A	3,40	219,37BA	32,5	955,4
Consórcio (polímero)	5,06A	3,37	259,46BA	32,2	956,6
CV%	16,56		34,13		

Médias de dez repetições seguidas por letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de T de Student (LSD), a 5% de probabilidade.

<sup>(1)</sup>Produtividade baseada na produção de 1ha, sem repetições, impossibilitando o teste estatístico.

<sup>(2)</sup>Teor de N nos grãos obtido de cinco repetições, mas da coleta baseada na produção de 1ha, sem repetições, impossibilitando o teste estatístico.

<sup>(3)</sup>N acumulado nos grãos obtido a partir dos resultados (1) e (2), impossibilitando o teste estatístico.

Em áreas tecnificadas e de alto investimento como essas em que a cultura do feijão-caupi está sendo inserido no Centro-Oeste, alguns parâmetros usados em experimentos visando ao modelo de agricultura familiar não são adequados. Nessas áreas não é possível atribuir o crescimento da parte vegetativa da planta somente a nodulação, pois o nível nutricional das áreas de plantio é maior comparado com os experimentos em outras áreas, sem contar que a disponibilidade de água, seja pela chuva ou uso de irrigação, faz com que estes plantios alcance produtividades superiores a de regiões como no Nordeste, que tem a água como limitante. Assim, o crescimento da parte aérea pode não ser apenas função do nível de nodulação, e sim da relação de raiz e nódulo, contribuindo para aporte de nutrientes para a parte aérea.

Apesar da correlação observada entre raiz e parte aérea, percebe-se que o tratamento com a estirpe BR3262 foi superior aos demais quanto à massa de raiz e gerou maior massa da parte aérea, mas obteve a menor produtividade entre os tratamentos. Esse resultado mostra que o desenvolvimento vegetativo do feijão-caupi não necessariamente aumenta a sua produtividade, assim a eficiência relativa de muitas estirpes avaliadas com relação à parte aérea não significa que estas promoveram um aumento de produtividade.

Por outro lado a disponibilidade de nutrientes no solo em níveis adequados, como K (potássio) com 128 mg dm<sup>-3</sup>, P (fósforo) com 7,79 mg dm<sup>-3</sup>, somatório de Ca (cálcio) e Mg (magnésio) com 3,83 mmolc dm<sup>-3</sup> e matéria orgânica com 25,5 g dm<sup>-3</sup> contribuem para o desenvolvimento vegetativo da cultura. Uma vez que o P auxilia na nodulação pela transferência de energia na forma de ATP e no aumento no número de pêlos radiculares proporcionando mais sítios de infecção para a bactéria (OKELEYE e OKELANA, 1997). Quando presente em níveis insuficientes, é capaz de comprometer a eficiência da associação

simbiótica (FREIRE FILHO et al., 2005), enquanto que a deficiência de K afeta a fotossíntese e, conseqüentemente, o fornecimento de fotossintatos da planta para a bactéria, limitando a nodulação e a fixação simbiótica do nitrogênio (DUKE e COLLINS, 1985).

Na Tabela 14, referente à FBN mensurada pela técnica da abundância natural do  $^{15}\text{N}$ , percebe-se que a mesma planta (Pé de galinha- *Elseusine indica*) tem valor de delta inferior ao experimento de Sinop- MT, com 5,101 ‰. No experimento de Primavera do Leste- MT (Tabela 14) a planta usada como referência pode ter subestimado a fixação da planta teste, uma vez que esta planta *Elseusine indica* foi usada como referência na mensuração da FBN em cana de açúcar em Minas Gerais, em que apresentou valor de delta de 7,66 (BODDEY et al., 2001). É evidente que essa variação nos valores de delta da planta de referência pode ser apenas uma variação do próprio solo.

O N disponível no solo apresenta menor enriquecimento com  $^{15}\text{N}$ , pois a planta de referência apresenta valores de  $\delta^{15}\text{N}$  inferiores ao encontrado em Sinop. No entanto, todos os tratamentos indicam diluição isotópica, conseqüentemente ocorreu fixação de nitrogênio via simbiótica. Apesar de que o tratamento inoculado com a estirpe BR3267 em veículo polimérico apresentou um valor de  $\delta^{15}\text{N}$  estatisticamente similar ao da planta de referência.

Nota-se que a BR3267 testada em dois veículos de inoculação (líquido e polimérico) e inoculada em duas densidades, inoculante líquido (300 ml/ 50 kg semente) e inoculante polimérico (100 ml/ 50 kg semente) apresentou resultados diferentes. A inoculação com a BR3267 em veículo líquido apresentou fixação biológica de N de 27% (Tabela 14), isto provavelmente pela alta densidade de inoculação utilizada. Enquanto, que quando inoculada com a densidade de 100 ml ha<sup>-1</sup> (100 ml/ 50 kg semente), dose três vezes inferior à usada com o inoculante líquido, fixou de forma biológica apenas 11% do N (Tabela 14), indicando que está estirpe pode ser sensível a densidade de inoculação. Mais de acordo a Tabela 11, também se comprova que a inoculação para feijão-caupi é necessária para a produção em sistemas tecnificados, tendo em vista que o tratamento não inoculado não apresentou fixação biológica de nitrogênio.

**Tabela 14.** Delta  $\delta^{15}\text{N}$  (‰), nitrogênio proveniente da FBN (%Ndfa), nitrogênio derivado da FBN na parte aérea e nitrogênio fixado (kg ha<sup>-1</sup>) de plantas de feijão-caupi (BRS Guariba), 35 dias após a emergência.

Tratamento	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	Ndfa(%)	N derivado FBN parte aérea (mg planta <sup>-1</sup> )	kg ha <sup>-1</sup> N fixado
BR3267 (polímero)	4,32B	11C	26,55B	6,4B
BR3262 (polímero)	2,43A	39A	108,61A	26,0A
BR3267 (líquido)	3,28A	27B	56,30B	13,5B
Consórcio (polímero)	2,59A	37BA	96,06A	23,0A
Planta de Referência $\delta^{15}\text{N}$ (‰)				
Pé de galinha ( <i>Eleusine indica</i> ) <sup>1</sup> 5,10B				
CV%	19,45	28,93	35,23	35,23

Médias seguidas por letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Sementes inoculadas com a BR3267 com inoculante polimérico e líquido. E inoculação com a BR3262 e com o consórcio com o inoculante polimérico em Primavera do Leste- MT.

Por outro lado, mesmo os tratamentos inoculados com a densidade de 100 ml ha<sup>-1</sup> (100 ml/ 50 kg semente), dose três vezes inferior à usada com o inoculante líquido, obtiveram os maiores valores Ndfa(%), 39% com a inoculação da BR3262 e 37% com a inoculação do consórcio das quatro estirpes recomendadas, confirmando que esta estirpe de *B. elkanii* a priori (BR3262) e o conjunto podem ser utilizados para inoculação na região Centro-Oeste e não foram sensíveis a densidade de inoculação.

A variação nos valores de Ndfa(%) em feijão-caupi é evidente. BELANE e DAKORA (2009) avaliaram 30 genótipos de feijão-caupi em Ghana no ano de 2005, usando a abundância natural de  $\delta^{15}\text{N}$  com plantas de 46 DAP e encontraram variação de 7,91% a 58,2%, porém quando analisados em 2006, com 15 genótipos com plantas de 72 DAP, a variação foi de 55,7% a 89%. Apesar de não ser um aspecto bem estudado ainda, não só a idade da planta na avaliação pode influenciar diretamente nos resultados de fixação, mais o componente raiz também. Neste mesmo trabalho de BELANE e DAKORA (2009) uma das cultivares utilizadas na avaliação aos 46 DAP obtiveram 25,3% do Ndfa na parte aérea e na raiz com 76,1%, já com 72 DAP a fixação na parte aérea passou para 89% e na raiz foi para 7,8%, isto indica que a taxa de fixação biológica da raiz pode influenciar os resultados de fixação da parte aérea.

Em Primavera do Leste os tratamentos inoculados com a BR3262 e o conjunto de estirpes apresentaram maior massa de raiz e, conseqüentemente, foram os que mais fixaram nitrogênio via simbiótica. BELANE e DAKORA (2010) encontraram para plantas de feijão-caupi com 46 DAP variação de 63,51% a 86,7%; já aos 67 DAP a variação foi de 56,2% a 96,3%. BELANE e DAKORA (2011) evidenciaram na avaliação de cultivares que existe correlação positiva ao avaliar o N fixado via simbiótica e o carbono fixado via fotossíntese, como indicador do uso eficiente de carbono e nitrogênio, já que as bactérias nos nódulos são dependentes do transporte de fotossimilados da parte aérea para as raízes e para os nódulos.

A quantidade de nitrogênio fixado ha<sup>-1</sup> no sistema, mostra que mesmo a avaliação sendo realizada com apenas de 15 dias de fixação biológica, conforme discutido anteriormente, os tratamentos inoculados já indicam fixação. O tratamento inoculado com a BR3262 e o consórcio das quatro estirpes recomendadas foram superiores estatisticamente, chegando a fixar 26 kg ha<sup>-1</sup> e 23 kg ha<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 14). De acordo a Tabela 13, o N acumulado nos grãos e que conseqüentemente foi exportado do sistema ficou entre 32 e 34 kg ha<sup>-1</sup>, confirmando que apesar de primariamente esta gerando um balanço negativo no sistema, a tendência é que a fixação biológica ultrapasse os 35 kg ha<sup>-1</sup> de N fixado, gerando um balanço positivo.

O sistema de plantio direto adotado na propriedade mais o fato que a cultura anterior foi arroz podem interferir nos resultados. Apesar de ALVES et al. (2005) mostraram que o plantio direto estimula o processo simbiótico, pela menor disponibilidade de N no solo, devido a maior imobilização da população microbiana do solo, provocado pela menor movimentação e aeração. Neste experimento o solo apresentou 25,5 g dm<sup>-3</sup> de MO e 1,2 g dm<sup>-3</sup> do próprio nitrogênio, levando a inferir que as plantas podem limitar a fixação biológica em uma preferência de obtenção de N via solo, já que o mesmo não é limitante no solo. E ao mesmo tempo é possível que o <sup>15</sup>N quantificado no feijão-caupi tenha sido obtido via solo, pois no ciclo natural do nitrogênio o <sup>15</sup>N é último a sair do sistema em função de sua massa e sabendo que a cultura anterior foi arroz que também se beneficia de fixação biológica. De acordo CAMPOS et al., 2003 alguns genótipos chegam a 30% do nitrogênio oriundo da fixação biológica, assim este material vegetal repostado ao solo poderá enriquecer o solo com nitrogênio na forma de <sup>15</sup>N.

Não se pode afirmar que nestas áreas de plantio direto, onde o sistema favorece a simbiose, que a FBN na cultura do feijão-caupi atingirá níveis acima de 60% do nitrogênio oriundo da fixação biológica, pois nestes solos com alto teor de matéria orgânica e nitrogênio,

as plantas poderam optar em obter N via solo. Porém a inoculação permitirá tanto o aumento de produtividade quanto manter o nível de nitrogênio no sistema, para não gerar um balanço negativo de entrada e saída de N. Como, por exemplo, NYEMBRA e DAKORA (2010), em estudo em zona agroecológica central da Zâmbia, um sistema estabilizado, encontraram que o feijão-caupi fixou de forma biológica 35,4 kg N ha<sup>-1</sup>, com 58,5% do nitrogênio oriundo da fixação biológica. Assim indicando que em sistemas onde o nitrogênio não seja o fator limitante a porcentagem de N oriundo da fixação biológica será reduzida em função principalmente do teor de matéria orgânica e do próprio N no solo.

PULE-MEULENBERG et al. (2010) avaliaram nove genótipos de feijão-caupi e em Ghana encontraram valores de fixação biológica variando de 69,3% a 86,6%, para coleta aos 46 DAP. Já, quando os autores avaliaram estes genótipos na África do Sul a variação foi de 59,3% a 92,9%, para coleta aos 46 DAP. Porém apesar de algumas cultivares apresentarem alta fixação biológica de nitrogênio, estas possuem média produtividade. Em Ghana, a cultivar com a maior fixação biológica (86,6%), obteve uma produtividade de 791,2 kg ha<sup>-1</sup> e na África do Sul, por exemplo, uma cultivar com fixação biológica de 72,6%, rendeu uma produtividade de apenas 512,1 kg ha<sup>-1</sup>.

A cultivar BRS guariba tem atingido alta produtividade comparada a média nacional, porém os valores de fixação biológica de nitrogênio estão abaixo de 50% (Tabela 11 e 14). O que pode ser explicado pelo tempo da avaliação, a cultivar e a capacidade dos solos em fornecerem o nitrogênio necessário para o ciclo da cultura. A capacidade de fixação biológica de nitrogênio pelas cultivares de feijão-caupi deve ser levada em consideração junto com o potencial produtivo. A cultivar utilizada nestes experimentos (BRS Guariba) é recomendada para o âmbito nacional tendo em nível de campo uma produtividade média de 1000 kg ha<sup>-1</sup> como encontrado no experimento de Primavera do Leste, que reflete o cenário de produção do Centro-Oeste.

Conforme observado por NEVES e RUMJANEK (1997) a espécie *B. japonicum* contribui para maior acúmulo de N. PAUFERRO et al. (2010) observaram em quatro cultivares de soja com as estirpes separadas, SEMIA 5080 (*B. japonicum*) e SEMIA 5019 (*B. elkanii*), que quando avaliadas quanto %Ndfa e quantidade N na planta provindo da FBN a inoculação com *B. japonicum* foi superior a inoculação com *B. elkanii*. Mas nota-se que nestes experimentos de feijão-caupi os maiores valores de fixação simbiótica de N foram obtidos com a BR3262, que é aparentemente da espécie *B. elkanii* (Tabela 14), não confirmando o que é encontrado por alguns autores, que atribuem à espécie *B. elkanii* apenas a característica de maior capacidade de competir contra estirpes nativas e ocupar os nódulos (BODDEY e HUNGRIA, 1997; NEVES e RUMJANEK, 1997). Por outro lado os dados corroboram estudo de ZILLI et al. (2006), que não encontrou diferença entre as estirpes *Bradyrhizobium elkanii* ou *Bradyrhizobium* sp. quanto a eficiência simbiótica e a capacidade de ocupação nodular.

A variação da %Ndfa nos experimentos de Sinop e Primavera do Leste (Tabela 11 e 14) confirma HERRIDGE et al. (2008), que encontraram na cultura do feijão-caupi valores desde 8 a 97% de nitrogênio oriundo da fixação biológica, sendo que nesse estudo o valor mínimo encontrado foi de 4% e o máximo de 48%. Esta variação pode ser em função da presença de nitrogênio no solo inibindo a FBN, a data exata da coleta e a relação entre a cultivar e a bactéria utilizada.

## 5 CONCLUSÕES

O inoculante polimérico com o veículo IPC 2.2 obteve uma produtividade estatisticamente superior ao controle absoluto e similar as tecnologias já recomendadas, podendo ser recomendado para inoculação das estripes de feijão-caupi.

A prática agrícola da pré inoculação mostrou-se viável em laboratório com a utilização do inoculante polimérico, porém ainda são necessários mais estudos para se recomendar a prática no campo.

A prática agrícola da pré inoculação com inoculante turfoso resultou em uma redução linear da produtividade em função do aumento de dias do plantio após a inoculação.

No experimento de pré inoculação as maiores produtividades foram obtidas com a inoculação com inoculante polimérico no dia do plantio ( $1585,2 \text{ kg ha}^{-1}$ ) e com 35 dias com antecedência ( $1549,8 \text{ kg ha}^{-1}$ ).

A quantificação do nitrogênio oriundo da FBN em feijão-caupi na região Centro-Oeste, com 35 dias após o plantio não ultrapassou os 50% Ndfa.

Diante dos resultados da quantificação da fixação biológica de nitrogênio a inoculação mostra-se uma prática necessária para o Centro-Oeste, visto que quando as sementes não foram inoculadas, as plantas não obtiveram fixação biológica de nitrogênio.

A inoculação com a estirpe BR3262 e o conjunto das quatro estirpes recomendadas, possibilitaram com apenas 15 dias do processo de fixação biológica de nitrogênio uma entrada no sistema de mais  $20 \text{ kg ha}^{-1}$  de nitrogênio.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A maior parte dos trabalhos realizados no Brasil se limita ao estudo de parâmetros como o número e massa de matéria seca de nódulos, massa de matéria seca da parte aérea, teor de nitrogênio e produtividade. Porém, na estimativa dos valores para a contribuição da FBN, nas áreas de Cerrado comumente cultivadas com soja inoculada podem ocorrer problemas de nodulação cruzada. Estirpes recomendadas para soja, que se encontram em alta densidade no solo, em virtude dos anos de inoculação, podem nodular o feijão-caupi.

Este fato foi averiguado por ZILLI et al. (2011), em estudo com inoculação em casa de vegetação. As estirpes recomendadas para a soja nodularam o feijão-caupi e foram similares as estirpes recomendadas para feijão-caupi quanto ao número e massa de matéria seca de nódulos, também a massa de matéria seca da parte aérea, N-total e quanto à eficiência nodular. Apesar das estirpes SEMIA 5080 e SEMIA 5079 apresentarem baixa eficiência, a SEMIA 587 apresentou eficiência de FBN na cultura do feijão-caupi semelhante à das estirpes SEMIA 6463 e SEMIA 6462.

Diante das avaliações feitas e das características da agricultura no Centro-Oeste, recomenda-se o uso da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e identificação sorológica (ELISA) para confirmar se as estirpes de feijão-caupi estão ocupando os sítios de nodulação de forma satisfatória, uma vez que os solos apresentam alta densidade de rizóbios recomendados para soja, também capazes de nodular o feijão-caupi, porém com baixa eficiência.

Deve se continuar a quantificar a quantidade de nitrogênio oriundo da FBN em feijão-caupi (%Ndfa) em número maior de cultivares, em outros sistemas de produção com o feijão-caupi e em estados fisiológicos diferentes da planta, com ênfase para a maturação.

A prática agrícola de pré inoculação deve ser mais estudada, em especial sobre o comportamento das bactérias nas duas primeiras semanas e a compatibilidade destas com a aplicação de fungicidas. Devendo ser feita uma recuperação de rizóbios nas sementes inoculadas avaliando tratamentos com e sem presença de fungicida.

O uso de inoculante é extremamente necessário para a produção do feijão-caupi e diante da escassez do uso da turfa como veículo, o inoculante polimérico é uma tecnologia essencial para ser usada no Brasil e em países com baixa tecnologia, como a África do Sul origem do feijão-caupi, sendo esta tecnologia de fácil reprodução e manipulação, sem gerar subprodutos danosos ao homem e ao ambiente.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBAREDA, M.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, D. N.; CAMACHO, M. TEMPRANO, F. J. Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: Solid and liquid formulations. **Soil Biology & Biochemistry** v. 40, n.11, p. 2771-2779, nov. 2008.
- ALFAIA, S. S. Destino de fertilizantes nitrogenados ( $^{15}\text{N}$ ) em um Latossolo Amarelo cultivado com feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.). **Acta Amazônica**, 27: 65-72, 1997.
- ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant Soil**, 252:1-9, 2003.
- ALVES, B. J. R.; ZOTARELLI, L.; FERNANDES, F. M.; HECKLER, J. C.; MACEDO, R. A. T.; BODDEY, R. M.; JANTALIA, C. P.; URQUIAGA, S. Fixação biológica de nitrogênio e fertilizantes nitrogenados no balanço de nitrogênio em soja, milho e algodão. **Pesq. agropec. bras.** Brasília, v.41, n.3, p.449-456, mar. 2006.
- ALVES, B. J. R.; ZOTARELLI, L.; JANTALIA, C. P.; BODDEY, R. M. & URQUIAGA, S. Emprego de isótopos estáveis para o estudo do carbono e nitrogênio no sistema solo planta. In: AQUINO, A. M. & ASSIS, R. L., orgs. **Processos biológicos no sistema solo-planta: Ferramentas para uma agricultura sustentável.** Brasília, Embrapa/Informação Tecnológica, 2005. v.1. p.343-368.
- ANDRADE JÚNIOR, A. S.; SANTOS, A. A.; SOBRINHO, C. A.; BASTOS, E. A.; MELO, F. B.; VIANA, F. M. P.; FREIRE FILHO, F. R.; CARNEIRO, J. S.; ROCHA, M. M.; CARDOSO, M. J.; SILVA, P. H. S.; RIBEIRO, V. Q. Cultivo de feijão-caupi. Terezina: Embrapa Meio-Norte, 2003. (**Embrapa Meio-Norte, Sistemas de Produção, 2. Versão eletrônica julho/2003**). Disponível em: <http://www.cpamn.embrapa.br/pesquisa/graos/FeijaoCaupi/index.htm>.
- ARRUDA, J. S.; LOPES, N. F.; BACARIN, M. A. Nodulação e fixação do dinitrogênio em soja tratada com sulfentrazone. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 325-330, fev. 2001.
- BELANE, A. K.; DAKORA, F. D. Measurement of  $\text{N}_2$  fixation in 30 cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) genotypes under field conditions in Ghana using  $^{15}\text{N}$  natural abundance technique. **Symbiosis**, 48: 47-56, 2009.
- BELANE, A. K.; DAKORA, F. D. Photosynthesis, symbiotic N and C accumulation in leaves of 30 nodulated cowpea genotypes grown in the field at Wa in the Guinea savanna of Ghana. **Field Crops Research** 124: 279-287, 2011.
- BELANE, A. K.; DAKORA, F. D. Symbiotic  $\text{N}_2$  fixation in 30 field-grown cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) genotypes in the Upper West Region of Ghana measured using  $^{15}\text{N}$  natural abundance. **Biol Fertil Soils**, 46:191-198, 2010.
- BOARETTO, A. E.; TRIVELIN, P. C. O.; MURAOKA, T. Uso de isótopos como traçadores em fertilidade do solo e nutrição de plantas. CENA-USP, 75p. FERTIBIO, 2004.
- BODDEY R. M. Methods for the quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. **Critical Reviews in Plant Sciences**. 6: 209-266. 1987.
- BODDEY R. M.; MULLER, S. H.; ALVES B. J. R. Estimation of the contribution of biological  $\text{N}_2$  fixation to two *Phaseolus vulgaris* genotypes using simulation of plant nitrogen uptake from  $^{15}\text{N}$ -labelled soil. **Fertilizer Research**, Dordrecht, v. 45, p. 169-185, 1996.

- BODDEY R. M.; PEOPLES M. B.; PALMER B.; DART P. J. The use of  $^{15}\text{N}$  natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, 57:235–270, 2000.
- BODDEY R. M.; POLIDORO J. C.; RESENDE A. S.; ALVES B. J. R.; URQUIAGA S. Use of the  $^{15}\text{N}$  natural abundance technique for the quantification of the contribution of  $\text{N}_2$  fixation to sugar cane and other grasses. **Australian Journal of Plant Physiology**, 28:889–895. 2001.
- BODDEY, R. M.; HUNGRIA, M. Phenotypic grouping of Brazilian *Bradyrhizobium* strains which nodulate soybean. **Biology and Fertility of Soils**, v.25, p.407-415, 1997.
- BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C. D. E.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Field application of the  $^{15}\text{N}$  isotope dilution technique for the reliable quantification of plant-associated biological nitrogen fixation. **Fertilizer Research**, 42: 77–87. 1995.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 13, de 24 de março de 2011. **Aprovar as normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura, bem como as relações dos micro-organismos autorizados e recomendados para produção de inoculantes no Brasil, na forma dos Anexos I, II e III, desta Instrução.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 25 de mar. 2011. Seção 1. p.3-7.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 30, de 12 de novembro de 2010. **Estabelecer os métodos oficiais para análise de inoculantes, sua contagem, identificação e análise de pureza na forma desta Instrução Normativa.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 17 de nov. 2010. Seção 1. p.4-10.
- BRITO, M. M. P.; MURAOKA, T.; SILVA, E. C. Marcha de absorção do nitrogênio do solo, do fertilizante e da fixação simbiótica em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. walp.) e feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) determinada com uso de  $^{15}\text{N}$ . **R. Bras. Ci. Solo**, 33:895-905, 2009.
- BUCHER, C. A.; REIS, V. M. **Biofertilizante contendo bactérias diazotróficas.** Seropédica, RJ, Embrapa Agrobiologia, 2008. 17 p. (Embrapa-Agrobiologia. Documentos 247).
- BURRIS R. H.; MILLER C. E. Application of  $^{15}\text{N}$  to the study of biological nitrogen fixation. **Science**, 93:114–115, 1941.
- BUZETTI, S. Estirpes de *Rhizobium tropici* na inoculação do feijoeiro. **Scientia Agrícola**. v.57 (3) 507–512, 2000.
- CAMPOS, D. V. B.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; SEGUNDO, U. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio para a cultura de arroz sob inundação. **Agronomia**, vol. 37, nº 2, p. 41 - 46, 2003.
- CASTRO, C. M.; ALVES, B. J. R.; ALMEIDA, D. L.; RIBEIRO, R. L. D. Adubação verde como fonte de nitrogênio para a cultura da berinjela em sistema orgânico. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.39, n.8, p.779-785, 2004.
- CHAGAS JUNIOR, A. F.; RAHMEIER, W.; FIDELIS, R. R.; SANTOS, G. R.; CHAGAS, L. F. B. Eficiência agrônômica de estirpes de rizóbio inoculadas em feijão-caupi no Cerrado, Gurupi-TO. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 41, n. 4, p. 709-714, out-dez, 2010.

- CHALK, P. M. Estimation of N<sub>2</sub> fixation by isotope dilution: an appraisal of techniques involving <sup>15</sup>N enrichment and their application. **Soil Biology and Biochemistry**, 17: 389-410. 1985.
- COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; MARTINS, L. V.; AMARAL, F. H. C.; MOREIRA, F. M. S. Nodulação e produtividade de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. por cepas de rizóbio em Bom Jesus, PI. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 1, p. 1-7, jan-mar, 2011.
- COSTA, J. V. T.; LIRA JUNIOR, M. A.; FERREIRA, R. L. C.; STAMFORD, N. P.; ARAÚJO, F. A. S. Desenvolvimento de nódulos e plantas de caupi (*Vigna unguiculata*) por métodos destrutivo e não destrutivo. **Revista Caatinga, Mossoró**, v.19, p.11-19, 2006.
- DAMASCENO e SILVA, K. J. Estatística da produção de feijão-caupi. Portal do agronegócio, 2009. Disponível em: < <http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=34241> >. Acesso em 25 jun. 2011.
- DEAKER, R.; ROUGHLEY, R.J.; KENNEDY, I.R. Legume seed inoculation technology—a review. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 36, p.1275–1288, 2004.
- DELGADO, G. C. A questão agrária no Brasil: 1950-2003. In: JACCOUD, L. (Org.). **Questão Social e Políticas Sociais no Brasil Contemporâneo**. Brasília, DF: Ipea, 2005. p. 51-90.
- DUKE, S. H.; COLLINS, M. Role of potassium in legume dinitrogen fixation. In: MUNSON, R. D. (Ed.) Potassium in agriculture. Madison: **American Society of Agronomy**, 1985. p. 443-465.
- EMBRAPA MEIO NORTE. Sistemas de Produção, 2. Cultivo de Feijão-Caupi. Versão eletrônica, 2003. Disponível em: [www.embrapa.br/sistemas de produção/feijão-caupi](http://www.embrapa.br/sistemas_de_producao/feijao-caupi). Acesso em 15 jun. 2011.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ). **Manual de métodos de análise de solos**. 2. ed. rev. atual. Rio de Janeiro, 1997. 212p. (EMBRAPACNPS. Documentos, 1).
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – **Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil**. Londrina, Embrapa Soja/Embrapa Cerrados/Embrapa Agropecuária Oeste, 2008. 280p. (Sistema de Produção, 12)
- EMBRAPA. Safra recorde de feijão-caupi no Mato Grosso, 2009. Disponível em [www.embrapa.br/noticias/ Safra recorde de feijão-caupi no Mato Grosso](http://www.embrapa.br/noticias/Safra_recorde_de_feijao-caupi_no_Mato_Grosso). Acesso em 15 jun. 2011.
- FAO. 2008. FAOSTAT Agricultural Database. Disponível em: <http://faostatfao.org/>. Acesso em: 11 mar. 2012.
- FERNANDES JÚNIOR, P. I. Composições Poliméricas a Base de Carboximetilcelulose (CMC) e Amido como Veículos de Inoculação de Rizóbio em Leguminosas. **Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo)** – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 43 p. Seropédica, 2006.
- FERNANDES JÚNIOR, P. I.; GUSMÃO, T. R.; PAULO JANSEN, P, O.; XAVIER, G. R. and RUMJANEK, N. G. Polymers as carriers for rhizobial inoculant formulations. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.44, n.9, p.1184-1190, set. 2009.
- FERNANDES JÚNIOR, P. I.; SILVA JÚNIOR, E. B.; SILVA JÚNIOR, S.; SANTOS, C. E. R. S.; OLIVEIRA, P. J.; RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.

- Performance of polymer compositions as carrier to cowpea rhizobial inoculant formulations: Survival of rhizobia in pre-inoculated seeds and field efficiency. **African Journal of Biotechnology**. Vol. 11(12), pp. 2945-2951, 9 fev, 2012.
- FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 38, p.835-842, 2003.
- FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v.6, p.36- 41, 2008.
- FRANCO, M. C.; CASSINI, S. T. A.; OLIVEIRA, V. R.; VIEIRA, C. & TSAI, S.M. Nodulação em feijão dos conjuntos gênicos andino e meso-americano. **Pesq. Agropec. Bras.**, 37:1145-1150, 2002.
- FREIRE FILHO, F. R.; Lima, J. A. de A.; Silva, P. H. S. da; Viana, F. M. P. 2005. **Fixação Biológica de Nitrogênio**. (Org.). 335p.
- FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q. Prefácio. In: FREIRE FILHO, F.R; LIMA, J. A. A. & RIBEIRO, V. Q. (Ed). Feijão-Caupi – **Avanços tecnológicos**. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, 2005. 519p.
- FREIRE FILHO, F. R.; ROCHA, M. de M.; BRIOSO, P.S.T.; RIBEIRO, V.Q. BRS Guariba: a white grain cowpea cultivar for the Brazilian Mid-North Region. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.6, p.175-176, 2007.
- FREIRE FILHO, F.R.; RIBEIRO, V. Q.; BARRETO, P. D.; SANTOS, C. A. **Melhoramento genético do caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp.) na região do Nordeste**. In: WORKSHOP, 1998. [S.1.]: Embrapa Semi-Árido, 1998.
- GUALTER, R. M. R. Efeito da Inoculação com Diferentes Estirpes de Rizóbio na Nodulação, Fixação Biológica de Nitrogênio e na Produtividade em Feijão-Caupi – 2010. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-graduação em Agronomia.
- GUALTER, R. M. R.; BODDEY, R. M.; RUMJANEK, N. G.; FREITAS, A.C.R e XAVIER, G. R. Eficiência agronômica de estirpes de rizóbio em feijão-caupi cultivado na região da Pré-Amazônia maranhense. **Pesq. agropec. bras.**, v.46, n.3, p.303-308, mar. 2011.
- GUEDES, G. N.; SOUZA, A. S.; ALVES, L. S. Eficiência agronômica de inoculantes em feijão-caupi no município de pombal – PB. **Revista Verde** (Mossoró – RN – Brasil) v.5, n.4, p. 82 - 96 outubro/dezembro de 2010. <http://revista.gvaa.com.br>.
- HARDARSON, G.; DANSO, S.K.A. & ZAPATA, F. Dinitrogen fixation measurements in alfalfa-ryegrass swards using nitrogen-15 and influence of the reference crop. **Crop Sci.**, 28:101-105, 1988.
- HERRIDGE, D. F.; BERGERSEN, F. J.; PEOPLES, M. B. Measurement of nitrogen fixation by soybean in the field using the ureide and natural <sup>15</sup>N abundance methods. **Plant Physiol.** 93: 708–716, 1988.
- HERRIDGE, D. F.; PEOPLES, M. B.; BODDEY, R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant Soil**, 311:1–18, 2008.
- HERRIDGE, D. F. Use of the ureide technique to describe the nitrogen economy of fields-grown soybeans. **Plant Physiology**, Rockville, v. 70, n. 1, p. 7-11, 1982.

HUNGRIA, M.; NEVES, M. C. P.; VICTORIA, R. L. Assimilação do nitrogênio pelo feijoeiro. I. Atividade da nitrogenase, da nitrato redutase e transporte do nitrogênio na seiva do xilema. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 9, n. 3, p. 193-200, 1985.

HUNGRIA, M.; BARRADAS, C.A. & VALLSGROVE, R.M. Nitrogen fixation, assimilation and transport during the initial growth stage of *Phaseolus vulgaris* L. **J. Exper. Bot.**, 42:839-844, 1991.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. **Londrina: Embrapa Soja**, 2007. 80p.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R. & PERES, J. R. R. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAUJO, R. S. & HUNGRIA, M., eds. **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1994. p.9-89.

IKUTA, N. Desenvolvimento de métodos de identificação e quantificação de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1995. 90 p. **Tese de doutorado**.

IPEA– Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. **Disponível em:** <<http://www.ipea.gov.br/Destaques/brasil/CapV.pdf>>. Acesso em: 11 mar. 2012.

JUNG, G.; MUGNIER, J. Polymer-entrapped *Rhizobium* as an inoculant for legumes. **Plant and Soil**. v. 65: 219-231, 1982.

JUNK, G.; SVEC, H.; V. The absolute abundance of the nitrogen isotopes in the atmosphere and compressed gas from various sources. **Geo Cosmo Acta**, 14:234–243, 1958.

KÄISTNER, U., HOFFMANN, H., DÖNGES R. AND HILBIG, J. Structure and solution properties of sodium carboxymethyl cellulose, *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Asp.* **123-124**. 307-328, 1996.

KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. T. M. A.; KECSKÉS, M. L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biology and Biochemistry**, London, v. 36, p. 1229- 1244, 2004.

KESSEL, C. V; HARTLEY, C. Agricultural management of grain legumes: has it led to an increase in nitrogen fixation? **Field Crops Research**, v.65, p.165-181, 2000.

KIM, H.S.; KAMARA, B.J.; GOOD, I.C. ENDERS JUNIOR, G.L. Method for the preparation of stabile microencapsulated lactic acid bacteria. **Journal of Industrial Microbiology**. v. 3: 253–257, 1988.

KONING, C.; VAN DUIN, M.; PAGNOULLE, C.; JEROME, R. Strategies for compatibilization of polymer blends. **Progress in Polymer Science**. v. 23: 707- 757, 1998.

LACERDA, A.M.; MOREIRA, F.M.S.; ANDRADE, M.J.B.; SOARES, A.L.L. Yield and nodulation of cowpea inoculated with selected strains. **R. Ceres**, 51:67-82, 2004.

LEITE, J.; MARTINS, L. M. V.; OLIVEIRA, W. S.; SANTOS, N. T.; PINHEIRO, C. M.; SAMPAIO, A. A.; XAVIER, G. R. Evidência de Dispersão de Rizóbio via Sementes de Feijão-Caupi Comercializadas em Feiras Populares: Resultados Preliminares. **Rev. Bras. De Agroecologia/nov**. Vol. 4 Nº. 2, 2009.

- LIMA, E. V.; MORAIS, O. M.; TANAKARA, R. & GRASSI FILHO, H. Adubação NK no desenvolvimento e na concentração de macronutrientes no florescimento do feijoeiro. **Scientia Agrícola**, v.58, m. 1, p.125-129, 2001.
- LIU, H. L.; YANG, T. C. K. Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus helveticus* by ZnO and TiO<sub>2</sub> activated with ultraviolet light. **Process Biochemistry**. v. 39: 475- 481, 2003.
- MAPA de solos do Brasil. Rio de Janeiro: **IBGE: Embrapa Solos**, 2001. 1 Mapa. Escala 1:5.000.000.
- MARIOTTI, A.; GERMON, G.; HUBERT, C.; KAISER, P.; LÉTOLLE P. R.; TARDIEUX, A.; TARDIEUX, P. Experimental determination of nitrogen kinetic isotope fraction: some principle; illustrations for the denitrification and nitrification processes. **Plant Soil** 62:413–430, 1981.
- MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. **Soil Biol and Biochemistry**. 29:1005–1010, 1997.
- MARTINS, L. M.; XAVIER, G. R.; RANGEL, F. W.; RIBEIRO; J. R. A.; NEVES, M. C. P.; MORGADO, L. B.; RUMJANEK, N. G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v.38, p.333–339, 2003.
- MARTINS, L.M.V. **Características ecológicas e fisiológicas de rizóbio que nodula caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) isolados a partir de solos da região Nordeste do Brasil**. 1996. 213p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- MASKEY S.; BHATTARAI S. L; PEOPLE M. B.; HERRIDGE D. F.; On-farm measurements of nitrogen fixation by winter and summer legumes in the Hill and Terai regions of Nepal. **Field Crops Res**, 70:209–221, 2001.
- MELO, S. R. e ZILLI, J. E. Fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijão-caupi recomendadas para o estado de Roraima. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.44, n.9, p.1177-1183, set. 2009.
- MENDES, I. C.; REIS JUNIOR, F. B.; HUNGRIA, M.; SOUSA, D. M. G. & CAMPO, R. J. Adubação nitrogenada suplementar tardia em soja cultivada em Latossolos do Cerrado. **Pesq. Agropec. Bras.**, 43, 1053-1060, 2008.
- MENDES, I. C.; HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Establishment of *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains in a Brazilian Cerrado oxisol. **Biol Fertil Soils**. 40: 28–35, 2004.
- MILES, A. A.; MISRA, S. S. The estimation of the bacterial power of the blood. **Journal of Hygiene**. v.38: 732–749, 1938.
- MIRANDA, C. H. B.; VIEIRA, A.; CADISCH, G. Determinação da Fixação Biológica de Nitrogênio no Amendoim Forrageiro (*Arachis* spp.) por Intermédio da Abundância Natural de <sup>15</sup>N. **R. Bras. Zootec.** v.32, n.6, p.1859-1865, 2003 (Supl. 2)
- MOREIRA, F. M. S. Bactérias fixadoras de nitrogênio. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. & BRUSSAARD, L., eds. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2008. p.631-680.

- MOREIRA, F. M. S. Estirpes de bactérias altamente eficientes que fornecem nitrogênio para o caupi foram selecionadas na UFLA e já são recomendadas para a produção de inoculantes comerciais. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2005. 16p. Disponível em: <www.ufla.br/editora/publicações/boletim de extensão>. (**Boletim de Extensão da UFLA**). Acesso em: 06 jan. 2012.
- NASCIMENTO, C. S.; LIRA JR, M. A.; STAMFORD, N. P.; FREIRE, M. B. G. S & SOUSA, C. A. Nodulação e produção do caupi (*vigna unguiculata* L. walp) sob efeito de plantas de cobertura e inoculação. **R. Bras. Ci. Solo**, 32:579-587, 2008.
- NEVES, M. C. P. & RUMJANEK, N. G. Diversity and adaptability of Soybean cowpea hizobia in tropical soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, n. 5/6, p. 889-895, 1997.
- NOGUEIRA, J. M.; FROHLICH, A. G. Inovações tecnológicas, meio ambiente e agricultura: desafios para sustentabilidade em mato grosso. **Apresentação Oral-Instituições e Desenvolvimento Social na Agricultura e Agroindústria**. DEPARTAMENTO DE ECONOMIA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, BRASÍLIA - DF – BRASIL. Acessado 10 de março de 2012.
- NYEMBA, R. C.; DAKORA, F. D. Evaluating N<sub>2</sub> fixation by food grain legumes in farmers fields in three agro-ecological zones of Zambia, using N<sup>15</sup> natural abundance. **Biol Fertil Soils**, 46:461–470, 2010.
- OKELEYE, K. A.; OKELANA, M. A. Effect of phosphorus fertilizer on nodulation, growth and yield of cowpea (*Vigna unguiculata*) varieties. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 67, p. 10-12, 1997.
- OKITO, A.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Isotopic fractionation during N<sub>2</sub> fixation by four tropical legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, 36: 1179- 1190. 2004.
- OLIVEIRA, A. P.; SILVA, V. R. F.; ARRUDA, F. P.; NASCIMENTO, I. S. & ALVES, A. U. Rendimento de feijão-caupi em função de doses e formas de aplicação de nitrogênio. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 1, p. 77-80, 2003.
- PAFFETTI, D.; DAGUIN, F.; FANCELLI, S.; GNOCCHI, S.; LIPPI, F.; SCOTTI, C.; BAZZICALUPO, M. Influence of plant genotype on the selection of nodulating *Sinorhizobium meliloti* strains by *Medicago sativa*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 3–8, 1998.
- PAUFERRO, N.; GUIMARÃES, A. P.; JANTALIAA, C. P.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. 15N natural abundance of biologically fixed N<sub>2</sub> in soybean is controlled more by the Bradyrhizobium strain than by the variety of the host plant. **Soil Biology & Biochemistry**, 42: 1694- 1700, 2010.
- PEOPLES, M. B.; FAIZAH, A. W.; RERKASEM, B.; HERRIDGE D. F. Methods for Evaluating Nitrogen Fixation by Nodulated Legumes in the Field. **ACIAR, Canberra**, 1989.
- PEOPLES, M. B.; BROCKWELL. J.; HERRIDGE, D. F.; ROCHESTER, I. J.; ALVES, B. J. R.; URQUIAPA, S.; BODDEY, R. M.; DAKORA, F. D.; BHATTARAI, S.; MASKEY, S. L.; SAMPET, C.; RERKASEM, B.; KHAN, D. F.; HAUGGAARD-NIELSEN, H.; JENSEN, E. S. The contribution of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. **Symbiosis** 48:1–17, 2009.

- PEOPLES, M. B.; HERRIDGE, D. F.; LADHA, J. K. Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? **Plant Soil** 174:3–28, 1995.
- PULE-MEULENBERG, F.; BELANE, A. K.; KRASOVA-WADE, T.; DAKORA, F. D. Symbiotic functioning and bradyrhizobial biodiversity of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) in Africa. **BMC Microbiology**, 10:89 1471-2180, 2010
- REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; URQUIAGA, S. Recomendação de uma mistura de estirpes de cinco bactérias fixadoras de nitrogênio para inoculação de cana-de-açúcar: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11335), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR 11504), *Azospirillum amazonense* (BR 11145) e *Burkholderia tropica* (BR 11366). 2009. 04p. (**Embrapa Agrobiologia. Circular Técnica 30**).
- RELARE- Reunião da rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbianos de interesse agrícola, 13. **Anais. Londrina: Embrapa Soja**, 2007. 212p.
- RHOR, T. G. **Estudo reológico da mistura carboximetilcelulose/amido e sua utilização como veículo de inoculação bacteriano**. Seropédica, RJ, 2007. 124 p. Dissertação. (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R. & NEVES, M. C. P. Fixação biológica de nitrogênio. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A. & RIBEIRO, V. Q., eds. **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília, Embrapa/ Informação Tecnológica, 2005. p.281-335.
- SARAIVA, C. N.; ANDRADE, M. L. Jr.; STAMFORD, N. P.; GALVÃO, M. B. S. F.; & ALBUQUERQUE, C. S. Nodulação e produção do caupi (*vigna unguiculata l. walp*) sob efeito de plantas de cobertura e inoculação. **R. Bras. Ci. Solo**, 32:579-587, 2008.
- SCHUH, C. A. **Biopolímeros como suporte para inoculantes**. Porto Alegre, RS, 2005. 81 f. Dissertação. (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- SQUARO JR., J. C.; DAROS, E.; PAULETTI, V.; RONZELLI JR., P.; SOARES-KOEHLER, H. & OLIVEIRA, R. A. Doses e formas de aplicação de potássio na cultura do feijoeiro em sistema de plantio direto na palha. **Scientia Agrícola**, v.7, n.1-2, p.9-14, 2006.
- SHEARER, G.; KOHL, D. H. N<sub>2</sub>-fixation in field settings: estimations based on natural 15N abundance. **Australian Journal of Plant Physiology**, 13: 699–756. 1986.
- SILVA JUNIOR, E. B.; RUMJANEK, N. G.; JARDIM, E. R.; LINHARES, R. A.; XAVIER, G. R. Adoção da tecnologia de inoculação do feijão-caupi por agricultores familiares do estado do rio de janeiro através de metodologia participativa. **Rev. Expressa Extensão/ UFPel**, vol. 14 (1), 104-109, julho de 2009.
- SILVA, M. F. **Uso de Inoculante Polimérico contendo Bactérias Diazotróficas na Cultura da Cana-de-açúcar**. Seropédica, RJ, 2009. 80 f. Tese. (Doutorado em Ciências do Solo)- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- SILVA, M. F.; OLIVEIRA, P. J.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; REIS, V. M.; Inoculantes formulados com polímeros e bactérias endofíticas para a cultura da cana de açúcar. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.44, n.11, p.1437-1443, nov. 2009.

SILVA, M. T.; ZÜGE, M.; HAMER, E. Análise dos fatores condicionantes da reestruturação agrícola no estado de mato grosso. **XLIV CONGRESSO DA SOBER-** Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural. Fortaleza, 23 a 27 de Julho de 2006.

SILVA, V. N.; SILVA, L. E. S. F. & FIGUEIREDO, M. V. B. Coinoculação de sementes de caupi com *Bradyrhizobium* e *Paenibacillus* e sua eficiência na absorção de cálcio, ferro e fósforo pelas plantas. **Pesq. Agropec. Tropical**, 36:95-99, 2006.

SINDAG- Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola. **Disponível em:** <<http://www.sindag.com.br>>. Acesso em 10 mar. 2012.

SMITH, R. S. Legume inoculant formulation and application. **Canadian Journal of Microbiology, Ottawa**, CA, v.38, p. 485-492, 1992.

SOARES, A. L. L.; PEREIRA, J. P. A. P.; FERREIRA, P. A. A.; MARTINS, H. M. V.; LIMA, A. S.; ANDRADE, M. J. B. & MOREIRA, F. M. S. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). I – Caupi. **R. Bras. Ci. Solo**, 30:795-802, 2006.

SOUZA FILHO, H. M.; BUAINAIN, A. M.; SILVEIRA, J. M. F. J.; VINHOLIS, M. M. B. Condicionantes da adoção de inovações tecnológicas na agricultura. **Cadernos de Ciência & Tecnologia, Brasília**, v. 28, n. 1, p. 223-255, jan./abr. 2011.

STEPHENS, J. H.G.; RASK, H. Inoculant production and formulation. **Field Crops Research**, Amsterdam. NL, v.65, p. 249-258, 2000.

TEMPRANO, F.J.; ALBAREDA, M.; CAMACHO M.; DAZA A.; SANTAMARÍA, C.; NOMBRE RODRÍGUEZ-NAVARRO, C. Survival of several *Rhizobium/Bradyrhizobium* strains on different inoculant formulations and inoculated seeds. **International Microbiology**. v. 5: 81–86, 2002.

TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch-composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, London, UK, v.39, n.2, p. 151–165, mar. 2004.

TRIVELIN, P. C. O. Técnicas com <sup>15</sup>N em estudos de fixação biológica do nitrogênio (FBN). Apostila do Programa de Pós-Graduação em Energia Nuclear na Agricultura, **CENA/USP**, Piracicaba, outubro de 2001.

UNKOVICH, M. J.; BALDOCK, J.; PEOPLES, M. B. Prospects and problems of simple linear models for estimating symbiotic N<sub>2</sub> fixation by crop and pasture legumes. **Plant Soil**, 329:75–89, 2010

URQUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S.; BODDEY, R.M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**. 56: 105-114, 1992.

VARGAS, M. A. T. & HUNGRIA, M. Fixação biológica do N<sub>2</sub> na cultura da soja. In: VARGAS, M. A. T. & HUNGRIA, M., eds. **Biologia dos solos de cerrados**. Planaltina, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1997. p.297-360.

VEGRO, C. L. R.; FERREIRA, C. R. R. P. T. **Evolução do consumo de fertilizantes no Estado de Mato Grosso, 1987-2002**. Informações econômicas, SP, v. 34, n. 2, fev. 2004.

VIEIRA NETO, S. A.; PIRES, F. R.; MENEZES, C.C. E.; MENEZES, J. F. S.; SILVA, A. G.; SILVA, G. P. & ASSIS, R. L. Formas de Aplicação de Inoculante e Seus Efeitos Sobre a Nodulação da Soja. **R. Bras. Ci. Solo**, 32:861-870, 2008.

- VINCENT, J.M. A. Manual for the Practical study of Root Nodule Bacteria. Oxford, **Blackwell Scientific Publications**, 197, 164p (IBP Handbook, 15).
- WANI, S.P.; RUPELA, O.P.; LEE, K.K. Sustainable agriculture in the semi-arid tropics through biological nitrogen in grain legumes. **Plant and Soil**, v.174, p.29-49, 1995.
- XAVIER, G. R.; CORREIA, M. E. F.; AQUINO, A. M. de ; ZILLI, J. E. ; RUMJANEK., N. G. The structural and functional biodiversity of soil: an interdisciplinary vision for conservation agriculture in Brazil. In: Patrice Dion. (Org.). **Soil Biology and Agriculture in the Tropics**. 1 ed. Berlim: Spring, v.1. p. 65-80. 2010.
- XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; RIBEIRO, J. R. A. e RUMJANEK, N. G. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. **Caatinga** (Mossoró, Brasil), v.19, n.1, p.25-33, janeiro/março 2006a.
- XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; MORGADO, L. B.; ALCANTARA, R. M. C. M.; FORTALEZA J. M.; FREIRE-FILHO, F. R.; DANTAS, J. P.; SANTOS, C. E. R. S.; ZILLI, J. E.; COSTA, J. R. Avaliação do desempenho de estirpes de rizóbio em feijão-caupi: dados de rede referente ao 1º ano de experimentação. In: **FERTBIO**, 2006, BONITO, 2006b.
- XAVIER, R. P. Adubação verde em cana-de-açúcar: influência na nutrição nitrogenada e na decomposição dos resíduos da colheita. Seropédica - RJ, 2000. **Tese (mestrado)**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- XAVIER, T. F.; ARAÚJO, A. S. F.; SANTOS, V. B.; CAMPOS, F. L. Inoculação e adubação nitrogenada sobre a nodulação e a produtividade de grãos de feijão-caupi. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.7, p.2037-2041, out, 2008.
- XAVIER, T. F.; ARAÚJO, A. S. F.; SANTOS, V. B.; CAMPOS, F. L. Ontogenia da nodulação em duas cultivares de feijão-caupi. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, p.561-564, 2007.
- ZILLI, J. E.; CAMPO, R. J. e HUNGRIA, M. Eficácia da inoculação de *Bradyrhizobium* em pré-semeadura da soja. **Pesq. Agropec. bras.**, Brasília, v.45, n.2, p.335-338, mar. 2010a.
- ZILLI, J. E.; CARVALHO, L. M.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Fixação biológica de nitrogênio na cultura do feijão-caupi em Roraima. In: ZILLI, J. E.; ALCANTARA, A. V.; MELO, V. F. **Workshop sobre a Cultura do Feijão-caupi em Roraima. Embrapa**, Documentos 04, 2007.
- ZILLI, J. E.; GIANLUPPI, V.; CAMPO, R. J.; COSTA ROUWS, J. R. & HUNGRIA, M. Inoculação da soja com *Bradyrhizobium* no sulco de semeadura alternativamente à inoculação de sementes. **R. Bras. Ci. Solo**, 34:1875-1881, 2010b.
- ZILLI, J. E.; MARSON, L. C.; MARSON, B. F.; RUMJANEK, N. R.; XAVIER, G. R. Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão-caupi em Roraima. **ACTA AMAZONICA**, vol. 39(4) 2009: 749 – 758.
- ZILLI, J. E.; MARSON, L. C.; MARSON, B. F.; GIANLUPPI, V.; CAMPO, R. J. e HUNGRIA, M. Inoculação de *Bradyrhizobium* em soja por pulverização em cobertura. **Pesq. Agropec. bras.**, Brasília, v.43, n.4, p.541-544, abr. 2008.
- ZILLI, J. E.; MARSON, L. C.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Avaliação de Estirpes de Rizóbio para a Cultura do Feijão-caupi em Roraima. 2006. 09p. (**Embrapa Roraima. Circular Técnica 01**).

- ZILLI, J. E.; NETO, M. L. S.; FRANÇA, I. J.; PERIN, L.; MELO, A. R. Resposta do feijão-caupi à inoculação com estirpes de *bradyrhizobium* recomendadas para a soja. **R. Bras. Ci. Solo**, 35:739-742, 2011.
- ZILLI, J. E.; RIBEIRO, K. G.; CAMPO, R. J. & HUNGRIA, M. Influence of fungicide seed treatment on soybean nodulation and grain yield. **R. Bras. Ci. Solo**, 33:917-923, 2009.
- ZILLI, J. E.; SMIDERLE, O. J.; FERNANDES JÚNIOR, P. I.; Eficiência agronômica de diferentes formulações de inoculantes contendo *Bradyrhizobium* na cultura da soja em Roraima. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 4, n. 2, p. 56-61, jul-dez, 2010.
- ZILLI, J. E.; VALICHESKI, R.R; RUMJANEK, N. G.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; FREIRE FILHO, F. R.; NEVES, M. C. P. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do Cerrado em caupi. **Pesq. Agropec. bras.**, Brasília, v.41, p.811-818, 2006.
- ZILLI, J. E.; VALISHESKI, R. R.; FREIRE FILHO, F.R.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Assessment of cowpea rhizobium diversity in Cerrado areas of Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.35, p.281-287, 2004.
- ZILLI, J. E.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. **BR 3262**: nova estirpe de *Bradyrhizobium* para a inoculação de feijão-caupi em Roraima. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2008. 7p. (**Embrapa Roraima. Comunicado técnico, 10**).
- ZILLI, J. E.; FERREIRA, E. P. B.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Efficiency of fast-growing rhizobia capable of nodulating cowpea. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 71(3): p.553-560, 1999.

## 8 ANEXOS



**Figura 9.** Plantio de feijão-caupi (BRS guariba). Embrapa Agrossilvipastoril, Sinop- MT.



**Figura 10.** Coleta de plantas e nódulos de feijão-caupi (BRS guariba), 32 dias após a emergência. Embrapa Agrossilvipastoril, Sinop- MT.



**Figura 11.** Coleta da produção de grãos de feijão-caupi (BRS guariba), 74 dias após a emergência. Embrapa Agrossilvipastoril, Sinop- MT.



**Figura 12.** Coleta de plantas e nódulos de feijão-caupi (BRS guariba), 35 dias após a emergência. Fazenda Novo Horizonte- Sementes Tomazetti, Primavera do Leste- MT.