

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

DISSERTAÇÃO

Iniciação da Nodulação em Cultivares de Feijoeiro

Luciana Fernandes de Brito

2013



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

INICIAÇÃO DA NODULAÇÃO EM CULTIVARES DE FEIJOEIRO

LUCIANA FERNANDES DE BRITO

Sob a Orientação do Professor

Adelson Paulo de Araújo

e Co-orientação da Pesquisadora

Rosângela Stralotto

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

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2013

641.3565

B862i

T

Brito, Luciana Fernandes de, 1988-
Iniciação da nodulação em cultivares de feijoeiro /
Luciana Fernandes de Brito – 2013.
56 f. : il.

Orientador: Adelson Paulo de Araújo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação
em Agronomia – Ciência do Solo.
Bibliografia: f. 38-43.

1. Feijão – Cultivo – Teses. 2. Feijão – Inoculação
– Teses. 3. Rizóbio – Teses. 4. Solos – Teor de
nitrogênio – Teses. 5. Nitrogênio – Fixação – Teses.
I. Araújo, Adelson Paulo de,-. II. Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-
Graduação em Agronomia – Ciência do Solo. 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**

LUCIANA FERNANDES DE BRITO

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 25/02/2013

Adelson Paulo de Araújo. Dr. UFRRJ
(Orientador)

Ednaldo da Silva Araújo. Dr. Embrapa-CNPAB

Jean Luiz Simões de Araújo. Dr. Embrapa-CNPAB

Ao meu irmão, Ricardo Fernandes de Brito, que mesmo sem saber, me dá coragem para
continuar.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, e por ter me atendido nas minhas orações.

Ao meu pai, Evanor Correa de Brito, que derrotou com bravura a miséria e as dificuldades da vida de sertanejo. Agradeço imensamente por ter mais dele em mim do que supunha.

À Zora Martins Fernandes, minha mãe, por fazer o chão retornar aos meus pés sempre que escuto sua voz ao telefone. Por ter estado sempre ao meu lado, dedicando todo o cuidado e amor que nem sei se mereço.

Aos meus irmãos Eduardo e Ricardo por serem a minha melhor companhia.

Ao Sr. Vicente Fernandes, meu segundo pai, por existir em minha vida de maneira tão significativa, pelos sábios ensinamentos, pelo bom humor, pelos sorrisos, pela bondade e pelo apoio. A Sra. Ozita Martins, minha segunda mãe, pelo amor, pela doçura, bondade, apoio e pelas orações. Sempre com aquele cuidado único, inesquecível.

Ao Sr. Artur Correa de Brito, meu avô paterno, por ter me ensinado mais em sua curta passagem por minha vida do que qualquer pessoa foi, é ou será capaz de me ensinar. À Dona Nair, minha avó paterna, por ser meu exemplo de força e sobrevivência.

Ao meu orientador, Dr. Adelson Paulo de Araújo, pelo apoio e orientação impecável e pelo exemplo de pesquisador. E à minha admirável orientadora, Dra. Rosângela Stralio, pelo incentivo, pelo exemplo de mulher, de profissional ética e dedicada, pela amizade, pelo apoio durante esses anos e pela orientação impecável. Posso afirmar que são os melhores orientadores que uma pessoa pode ter, em todos os sentidos, Adelson por ser um profissional sem defeitos e Rosângela por ser a profissional que um dia eu quero ser.

Ao pesquisador da Embrapa Agrobiologia Bruno Jose Rodrigues Alves, pelo apoio e orientação nas análises de redução de acetileno e atividade da nitrogenase.

Ao Sr. Benedito de Sousa e à PESAGRO-RJ, pela contribuição e parceria no experimento conduzido em Macaé.

Ao Mestre Rafael Sanches Pacheco, pelo apoio, incentivo, e pelos muitos anos de parceria e amizade. Aos bolsistas de Iniciação Científica, Julia, Rita e Neilton, por todo apoio nos meus experimentos e pela amizade.

Aos grandes amigos Geraldo, Luís Chaves, Wilson, Lúcio, Naldo, Claudinho, Ângela, Izabel e funcionários do campo, pelo apoio dentro da Embrapa. Vale um agradecimento especial aos funcionários da Casa de Vegetação, Aurélio, Alderi, Roberto Carlos, Enivaldo e Serginho, pelo grande apoio nos experimentos realizados por lá, que não foram poucos.

À minha amiga Laís, por ter sido minha companheira apesar da separação física e por honrar o título de minha melhor amiga. Aos grandes amigos Helen, Rogéria, Leiliane, Maicon, Fernanda, Dayane, Irineu e Renan pelos bons momentos durante o mestrado. Às grandes aquisições que fiz nesses dois anos, Wanessa, e Rodrigo, espero que essas novas amigas durem para sempre.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela minha formação.

Ao Departamento de Solos, por fornecer um curso onde aprendi tanto, não só nas disciplinas, mas também pela eficiência da direção e dos funcionários.

À Embrapa Agrobiologia pelo apoio à minha graduação e mestrado, sem o qual a minha formação não seria completa.

Ao CNPq pelo apoio financeiro concedido no primeiro ano de mestrado e à FAPERJ pela concessão da bolsa “Nota 10”.

BIOGRAFIA

Luciana Fernandes de Brito nasceu em 22 de fevereiro de 1988, na cidade de Januária-MG, filha de Evanor Correa de Brito e Zora Martins Fernandes. cursou o ensino fundamental em escola pública estadual e o médio em escola pública federal. Em 2005, se formou como Técnica em Agropecuária no Centro Federal de Educação Tecnológica de Januária. Em 2006, ingressou no curso de graduação em Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), diplomando-se Engenheira Agrônoma em 2011. Durante a graduação, trabalhou como estagiária na Embrapa Agrobiologia, sob a orientação da Pesquisadora Rosângela Straliozzo. Foi bolsista de iniciação científica do PIBIC-CNPq da UFRRJ por 24 meses, trabalhando sobre o tema de fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro, com o Professor Adelson Paulo de Araújo. Em fevereiro de 2011, ingressou como aluna de Mestrado no Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo da UFRRJ, onde foi bolsista do CNPq e da FAPERJ.

RESUMO

BRITO, Luciana Fernandes. **Iniciação da Nodulação em Cultivares de Feijoeiro**. 2013. 55f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

A fixação biológica de N_2 no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) não é tão eficiente quanto em outras leguminosas de grãos, em parte pela ausência de sincronia entre o esgotamento das reservas cotiledonares e a formação de nódulos e a efetiva fixação de N, o que ocasiona um estresse nutricional no início do ciclo. Elevados teores de N no solo podem limitar a nodulação no feijoeiro, mas adequadas produtividades do feijoeiro sob inoculação demandam a aplicação de N mineral complementar. Foram conduzidos cinco experimentos em solução nutritiva, para avaliação da iniciação da nodulação de cultivares de feijoeiro e o efeito do N mineral neste processo. Além disso, foram conduzidos dois experimentos de campo para avaliar o efeito da época da aplicação de N sobre a nodulação e o rendimento de grãos em feijoeiro sob inoculação com estirpes comerciais de rizóbio. Nos experimentos em solução nutritiva, foram realizadas coletas diárias após a formação do primeiro nódulo, sendo avaliados a redução de acetileno no sistema radicular, a massa seca vegetal e o tamanho dos nódulos por análise digital de imagens. Nos experimentos de campo, foram avaliadas a massa seca de parte aérea e nódulos quando da floração e o rendimento de grãos e componentes de produção. O início da nodulação ocorreu aos 10 dias após a emergência (DAE), e da atividade da nitrogenase aos 11 DAE, nas cinco cultivares avaliadas. As cultivares precoces Radiante e Jalo Precoce apresentaram atividade da nitrogenase inferior às cultivares Pontal e Valente, de ciclo normal. A adição de N reduziu a nodulação inicial em todas as cultivares, anulando-a a partir da dose de 2 mmol de N. Aos 15 DAE, por ocasião da queda do cotilédone, as plantas de feijoeiro inoculadas com rizóbio sofreram uma redução de massa seca de parte aérea e raízes, em comparação com plantas inoculadas que receberam N mineral. No campo, os tratamentos de inoculação com rizóbio associada à adubação nitrogenada em cobertura forneceram massa seca de parte aérea na floração e produtividade de grãos similares às observadas no tratamento de testemunha nitrogenada. Os resultados dos dois experimentos de campo sugerem que o uso do N mineral no plantio pode ser substituído pela inoculação com rizóbio sem causar reduções na produtividade de grãos.

Palavras-chave: Feijão. *Rhizobium*. Inoculação. Genótipo. Nodulação.

ABSTRACT

BRITO, Luciana Fernandes. **Initiation of Nodulation in Common Bean Cultivars.** 2013. 55p. Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science) Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

The biological N₂ fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is not efficient as in other grain legumes in part due to the asynchrony between the cotyledon abscission and the effective nitrogen fixation, which causes a nutritional stress early in the growth cycle. High levels of N in the soil can limit nodulation in common bean but appropriate yields under inoculation demand additional N fertilization. Five experiments were conducted in nutrient solution to evaluate the initiation of nodulation of bean cultivars and the effect of mineral N in this process. Additionally, two field experiments were conducted to evaluate the effect of time of N application on nodulation and grain yield of bean crop under inoculation with commercial rhizobia strains. In the experiments in nutrient solution, plants were harvested daily after the first nodule formation, and it were evaluated the acetylene reduction in the root system, plant dry mass and size of nodules by digital image analysis. In field experiments, the dry mass of shoots and nodules at full flowering and grain yield and yield components were evaluated. The initiation of nodulation occurred at 10 days after emergence (DAE), and of nitrogenase activity at 11 DAE, in the five bean cultivars. The early cultivars Radiante and Jalo Precoce showed nitrogenase activity lower than the cultivars Pontal and Valente, of normal cycle. The addition of N reduced nodulation in its initial phase in all cultivars, nullifying it at levels higher than 2 mmol of N. At 15 DAE, at the cotyledon fall, dry mass of shoots and roots of bean plants inoculated with rhizobia were lower as compared with inoculated plants receiving mineral N. In the field, the inoculation associated with N application covering treatments gave shoot dry mass at flowering and grain yield similar to those observed in the control N treatment. The results of the two field experiments suggest that the use of mineral N at planting can be replaced by rhizobia inoculation without reducing grain yield of common bean.

Key-words: Common bean. *Rhizobium*. Inoculation. Genotype. Nodulation.

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1.** Características das sementes utilizadas no presente trabalho.....10
- Tabela 2.** Resultado das análises químicas de solo das áreas destinadas ao plantio dos experimentos conduzidos em Rio das Ostras-RJ e Macaé-RJ.....30
- Tabela 3.** Massa seca de parte aérea (MSPA), raízes (MSR) e nódulos (MSN) de plantas de feijoeiro aos 35 DAE, produção de grãos (PG) e número de vagens por planta (NVP), em experimento em Rio das Ostras-RJ, sob cinco fontes de suprimento de N: testemunha absoluta, sem adição de N mineral e sem inoculação; testemunha nitrogenada, aplicação de 120 kg N ha⁻¹; inoculação; inoculação associada a aplicação de 80 kg N ha⁻¹ no plantio; e inoculação associada a aplicação de 40 kg N ha⁻¹ em cobertura.....33
- Tabela 4.** Massa seca de parte aérea (MSPA) e de nódulos (MSN) de plantas de feijoeiro aos 35 e 50 DAE, em experimento em Macaé-RJ, sob sete fontes de suprimento de N: testemunha absoluta, sem adição de N mineral e sem inoculação; testemunha nitrogenada, aplicação de 120 kg N ha⁻¹; inoculação; inoculação + aplicação de 80 kg N ha⁻¹ no plantio; inoculação + aplicação de 30 kg N ha⁻¹ em cobertura; inoculação + aplicação de 40 kg N ha⁻¹ aos 15 e de 40 kg N ha⁻¹ 40 DAE; e adubação local, 20 kg N ha⁻¹ aos 15 DAE e de 20 kg N ha⁻¹ aos 40 DAE.....34
- Tabela 5.** Número de plantas (NP), número de vagens por planta (NVP), número de grãos por vagem (NGV), massa de 100 grãos (MCG) e produção de grãos (PG) de plantas de feijoeiro, em experimento conduzido em Macaé-RJ, sob sete fontes de suprimento de N: testemunha absoluta, sem adição de N mineral e sem inoculação; testemunha nitrogenada, aplicação de 120 kg de N ha⁻¹; inoculação; inoculação + aplicação de 80 kg de N ha⁻¹ no plantio; inoculação + aplicação de 30 kg de N ha⁻¹ em cobertura; inoculação + aplicação de 40 kg de N ha⁻¹ aos 15 e de 40 kg de N ha⁻¹ 40 DAE; e adubação local, aplicação de 20 kg de N ha⁻¹ aos 15 DAE e de 20 kg de N ha⁻¹ aos 40 DAE.....35

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Vista do primeiro experimento de avaliação da iniciação da nodulação, conduzido em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia em Seropédica- RJ.....11
- Figura 2:** Etapas do processamento de imagens para estimativa do diâmetro e do número de nódulos de feijoeiro por análise digital de imagens (software Imlab): (A) imagem em tons de cinza; (B) imagem após contraste e binarização; (C) imagem após remoção de objetos considerados como impurezas; (D) resultado do processo de estimativa da área em pixels de cada objeto.....13
- Figura 3:** Massa seca de nódulos (A), número de nódulos (B), diâmetro médio de nódulos (C) e atividade da nitrogenase (D) no sistema radicular, de cinco cultivares de feijoeiro crescidas em solução nutritiva isenta de N, em quatro épocas de avaliação; barras verticais representam a diferença mínima significativa (Duncan 5%) e comparam cultivares dentro de cada época de coleta.....16
- Figura 4:** Massa seca de parte aérea (A) e de raízes (B) de cinco cultivares de feijoeiro, inoculadas com rizóbio e cultivadas em solução nutritiva, em quatro épocas de avaliação após a emissão do primeiro nódulo. Barras verticais representam a diferença mínima significativa (Duncan 5%) e comparam cultivares dentro de cada época de coleta.....17
- Figura 5:** Massa seca (A), diâmetro (B) e número (C) de nódulos e atividade da nitrogenase (D) de quatro cultivares de feijoeiro crescidas em solução nutritiva, em duas épocas de avaliação. Barras verticais representam a diferença mínima significativa (Duncan 5%) e comparam cultivares dentro de cada época de coleta.....18
- Figura 6:** Massa seca de parte aérea (A) e de raízes (B) de quatro cultivares de feijoeiro, inoculadas com rizóbio e cultivadas em solução nutritiva, em duas épocas de avaliação. Barras verticais representam a diferença mínima significativa (Duncan 5%) e comparam cultivares dentro de cada época de coleta.....19
- Figura 7:** Massa seca (A), diâmetro (B) e número (C) de nódulos e atividade da nitrogenase (D) de plantas de feijoeiro, cultivadas em solução nutritiva, sob inoculação e inoculação com adição de 2 mmol de N mineral; médias de quatro cultivares (Ouro Negro, Valente, Pontal e Radiante). Barras verticais representam a diferença mínima significativa (Duncan 5%) e comparam fontes de N dentro de cada época de coleta.....20
- Figura 8:** Massa seca (A), diâmetro (B) e número (C) de nódulos e atividade da nitrogenase (D) de quatro cultivares de feijoeiro (Ouro Negro, Valente, Pontal e Radiante), cultivadas em solução nutritiva; médias de dois tratamentos (inoculação e inoculação com adição de 2 mmol de N). Barras verticais representam a diferença mínima significativa (Duncan 5%) e comparam cultivares dentro de cada época de coleta.....21
- Figura 9:** Massa seca de parte aérea (A) e de nódulos (B) de plantas de feijoeiro, cultivadas em solução nutritiva, sob quatro doses de N; médias de quatro cultivares (Ouro Negro, Valente, Pontal e Radiante). Barras verticais representam a diferença mínima significativa (Duncan 5%) e comparam doses de N dentro de cada época de coleta.....22

Figura 10: Massa seca (A), diâmetro (B) e número (C) de nódulos e atividade da nitrogenase (D) plantas de feijoeiro cultivar Valente, cultivadas em solução nutritiva, sob inoculação e inoculação com adição de 2 mmol de N mineral. Barras verticais representam a diferença mínima significativa (Duncan 5%) e comparam fontes de N dentro de cada época de coleta.....23

Figura 11: Massa seca de parte aérea (A) e de raízes (B) de plantas de feijoeiro cultivar Valente, cultivadas em solução nutritiva, sob inoculação e inoculação com adição de 2 mmol de N mineral. Barras verticais representam a diferença mínima significativa (Duncan 5%) e comparam fontes de N dentro de cada época de coleta.....24

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1	O Nitrogênio na Cultura do Feijoeiro.....	2
2.2	A Fixação Biológica de Nitrogênio em Feijoeiro.....	3
2.3	O Efeito do Nitrogênio na Nodulação do Feijoeiro.....	5
CAPÍTULO I - AVALIAÇÃO DO INÍCIO DA NODULAÇÃO E DA ATIVIDADE DA NITROGENASE EM CULTIVARES DE FEIJOEIRO.....		6
RESUMO.....		7
ABSTRACT		8
1	INTRODUÇÃO	7
2	MATERIAL E MÉTODOS	10
2.1	Delineamentos Experimentais e Condições de Cultivo.....	10
2.2	Coletas e Avaliações Realizadas	12
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
3.1	Avaliação do Início da Nodulação e da Atividade da Nitrogenase	15
3.2	Efeito do Nitrogênio Sobre a Iniciação da Nodulação e da Atividade da Nitrogenase.....	19
4	CONCLUSÕES.....	25
CAPÍTULO II - EFEITO DA ÉPOCA DE APLICAÇÃO DO NITROGÊNIO SOBRE A PRODUÇÃO DO FEIJOEIRO INOCULADO COM RIZÓBIO		26
RESUMO.....		27
ABSTRACT		28
1	INTRODUÇÃO	29
2	MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1	Delineamentos Experimentais	30
2.2	Condições de Cultivo	30
2.3	Contagem de rizóbio no solo	31
2.4	Amostragens e Avaliações.....	31
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
3.1	Ensaio em Rio das Ostras	32
3.2	Ensaio em Macaé.....	33
4	CONCLUSÕES.....	36
3	CONCLUSÕES GERAIS	37
4	REFERÊNCIAS BILIOGRÁFICAS.....	38

1 INTRODUÇÃO

Um dos desafios do desenvolvimento agrícola é se contrapor à dependência de recursos e serviços ambientais não-renováveis e operar de maneira sustentável. A expansão da agricultura ocorre concomitante à constituição do complexo agroindustrial, modernizando a base técnica dos meios de produção, alterando as formas de produção agrícola e gerando efeitos sobre o meio ambiente. Com o aumento expressivo da população mundial, cerca de um bilhão de habitantes a cada passagem de década (UNFPA, 2011), a demanda por alimentos se torna cada vez maior. Isso resulta em uma utilização intensiva de fertilizantes e adubos minerais. O consumo mundial dos fertilizantes N, P₂O₅ e K₂O no Brasil em 2008 ultrapassou 10 milhões de toneladas (FAO, 2010).

A cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) representa uma das principais fontes de proteína de origem vegetal nos países pobres. Dados da FAO (2012) colocam o Brasil em 2010 como o segundo maior produtor de feijão em grãos no mundo, atrás apenas da Índia e à frente de Myanmar, Estados Unidos, China e México. Todavia, em 2010 o Brasil situava-se como o 6º maior importador de feijão no mundo, com importações de 110 mil toneladas (FAO, 2012). Segundo a CONAB (2012), a área plantada de feijoeiro no Brasil na safra 2010/2011 foi de 3,99 milhões de ha, com produção de 3,73 milhões de toneladas e produtividade média de 935 kg ha⁻¹. Esta baixa produtividade é parcialmente associada ao fato de que 79,11% da área plantada de feijão é cultivada na primeira safra e na segunda safra, caracterizadas pelo cultivo em pequenas áreas, tipicamente familiares, onde os produtores utilizam poucos insumos agrícolas, irrigação e colheita mecanizada (CONAB, 2012).

O processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) é uma alternativa de baixo custo que pode auxiliar no incremento da produtividade do feijoeiro em áreas de agricultura familiar, uma vez que é fornecido nitrogênio (N) para a planta por meio da simbiose. O feijoeiro comum pode se beneficiar da FBN, com produtividades de grãos superiores a 2.000 kg ha⁻¹ em cultivos com uso de inoculação (HUNGRIA et al., 2003). Apesar de haver contribuição da FBN para a cultura, alguns trabalhos relatam que somente a inoculação não proporciona a quantidade de N necessária para atingir altos níveis de produtividade (ALVES, 2002; SILVA et al., 2002; FERREIRA et al., 2004). Stralio et al. (1999) listaram os principais fatores que interferem no sucesso da inoculação do feijoeiro com rizóbio a nível de campo, considerando-se as diferentes espécies de rizóbio que nodulam esta hospedeira e suas interações com os fatores do ambiente. Alguns desses fatores são intrínsecos da bactéria, outros são extrínsecos, envolvendo outros microrganismos do solo, fatores de clima e solo ou determinados pela planta hospedeira.

Além de todas essas limitações, alguns períodos do desenvolvimento do feijoeiro são críticos em relação à FBN: na fase inicial de crescimento da planta, a FBN pode não suprir as demandas de N da cultura, e na fase de desenvolvimento das vagens ocorre a senescência de nódulos (OLIVEIRA et al., 1996; FAGERIA & BALIGAR, 2005). Nessas fases, o N pode ser fornecido por meio de aplicação de adubo mineral. Assim, a demanda total da planta é suprida sendo possível uma economia considerável de N mineral (PELEGRIN et al., 2009).

No Capítulo I, o objetivo do trabalho foi identificar o início da nodulação e da atividade da enzima nitrogenase em plantas de feijoeiro, em condições de solução nutritiva, e os efeitos do suprimento de N sobre este processo. No Capítulo II, objetivou-se avaliar em condições de campo o efeito da época de aplicação da adubação nitrogenada no rendimento de feijoeiro sob inoculação com rizóbio.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Nitrogênio na Cultura do Feijoeiro

O feijoeiro comum é uma planta anual herbácea, pertencente à família *Fabaceae*, sub-família *Faboideae*, gênero *Phaseolus*, e está classificado como *Phaseolus vulgaris* L. A origem do gênero *Phaseolus* se deu na América, pois populações selvagens de feijão crescem desde o México até a Argentina, em altitudes que variam entre 500 e 2.000 m (DEBOUCK, 1986). Os vestígios arqueológicos encontrados de feijoeiro cultivado têm idades aproximadas de 10.000 anos (GEPTS & DEBOUCK, 1991). A ocorrência de populações selvagens da espécie em diferentes áreas é um dos fatores que permitiram o surgimento de uma ampla variação de raças.

O cultivo dessa leguminosa é bastante difundido em todo o território nacional, no sistema solteiro ou consorciado com outras culturas. O plantio de feijão no Brasil é feito, de acordo com a região, ao longo do ano, em três épocas. A primeira safra (plantio das águas) ocorre em Goiás de outubro a novembro, e no Rio de Janeiro de setembro a novembro. Em cada um desses estados existem variações, dependendo da geografia regional, sendo necessário o conhecimento do regime de chuvas predominante na região ou do local de plantio (EMBRAPA, 2005). A segunda safra (plantio da seca), cultivada nos meses de janeiro e fevereiro, representa a maior área cultivada de feijão e responde pela maior parte da produção nacional. No plantio de inverno (terceira safra), efetuado entre maio e junho, a produção de feijão no sistema irrigado, com predominância do pivô central, está concentrada nas Regiões Centro-Oeste e Sudeste, nos Estados de Minas Gerais, Goiás e São Paulo.

O N se encontra no solo na forma de nitrato e amônio. Na assimilação do nitrato pelas plantas, a primeira etapa do processo é a redução do nitrato em nitrito no citoplasma. A enzima que catalisa essa reação é a nitrato redutase, principal proteína contendo molibdênio encontrada nos tecidos vegetais. Em uma segunda etapa, o nitrito é convertido a amônio pela enzima nitrito redutase. O nitrito é um íon altamente reativo e potencialmente tóxico, sendo transportado imediatamente do citosol para o interior dos cloroplastos nas folhas e nos plastídeos nas raízes. Na assimilação do amônio, as células vegetais evitam a toxicidade deste pela rápida conversão do amônio em aminoácido (TAIZ & ZEIGER, 2006). Entre os adubos nitrogenados mais aplicados destacam-se a ureia e o sulfato de amônio. Segundo Carvalho et al. (2001), observa-se maior produtividade do feijoeiro com a aplicação de ureia em relação ao sulfato de amônio, proporcionando maior obtenção na quantidade de sementes comerciais.

O feijão é considerado uma cultura exigente em nutrientes. O N é o nutriente mais exigido pela cultura: durante o seu ciclo, a cultura pode extrair do solo cerca de 200 kg ha⁻¹ de N, sendo o nutriente mais absorvido pela planta e mais acumulado nos grãos (HAAG & MALAVOLTA, 1967). Estima-se que para cada kg de N aplicado no solo, obtém-se até 18 kg de grãos de feijão (SANTOS & FAGERIA, 2008). A aplicação de N em cultivo de feijoeiro pode compensar a redução da produção ocasionada pelo estresse hídrico na fase vegetativa da planta (STONE & MOREIRA, 2001). O fornecimento de N, por meio da adubação de cobertura, proporciona aumento do tamanho das sementes de feijão (CRUSCIOL et al., 2003), além de aumentar a quantidade de sementes comerciais (CARVALHO et al., 2001). Segundo Arf et al. (1999), a aplicação de 45 kg N ha⁻¹ em cobertura propiciou a obtenção de grãos mais pesados, aumentando em 17,8% a produtividade média do feijoeiro. Silveira et al. (2003) também registraram produtividade máxima estimada de 2.449 kg ha⁻¹, com a dose de 62 kg N ha⁻¹, utilizando a cultivar Pérola. Furtini et al. (2006) avaliaram as respostas de 100 linhagens de feijoeiro à aplicação de N em cobertura e constataram que 77% das linhagens não responderam à adubação nitrogenada em cobertura e que 23% tiveram resposta. Além disso,

em linhagens que responderam à aplicação de N, a produtividade de grãos foi 12% acima da obtida sem aplicação de N.

Em feijoeiro, a produtividade e a eficiência de uso de N diferem de acordo com o manejo de fertilizante nitrogenado (SANTOS & FAGERIA, 2008). Geralmente, é utilizado o parcelamento da adubação nitrogenada, uma vez que a planta apresenta pouca exigência do nutriente na fase inicial. Além disso, a aplicação de N mineral em solos tropicais apresenta baixa eficiência de recuperação pelas plantas, sendo normalmente inferior a 50%, podendo, em solos arenosos, atingir entre 5% e 10% devido às grandes perdas por lixiviação e volatilização (OSINAME et al., 1983; DUQUE et al., 1985). Assim, utiliza-se na semeadura apenas uma fração da dose recomendada, com a posterior aplicação em cobertura, nos períodos de maior exigência. O manejo do N realizado de forma inadequada pode afetar negativamente a produção de feijão. Quando a aplicação do N mineral é feita diretamente no sulco de semeadura a população de feijoeiro pode ser afetada, em decorrência da salinização do sulco, que prejudica a germinação das sementes, comprometendo a produção (BINOTTI et al., 2009; SILVA et al., 2002). Santos & Fageria (2008) compararam diferentes tipos de manejo de N, encontrando maior produtividade com o N aplicado nas entrelinhas aos 15 dias após a emergência (DAE). Além disso, Farinelli et al. (2006) verificaram que a aplicação de N no plantio e em cobertura eleva a produtividade do feijoeiro em 12% em relação à aplicação de N somente no plantio.

Segundo dados da CONAB (2010), o uso de fertilizantes representa 18,97% do custo de produção do feijão. O custo econômico dos fertilizantes nitrogenados usados no Brasil é de R\$ 750,00 por tonelada de uréia e R\$ 650,00 por tonelada de sulfato de amônio (CONAB, 2010). Esse custo é considerado elevado, levando em consideração que os produtores de pequenas áreas, responsáveis pela maior parte da produção do país, são desprovidos de poder econômico. Além do custo econômico, a utilização de N mineral causa danos ambientais, como a contaminação de lençóis freáticos causada pela lixiviação do N, e a emissão de CO₂ na atmosfera causada pela fabricação de N fertilizante, que explora intensamente a energia fóssil.

2.2 A Fixação Biológica de Nitrogênio em Feijoeiro

Uma alternativa para redução dos custos econômicos e ambientais da adubação nitrogenada em cultivos de feijoeiro é a tecnologia de inoculação das sementes com rizóbio. A FBN é o processo em que bactérias do gênero *Rhizobium* estabelecem uma simbiose com a planta hospedeira, formando estruturas nas raízes chamadas nódulos. O N₂ atmosférico não é assimilado pelas plantas, mas pode ser transformado em amônia (NH₃) por meio do complexo enzimático nitrogenase, o qual promove a reação de quebra dos átomos de N₂ à temperatura ambiente e pressão normal, utilizando energia de processos fotossintéticos. Para tanto, é necessário que ocorra inicialmente uma troca de sinais entre o rizóbio e a planta hospedeira. A planta de feijão excreta substâncias químicas na rizosfera que têm ação quimiotática sobre a bactéria, e facilitam a colonização da raiz pelo rizóbio (HUNGRIA & STACEY, 1997), além de flavonoides que induzem a transcrição de genes da bactéria que produzem proteínas importantes no processo de infecção (COOPER, 2004).

O inoculante é basicamente uma cultura de rizóbios selecionados e misturados a um veículo, sendo a inoculação feita nas sementes. O veículo de inoculação utilizado no inoculante comercial é a turfa. A inoculação consiste em misturar 200 mL de água potável com 200 g de inoculante turfoso até formar uma pasta homogênea (MERCANTE et al., 1992). Essa pasta é suficiente para cobrir cerca de 50 kg de sementes, sendo importante que a cobertura seja uniforme e que as sementes sejam postas para secar à sombra em local arejado.

As sementes inoculadas devem ser plantadas no máximo no dia seguinte ao da inoculação, necessitando ser reinoculadas caso contrário.

As produtividades de grãos obtidas em cultivos sob inoculação podem ser superiores a 2.000 kg ha⁻¹ (HUNGRIA et al., 2000, 2003; STRALIOTTO, 2000; FERREIRA et al., 2009). Pelegrin et al. (2009) avaliaram a resposta de feijoeiro à inoculação com rizóbio e à aplicação de fertilizantes nitrogenados, concluindo que a inoculação resultou em rendimentos de grãos equivalentes à aplicação de 80 kg N ha⁻¹, e que quando acrescida da adubação com 20 kg N ha⁻¹ no plantio, a inoculação propiciou acréscimo de receita líquida semelhante à aplicação de 160 kg N ha⁻¹, sendo superior à adubação de 20 kg N ha⁻¹ sem inoculação. Mostasso et al. (2001) obtiveram resultados de rendimento de grãos de 1612 a 2600 kg ha⁻¹, em experimentos de avaliação da inoculação em feijão.

Relatam-se contribuições da FBN em condições de campo variando entre 25 e 65 kg N ha⁻¹ (RUSCHEL et al., 1982) ou 40 e 125 kg N ha⁻¹ (RENNIE & KEMP, 1983) na parte aérea na maturação fisiológica, ou de 21 a 44 kg N ha⁻¹ nos grãos (PEREIRA et al., 1989). Experimentos de campo em sete países mostraram que a FBN contribuiu com 35% do N acumulado pelo cultivo, com valores máximos de 70% em cultivares de ciclo mais longo em condições ambientais favoráveis (HARDARSON et al., 1993).

Apesar disso, o feijoeiro é considerado uma cultura de baixa capacidade de FBN em comparação com outras leguminosas de grão, como a soja (*Glycine max*). O cultivo sob inoculação de soja é exemplo de sucesso da FBN, pois dispensa a adubação nitrogenada em sua totalidade (HUNGRIA et al., 2005). A ineficiência da FBN em feijoeiro se deve, em parte, às condições de baixa fertilidade do solo quando muitas vezes o cultivo é mantido nas regiões tropicais, onde os solos usualmente têm baixa fertilidade natural e podem ocorrer estresses nutricionais e ambientais.

A variabilidade genética da planta hospedeira é muito grande, e não houve um programa de melhoramento para que a obtenção de plantas que geram grandes produtividades em cultivos sob inoculação, sem a presença de N mineral, como foi feito na soja. A realização de um processo de melhoramento de uma cultivar de feijão é muito lenta, e sem resultados garantidos no que se refere a uma cultivar com alta eficiência em FBN. Atualmente não existe uma tecnologia para introdução direta de genes para esse fim, e também a planta de feijoeiro é recalcitrante à manipulação do seu DNA recombinante, vez que não possível regenerar plantas de feijão a partir de células e tecidos em cultivo.

Além disso, existe fator de curto período vegetativo destinado à nodulação e à FBN, que tem seu pico na floração da cultura, aos 35 DAE (FRANCO et al., 1978) e se reduz após os 40 DAE (HUNGRIA et al., 1997), antes da fase de desenvolvimento em que o feijão acumula mais N, a partir dos 50 DAE (HAAG & MALAVOLTA, 1967). No desenvolvimento inicial da planta, o feijoeiro utiliza a reserva de nutrientes presentes nos cotilédones até por volta de 12 DAE (HUNGRIA et al., 1991), considerado o período médio para o esgotamento das reservas cotiledonares. Entretanto, o feijoeiro não apresenta sincronização entre o esgotamento das reservas nitrogenadas cotiledonares e a formação de nódulos e a fixação efetiva de N, o que culmina em um estresse nutricional por volta dos 16 a 20 DAE, até as plantas formarem nódulos efetivos (PEÑA-CABRIALES et al., 1993).

Em feijoeiro, a simbiose é sensível ao nitrato presente no solo, além da presença de estirpes nativas do solo que competem com o rizóbio inoculado (PIHA & MUNNS, 1987; LEIDI & RODRÍGUEZ-NAVARRO, 2000; GRAHAM et al., 2003; HUNGRIA et al., 2003). Mesmo que a tecnologia de inoculação não seja suficiente para suprir todo o N requerido para o desenvolvimento da planta, sendo necessária a realização de adubações nitrogenadas em cobertura, a não utilização da adubação no plantio pode representar uma economia a ser considerada (PELEGRIN et al., 2009).

2.3 O Efeito do Nitrogênio na Nodulação do Feijoeiro

É conhecido na pesquisa o efeito deletério do nitrato no solo à nodulação do feijoeiro. Franco & Döbereiner (1968) observaram que a aplicação de N, numa dose de 40 mg N kg⁻¹ em vasos com solo, prejudicou a nodulação do feijoeiro. Num experimento em casa de vegetação, Müller & Pereira (1995) observaram que a massa seca de nódulos e a redução de acetileno foram reduzidas com a aplicação da dose de 25 mg N kg⁻¹ no estágio vegetativo da planta.

A adubação por cobertura com doses elevadas de N pode influenciar negativamente na FBN em diferentes cultivares de feijão (GRAHAM, 1981; TSAI et al, 1993; MÜLLER & PEREIRA, 1995). A adubação com 40 kg N ha⁻¹ em cobertura reduziu em média em 10 % a percentagem de N derivado da atmosfera em plantas de feijoeiro, mas com marcadas variações entre genótipos, indicando a possibilidade de melhoramento para aumentar a eficiência da FBN sob adubação mineral (RENNIE & KEMP, 1983).

Para diminuir os sintomas visuais de amarelecimento e suprir as necessidades nutricionais da cultura, por muitos anos foi recomendada a utilização de uma dose de N no início do cultivo, o que é comumente denominado de “N start” ou “N de arranque” (PEREIRA et al., 1989). Alguns resultados têm demonstrado que pequenas doses de N podem estimular a nodulação sem limitar a FBN durante o desenvolvimento vegetativo do feijoeiro, quando o solo apresenta boa disponibilidade de outros nutrientes como P, K e S (TSAI et al., 1993). Ruschel & Saito (1977) relataram que a adição de elevados teores de N afeta inicialmente o número e peso de nódulos, mas não inibe o seu desenvolvimento e a FBN. Além disso, Rosolem (1987) verificou que a aplicação de pequenas quantidades de N no solo resulta no maior crescimento dos nódulos e maior FBN, e que níveis muito baixos de nitrato no solo podem ser limitantes à atividade simbiótica.

A adubação de cobertura causa aumento na produtividade de grãos de genótipos de feijoeiro em cultivos sob inoculação (LEMOS et al., 2003). Silva et al. (2009) obtiveram, em Dourados (MS), produtividade acima de 2000 kg ha⁻¹ em tratamentos inoculados, sendo essa produtividade equivalente às obtidas com doses de N mineral de 80 kg N ha⁻¹ e de 120 kg N ha⁻¹. Parte da demanda por N da planta pode ser suprida quando a inoculação é utilizada em associação com a adubação nitrogenada em cobertura, o que pode propiciar rendimento de grãos de 3.000 kg ha⁻¹ (PELEGRIN et al., 2009). Então, para que a produtividade do feijoeiro em cultivos com inoculação seja maximizada, esta tecnologia pode ser complementada pela aplicação de N mineral. Todavia, são necessários estudos para determinação de uma dose ótima de N na cultura do feijoeiro, bem como a melhor época de aplicação (HENSON & BLISS, 1991).

**CAPÍTULO I - AVALIAÇÃO DO INÍCIO DA NODULAÇÃO E DA
ATIVIDADE DA NITROGENASE EM CULTIVARES DE
FEIJOEIRO**

RESUMO

Para melhor compreensão do processo de fixação biológica de N_2 no feijoeiro, torna-se necessário o estudo da iniciação da nodulação e da efetiva atividade de fixação dos nódulos. Além disto, torna-se necessário aprofundar os estudos sobre o efeito da época de aplicação de N sobre a nodulação do feijoeiro. O objetivo desse trabalho foi identificar a iniciação da nodulação e da atividade da nitrogenase em distintas cultivares de feijoeiro, em condições de solução nutritiva, na ausência e na presença de N. Para tanto, foram conduzidos cinco experimentos em condições de solução nutritiva com delineamento inteiramente ao acaso. Foram cultivadas cinco cultivares distintas feijoeiro, inoculadas com as estirpes comerciais de rizóbio. As plantas foram observadas diariamente até a emissão do primeiro nódulo. Após a emissão do primeiro nódulo, foram realizadas coletas a fim de detectar o início da fixação de N_2 por meio da avaliação da atividade da nitrogenase. Foram mensurados a massa seca de parte aérea, raízes e nódulos e o número e tamanho de nódulos através da análise digital de imagens. O início da nodulação nas plantas de feijoeiro ocorre aos 10 dias após emergência, nas cinco cultivares avaliadas. A atividade da nitrogenase se iniciou aos 11 dias após emergência em todas as cultivares. As cultivares Radiante e Jalo Precoce, de ciclo precoce, apresentaram atividade da nitrogenase inferior às cultivares Pontal e Valente, de ciclo normal. A adição de N prejudicou a nodulação em sua fase inicial em todas as cultivares de feijoeiro, anulando-a a partir da dose de 2 mmol de N. Aos 15 dias após emergência, as plantas de feijoeiro inoculadas com rizóbio sofreram uma redução de massa seca de parte aérea e raízes, em comparação com plantas inoculadas que receberam N mineral.

ABSTRACT

For a better understanding of the process of biological N₂ fixation on common bean, it becomes necessary to study the initiation of nodulation and the effective nitrogen fixation. Moreover, it is necessary to deepen the studies on the effect of time of N application on bean nodulation. The objective of this study was to identify the initiation of nodulation and nitrogenase activity in different bean cultivars under conditions of nutrient solution in the absence and presence of N. Five experiments were conducted under conditions of nutrient solution in completely randomized design. Five different bean cultivars were grown, inoculated with commercial strains of rhizobia. Plants were observed until the first nodule appeared, and further samplings were made daily to detect the initiation of N₂ fixation by nitrogenase activity. The dry mass of shoots, roots and nodules were determined, and the nodule number and size were measured by digital image analysis. The initiation of nodulation in bean plants occurred at 10 days after emergence, in the five cultivars. The nitrogenase activity began at 11 days after emergence in all cultivars. Cultivars Radiante and Jalo Precoce, of early maturity, showed lower nitrogenase activity than cultivars Pontal and Valente, of normal cycle. The addition of N reduced nodulation in its initial phase in all bean cultivars, nullifying it at levels above 2 mmol of N. At 15 days after emergence, bean plants inoculated with rhizobia had lower dry mass of shoots and roots, as compared to inoculated plants receiving mineral N.

1 INTRODUÇÃO

A capacidade de fixar N_2 varia entre e dentro de espécies de leguminosas, em virtude da grande variabilidade genética desta família, o que representa um material inesgotável para seleção genética. Dentro de *Phaseolus vulgaris*, essa variabilidade já foi demonstrada, refletindo em diferença no peso, número e eficiência dos nódulos, atividade da nitrogenase e N total acumulado pelas plantas (GRAHAM & ROSAS, 1979). O potencial de fixação de N da cultura do feijoeiro é considerado baixo, e observa-se que a contribuição da FBN em cultivares de feijoeiro de ciclo longo é de 62%, e em cultivares de ciclo precoce é de 40% (RUSCHEL et al., 1982).

No desenvolvimento inicial da planta, o feijoeiro utiliza a reserva de nutrientes presentes nos cotilédones até por volta de 12 DAE (HUNGRIA et al., 1991), considerado o período médio para o esgotamento das reservas cotiledonares. Entretanto, Peña-Cabriales et al. (1993) sugerem que o feijoeiro não apresenta sincronização entre o esgotamento das reservas nitrogenadas cotiledonares e a formação de nódulos e a fixação efetiva de N, o que culmina em um estresse nutricional por volta dos 16 a 20 DAE, até as plantas formarem nódulos efetivos. O fornecimento de uma pequena dose de N como uma espécie de arranque, pode suprir a necessidade da planta na fase entre a cessação das reservas da planta e a iniciação da FBN.

Para melhor compreensão do processo de FBN no feijoeiro, torna-se necessário o estudo da iniciação da nodulação e da efetiva atividade de fixação dos nódulos. Além disto, torna-se necessário aprofundar os estudos sobre o efeito da época de aplicação de N sobre a nodulação do feijoeiro. Hungria & Neves (1986) conduziram um estudo detalhado sobre a nodulação do feijoeiro, mas não foram constatadas informações sobre quando ocorre a emissão do primeiro nódulo ou se inicia a FBN, o que se deve ao fato de que a ontogenia do feijoeiro foi acompanhada em experimento em vasos contendo solo, o que dificultaria a observação desses eventos.

Os objetivos desse trabalho foram identificar a iniciação da nodulação e da atividade da nitrogenase em distintas cultivares de feijoeiro, em condições de solução nutritiva, na ausência e na presença de N.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Delineamentos Experimentais e Condições de Cultivo

Foram realizados cinco experimentos em condições de solução nutritiva em casa de vegetação, na Embrapa Agrobiologia, em Seropédica, RJ. Nos quatro primeiros experimentos, as plantas de feijoeiro foram crescidas em bandejas plásticas com dimensões de 50x30x15 cm e volume de 12 L, com 20 plantas por bandeja. No quinto experimento, as plantas foram crescidas em vasos com 1 L de solução nutritiva e duas plantas por vaso.

As cultivares de feijoeiro utilizadas nos experimentos são cultivares de uso comercial (EMBRAPA, 2013), e foram selecionadas de forma a abranger diferentes hábitos de crescimento e duração do ciclo. Algumas características das cultivares testadas são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Algumas características das cultivares de feijoeiro avaliadas.

Cultivar	Tipo	Grão	Massa de 100 grãos (g)	Ciclo	Duração do ciclo
Radiante	I	Rajado	44	Precoce	< 75 dias
Jalo Precoce	II	Jalo	35	Precoce	< 75 dias
Ouro Negro	III	Preto	24	Normal	80 – 95 dias
Pontal	III	Carioca	26	Normal	85 – 95 dias
Valente	II	Preto	22	Normal	85 – 95 dias

Tipos I, II e III: ereto determinado, ereto indeterminado, prostrado indeterminado, respectivamente.

Para avaliação do início da nodulação e da atividade da nitrogenase, foram conduzidos dois experimentos. O primeiro experimento foi conduzido entre 6 e 20 de novembro de 2011, sendo utilizadas cinco cultivares (Radiante, Valente, Jalo Precoce, Ouro Negro e Pontal). As plantas foram dispostas inteiramente ao acaso nas bandejas, com quatro repetições de cada cultivar por bandeja, e oito bandejas no total do experimento. As coletas das plantas foram efetuadas aos 10, 11, 12 e 13 dias após emergência (DAE), sendo coletadas duas bandejas em cada época de coleta, correspondendo a oito repetições de uma planta por cultivar. O segundo experimento foi conduzido entre 27 de fevereiro e 9 de março de 2012, com quatro cultivares de feijoeiro (Radiante, Valente, Ouro Negro e Pontal). Nesse experimento, assim como nos experimentos posteriores, os dados da cultivar Jalo Precoce não foram utilizados, vez que a mortalidade das plântulas dessa cultivar era bastante elevada, impossibilitando a análise final. As plantas foram dispostas nas bandejas inteiramente ao acaso, com quatro repetições de cada cultivar por bandeja e quatro bandejas. As coletas das plantas foram efetuadas aos 10 e 12 DAE, sendo coletadas duas bandejas em cada época de coleta, correspondendo a oito repetições de uma planta por cultivar.

Para a avaliação do efeito do N no início da nodulação do feijoeiro, foram conduzidos dois experimentos, nos quais foram comparadas plantas na ausência e presença de N mineral na forma de uréia. O primeiro experimento, conduzido entre 16 e 30 de abril de 2012, teve esquema fatorial 2 x 5, entre dois níveis de N (ausência e presença de N mineral com 2 mmol de N na solução nutritiva) e quatro cultivares de feijoeiro (Radiante, Valente,

Ouro Negro e Pontal). As plantas foram dispostas inteiramente ao acaso nas bandejas, com cinco repetições de cada cultivar por bandeja, e oito bandejas no total do experimento. As coletas foram efetuadas aos 10, 11, 12 e 13 DAE, sendo coletada duas bandejas em cada época de coleta (uma para cada nível de N), correspondendo a cinco repetições de uma planta por cultivar. O segundo experimento, conduzido de 26 de maio a 8 de junho de 2012, teve esquema fatorial 4 x 4, entre quatro doses de N (0, 1, 2 e 4 mmol na solução nutritiva) e quatro cultivares de feijoeiro (Radiante, Valente, Ouro Negro e Pontal). As plantas foram dispostas inteiramente ao acaso nas bandejas, com cinco repetições de cada cultivar por bandeja, e oito bandejas no total do experimento. As coletas foram efetuadas aos 10 e 12 DAE, sendo coletada quatro bandejas em cada época de coleta (uma para cada nível de N), correspondendo a cinco repetições de uma planta por cultivar.

Além disso, foi conduzido um terceiro experimento, entre 12 de agosto e 5 de setembro de 2012, no qual as plantas foram cultivadas em vasos contendo 1 L de solução nutritiva, cada vaso com duas plantas, utilizando-se apenas a cultivar Valente. O experimento teve delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 3 com seis repetições, entre dois níveis de N (ausência e presença de N mineral com 2 mmol na solução nutritiva) e três épocas de coleta (11, 15 e 20 DAE), totalizando 36 vasos.

A solução nutritiva foi preparada conforme Araújo et al. (2008), e continha 1,65 mM de CaCl_2 , 1,0 mM de MgSO_4 , 0,25 mM de KH_2PO_4 , 0,7 mM de K_2SO_4 , 8,0 μM de Fe-EDTA, 6 μM de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 4 μM de H_3BO_3 , 2 μM de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 μM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,2 μM de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Cada bandeja recebeu 10 g de CaCO_3 , e no experimento com vasos cada vaso recebeu 1 g de CaCO_3 , para tamponar a solução para pH em torno de 7 (Araújo et al., 2008). A aeração das bandejas e dos vasos plásticos foi realizada por bombeamento de ar com compressor de ar BOYU[®] de 0,2 HP de potência acoplada a tubos de silicone de 25 mm ligados a cada bandeja ou vaso, a aeração foi realizada sem tempo de pausa. A solução nutritiva era trocada semanalmente.



Figura 1. Vista do primeiro experimento de avaliação da iniciação da nodulação, conduzido em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia, em Seropédica- RJ.

As sementes foram inoculadas com o coquetel composto pelas estirpes comerciais BR 322 (CIAT 899), BR 520 (PRF 81) e BR 534 (CPAC H 12) de *Rhizobium tropici*, sendo o inoculante preparado no laboratório de meio de cultura da Embrapa Agrobiologia. As estirpes foram crescidas inicialmente em placas de petri contendo meio YMA sólido (VINCENT, 1970) para verificação da pureza. Posteriormente, as colônias isoladas foram transferidas para erlenmeyer contendo meio YMA líquido, onde permaneceram por três dias em agitador a 30 °C e 150 rpm.

Para obter uma quantidade elevada de células no inoculante, foram transferidos 20 mL do inoculante líquido para tubos do tipo Falcon para centrifugação, e o precipitado celular foi lavado com solução salina 0,85%; esse procedimento foi repetido três vezes. O material resultante foi transferido para erlenmeyer contendo 250 mL de solução salina, permanecendo em agitador a 150 rpm por 10 min.

As sementes de feijão foram imersas em água destilada por 10 min para posterior desinfestação. Após a hidratação, as sementes foram imersas em álcool 70% por 30 segundos e em seguida, imersas em peróxido de hidrogênio por 3 min, sendo lavadas dez vezes em água destilada autoclavada. As plantas foram germinadas em bandejas plásticas de 30x20x10 cm forradas com uma camada de algodão sob papel absorvente, e o algodão foi umedecido com água destilada autoclavada.

Após a emissão da radícula, as plântulas foram inoculadas por meio da submersão do sistema radicular no inoculante líquido em placa de petri por 30 min. Após a inoculação, os caules das plântulas foram envolvidos por algodão para o cultivo em solução nutritiva. As plântulas foram presas a placas de isopor (poliestireno expandido) que permaneceram sobre as bandejas ou vasos, deixando as raízes das plantas em contato com a solução.

Após o preparo do inoculante, foi realizada uma contagem de rizóbio. Foram retiradas três alíquotas de 0,10 mL do inoculante líquido com pipetador automático, sendo transferidas para microtubos do tipo Eppendorf. As amostras foram diluídas em 0,9 mL solução salina (0,85%, acrescida de 0,1% de Tween-20) e agitadas em vortex PARSEC[®], foi realizada uma diluição seriada de cada amostra até a diluição 10⁻⁷. As diluições 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ e 10⁻⁷ foram transferidas para placas de petri contendo meio YMA pelo método da gota escorrida (EMBRAPA, 2013) para posterior contagem de colônias detecção do número de unidades formadoras de colônias por mL de inoculante (UFC mL⁻¹, VINCENT, 1970).

2.2 Coletas e Avaliações Realizadas

Em todos os experimentos, as plantas foram observadas diariamente até a emissão do primeiro nódulo. Após a emissão do primeiro nódulo, foram realizadas coletas a fim de detectar o início da fixação de N₂ por meio da avaliação da atividade da nitrogenase.

Nas coletas, os sistemas radiculares foram cortados e colocados em erlenmeyer de 250 mL para a avaliação da redução de acetileno. Nos erlenmeyers hermeticamente fechados, foram retirados 25 mL do ar contido em seu interior, aplicando em seguida 25 mL de acetileno, usando uma seringa de injeção. Após a incubação por 30 min, foi coletada uma amostra de 1 mL, sendo injetada 0,5 mL para leitura da concentração de etileno em cromatografia gasosa no laboratório de Ciclagem de Nutrientes na Embrapa Agrobiologia. Foi utilizado o cromatógrafo a gás modelo Perkin-Elmer L Auto System e Integrator PE Nelson Modelo 1022, com Detector de Ionização de Chama (FID - Flame Ionization Detector) e coluna cromatográfica Poropak N. A curva padrão de etileno foi construída injetando-se no cromatógrafo o etileno nas concentrações de 6, 15 e 30 µL mL⁻¹. Os valores de etileno produzido foram convertidos para µmol C₂H₄ h⁻¹ planta⁻¹, considerados como a atividade da nitrogenase.

Os nódulos destacados foram espalhados em folhas de acetato transparentes com dimensões de 20x30 cm. As folhas de acetato foram colocadas em scanner de mesa EPSON® NX200, e a imagem foi digitalizada em tons de cinza (cinzento a 8 bits) e 300 dpi de resolução. Posteriormente, cada imagem foi submetida a contraste e binarização, sendo removidos elementos que foram considerados como impurezas (Figura 2).

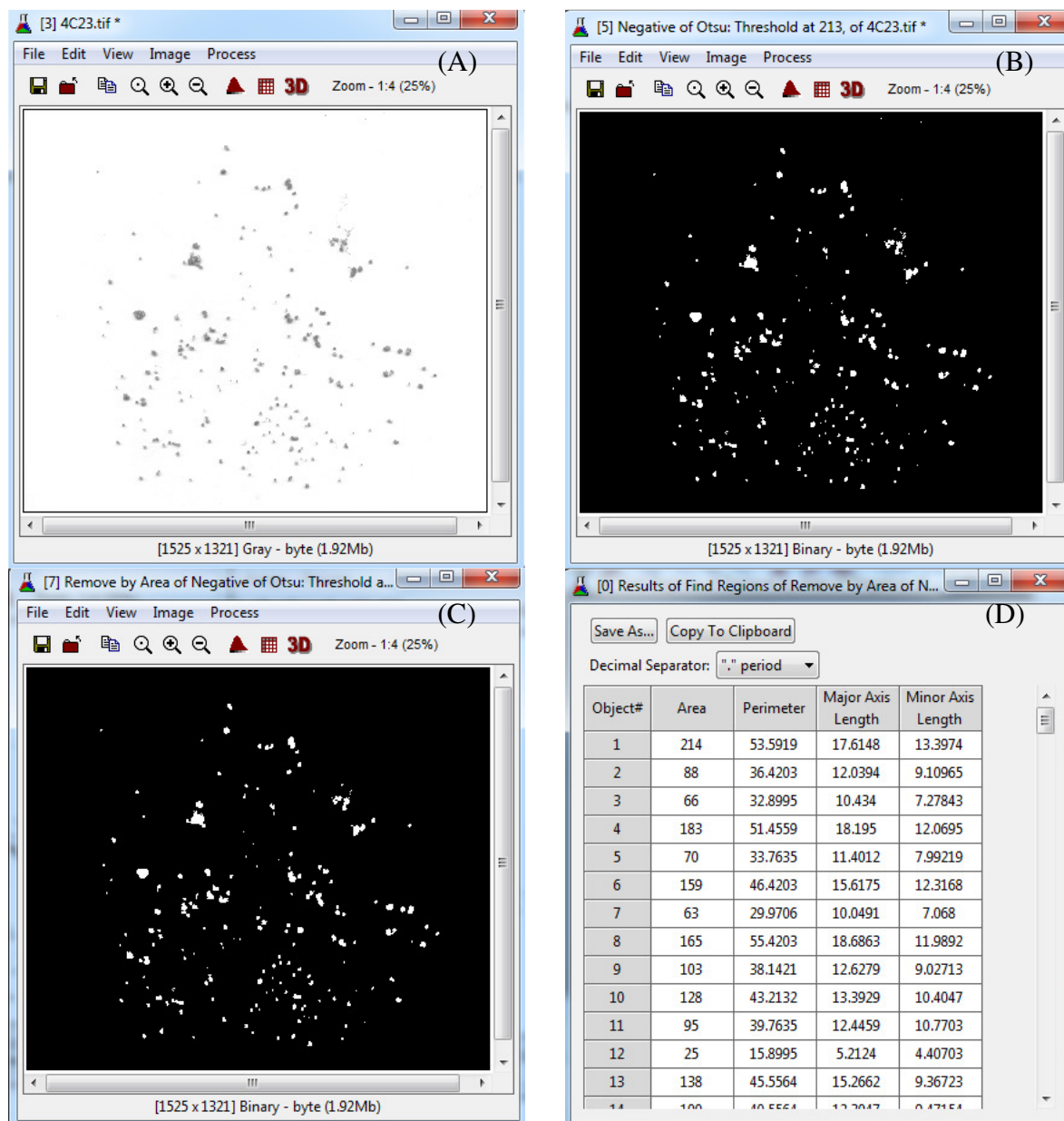


Figura 2: Etapas do processamento de imagens para estimativa do diâmetro e do número de nódulos de feijoeiro por análise digital de imagens (software Imlab): (A) imagem em tons de cinza; (B) imagem após contraste e binarização; (C) imagem após remoção de objetos considerados como impurezas; (D) resultado do processo de estimativa da área em pixels de cada objeto.

Todo este procedimento foi efetuado por meio do programa ImLab versão 2.3 (SCURI, 2010), que efetua a contagem dos objetos na imagem e fornece o número de pixels presente em cada objeto. Após a contagem do número de pixels no Imlab, os dados foram

transferidos ao Excel, onde foi determinada a área de cada objeto através da equação: (número de pixels) \times (25,4/300)²/100, na qual cada pixel possuía 25,4/300 mm de largura, de acordo com a resolução da imagem de 300 dpi (*dots per inch*, ou pixels por polegada) obtida quando da digitalização. Com a área de cada objeto detectado na imagem, calculou-se seu diâmetro considerando-o como um círculo.

Em todas as coletas, cada planta foi cortada na altura da interseção do caule com a raiz. A parte aérea de cada planta foi posta em saco de papel e, após as análises de redução de acetileno e de mensuração dos nódulos, os sistemas radiculares e os nódulos também foram postos em sacos de papel. Todo o material vegetal foi seco em estufa a 65 °C. Após a secagem, as amostras foram pesadas em balança com precisão de 0,1 mg.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, para cada época de coleta isoladamente, comparando-se as médias pelo teste de Duncan a 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação do Início da Nodulação e da Atividade da Nitrogenase

No primeiro experimento, conduzido em novembro de 2011, o primeiro nódulo nas plântulas de feijoeiro ocorreu aos 10 DAE, independentemente da cultivar (Figura 3). O mesmo ocorre em feijão caupi (*Vigna unguiculata*), o qual o início da nodulação pode ser observado, em condições de casa de vegetação, em até 10 DAE (XAVIER et al., 2007). A nodulação da soja ocorre mais precocemente em comparação com o feijoeiro comum e caupi. Vargas et al. (1982), em um experimento em condições de campo, observaram que o primeiro nódulo da soja foi emitido aos 5 DAE. Um dos motivos pelos quais a eficiência de feijoeiro é baixa em comparação com a soja é que o tempo de manutenção dos nódulos em feijoeiro é inferior à soja. No presente trabalho fica evidenciado que a formação dos nódulos de feijão ocorre tardiamente em relação aos nódulos de plantas de soja, deixando um espaço de tempo curto para o feijoeiro realizar a formação e desenvolvimento de nódulos e a fixação do N₂ com eficiência.

Nesse experimento, os valores de massa seca de nódulos foram inferiores a 30 mg planta⁻¹, visto que as plantas se encontravam em estágio inicial de desenvolvimento. De forma geral, a massa, diâmetro e o número de nódulos aumentaram ao longo das coletas, nas cultivares testadas (Figura 3).

Na fase inicial da nodulação, não foi possível detectar diferença nos parâmetros de nodulação entre as diferentes cultivares de feijão. Não foram observadas diferenças significativas entre as cultivares na massa, diâmetro e no número de nódulos, parcialmente em virtude dos elevados coeficientes de variação observados nestes parâmetros (Figura 3). Além disso, as coletas foram realizadas até o quarto dia após a emissão do primeiro nódulo, quando o desenvolvimento dos nódulos estava ainda em fase inicial. Provavelmente a diferença na nodulação entre as cultivares seria observada em uma fase mais tardia.

A detecção da atividade da nitrogenase foi observada aos 11 DAE em todas as cultivares, com aumento crescente com as coletas (Figura 3). Felix et al. (1981) detectaram o pico de atividade da nitrogenase em feijoeiro entre a floração plena e o início do enchimento de grãos. Foi observado um aumento acentuado na atividade da nitrogenase na cultivar Valente aos 13 DAE. Aos 12 e 13 DAE, a atividade da nitrogenase na cultivar Pontal foi maior que na cultivar Radiante. Aos 13 DAE, a atividade da nitrogenase na cultivar Valente foi maior que nas cultivares Radiante e Jalo Precoce, ambas cultivares de ciclo precoce. Isto indica um retardo no início do processo de FBN nas cultivares de ciclo precoce e hábito de crescimento determinado, o que reforça as evidências de que cultivares de feijoeiro de ciclo precoce têm menor potencial de fixação de N que cultivares de ciclo longo (RUSCHEL et al., 1982).

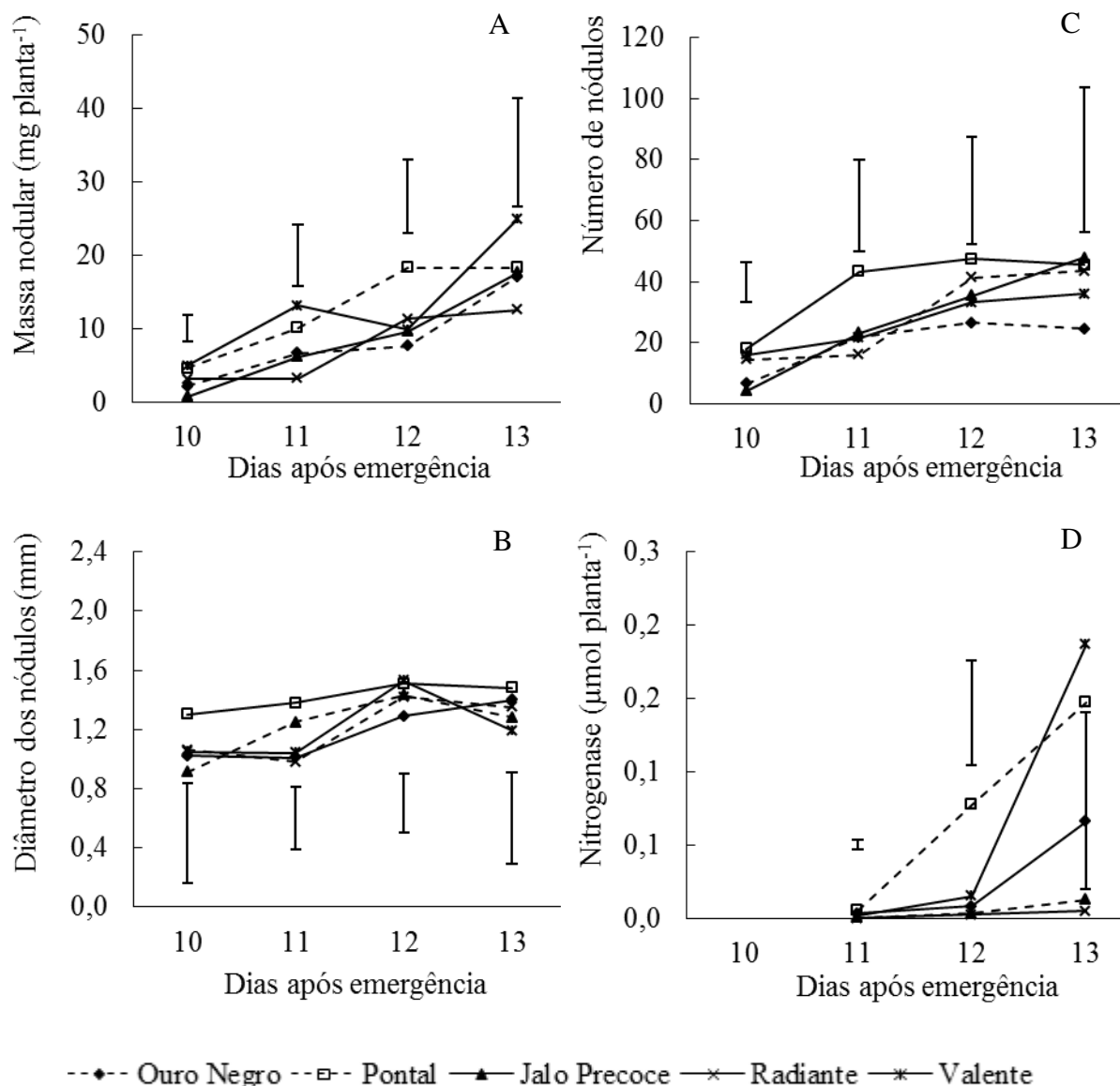


Figura 3: Massa seca de nódulos (A), número de nódulos (B), diâmetro médio de nódulos (C) e atividade da nitrogenase (D) no sistema radicular, de cinco cultivares de feijoeiro crescidas em solução nutritiva isenta de N, em quatro épocas de avaliação; barras verticais representam a diferença mínima significativa (Duncan 5%) e comparam cultivares dentro de cada época de coleta.

Os valores de massa seca de parte aérea de todas as cultivares aos 13 DAE foram inferiores aos valores aos 12 DAE (Figura 4). Esta redução na massa seca de parte aérea provavelmente se deve a proximidade do período de “fome” de N, que acontece por ocasião da queda do cotilédone, aproximadamente aos 15 dias após germinação (HUNGRIA et al., 1997). Apesar de se observar atividade da nitrogenase (Figura 3), as reservas de N contidas no cotilédone foram reduzidas e o N produzido pela FBN não deve ter sido suficiente para a demanda das plantas e, conseqüentemente, para o incremento na massa seca de parte aérea. Aos 10, 11 e 13 DAE, as cultivares de ciclo precoce (Jalo Precoce e Radiante) apresentaram massa seca de parte aérea superior às encontradas nas cultivares de ciclo tardio (Figura 4), inclusive por terem sementes maiores.

Os resultados de massa seca de parte aérea evidenciam o efeito das sementes das cultivares precoces, com maior desenvolvimento de parte aérea apesar de terem apresentado baixa atividade da nitrogenase em comparação com as cultivares de ciclo tardio. Esse resultado pode também ser motivado pelo acúmulo de massa seca de raízes dessas cultivares, que foi, de modo geral, superior às cultivares de ciclo tardio, o que pode ter promovido maior absorção de nutrientes. Além disso, os dados de massa seca de parte aérea e raízes associados aos dados de atividade da nitrogenase obtidos no presente experimento levantam a hipótese de que a nodulação tardia em cultivares de ciclo precoce é ocasionada pela maior reserva cotiledonar, devido ao maior tamanho do grão em comparação com as demais cultivares (Tabela 1).

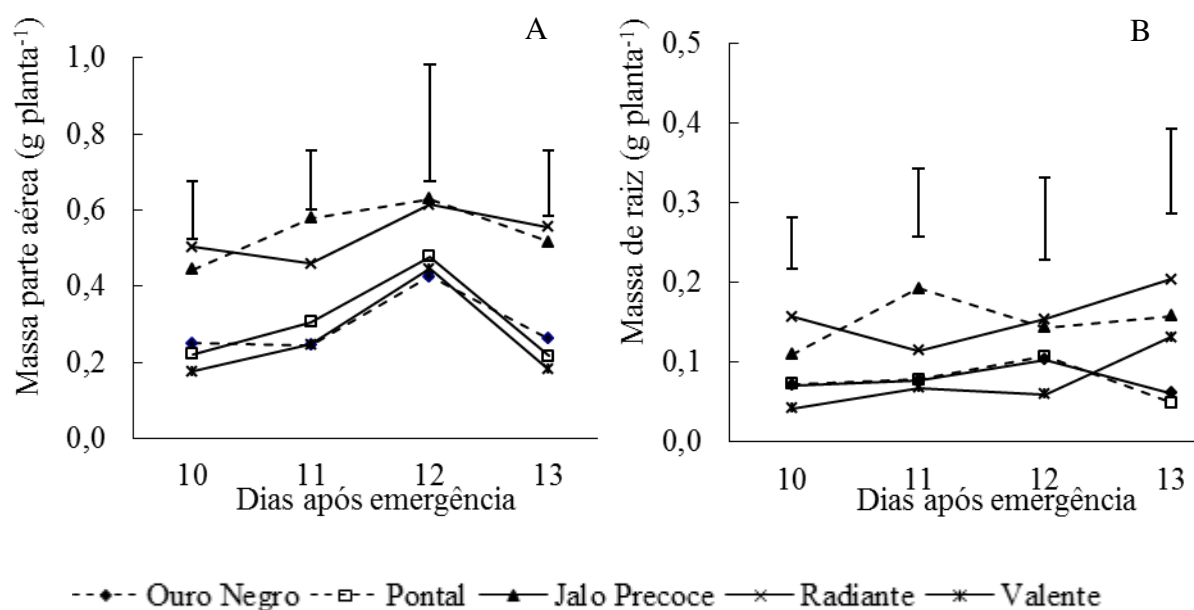


Figura 4: Massa seca de parte aérea (A) e de raízes (B) de cinco cultivares de feijoeiro, inoculadas com rizóbio e cultivadas em solução nutritiva, em quatro épocas de avaliação após a emissão do primeiro nódulo. Barras verticais representam a diferença mínima significativa (Duncan 5%) e comparam cultivares dentro de cada época de coleta.

No segundo experimento, conduzido em fevereiro de 2012, assim como no primeiro experimento, o início da nodulação ocorreu aos 10 DAE, independente da cultivar testada (Figura 5). De modo geral, houve um acréscimo na massa seca de nódulos entre os 10 e 12 DAE em todas as cultivares (Figura 5). A nodulação na cultivar Pontal foi maior que nas cultivares Ouro Negro e Valente na primeira coleta. Esse resultado remete ao estudo realizado por Araújo et al. (1996) sobre o início da nodulação em sete cultivares de feijoeiro, onde foi observado que sementes do tipo carioca exsudam mais indutores dos genes da nodulação em comparação com sementes pretas. Isso também pode se justificar pelo número elevado de nódulos observado nessa coleta na cultivar Pontal, que foi superior ao número de nódulos das cultivares Radiante e Ouro Negro. No entanto, nos 12 DAE, não foi observada diferença entre o diâmetro de nódulos nas cultivares testadas (Figura 5).

Na cultivar Radiante, a nodulação foi menor que nas cultivares Valente e Ouro Negro aos 10 DAE e menor em comparação com as demais cultivares aos 12 DAE (Figura 5). Isso reforça os dados encontrados no primeiro experimento e a constatação de Ruschel et al. (1982) de que cultivares de ciclo precoce tem menor capacidade de nodulação. Aos 12 DAE,

a cultivar Radiante apresentou menor atividade da nitrogenase que as demais cultivares, confirmando um menor potencial para FBN das cultivares precoces. Não foi observada diferença estatística entre as cultivares no diâmetro de nódulos (Figura 5).

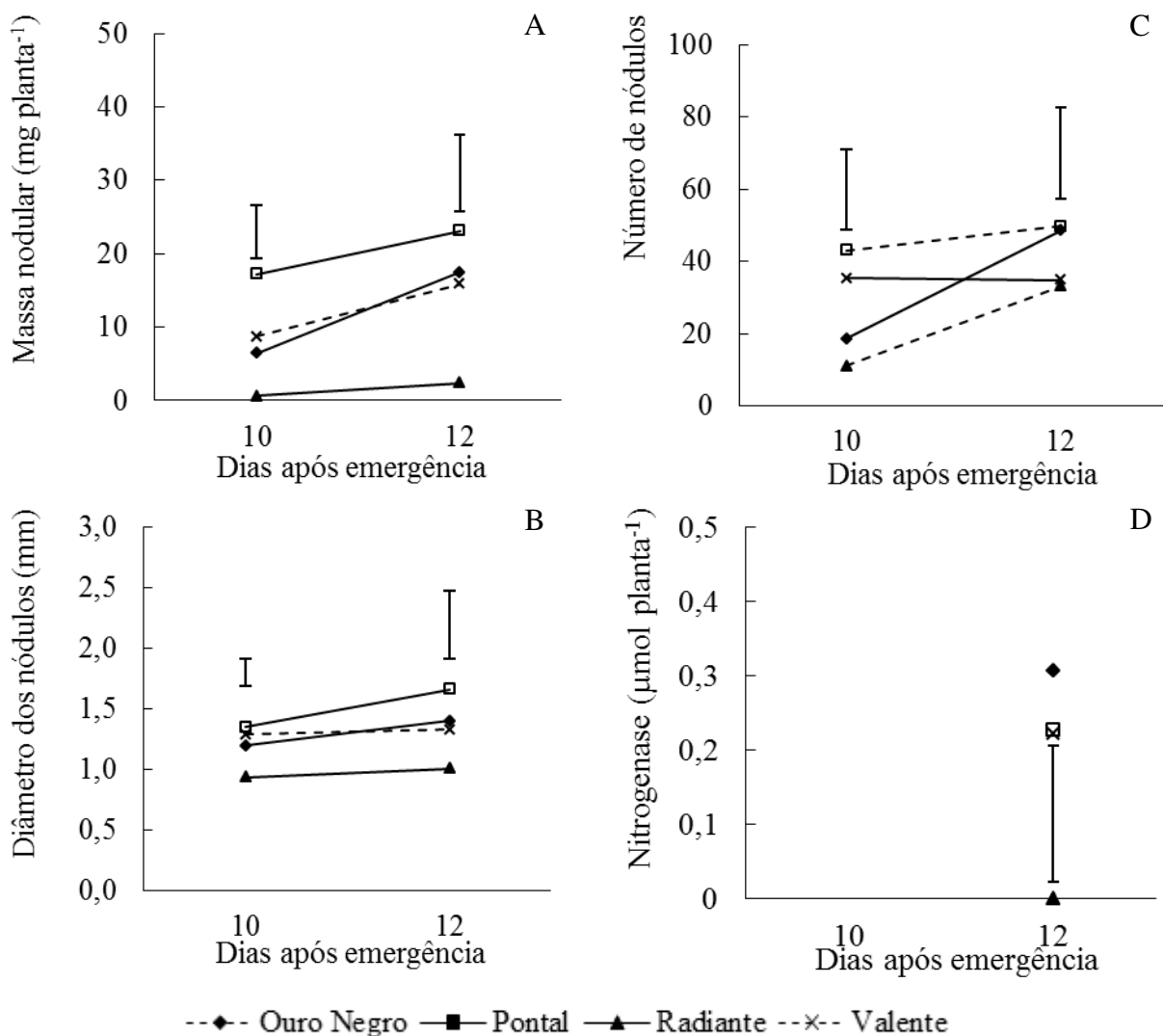


Figura 5: Massa seca (A), diâmetro (B) e número (C) de nódulos e atividade da nitrogenase (D) de quatro cultivares de feijoeiro crescidas em solução nutritiva, em duas épocas de avaliação. Barras verticais representam a diferença mínima significativa (Duncan 5%) e comparam cultivares dentro de cada época de coleta.

Para a massa seca de raízes, a cultivar Radiante foi superior em comparação às demais cultivares testadas (Figura 6). Não houve diferença significativa na massa seca de parte aérea entre as cultivares testadas (Figura 6). Observou-se uma queda na massa seca de parte aérea aos 12 DAE, em todas as cultivares (Figura 6), confirmando os dados do primeiro experimento (Figura 4), quando uma possível “fome” de N teria ocasionado uma pequena perda da massa de parte aérea, devido à proximidade do período da queda do cotilédone (HUNGRIA et al., 1997).

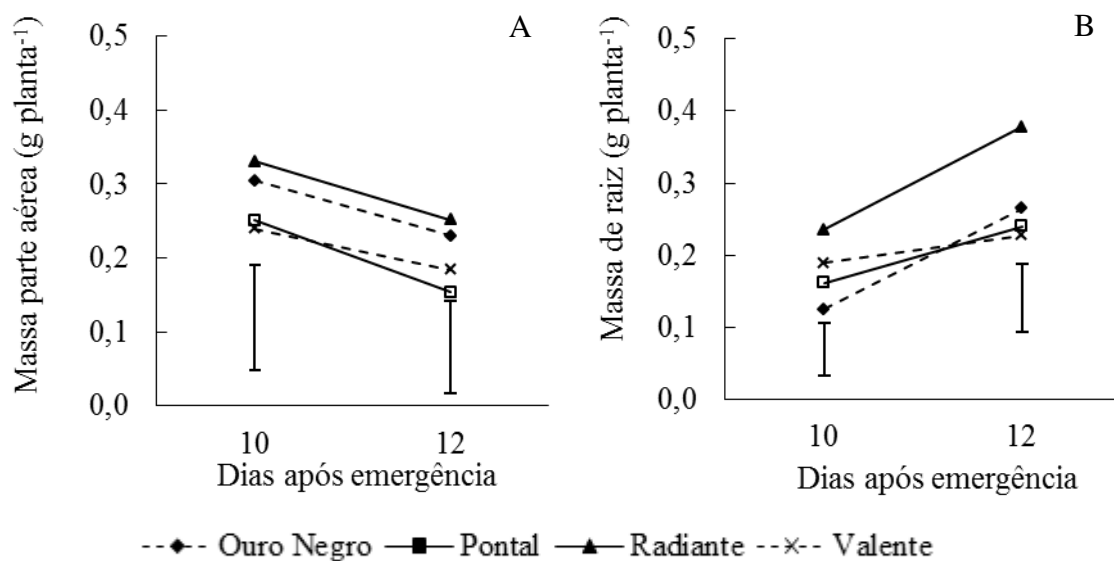


Figura 6: Massa seca de parte aérea (A) e de raízes (B) de quatro cultivares de feijoeiro, inoculadas com rizóbio e cultivadas em solução nutritiva, em duas épocas de avaliação. Barras verticais representam a diferença mínima significativa (Duncan 5%) e comparam cultivares dentro de cada época de coleta.

3.2 Efeito do Nitrogênio Sobre a Iniciação da Nodulação e da Atividade da Nitrogenase

No primeiro experimento, conduzido em abril de 2012, na média das cultivares, o início da nodulação ocorreu aos 10 DAE, tanto nos tratamentos com ou sem aplicação de N mineral (Figura 7). Na média das cultivares, em todas as coletas, a massa seca e o número de nódulos no tratamento sem adição de N foram maiores que no tratamento de inoculação com adição de N (Figura 7), indicando que a presença de N reduziu a nodulação inicial do feijoeiro. Da mesma forma, o diâmetro de nódulos foi maior no tratamento de inoculação sem adição de N, indicando que a adição de N induziu a formação de nódulos menores. A atividade da nitrogenase também foi menor no tratamento com adição de N mineral (Figura 7). O efeito prejudicial do N mineral à nodulação já foi relatado por Franco & Döbereiner (1986). No entanto, o resultado do presente experimento aponta claramente esse efeito nos primeiros dias da nodulação do feijoeiro, quando se inicia a fixação.

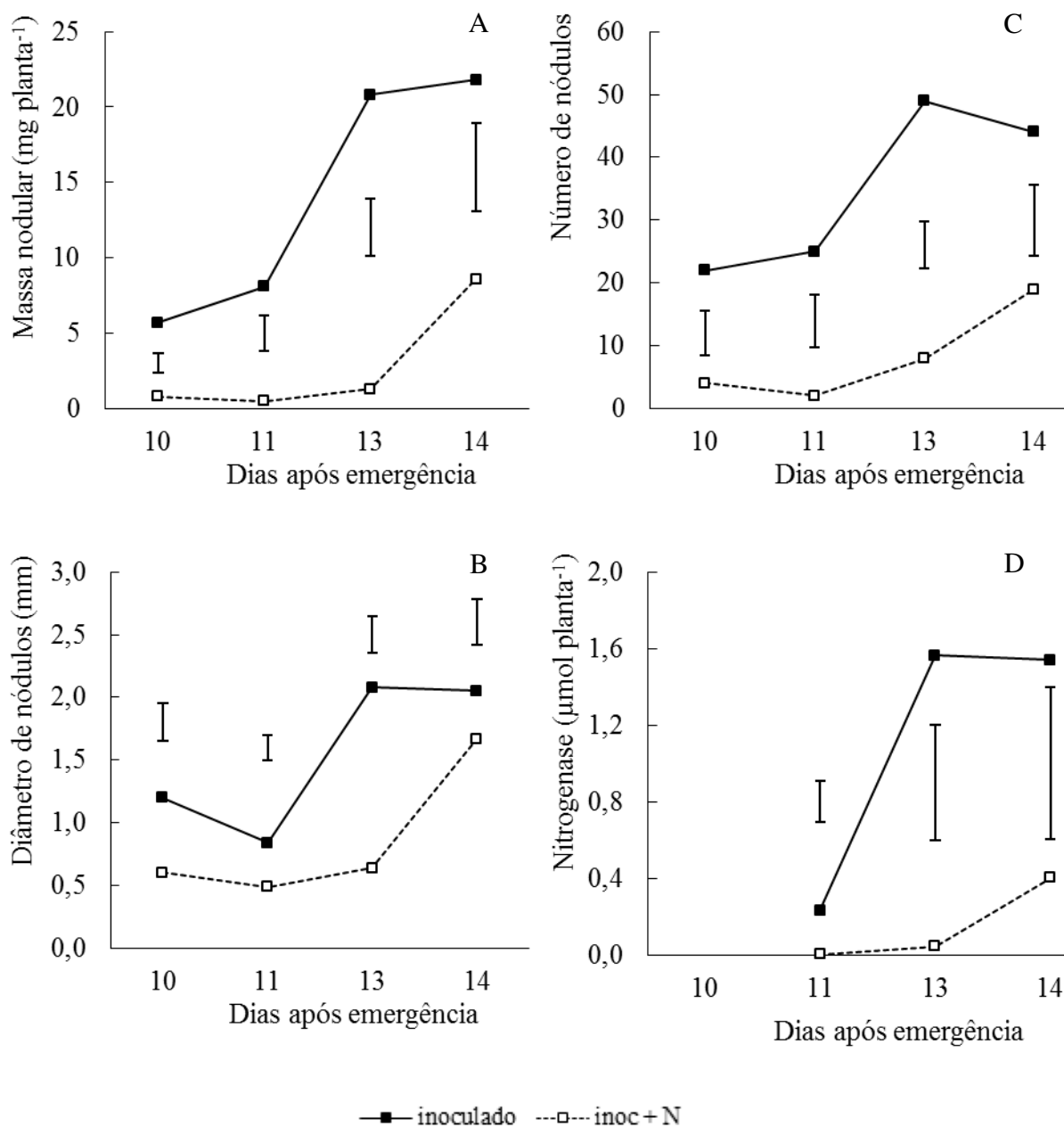


Figura 7: Massa seca (A), diâmetro (B) e número (C) de nódulos e atividade da nitrogenase (D) de plantas de feijoeiro, cultivadas em solução nutritiva, sob inoculação e inoculação com adição de 2 mmol de N mineral; médias de quatro cultivares (Ouro Negro, Valente, Pontal e Radiante). Barras verticais representam a diferença mínima significativa (Duncan 5%) e comparam fontes de N dentro de cada época de coleta.

Na média dos tratamentos de fontes de N, a cultivar Radiante apresentou nodulação apenas aos 13 DAE (Figura 8), evidenciando novamente o menor potencial de nodulação na cultivar de ciclo curto. As cultivares Ouro Negro e Pontal apresentaram massa seca e número de nódulos superiores à cultivar Radiante em todas as coletas (Figura 8). De modo geral, a massa seca e o número de nódulos sofreram um acréscimo entre os 11 e 14 DAE (Figura 8). A cultivar Radiante produziu nódulos de diâmetro inferior às demais cultivares em todas as coletas, não diferindo apenas da cultivar Valente aos 13 DAE Apesar do aumento do número

e diâmetro dos nódulos, a cultivar Radiante não apresentou, na média dos tratamentos, atividade da nitrogenase até os 13 DAE, iniciando-se apenas aos 14 DAE (Figura 8).

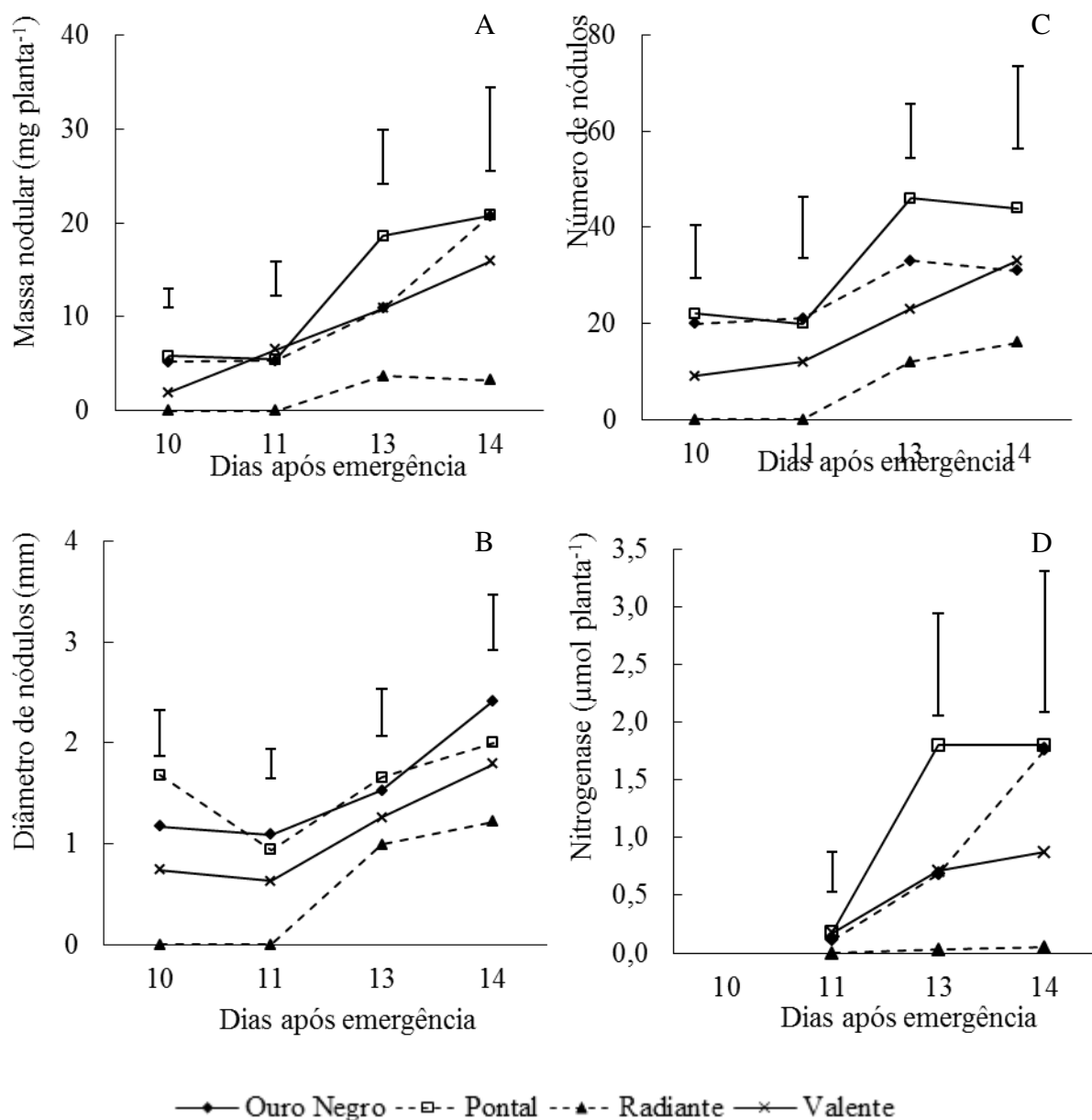


Figura 8: Massa seca (A), diâmetro (B) e número (C) de nódulos e atividade da nitrogenase (D) de quatro cultivares de feijoeiro (Ouro Negro, Valente, Pontal e Radiante), cultivadas em solução nutritiva; médias de dois tratamentos (inoculação e inoculação com adição de 2 mmol de N). Barras verticais representam a diferença mínima significativa (Duncan 5%) e comparam cultivares dentro de cada época de coleta.

No segundo experimento, conduzido em maio de 2012, observa-se que a nodulação ocorreu apenas nos tratamentos de ausência de N e de adição de 1 mmol de N (Figura 9), tendo a massa de nódulos no tratamento de ausência de N e no tratamento de adição de 1 mmol de N aumentado após os 10 DAE (Figura 9). Nesse experimento, a nodulação foi completamente inibida quando a dose de N foi aumentada para 2 e 4 mmol (Figura 9). No entanto, no experimento anterior, a nodulação ocorreu no tratamento com dose de 2 mmol de

N, apesar de parcialmente inibida (Figura7). Apesar de ter se procedido a inoculação da mesma forma nos dois experimentos, a aderência das bactérias nas raízes das plântulas pode ter sido diferenciada. Há muito tempo se conhece que apenas uma pequena quantidade de bactérias presente no meio de cultura é capaz de aderir às raízes, mesmo nos casos como o do presente trabalho, onde a quantidade de células por mL de inoculante foi mantida elevada (ARAÚJO et al., 1996).

Como nos dois experimentos a mesma dose de N inibiu a nodulação de maneira diferente, investigações futuras são necessárias a fim de encontrar uma dose ótima de N, que pode proporcionar um arranque para a produção de parte aérea na fase inicial do desenvolvimento das plantas de feijoeiro, sem causar uma grande limitação na nodulação. Observa-se que no tratamento de inoculação e adição de 1 mmol de N, a produção de massa seca de parte aérea foi superior ao tratamento com aplicação de 2 mmol aos 10 DAE e ao tratamento de aplicação de 4 mmol de N aos 10 e 12 DAE (Figura 9).

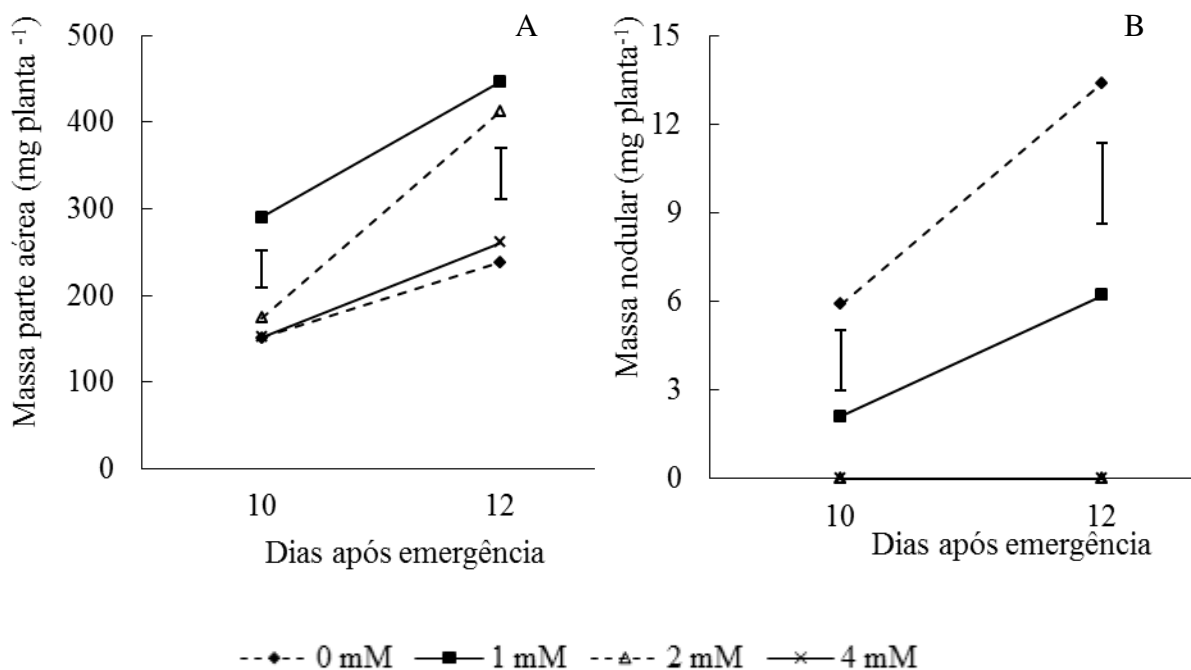


Figura 9: Massa seca de parte aérea (A) e de nódulos (B) de plantas de feijoeiro, cultivadas em solução nutritiva, sob quatro doses de N; médias de quatro cultivares (Ouro Negro, Valente, Pontal e Radiante). Barras verticais representam a diferença mínima significativa (Duncan 5%) e comparam doses de N dentro de cada época de coleta.

No terceiro experimento, conduzido em agosto de 2012, foram utilizados vasos com 1 L de solução nutritiva com duas plantas por vaso, e desta foram as plantas foram crescidas por mais tempo (até os 20 DAE), obtendo-se resultados mais consistentes sobre a produção de parte aérea das plantas de feijoeiro.

Como aos 11 DAE havia muitas plantas sem nódulos no tratamento com adição de N, não foi efetuada a análise estatística do diâmetro dos nódulos. Aos 11 DAE, o número de nódulos foi inferior no tratamento de inoculação e adição de N, sendo esses valores inferiores a 4 nódulos por planta (Figura 10). O diâmetro dos nódulos do tratamento com adição de N foi inferior ao tratamento de inoculação aos 15 DAE. Apesar disso, nas três coletas não houve

diferença estatística entre os dois tratamentos na massa seca de nódulos. A atividade da nitrogenase foi inibida pelo uso do N mineral aos 11 e 15 DAE (Figura 10).

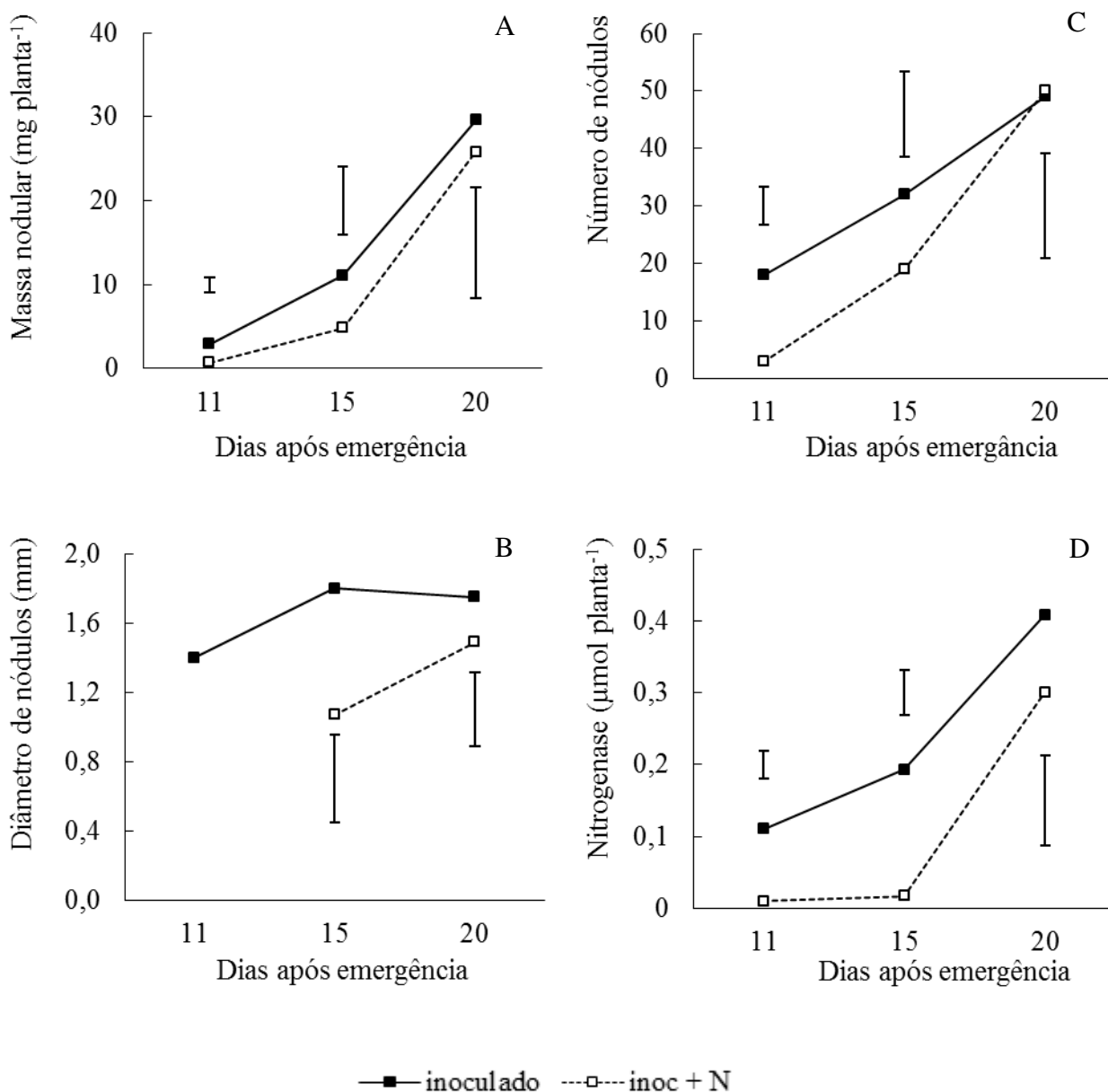


Figura 10: Massa seca (A), diâmetro (B) e número (C) de nódulos e atividade da nitrogenase (D) plantas de feijoeiro cultivar Valente, cultivadas em solução nutritiva, sob inoculação e inoculação com adição de 2 mmol de N mineral. Barras verticais representam a diferença mínima significativa (Duncan 5%) e comparam fontes de N dentro de cada época de coleta.

Os dados apresentados nos experimentos de avaliação do efeito do N no início da nodulação comprovam a inibição de algumas características da nodulação causada pela aplicação de N mineral na fase emissão dos nódulos de feijoeiro e do início da fixação nessa cultura. A inibição da nodulação tem efeito negativo direto na produção e na qualidade dos grãos de feijoeiro, uma vez que existe uma correlação positiva entre a massa nodular e a

quantidade de N acumulado no grão de feijão (DÖBEREINER, 1966). Essa correlação ocorre também em feijão caupi (WADISIRISUK & WEAVER, 1985).

Aos 20 DAE, foi observado que o número e o diâmetro dos nódulos e a atividade da nitrogenase dos dois tratamentos se igualaram (Figura 10), o que sugere que a inibição dessas características encontrada no tratamento com aplicação de N nos primeiros dias da nodulação pode ser um efeito inicial, que permite a posterior recuperação da massa nodular pelas plantas quando aplicada uma dose ótima de N mineral.

Aos 15 DAE, foi observada diferença significativa entre os tratamentos no desenvolvimento de raízes e parte aérea das plantas, sendo o tratamento de inoculação com aplicação de N mineral superior ao tratamento de inoculação (Figura 11). Esse resultado sugere, assim como no primeiro experimento de avaliação do início da nodulação (Figura 4), a ocorrência de um período de “fome de N” em plantas de feijoeiro inoculadas com rizóbio. A queda do cotilédone ocorre aproximadamente aos 15 DAE (HUNGRIA et al., 1997), na mesma época em que foi observada a diferença entre os tratamentos no desenvolvimento de raízes e parte aérea. Observa-se que o uso do N mineral em associação com a inoculação suprimiu o efeito da “fome de N”, possivelmente por ter fornecido à planta o suprimento de N necessário para o incremento da massa seca que não fornecido pela FBN. No entanto, os valores de massa seca de parte aérea e raízes dos dois tratamentos foram similares aos 20 DAE (Figura 11), sugerindo que a planta de feijoeiro inoculada com rizóbio pode promover uma recuperação de massa seca após o período de deficiência de N ocasionado pela perda das reservas cotiledonares.

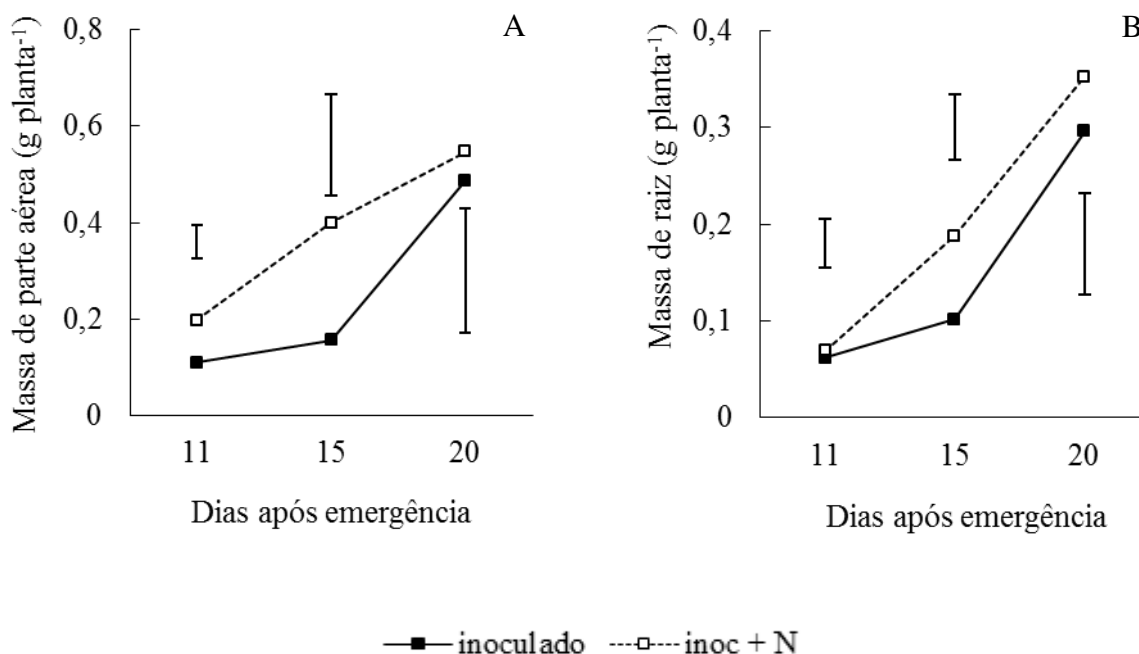


Figura 11: Massa seca de parte aérea (A) e de raízes (B) de plantas de feijoeiro cultivar Valente, cultivadas em solução nutritiva, sob inoculação e inoculação com adição de 2 mmol de N mineral. Barras verticais representam a diferença mínima significativa (Duncan 5%) e comparam fontes de N dentro de cada época de coleta.

4 CONCLUSÕES

O início da nodulação nas plantas de feijoeiro ocorre aos 10 dias após a emergência, nas cinco cultivares avaliadas. A atividade da nitrogenase se iniciou aos 11 dias após a emergência em todas as cultivares. As cultivares Radiante e Jalo Precoce, de ciclo precoce, apresentaram atividade da nitrogenase inferior às cultivares Pontal e Valente, de ciclo normal.

A adição de N prejudicou a nodulação em sua fase inicial em todas as cultivares de feijoeiro, anulando-a a partir da dose de 2 mmol de N.

Aos 15 DAE as plantas de feijoeiro inoculadas com rizóbio sofreram uma redução de massa seca de parte aérea e raízes, em comparação com plantas inoculadas que receberam N mineral, indicando um período de “fome” de N, quando se esgotam as reservas cotiledonares e o N oriundo da fixação biológica não supre a demanda total da planta.

**CAPÍTULO II - EFEITO DA ÉPOCA DE APLICAÇÃO DO
NITROGÊNIO SOBRE A PRODUÇÃO DO FEIJOEIRO
INOCULADO COM RIZÓBIO**

RESUMO

Trabalhos recentes de pesquisa reportam elevada eficiência de rizóbios nativos na inoculação do feijão e também a possibilidade da associação da inoculação com rizóbio e a adubação nitrogenada. O objetivo do presente trabalho foi avaliar, em condições de campo, o efeito da época de aplicação do N sobre a nodulação e rendimento do feijoeiro em cultivo sob inoculação com estirpes comerciais de rizóbio. Foram conduzidos dois experimentos de campo no Estado do Rio de Janeiro, dentro de propriedades rurais, o primeiro entre maio e julho de 2012, em Rio das Ostras, e o segundo entre agosto de 2012 e outubro de 2012, em Macaé. Os dois experimentos eram em blocos ao acaso, com cinco repetições, sendo avaliada a inoculação associada à adubação mineral no plantio e em cobertura. Foram realizadas coletas de biomassa na época da floração, determinando-se massa seca de parte aérea, raízes e nódulos, e avaliados a produção de grãos e componentes de produção na maturação. Os tratamentos de inoculação com as estirpes de rizóbio associada à adubação nitrogenada em cobertura forneceram massa seca de parte aérea na floração e produção de grãos similares às observadas no tratamento de testemunha nitrogenada. Os resultados dos dois experimentos de campo sugerem que o uso do N mineral no plantio pode ser substituído pela inoculação com rizóbio sem causar reflexos negativos na produtividade de grãos.

ABSTRACT

Recent researches reported high efficiency of indigenous rhizobia for nodulation of common bean and also the possibility of the association of inoculation and nitrogen fertilization. The objective of this study was to evaluate, under field conditions, the effect of timing of N fertilizer application on nodulation and yield of common bean under inoculation with commercial rhizobia strains. Two field experiments were conducted in farms in the State of Rio de Janeiro, the first between May and July 2012 in Rio das Ostras, and the second between August 2012 and October 2012 in Macaé. The two experiments had randomized block design with five replications, where inoculation associated with mineral fertilizer at planting and coverage were evaluated. Biomass was sampled at flowering, when dry mass of shoots, roots and nodules were determined, and grain yield and yield components were evaluated at maturity. The inoculation with rhizobia associated with nitrogen at covering gave dry mass of shoots at flowering and grain yield similar to those observed in the N-control treatment. The results of the two field experiments suggest that the use of mineral N at planting can be replaced by rhizobia inoculation without causing negative effects on grain yield.

1 INTRODUÇÃO

A cultura do feijoeiro apresenta baixo potencial de FBN em relação a outras leguminosas de grão, como a soja. Diversos estudos sobre FBN em feijoeiro já relataram as causas do baixo potencial de FBN do feijoeiro (STRALIOTTO & RUMJANEK, 1999), entre eles: elevadas temperatura (HUNGRIA & FRANCO, 1993; SÁ, 1993), acidez do solo (TAYLOR et al., 1991; COLETTA FILHO, 1993), disponibilidade de nutrientes no solo (TSAI et al., 1993), a interação com a cultivar (RUSCHEL, 1982) e competitividade das populações de rizóbios nativos (TAJINI et al., 2008).

No entanto, resultados obtidos em experimentos de campo mostram que o processo de FBN oferece suprimento parcial de N para a planta, podendo alcançar níveis de produtividade superiores a 2.000 kg ha⁻¹ (STRALIOTTO, 2000; SILVA et al., 2009; MOSTASSO et al., 2002). Ferreira et al. (2000) obtiveram em tratamento de inoculação com rizóbio produtividade igual ao tratamento de aplicação de 30 kg N ha⁻¹ no plantio e 30 kg N ha⁻¹ em cobertura, e concluíram que a inoculação com estirpes eficientes de rizóbio ou seu cultivo em solos com população nativa eficiente pode dispensar a adubação nitrogenada em cobertura para a cultura, sem danos na produção final. Trabalhos recentes obtiveram altas produtividades de feijoeiro em condições de campo em cultivo sob inoculação (PELEGRIN et al., 2009; SILVA et al., 2009; FERREIRA et al., 2009).

As populações de rizóbio nativo podem não ser eficientes para atender a necessidade de N das plantas de feijão durante seu ciclo, além de dificultar a infecção das bactérias inoculadas. Desse modo, as estirpes selecionadas devem ser eficientes e competitivas. Hungria et al. (2000) realizaram o isolamento e caracterização de estirpes no estado do Paraná, obtendo as estirpes de *Rhizobium tropici* PFR 35, PRF54 e PRF81, que foram similares as CIAT 299 e CIAT 899, além de tolerantes a altas temperaturas e acidez. O desempenho da estirpe PRF 81 em experimento de campo indicou um potencial de indicação de estirpe de *R. tropici*, competitiva e eficiente, para as áreas tropicais e subtropicais, sendo atualmente utilizada no inoculante comercial para feijoeiro. A inoculação de estirpes eficientes incrementou a nodulação, e aumentou a produção de grãos em 465 kg ha⁻¹ em relação ao tratamento controle somente com presença de rizóbio nativo (Hungria et al., 2003). Ferreira et al. (2009) não obtiveram, em campo, diferença na nodulação entre os tratamentos de inoculação com rizóbio e o tratamento sem inoculação, mas um tratamento de inoculação com rizóbio proporcionou produtividade 329 kg ha⁻¹ superior ao tratamento sem inoculação. Isso indica a importância da inoculação de cepas eficientes para o sucesso da FBN na cultura do feijoeiro.

Segundo Franco et al. (1978), a maior contribuição da FBN para a cultura ocorre até a floração, sendo o N mineral mais assimilado pela planta na emissão das vagens e no enchimento de grãos. Assim, a aplicação de N mineral em cobertura pode otimizar o efeito da FBN, aumentando a produção de grãos. Pelegrin et al. (2009) concluíram que a inoculação com rizóbio complementada com adubação com 20 kg N ha⁻¹ resultou em rendimento e grãos em feijoeiro equivalente à aplicação de até 160 kg N ha⁻¹. A adubação nitrogenada em cobertura associada à inoculação com *R. tropici* não prejudicou a simbiose, gerando produtividade de feijão semelhante a aplicação com fertilizante nitrogenado aplicado no sulco e em cobertura (MOURA et al., 2009).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar, em condições de campo, o efeito da época de aplicação do N sobre a nodulação e rendimento do feijoeiro em cultivo sob inoculação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Delineamentos Experimentais

Foram conduzidos dois experimentos de campo no Estado do Rio de Janeiro, dentro de propriedades rurais, o primeiro entre maio e julho de 2012, em Rio das Ostras, e o segundo entre agosto de 2012 e outubro de 2012, em Macaé.

O experimento em Rio das Ostras foi realizado em parceria com a Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO-RIO) e foi conduzido na região de Cantagalo, em Rio das Ostras-RJ, localizada na latitude 22° 31' 37" S e longitude 41° 56' 42" W, com altitude de 8 m. O delineamento experimental adotado foi de blocos ao acaso, com quatro repetições, com cinco tratamentos: testemunha absoluta, sem aplicação de N e sem inoculação; testemunha nitrogenada, com 80 kg N ha⁻¹ no plantio e 40 kg N ha⁻¹ em cobertura; inoculação com as estirpes comerciais; inoculação com as estirpes comerciais com aplicação de 80 kg N ha⁻¹ no plantio; e inoculação com as estirpes comerciais com aplicação de 40 kg N ha⁻¹ em cobertura. Foi utilizada a cultivar Ouro Negro.

O experimento em Macaé-RJ foi localizado na latitude 22° 22' 15" S e longitude 41° 47' 13" W, com altitude de 2 m. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com quatro repetições e seis tratamentos: testemunha absoluta, sem aplicação de N e sem inoculação; testemunha nitrogenada, com aplicação de 80 kg N ha⁻¹ no plantio e 40 kg N ha⁻¹ em cobertura; ausência de inoculação, com adubação nitrogenada utilizada pelos produtores locais, de 20 kg N ha⁻¹ aos 15 DAE e 20 kg N ha⁻¹ aos 40 DAE; inoculação com as estirpes comerciais; inoculação com as estirpes comerciais com aplicação de 80 kg N ha⁻¹ no plantio; inoculação com as estirpes comerciais com aplicação de 30 kg N ha⁻¹ em cobertura; e inoculação com estirpes comerciais com aplicação de 40 kg N ha⁻¹ aos 15 DAE e 40 kg N ha⁻¹ aos 40 DAE. Foi utilizada a cultivar Ouro Negro.

2.2 Condições de Cultivo

Cada parcela tinha área de 12 m², com 6 linhas de 4 m de comprimento espaçadas 0,5 m entre si. Foi coletada uma amostra de terra para a realização da análise de solo (Tabela 2), de acordo com Embrapa (1997). Os fertilizantes nitrogenados, fosforados e potássicos foram colocados no fundo do sulco, na forma de uréia, superfosfato simples e cloreto de potássio, respectivamente. Foram aplicados 90 kg de P₂O₅ e 40 kg de K₂O por ha.

Tabela 2: Resultado das análises químicas de solo (0-20 cm) das áreas destinadas ao plantio dos experimentos conduzidos em Rio das Ostras-RJ e Macaé-RJ.

Região	Na	Ca	Mg	H+Al	Al	pH _{água}	C	P	K
	----- cmol _c dm ⁻³ -----						%	-- mg dm ⁻¹ --	
Rio das Ostras	0,05	3,2	1,3	4,0	0,4	5,2	1,32	15	126
Macaé	0,08	2,3	0,8	14,2	0,8	4,9	4,42	14	172

O inoculante foi preparado por meio da injeção de caldo de cultivo das estirpes comerciais meio de cultura YMA em sacos plásticos, previamente selados, com 150 g de turfa autoclavada. A turfa utilizada foi preparada e empacotada conforme é feito para uso em inoculantes comerciais. Após o preparo do inoculante, para verificação da qualidade do

inoculante, foi realizada uma contagem de rizóbio, baseando-se na metodologia recomendada pela Rede de Laboratórios para a Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE, 2004).

2.3 Contagem de rizóbio no solo

Anteriormente ao plantio, foi retirada amostra de terra para realizar a prática de captura e quantificação da população nativa de rizóbio, através da técnica do Número Mais Provável. Foram pesados 10 g do solo em três repetições, e o solo foi colocado em erlenmeyer contendo 90 mL de solução salina 0,85%, sendo posto em agitador por 10 min a 150 rpm. A parte sólida foi decantada e uma alíquota de 1 mL foi retirada do conteúdo sobrenadante e transferida para um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina. Foi realizada uma diluição seriada até a diluição 10^{-8} e o conteúdo resultante foi reservado para inoculação.

Para o plantio, foram utilizados vasos de Leonard (VINCENT, 1970) previamente autoclavados, contendo 500 cm^3 de uma proporção de 1:1 de areia e vermiculita, onde foram semeadas quatro sementes da cultivar Carioca por vaso. As sementes foram desinfestadas e todo o material utilizado foi esterilizado para evitar possíveis contaminações externas. Foram cultivados três vasos para cada diluição, 1 mL do conteúdo da diluição foi pipetado sobre cada semente já na cova no momento do plantio. Uma fina camada de areia estéril foi posta sobre as covas, já fechadas, impedindo contaminações posteriores.

A partir do décimo DAE, os vasos foram abastecidos com solução nutritiva de Norris modificada (GRUZMAN & DÖBEREINER, 1968). Por ocasião da queda do cotilédone, as plantas foram desbastadas, mantendo-se duas por vaso. As plantas foram coletadas por ocasião da floração plena, na sexta semana após a emergência, e as raízes foram observadas para verificação da presença de nódulos. O cálculo utilizado para quantificação de células de rizóbio presentes por grama de solo foi realizado conforme a metodologia proposta por Vincent (1970).

2.4 Amostragens e Avaliações

Foram realizadas amostragens de biomassa, aos 35 DAE (plena floração) no experimento em Rio das Ostras, e aos 35 e 50 DAE no experimento em Macaé. Nestas amostragens, foram coletadas as plantas em 0,5 m linear em cada parcela experimental. As raízes foram lavadas, e os nódulos separados. A parte aérea, raízes e os nódulos foram secos em estufa a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ e pesados.

Na maturação de grãos, as plantas foram colhidas ao nível do solo em 1 m^2 da área útil de cada parcela, e colocadas em sacos de pano. No experimento em Macaé, as plantas da área restante de $2,0 \text{ m}^2$ da área útil de cada parcela também foram colhidas. Os sacos de pano foram transportados para Seropédica, colocados para secar em um galpão coberto suspensos por arame, até secagem dos grãos. Nas plantas colhidas na área central de $1,0 \text{ m}^2$ foram determinados o número de plantas e o número de vagens, e as vagens foram trilhadas manualmente, e os grãos de cada parcela foram pesados. No experimento de Macaé, foi retirada uma amostra de 100 grãos que foi pesada, seca em estufa e pesada novamente, obtendo-se o teor de umidade dos grãos de cada parcela, e o rendimento de grãos de cada parcela foi padronizado para 13% de teor de umidade. Com base na massa úmida da amostra de 100 grãos, e na massa total de grãos da parcela, foi estimado o número total de grãos. Foram calculados os componentes de produção: número de vagens por planta, número de grãos por vagem e massa de 100 grãos.

Os resultados foram submetidos à análise de variância como um único fator (fonte de N), comparando-se as médias pelo teste Duncan a 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaio em Rio das Ostras

No ensaio em Rio das Ostras, a avaliação da população de rizóbio no solo foi de 10^2 células g^{-1} de solo. A influência da elevada população nativa de rizóbio no solo teve reflexos importantes nos resultados desse experimento. Foi observada expressiva massa de nódulos aos 35 DAE no tratamento controle sem inoculação, não diferindo do tratamento inoculado (Tabela 3). A nodulação não diferiu nos diferentes tratamentos de aplicação de N mineral, sendo a nodulação no tratamento de inoculação com as estirpes comerciais igual a todos eles. Esse resultado sugere que as estirpes comerciais de rizóbio podem ter competido pela ocupação nodular com o rizóbio nativo, o que pode ter resultado em valores de nodulação semelhantes entre os tratamentos inoculados ou não.

Os tratamentos com inoculação e testemunha absoluta apresentaram massa seca de raízes inferior ao tratamento testemunha nitrogenada. A massa seca de parte aérea no tratamento de inoculação associada à aplicação de N no plantio não diferiu daquela encontrada no tratamento testemunha nitrogenada, mostrando que a inoculação com rizóbio é capaz de suprir parte da demanda por N da planta nessa fase (PELEGRIN et al., 2009).

Os níveis de produtividade de grãos obtidos foram baixos, entre 715 e 1046 $kg\ ha^{-1}$ (Tabela 3), o que se deve à grande concentração de precipitações ocorridas no período de condução do experimento, que pode ter prejudicado a produção. Não foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos de inoculação associados à aplicação de N, a testemunha não inoculada e o tratamento com aplicação de 120 $kg\ N\ ha^{-1}$ para rendimento de grãos (Tabela 3). A população nativa de rizóbio neste solo apresentou elevada eficiência, o que pode ser observado nos dados de produtividade (Tabela 3). A região onde foi conduzido o presente experimento é conhecida por plantios sucessivos de feijão. Em cultivos sucessivos de feijão, a introdução de estirpes de rizóbio pode ser afetada pela presença de rizóbio no solo (MERCANTE et al., 1992). A ocorrência de estirpes de rizóbio eficientes no solo tem sido relatada em outros experimentos com feijoeiro (MOURA et al., 2009; TAJINI et al., 2008; FERREIRA et al., 2000). A inoculação com rizóbio no primeiro ano é capaz de manter uma boa nodulação por três ciclos de crescimento do feijoeiro (TAJINI et al., 2008). Tajini et al. (2008) em solo da Tunísia também verificaram que em determinadas regiões, a população de rizóbio encontrada no solo é de elevada eficiência, o que dispensaria a recomendação de inoculação. Ferreira et al. (2000), em experimento de seleção de estirpes de rizóbio em Selvíria - MS (região de Cerrado), não observaram diferença de produtividade entre os tratamentos com estirpes selecionadas de *R. tropici* e sem inoculação, somente com o rizóbio nativo do solo.

A produção obtida nos tratamentos de inoculação associada à aplicação de N mineral não diferiu da produção obtida na testemunha nitrogenada. Pelegrin et al. (2009) avaliaram a viabilidade econômica da inoculação com rizóbio em comparação com a adubação com N mineral na cultura do feijoeiro, concluindo que o uso da inoculação associado à adubação com 20 $kg\ N\ ha^{-1}$ pode possibilitar aumento de receita líquida igual a que se alcança com aplicação de 160 $kg\ N\ ha^{-1}$. Não foi observada diferença entre os diferentes tratamentos no parâmetro número de vagens por planta (Tabela 3).

Tabela 3. Massa seca de parte aérea (MSPA), raízes (MSR) e nódulos (MSN) de plantas de feijoeiro aos 35 DAE, produção de grãos (PG) e número de vagens por planta (NVP), em experimento em Rio das Ostras-RJ, sob cinco fontes de suprimento de N: testemunha absoluta, sem adição de N mineral e sem inoculação; testemunha nitrogenada, aplicação de 120 kg N ha⁻¹; inoculação; inoculação + aplicação de 80 kg N ha⁻¹ no plantio; e inoculação + aplicação de 40 kg N ha⁻¹ em cobertura.

Fonte de N	MSPA (g planta ⁻¹)	MSR (g planta ⁻¹)	MSN (mg planta ⁻¹)	PG (g m ⁻²)	NVP
Testemunha absoluta	5,81 bc	2,71 b	449 a	739 ab	7,0
Testemunha nitrogenada	7,48 a	3,66 a	144 b	988 ab	8,4
Inoculação	6,02 bc	2,93 b	366 ab	715 b	6,3
Inoc + N no plantio	6,53 ab	2,97 b	181 b	955 ab	6,7
Inoc + N em cobertura	4,80 c	2,41 b	164 b	1046 a	7,3

Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Duncan a 5%.

3.2 Ensaio em Macaé

A contagem de rizóbio no solo de Macaé também resultou em 10² células g⁻¹ de solo. A massa seca de nódulos do tratamento testemunha absoluta na primeira coleta foi superior à nodulação dos demais tratamentos (Tabela 4), o que indica a eficiência do rizóbio já existente no solo. Na segunda coleta, realizada 15 dias após a primeira, a nodulação foi inibida nos tratamentos testemunha nitrogenada e inoculação associada à aplicação de N no plantio, evidenciando efeito prejudicial do fertilizante nitrogenado à nodulação. Esse resultado sugere que o N presente no solo no momento do plantio tem efeito de inibição da nodulação inferior ao efeito apresentado nos tratamentos com aplicação de N após o plantio, em cobertura, uma vez que a nodulação nesses tratamentos não diferiu da nodulação apresentada nos tratamentos testemunha absoluta e inoculação.

Além disso, o teor de matéria orgânica encontrado nesse solo foi bastante elevado (Tabela 2). Isso indica que a matéria orgânica presente no solo proporcionou um ambiente favorável ao estabelecimento do rizóbio nativo do solo. Essa observação também foi feita por Ruschel & Saito (1977), que relataram incrementos na nodulação do feijoeiro em condições de alto teor de matéria orgânica. Em contrapartida, essa matéria orgânica pode ter, em algum momento, elevado o teor de N prontamente disponível para a planta no solo, elevando assim o efeito deletério do N à nodulação nos tratamentos de aplicação de N mineral.

A massa seca de parte aérea não diferiu entre os diferentes tratamentos na primeira coleta (Tabela 4). Na segunda coleta, de modo geral, a massa seca de parte aérea não foi diferente entre os tratamentos, sendo apenas o tratamento de inoculação associada à adubação em cobertura inferior à testemunha nitrogenada. No entanto, esse tratamento resultou em produção de grãos superior à produção obtida na testemunha nitrogenada.

Tabela 4. Massa seca de parte aérea (MSPA) e de nódulos (MSN) de plantas de feijoeiro aos 35 e 50 DAE, em experimento em Macaé-RJ, sob sete fontes de suprimento de N: testemunha absoluta, sem adição de N mineral e sem inoculação; testemunha nitrogenada, aplicação de 120 kg N ha⁻¹; inoculação; inoculação + aplicação de 80 kg N ha⁻¹ no plantio; inoculação + aplicação de 30 kg N ha⁻¹ em cobertura; inoculação + aplicação de 40 kg N ha⁻¹ aos 15 e de 40 kg N ha⁻¹ 40 DAE; e adubação local, 20 kg N ha⁻¹ aos 15 DAE e de 20 kg N ha⁻¹ aos 40 DAE.

Fonte de N	MSPA 35 DAE (g planta ⁻¹)	MSPA 50 DAE (g planta ⁻¹)	MSN 35 DAE (mg planta ⁻¹)	MSN 50 DAE (mg planta ⁻¹)
Testemunha absoluta	2,74	6,72 ab	17,9 a	18,3 a
Testemunha nitrogenada	2,8	7,07 a	0,2 c	0,8 b
Inoculação	2,88	6,68 ab	4,1 b	22,6 a
Inoc + N em cobertura	2,72	5,02 b	4,0 b	7,4 ab
Inoc + N no plantio	2,34	6,44 ab	0,9 b	1,1 b
Inoc + N aos 15 e 40 DAE	2,96	5,56 ab	4,4 b	17,9 a
Adubação local	3,01	6,13 ab	10,9 ab	10,5 ab

Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Duncan a 5%.

Os dados de produção reforçam a discussão apresentada no experimento anterior e os resultados apresentados por Tajini et al. (2008), uma vez que a produção obtida no tratamento testemunha absoluta e também no tratamento de adubação local (sem inoculação e com uma dose baixa de N) foi superior à produção obtida no tratamento de aplicação de 120 kg N ha⁻¹. A área destinada à condução desse experimento, assim como em Rio das Ostras, é de cultivo sucessivo de feijoeiro, fator que pode ter elevado a eficiência do rizóbio nativo do solo. Os resultados dos dois experimentos de campo sugerem que o uso do N mineral e até mesmo da inoculação pode ser dispensado em áreas com essa característica.

A produção de grãos não diferiu entre os tratamentos de inoculação associada à adubação de cobertura. Vale salientar que a dose N utilizada no tratamento de inoculação associada à aplicação de 40 kg N ha⁻¹ em cobertura é metade da dose utilizada no tratamento de inoculação associada à aplicação de N mineral aos 15 e 40 DAE (Tabela 5). Isso indica que o uso de uma dose elevada de N em cobertura em cultivo sob inoculação não resulta em uma produtividade elevada em comparação ao uso de doses menores. No entanto, são necessários mais estudos para confirmar esse resultado.

O número de plantas encontrado nos tratamentos onde o N mineral foi aplicado no sulco de plantio (testemunha nitrogenada e inoculação associada à aplicação de N no plantio) foi menor que nos demais tratamentos (Tabela 5). Esse resultado reforça o resultado encontrado por Binotti et al. (2009), onde a população de plantas foi afetada pelo tratamento de aplicação de N no sulco de plantio, pois pode provocar um efeito salino causado pela ureia afetando a germinação das sementes.

Tabela 5. Número de plantas (NP), número de vagens por planta (NVP), número de grãos por vagem (NGV), massa de 100 grãos (MCG) e produção de grãos (PG) de plantas de feijoeiro, em experimento conduzido em Macaé-RJ, sob sete fontes de suprimento de N: testemunha absoluta, sem adição de N mineral e sem inoculação; testemunha nitrogenada (aplicação de 120 kg de N ha⁻¹); inoculação; inoculação + aplicação de 80 kg de N ha⁻¹ no plantio; inoculação + aplicação de 30 kg de N ha⁻¹ em cobertura; inoculação + aplicação de 40 kg de N ha⁻¹ aos 15 e de 40 kg de N ha⁻¹ 40 DAE; e adubação local, aplicação de 20 kg de N ha⁻¹ aos 15 DAE e de 20 kg de N ha⁻¹ aos 40 DAE.

Fonte de N	NP	NVP	NGV	MCG (g)	PG (gm ⁻²)
Testemunha absoluta	28 a	6,4 b	11,8 a	266	184,8 a
Testemunha nitrogenada	21 b	9,1 a	6,7 b	290	120,9 b
Inoculação	29 a	6,2 b	8,9 b	276	145,1 b
Inoc + N em cobertura	26 a	8,1 ab	9,0 b	292	186,4 a
Inoc + N no plantio	21 b	7,7 ab	9,4 ab	266	124,0 b
Inoc + N aos 15 e 40 DAE	28 a	7,7 ab	9,3 ab	286	194,5 a
Adubação local	28 a	8,0 ab	8,3 b	293	185,1 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

4 CONCLUSÕES

Os tratamentos de inoculação com as estirpes de rizóbio associada à adubação nitrogenada forneceram a mesma massa seca de parte aérea na floração e produtividade que a observada no tratamento de testemunha nitrogenada.

Os resultados dos dois experimentos de campo sugerem que o uso do N mineral no plantio pode ser substituído pela inoculação com rizóbio sem causar reflexos negativos na produtividade de grãos.

3 CONCLUSÕES GERAIS

Nos experimentos de casa de vegetação referentes ao Capítulo I, observou-se que o início da nodulação nas cultivares de feijoeiro avaliadas ocorreu aos 10 dias após a emergência, e que a atividade da nitrogenase se iniciou aos 11 dias após a emergência. Ainda nas condições da casa de vegetação, pode-se concluir que a adição de N mineral prejudicou a nodulação em sua fase inicial em todas as cultivares de feijoeiro, anulando-a a partir da dose de 2 mmol de N. Aos 15 dias após a emergência, as plantas de feijoeiro inoculadas com rizóbio sofreram uma redução de massa seca de parte aérea e raízes, em comparação com plantas inoculadas que receberam N mineral, indicando um período de “fome” de N, quando se esgotam as reservas cotiledonares e o N oriundo da fixação biológica não supre a demanda total da planta.

Os resultados dos dois experimentos de campo referentes ao Capítulo II sugerem que o uso do N mineral no plantio pode ser substituído pela inoculação com rizóbio sem causar reflexos negativos na produtividade de grãos. Além disso, os tratamentos de inoculação com rizóbio associada à adubação nitrogenada em cobertura forneceram massa seca de parte aérea na floração e produtividade de grãos similares às observadas no tratamento de testemunha nitrogenada.

Os resultados do presente trabalho apontam o efeito prejudicial do N mineral à nodulação do feijoeiro apenas na fase inicial do desenvolvimento da planta. A partir dos 15 dias após a emergência, observa-se que é necessária a suplementação com N mineral às plantas inoculadas. Esse resultado é complementado pelos resultados obtidos nos experimentos de campo, nos quais a inoculação associada à adubação de cobertura não diferiu da testemunha nitrogenada em termos de acúmulo de massa seca de parte aérea e de produção de grãos. No entanto, o presente trabalho avaliou a nodulação e o efeito do N na nodulação apenas nos primeiros dias do desenvolvimento dos nódulos. Assim, trona-se necessária a continuidade do presente estudo, principalmente na parte referente ao Capítulo I, para avaliar o efeito da aplicação do N durante toda a ontogenia da nodulação.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, V.G. Resposta do feijoeiro a doses de nitrogênio no plantio e cobertura e à inoculação de sementes com rizóbio. 46p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

ARAÚJO, F.F.; MUNHOZ, R.E.V.; HUNGRIA, M. Início da nodulação em sete cultivares de feijoeiro comum inoculadas com estirpes de *Rhizobium*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.31, p.435-443, 1996.

ARAÚJO, A.P.; PLASSARD, C.; DREVON, J.J. Phosphatase and phytase activities in nodules of common bean genotypes at different levels of phosphorus supply. Plant and Soil, v.312, p.129-138, 2008.

ARF, O.; SILVA, L.S.; BUZETTI, S.; ALVES, M.C.; SÁ, M.E.; RODRIGUES, R.A.F.; HERNANDEZ, F.B.T. Efeito da rotação de culturas, adubação verde e nitrogenada sobre o rendimento do feijão. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.34, n.11, p.2029-2036, 1999.

BINOTTI, F.F.S.; ARF, O.; SÁ, M.E.; BUZETTI, S.; ALVAREZ, A.C.C.; KAMIMURA, K.M. Fontes, doses e modo de aplicação de nitrogênio em feijoeiro no sistema de plantio direto. Bragantia, v.68, n.2, p.473-481, 2009.

CARVALHO, M.A.C.; ARF, O.; SÁ, M.E.; BUZETTI, S.; SANTOS, N.C.B.; BASSAN, D.A.Z. Produtividade e qualidade de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) sob influencia de parcelamento e fontes de nitrogênio. Revista Brasileira de Ciência de Solo, v.25, p.617-624, 2001.

COLETTA FILHO, H.D. Avaliação da fixação biológica do N₂ em genótipos de feijoeiro. ESALQ/ USP, Dissertação de Mestrado, 72p., 1993.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento [Home Page], 2010. Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em: set. 2011.

COOPER, J.E. Multiple responses of rhizobia to flavonoids during legume root infection. Advances in Botanical Research, v.41, p2-42, 2004.

CRUSCIOL, C.A.C.; LIMA, E.D.; ANDREOTTI, M; NAKAGAWA, J.; LEMOS, L.B.; YASHI, O.M.M. Efeito do nitrogênio sobre a qualidade fisiológica, produtividade e características de sementes de feijão. Revista Brasileira de Sementes, v.25, n.1, p.108-115, 2003.

DEBOUCK, D.G. Primary diversification of *Phaseolus* in the Americas: three centers. Plant Genetic Resources Newsletter, v.67, p.2-8, 1986.

DÖBEREINER, J. Evaluation of nitrogen fixation in legumes by the regression of total plant nitrogen with nodule weight. Nature, v.210, p.850-852, 1966.

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

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária [Home Page], 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: out. 2010.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia [Home Page], 2013. Disponível em <www.cnpab.embrapa.br>, Acesso em: jan. 2013.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Manual de métodos de análise de solo. 2.ed. Embrapa Solos, 212p., 1997.

FAO. Food and Agriculture Organization [Home Page], 2010. Disponível em <www.fao.org>. Acesso em: jan. 2013.

FAO. Food and Agriculture Organization [Home Page], 2012. Disponível em <www.fao.org>. Acesso em: jan. 2013.

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

FARINELLI, R.; LEMOS, L.B.; PENARIOL, F.G.; EGÉA, M.M.; GASPAROTTO, M.G. Adubação nitrogenada de cobertura no feijoeiro, em plantio direto e convencional. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.41, n.2, p.307-312, 2006.

FELIX, J.F.; OBATON, M; MESSIAEN, C.M.; SALSAC, L. Nitrate reductase and nitrogenase activities of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from different geographic locations. Plant and Soil, v.63, p.427-438, 1981.

FERREIRA, A.N.; ARF, O.; CARVALHO, M.A.C.; ARAÚJO, R.S.; SÁ, M.E.; BUZETTI, S. Estirpes de *Rhizobium tropici* na inoculação do feijoeiro. Scientia Agricola, v.57, p.507-512, 2000.

FERREIRA, A.C.B.; ANDRADE, M.J.B.; ARAÚJO, G.A.A. Feijão de alta produtividade: nutrição e adubação do feijoeiro. Informe Agropecuário, v.25, p.61-72, 2004.

FERREIRA, P.A.; SILVA, M.A.P.; CASSETARI, A.; RUFINI, M.; MOREIRA, F.M.S.; ANDRADE, J.B. A. Inoculação com cepas de rizóbio na cultura do feijoeiro. Ciência Rural, v.39, p.2210-2212, 2009.

FRANCO, A.A.; DÖBEREINER, J. Interferência do cálcio e nitrogênio na fixação simbiótica do nitrogênio por duas variedades de *Phaseolus vulgaris* L. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.3, p.223-227, 1968.

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

FURTINI, I.V.; RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B.; FURTINI NETO, A.E. Resposta diferencial de linhagens de feijoeiro ao nitrogênio. *Ciência Rural*, v.36, n.6, p.1696-1700, 2006.

GEPTS, P.; DEBOUCK, D. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: SCHOONHOVEN, A. van; VOYSEST, O. (Ed.). *Common beans: research for crop improvement*. Wallingford : CAB/CIAT, p.7-53, 1991.

GRAHAM, P.H.; ROSAS, J.C. Phosphorus fertilization and symbiotic nitrogen fixation in common bean. *Agronomy Journal*, v.71, p.925-926, 1979.

GRAHAM, P.H. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L. A review. *Field Crops Research*, v.4, p.93-112, 1981.

GRAHAM, P.H.; ROSAS, J.C.; DE JENSEN, C.E.; PERALTA, E.; TLUSTY, B.; ACOSTA-GALLEGOS, J.; PEREIRA, P.A.A. Addressing edaphic constraints to bean production: the Bean/Cowpea CRSP project in perspective. *Field Crops Research*, v.82, p.179-192, 2003.

GRUZMAN, I.; DÖBEREINER, J. Anais da IV Reunião Latino Americana Sobre Inoculantes Para Leguminosas, p. 84, 1968.

HAAG, H.P.; MALAVOLTA, E. Absorção de nutrientes pela cultura do feijoeiro. *Bragantia*, v.26, p.381-391, 1967.

HARDARSON, G.; BLISS, F.A.; CIGALES-RIVERO, M.R.; HENSON, R.A.; KIPE-NOLT, J.A.; LONGERI, L.; MANRIQUE, A.; PEÑA-CABIALES, J.J.; PEREIRA, P.A.A.; SANABRIA, C.A.; TSAI, S.M. Genotypic variation in biological nitrogen fixation by common bean. *Plant and Soil*, v.152, p.59-70, 1993.

HENSON, R.A.; BLISS, F.A. Effects of N fertilizer application timing on common bean production. *Fertilizer Research*, v.29, p.133-138, 1991.

HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P. Ontogenia da fixação biológica do nitrogênio em *Phaseolus vulgaris*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.21, p.715-730, 1986.

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

HUNGRIA, M.; FRANCO, A.A. Effects of high temperatures on nodulation and N₂ fixation by *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Soil*, v.149, p.95-102, 1993.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; ARAUJO, R.S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M.A.T., HUNGRIA, M. (Eds.), *Biologia dos Solos dos Cerrados*. EMBRAPA-CPAC, p.189-295, 1997.

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

- HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; CHUEIRE, L.M.O.; PROBANZA, A.; GUTTIERREZ-MAÑERO, F.J.; MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biology Biochemistry*, v.32, p.1515-1528, 2000.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium* strains. *Biology and Fertility of Soils*, v.39, p.88-93, 2003.
- HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; CAMPO, R.J.; GRAHAM, P.H. The Importance of Nitrogen Fixation to Soybean Cropping in South America. *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment*, v. 4, p.25-42, 2005.
- LEIDI, E.O.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, D.N. Nitrogen and phosphorus availability limit N₂ fixation in bean. *New Phytology*, v.147, p.337-346, 2000.
- LEMO, L.B.; FORNASIERI FILHO, D.; CAMARGO, M.B.; SILVA, T.R.B.; SORATTO, R.P. Inoculação de rizóbio e adubação nitrogenada em genótipos de feijoeiro. *Agronomia*, v.37, n.1, p.26-31, 2003.
- MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A.; MUNNS, D.N. A inoculação do feijoeiro comum com rizóbio. *Embrapa Agrobiologia, Comunicado Técnico 10*, 1992.
- MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F.L.; DIAS, B.G.; VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. *Field Crops Research*, v.73, p.121-132, 2002.
- MOURA, J.B.; GUARESHI, R.F.; CORREIA, A.R.; GAZOLLA, P.R.; CABRAL, J.S.R. Produtividade do feijoeiro submetido a adubação nitrogenada e inoculação com *Rhizobium Tropici*. *Ciência e Tecnologia Global*, v.2, p.66-71, 2009.
- MÜLLER, S.H.; PEREIRA, P.A.A. Nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by mineral nitrogen supply at different growth stages. *Plant and Soil*, v.177, p.55-61, 1995.
- OLIVEIRA, I.P.; ARAUJO, R.S.; DUTRA, L.G. Nutrição mineral e fixação biológica de nitrogênio. In: ARAUJO, R.S.; RA V A, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J.O. (Coord.). *Cultura do feijoeiro comum no Brasil*. Piracicaba: Potafos, p.169-221, 1996.
- OSINAME, O.; VAN GINJ, H.; ULEX, P.L.G. Effect nitrifications inhibitions of the fate and efficiency of nitrogenoms fertilizers under simulated homid tropical condutions. *Tropical Agriculture*, v.60, p.211-217, 1983.
- PELEGRIN, R.; MERCANTE, F.M.; OTSUBO, I.M.N.; OTSUBO, A.A. Resposta da cultura do feijoeiro à adubação nitrogenada e à inoculação com rizóbio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.33, p.219-226, 2009.
- PEÑA-CABRIALES, J.J.; GRAGEDA-CABRERA, O.A.; KOLA, V.; HARDARSON. G. Time course of N₂ fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant and Soil*, v.152, p.115-121, 1993.

- PEREIRA, P.A.A.; BURRIS, R.H.; BLISS, F.A. ^{15}N -determined dinitrogen fixation potential of genetically diverse bean lines (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant and Soil*, v.120, p.171-179, 1989.
- PHIA, M.I.; MUNNS, D.N.; Nitrogen fixation potential of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) compared with other grain legumes under controlled conditions. *Plant and Soil* v.98, p.169-182, 1987.
- SANTOS, A.B. DOS; FAGERIA, N.K. Características fisiológicas do feijoeiro em várzeas tropicais afetadas por doses e manejo de nitrogênio. *Ciência e Agrotecnologia*, v.32, p.23-31, 2008.
- SCURI, A. ImLab versão 2.3. TecGraf / PUC - Rio, 2010.
- SILVA, G.M.; STONE, L.F.; MOREIRA, J.A.A. Manejo da adubação nitrogenada no feijoeiro irrigado sob plantio direto. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v.32, p.1-5, 2002.
- SILVA, E.F.; MARCHETTI, M.E.; SOUZA, L.C.F.; MERCANTE, F.M.; RODRIGUES, E.T.; VITORINO, A.C.T. Inoculação do feijoeiro com *Rhizobium tropici* associada à exsudatos de *Mimosa flocculosa* com diferentes doses de nitrogênio. *Bragantia*, v.68, n.2, p.443-451, 2009.
- SILVEIRA, P.M. da; BRAZ, A.J.B.P.; DIDONET, A.D. Uso do clorofilômetro como indicador da necessidade de adubação nitrogenada em cobertura no feijão. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.38, p.1083-1087, 2003.
- STONE, L.F.; MOREIRA, J.A.A. Resposta do feijoeiro ao nitrogênio em cobertura, sob diferentes lâminas de irrigação e preparos do solo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.36, n.3, p.473-481, 2001.
- STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N.G. Biodiversidade do rizóbio que nodula o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e os principais fatores que afetam a simbiose. *Embrapa Agrobiologia, Documentos 94*, 1999.
- STRALIOTTO, R. Protocolo operacional para o preparo da turfa para inoculante rizobiano. *Seropédica: Embrapa Agrobiologia*, 2000.
- RENNIE, R.J.; KEMP, G.A. N_2 fixation in field beans quantified by ^{15}N isotope dilution. II. Effect of cultivars of beans. *Agronomy Journal*, v.75, p.645-649, 1983.
- RELARE. Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola [Home Page], 2004. Disponível em: <<http://www.relare.org.br>>. Acesso em: out. 2010.
- ROSOLEM, C.A. Calagem e adubação mineral. In: ARAÚJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J.O. (Coord.). *Cultura do feijoeiro comum no Brasil*. Piracicaba: Potafos, p.353-390, 1996.

RUSCHEL, A.P.; SAITO, S.M.T. Efeito da inoculação de *Rhizobium*, nitrogênio e matéria orgânica na fixação simbiótica de nitrogênio em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Revista Brasileira de Ciência do Solo, v.1, p.21-24, 1977.

RUSCHEL, A.P.; VOSE, P.B.; MATSUI, E.; VICTORIA, R.L.; SAITO, S.M.T. Field evaluation of N₂-fixation and N-utilization by *Phaseolus* bean varieties determined by ¹⁵N isotope dilution. Plant and Soil, v.65, p.397-407, 1982.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. Editora Artmed S.A. 3ª edição, 2003.

TAJINI, F.; DREVON, J. J.; LAMOUCHE, L.; AOUANI, M. E.; TRABELSI, M. Response of common bean lines to inoculation: comparison between the *Rhizobium tropici* CIAT899 and the native *Rhizobium etli* 12a3 and their persistence in Tunisian soils. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v.24, p.407- 417, 2008.

TAYLOR, R.W.; WILLIAMS, M.L.; SISTANI, K.R. N₂ fixation by soybean-*bradyrhizobium* combinations under acidity, low P and high Al stresses. Plant and Soil, v.131, p.293-300, 1991.

TSAI, S.M.; BONETTI, R.; AGBALA, S.M.; ROSSETTO, R. Minimizing the effect of mineral nitrogen on biological nitrogen fixation in common bean by increasing nutrient levels. Plant and Soil, v.152, p.131-138, 1993.

UNFPA, United Nations Population Fund [Home Page], 2011. <<http://unfpa.org.br>>. Acesso em jan. 2013.

WADISIRISUK, P.; WEAVER, R.W. Importance of bacteroid number in nodules and effective nodule mass to dinitrogen fixation by cowpeas. Plant and Soil, v.87, p.223-231, 1985.

VARGAS, M.A.T.; PERES, J.R.R.; SUHET, A.R. Adubação nitrogenada, inoculação e épocas de calagem para a soja em um solo sob cerrado. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.17, p.1127-1132, 1982.

VINCENT, J.M.A. Manual for the practical study of root-nodule bacteria. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1970. 164p. (IBP Handbook, 15).

VLASSAK, K.; VANDERLEYDEN, J.; FRANCO, A. Competition and persistence of *Rhizobium tropici* and *Rhizobium etli* in tropical soil during successive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultures. Biology and Fertility of Soils, v.21, p.61-68, 1996.

XAVIER, T.F.; ARAÚJO, A.S.F.; SANTOS, V.B.; CAMPOS, F.L. Ontogenia da nodulação em duas cultivares de feijão-caupi. Ciência Rural, v.37, p.561-564, 2007.