

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**FITOTECNIA**

**DISSERTAÇÃO**

**Desempenho do Feijoeiro Comum sob Inoculação  
Conjunta de Bactérias Promotoras de Crescimento  
Vegetal e Estirpes de *Rhizobium***

**Rita Hilário de Carvalho**

**2018**



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

**DESEMPENHO DO FEIJOEIRO COMUM SOB INOCULAÇÃO  
CONJUNTA DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO  
VEGETAL E ESTIRPES DE *Rhizobium***

**RITA HILÁRIO DE CARVALHO**

*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 **Mestre em Fitotecnia**, no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de concentração em Produção vegetal.

Seropédica-RJ  
Fevereiro de 2018.

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C331d Carvalho, Rita Hilário de, 1992-  
Desempenho do feijoeiro comum sob inoculação  
conjunta de bactérias promotoras de crescimento  
vegetal e estirpes de Rhizobium / Rita Hilário de  
Carvalho. - 2018.  
54 f.: il.

Orientador: Adelson Paulo de Araújo.  
Coorientadora: Rosângela Straliotto.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Fitotecnia, 2018.

1. Fixação Biológica de Nitrogênio. 2. Phaseolus  
vulgaris. 3. Promotores de Crescimento Vegetal. I.  
Araújo, Adelson Paulo de, 1963-, orient. II.  
Straliotto, Rosângela, -, coorient. III Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro. Fitotecnia. IV.  
Título.

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

**O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de  
Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.**

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

**RITA HILÁRIO DE CARVALHO**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Fitotecnia**, no curso de pós-graduação em Fitotecnia, área de concentração em Produção vegetal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 26/02/2018

---

Adelson Paulo de Araújo. Dr. UFRRJ  
(Orientador)

---

Irene da Silva Coelho. Dr. UFRRJ

---

Jean Luiz Simões de Araújo. Dr. Embrapa Agrobiologia

*O mundo não está interessado nos temporais que você encontrou. Ele quer saber se você trouxe o navio.*

*(William McFee)*

À minha família.  
Dedico

## AGRADECIMENTOS

A Deus e à Nossa Senhora por seu imenso amor, e por sempre me fazer ter fé inclusive nos momentos mais difíceis da caminhada até aqui.

Aos meus pais, Raimunda e Marcos que sempre me incentivaram a seguir nos estudos, e nunca mediram esforços para que eu alcançasse meus objetivos.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro por ser essa universidade linda e acolhedora e ao curso de Pós-Graduação em Agronomia – Fitotecnia, pelas oportunidades oferecidas, e pelo conhecimento proporcionado através de grandes professores e pesquisadores.

À fundação CAPES pela concessão da bolsa e pelo incentivo à pesquisa no país.

Ao meu orientador Adelson Paulo de Araújo, pela paciência, por ser um excelente professor e por aceitar meu convite à orientação mesmo envolvido com outras funções.

À minha co-orientadora Rosângela Stralotto pelo exemplo de mulher dedicada à pesquisa, e pelo apoio e companhia na condução dos experimentos.

Ao pesquisador Ederson da Conceição Jesus pelo acompanhamento, incentivo, paciência e por ter me acolhido como aluna no meio de tantos outros.

À Embrapa Agrobiologia e à Embrapa Solos pelo auxílio e estrutura proporcionados para condução da pesquisa, em especial ao pesquisador da Embrapa Solos Wenceslau Teixeira pelo auxílio na montagem da estação meteorológica no campo experimental de Seropédica.

Aos funcionários da Embrapa Agrobiologia que me auxiliaram desde o laboratório até o campo: Wilson, Lúcio, Claudinho, Marildo, Ernani, Roberto, Aurélio, Alderi, Eugênio, José Pedro, Paulo, Edvaldo, Edilson, Fredson e Oséias. Muito obrigada!

Aos amigos e bolsistas que de alguma forma contribuíram para esse projeto em vários momentos: Osnar, Rafaela, Tawane, Bárbara, Kaoany, Ernandes. Meus sinceros agradecimentos!

Ao meu namorado Vinício pelo amor e companheirismo de todas as horas, por não medir esforços para me auxiliar no campo, no laboratório e por me incentivar a todo momento à nunca desistir e ter forças para continuar.

Aos membros da banca Irene e Jean, por aceitarem o convite e contribuírem com seus conhecimentos para esse trabalho. Obrigada!

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Rita Hilário de Carvalho nasceu em 23 de fevereiro de 1992, na cidade do Rio de Janeiro – RJ, filha de Marcos Hilário de Carvalho e Raimunda Maria da Conceição. Coursou o ensino médio na Escola Técnica Estadual de Santa Cruz, formando-se em 2008 como Técnica em Segurança do Trabalho. No segundo semestre de 2010, ingressou no curso de graduação em Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), diplomando-se Engenheira Agrônoma em 2015. Durante a graduação atuou como estagiária na Embrapa Agrobiologia, sob a orientação da pesquisadora Rosângela Stralotto, desenvolvendo projetos na área de fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro comum. Em março de 2016, ingressou como aluna de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, onde foi bolsista CAPES.

## RESUMO GERAL

CARVALHO, Rita Hilário de. **Desempenho do feijoeiro comum sob inoculação conjunta de bactérias promotoras de crescimento vegetal e estirpes de *Rhizobium***. 2018. 54f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

A co-inoculação em plantas utilizando bactérias promotoras de crescimento surgiu como uma técnica para incrementar o desenvolvimento e produtividade de cultivos agrícolas, devido ao efeito sinérgico destas bactérias. O objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas em termos de nodulação, produção de biomassa e de grãos, da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal associadas à estirpes de *Rhizobium sp.* já estabelecidas para a cultura do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Foram conduzidos dois experimentos em casa de vegetação e três experimentos de campo. Os experimentos em casa de vegetação objetivaram avaliar o efeito da co-inoculação de *Rhizobium sp.* e bactérias promotoras de crescimento nas fases iniciais do desenvolvimento vegetativo em duas cultivares de feijoeiro. Os experimentos tinham delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e seis repetições, sendo efetuadas coletas nas fases fenológicas V3 e V4 (emissão da 1ª e da 3ª folha trifoliada, respectivamente), com as cultivares Pérola e BRS Esteio. A co-inoculação de *Rhizobium* com *Bradyrhizobium elkanii* estimulou a nodulação, em ambos os estágios para a cultivar Pérola e em V4 para a cultivar Esteio. A co-inoculação com *B. elkanii* também estimulou o crescimento vegetativo inicial, observado com mais intensidade em V4, com aumentos de 67% e 28% na massa de parte aérea para Pérola e Esteio, respectivamente. Não houve diferença entre a co-inoculação com promotoras de crescimento e *Rhizobium sp.*, quando comparada à inoculação apenas com *Rhizobium* para massa seca de raízes. Os experimentos de campo avaliaram o efeito da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento associadas a estirpes de *Rhizobium sp.*, na produção de biomassa e produtividade de grãos em três condições agroecológicas. Dois experimentos foram conduzidos em Macaé – RJ, em áreas com e sem cultivo anterior de feijoeiro e características físico-químicas do solo distintas, com a cultivar BRS Esteio, em delineamento em blocos ao acaso com cinco repetições e cinco tratamentos: testemunha absoluta, testemunha nitrogenada (80 kg ha<sup>-1</sup> de N), inoculação com estirpes comerciais de *Rhizobium sp.*, co-inoculação *Rhizobium* e *A. brasilense*, e co-inoculação *Rhizobium* e *B. elkanii*. No experimento conduzido na Embrapa Agrobiologia, acrescentou-se um tratamento com a co-inoculação com *A. brasilense* e aplicação de N mineral em cobertura (40 kg ha<sup>-1</sup> de N), todos os tratamentos avaliados com as cultivares BRS Esteio e Ouro Negro. As plantas foram amostradas quando da floração plena e na maturação dos grãos. Nas condições de campo, não foi possível confirmar o efeito promotor de crescimento das estirpes inoculadas ou da tecnologia de co-inoculação, em termos de produção de biomassa e de rendimento de grãos do cultivo do feijoeiro.

**Palavras-chave:** Feijoeiro comum; Co-inoculação; Promotores de Crescimento.

## GENERAL ABSTRACT

CARVALHO, Rita Hilário de. **Performance of common bean under co-inoculation of plant growth promoting bacteria and *Rhizobium* strains**. 2018. 54f. Dissertation (Master's Crop Science). Institute of Agronomy, Department of Crop Science, Federal University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Co-inoculation of plant growth promoting bacteria emerged as a technique for improving development and crop productivity due to the synergistic effect of these bacteria. The objective of this work was to evaluate the responses in terms of nodulation, biomass production and grain yield, of co-inoculation of plant growth promoting bacteria associated with *Rhizobium sp.* strains already established for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) crop. Two greenhouse experiments and three field experiments were carried out. The greenhouse experiments aimed to evaluate the effect of co-inoculation of *Rhizobium sp.* and growth promoting bacteria in the initial stages of vegetative development of two common bean cultivars. The experiments had completely randomized design with four treatments and six replications, and were harvested at the phenological phases V3 and V4 (first and third trifoliolate leaf fully expanded, respectively), with the cultivars Pérola and BRS Esteio. The co-inoculation of *Rhizobium* with *Bradyrhizobium elkanii* stimulated the nodulation, in both stages for cultivar Pérola and in V4 for cultivar Esteio. Co-inoculation with *Bradyrhizobium elkanii* also stimulated the initial vegetative growth, more intensively at V4, with increases of 67% and 28% in the shoot mass for Pérola and Esteio, respectively. There was no difference between co-inoculation with growth promoters and *Rhizobium sp.*, as compared to sole inoculation with *Rhizobium* for root dry mass. Field experiments evaluated the effect of co-inoculation of growth promoting bacteria associated with *Rhizobium* strains in the production of biomass and grain yield in three different agroecological conditions. Two experiments were conducted in Macaé - RJ, Brazil, in areas with and without previous cultivation of common bean and distinct soil physicochemical characteristics, with the BRS Esteio cultivar, in a randomized block design with five replicates and five treatments: absolute control, nitrogen control (80 kg ha<sup>-1</sup> N), inoculation with commercial strains of *Rhizobium*, *Rhizobium* and *A. brasilense* co-inoculation, and *Rhizobium* and *B. elkanii* co-inoculation. In the experiment conducted at Embrapa Agrobiologia, a treatment with a co-inoculation with *A. brasilense* and application of mineral N in cover (40 kg ha<sup>-1</sup> of N) was added, all treatments evaluated with the cultivars BRS Esteio and Ouro Negro. The plants were sampled at full bloom and grain maturation. In the field conditions, the growth promoting effect of the co-inoculation technology was not confirmed in terms of biomass production and grain yield of common bean crop.

**Keywords:** Common bean; Co-inoculation; Growth Promoters.

## ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1.** Número de nódulos, massa seca de parte aérea, massa seca de nódulos, e massa seca de raiz de plantas de feijoeiro cv. Pérola no estágio V3 e V4, com 20 e 33 DAE, respectivamente, submetidas a quatro fontes de N: inoculação com *R. tropici*, co-inoculação com *A. brasilense*, co-inoculação com *B. elkanii* e testemunha absoluta (sem N)..... 17
- Tabela 2.** Número de nódulos, massa seca de parte aérea, massa seca de nódulos, e massa seca de raiz de plantas de feijoeiro cv. BRS Esteio no estágio V3 e V4, com 27 e 36 DAE, respectivamente, submetidas a quatro fontes de N: inoculação com *R. tropici*, co-inoculação com *A. brasilense*, co-inoculação com *B. elkanii* e testemunha absoluta (sem N)..... 18
- Tabela 3.** Características químicas dos solos coletados para o experimento I em Córrego do ouro, e experimento II em área de assentamento, localizados em Macaé - RJ.....26
- Tabela 4.** Características químicas das amostras de solo coletadas a partir da área do experimento III, na Embrapa Agrobiologia, Seropédica – RJ. ....26
- Tabela 5.** Massa seca de parte aérea, massa seca de nódulos e massa seca de raiz, de plantas de feijoeiro co-inoculado com rizóbio e bactérias promotoras de crescimento (*B. elkanii* e *A. brasilense*) no estágio de floração plena, em Córrego do Ouro, Macaé – RJ (Experimento I). Com aplicação de 80 kg ha<sup>-1</sup> N na testemunha nitrogenada.....30
- Tabela 6.** Número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de 100 grãos e produtividade de grãos, de feijoeiro em função co-inoculação de rizóbio e bactérias promotoras de crescimento, em estágio de maturação de grãos, em Córrego do Ouro, Macaé – RJ (Experimento I), com aplicação de 80 kg ha<sup>-1</sup> N na testemunha nitrogenada ..... 30
- Tabela 7.** Massa seca de parte aérea, massa seca de nódulos e massa seca de raiz de feijoeiro comum em função da inoculação e co-inoculação de rizóbio com bactérias promotoras de crescimento aos 41 DAE, na área de assentamento em Macaé - RJ (Experimento II), com aplicação de 80 kg ha<sup>-1</sup> N na testemunha nitrogenada .....31
- Tabela 8.** Número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de 100 grãos e produção de grãos de feijoeiro em função da inoculação e co-inoculação de rizóbio e bactérias promotoras de crescimento aos 82 DAE, no assentamento em Macaé – RJ (Experimento II), com aplicação de 80 kg ha<sup>-1</sup> N na testemunha nitrogenada .....32
- Tabela 9.** Massa seca de parte aérea, nódulos e raízes, das cultivares de feijoeiro BRS Esteio e Ouro Negro em estágio de floração plena sob inoculação e co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento, associadas ou não a aplicação de N mineral, em Seropédica – RJ (Experimento III). Com aplicação de 80 kg ha<sup>-1</sup> N na testemunha nitrogenada..... 34
- Tabela 10.** Número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de 100 grãos e produção de grãos das cultivares de feijoeiro BRS Esteio e Ouro Negro, no estágio de maturação de grãos, submetidas à inoculação e co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento, associadas ou não a aplicação de N mineral, em Seropédica – RJ (Experimento III). Com aplicação de 80 kg ha<sup>-1</sup> N na testemunha nitrogenada .....36

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estação micro meteorológica na área experimental em Seropédica – RJ.....	52
<b>Figura 2.</b> Dados de temperatura do solo durante condução do experimento em Seropédica - RJ.....	53
<b>Figura 3.</b> Dados de umidade relativa durante condução do experimento em Seropédica – RJ. ....	54

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 Aspectos da Cultura do Feijoeiro.....	3
2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio no Feijoeiro.....	4
2.4 Co-inoculação em Feijoeiro com <i>Azospirillum brasilense</i> .....	8
2.5 O Gênero <i>Bradyrhizobium</i> .....	9
3 CAPÍTULO I - AVALIAÇÃO DA CO-INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE FEIJOEIRO COMUM.....	11
3.1 RESUMO.....	12
3.2 ABSTRACT.....	13
3.3 INTRODUÇÃO .....	14
3.4 MATERIAL E MÉTODOS .....	15
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
3.6 CONCLUSÕES .....	20
4 CAPÍTULO II - CO-INOCULAÇÃO DE RIZÓBIOS E BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL NO FEIJOEIRO EM CONDIÇÕES DE CAMPO .....	21
4.1 RESUMO.....	22
4.2 ABSTRACT.....	23
4.3 INTRODUÇÃO .....	24
4.4 MATERIAL E MÉTODOS .....	25
4.4.1 Descrição e localização das áreas experimentais.....	25
4.4.2 Delineamento experimental e tratamentos.....	26
4.4.3 Quantificação da população nativa de rizóbio.....	27
4.4.4 Amostragem de biomassa e colheita de grãos .....	28
4.4.5 Análise estatística .....	28
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.6 CONCLUSÕES .....	37
5 CONCLUSÕES GERAIS .....	38
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	39
ANEXO .....	52

## 1 INTRODUÇÃO

Em leguminosas como o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), o uso de fertilizantes nitrogenados pode ser substituído parcial ou completamente pelo uso de inoculantes que contenham bactérias fixadoras de nitrogênio (HUNGRIA et al., 2012). Além do custo envolvendo o uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos, há também o dano ambiental, com consequentes efeitos na contaminação dos mananciais hídricos (MERTEN & MINELLA, 2002). Com isso, independente do nível tecnológico dos produtores de feijão, são demandadas tecnologias que representem uma alternativa viável e sustentável para promover a produtividade da cultura (VERONEZI et al., 2012).

O emprego de estirpes bacterianas recomendadas para produção de inoculantes comerciais no Brasil, que sejam eficientes para fixação biológica de nitrogênio (FBN), torna-se de grande importância (VERONEZI et al., 2012). A estirpe BR 322 de *Rhizobium tropici* recomendada para inoculação do feijoeiro, é uma das estirpes mais testadas em diferentes condições de clima e manejo, mas existem outras estirpes elite como a BR 534 e a BR 520, consideradas eficientes em associar-se simbioticamente ao feijoeiro (CHUEIRE et al., 2003; HUNGRIA & VARGAS, 2000; HUNGRIA et al., 2013).

Os inoculantes são produtos que contém microrganismos que promovem ação benéfica às plantas. Estes devem ser produzidos atendendo os protocolos estabelecidos pela RELARE e são encontrados nas mais diversas formas, géis, líquidos e turfosos (SCHUH, 2005). Porém, o sucesso da inoculação depende de fatores como a eficiência competitiva das estirpes, cuidados no processo de inoculação, sobrevivência das estirpes a fatores adversos (HUNGRIA et al., 1994), qualidade do inoculante, dosagem adotada, entre outros.

Em condições de campo, o sucesso da inoculação do feijoeiro está diretamente relacionado à temperatura e umidade do solo, à utilização de adubos nitrogenados, às condições de fertilidade e pH do solo, aos cuidados no tratamento de sementes com fungicidas e inseticidas, às condições de armazenamento do produto, entre outros. Recomenda-se também que a inoculação seja feita à sombra e a semeadura realizada no mesmo dia, evitando-se exposição ao sol e ao calor excessivo.

Além das bactérias pertencentes ao grupo dos rizóbios, novas bactérias têm sido testadas, quanto à promoção de crescimento em plantas. As bactérias promotoras de crescimento são capazes de promover o crescimento vegetal através de alterações fisiológicas devido à liberação de hormônios, como auxinas e citocinina que promovem aumento no crescimento radicular (ZAFAR et al., 2012), melhorias na nutrição vegetal e otimização da nodulação, influenciando na interação rizóbio-planta (STAJKOVIC et al., 2011).

Visando alcançar o máximo da capacidade de fixar nitrogênio (N) atmosférico, através da associação entre bactérias do grupo dos rizóbios e bactérias promotoras de crescimento, a co-inoculação tem surgido com uma técnica de manejo adotada para diversas culturas, a exemplo da soja e do feijoeiro (BAI et al., 2002). Neste grupo de bactérias promotoras de crescimento, podemos encontrar as associativas, do gênero *Azospirillum*, sendo este gênero bastante conhecido por atuação em gramíneas, capaz de promover interações benéficas com leguminosas em associação aos rizóbios (YADEGARI et al., 2010).

Muitos trabalhos descrevem os principais benefícios associados à co-inoculação de rizóbios, como aumento no teor de N foliar, biomassa vegetal e produtividade de grãos (GITTI et al., 2012). Trabalhos também relatam a co-inoculação de *Bradyrhizobium spp.* com bactérias do gênero dos *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, entre outros, principalmente na cultura da soja, onde as informações sobre a FBN são bem concretas e as estirpes de *Bradyrhizobium* são amplamente utilizadas para inoculação (ARAÚJO & HUNGRIA, 1999; HUNGRIA et al., 2001). Porém, são poucos os estudos relacionados ao uso desse gênero como promotor de crescimento associado ao *Rhizobium* em feijoeiro.

Baseando-se no conceito de que a co-inoculação favorece o crescimento vegetal, foram conduzidos experimentos em condições de campo e em condições de casa de vegetação, onde plantas de feijoeiro foram submetidas à inoculação com estirpes de rizóbio, e co-inoculação com outros gêneros, associadas ou não à aplicação de N mineral. Nesse sentido, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento associadas às estirpes de *Rhizobium* já estabelecidas para a cultura do feijoeiro no desenvolvimento inicial, na promoção do crescimento vegetal e no rendimento de grãos de cultivares de feijoeiro comum.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos da Cultura do Feijoeiro

O feijoeiro comum é uma planta anual herbácea, trepadora ou não, pertence à família *Fabaceae*, subfamília *Faboideae*, gênero *Phaseolus*, e está classificado como *Phaseolus vulgaris* L. (CRONQUIST, 1988). Apresenta duas formas de crescimento: determinado e indeterminado. O hábito de crescimento determinado caracteriza-se por ter o caule e os ramos laterais terminando em uma inflorescência (inflorescência terminal) e possuir um número limitado de nós, já o hábito indeterminado é caracterizado por possuir um caule principal com crescimento contínuo, numa sucessão de nós e entrenós (PORTES, 1996).

A cultura do feijoeiro possui dois grandes grupos comerciais, o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e o feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], subdivididos a princípio pela coloração do tegumento do grão (BRASIL, 2008). Dentro do grupo do feijão comum existem vários tipos comerciais como carioca, preto, mulatinho, manteiga, feijões especiais, entre outros (CATÁLOGO, 2014).

O feijoeiro comum é a espécie mais cultivada entre as demais do gênero *Phaseolus* (YOKOYAMA & STONE, 2000; BARBOSA & GONZAGA, 2012). É uma cultura sensível às variações de temperatura e ao déficit hídrico, visto que estes fatores podem influenciar na porcentagem de vingamento das vagens, número de vagens por planta, e número de grãos por vagem, afetando a produtividade da cultura (ZIMMERMANN et al., 1996).

O feijoeiro apresenta um ciclo variável de acordo com a temperatura do ambiente e com a cultivar, o que permite que seja uma cultura adaptável tanto ao sistema de produção agrícola intensivo, quanto aqueles que possuem baixo investimento tecnológico, sendo uma cultura amplamente difundida em todo território nacional, cultivada por pequenos e grandes produtores, e produção em três safras durante o ano (BARBOSA & GONZAGA, 2012). O cultivo de feijoeiro comum em pequenas propriedades é feito em sua grande maioria em sistema com uso reduzido de tecnologias, por vezes voltada para a produção de subsistência, enquanto cultivos comerciais com elevado emprego de tecnologia e insumos são conduzidos em grandes áreas associadas principalmente à terceira safra no período de inverno, com a utilização de sistemas de irrigação (FUSCALDI & PRADO, 2005).

De acordo com Barbosa & Gonzaga (2012), cultivares melhoradas de feijoeiro comum, que proporcionam alto potencial de produção, elevada adaptação e menor sensibilidade a estresses bióticos ou abióticos, representam significativas contribuições à eficiência do setor produtivo. A recomendação de novas cultivares tem colaborado para o aumento da produtividade do feijoeiro no Brasil, que passou de 749 kg ha<sup>-1</sup> em 1997 para 1.354 kg ha<sup>-1</sup> em 2011 (PEREIRA et al., 2013), chegando a cerca de 2.000 kg ha<sup>-1</sup> em 2016 (CONAB, 2017). Dentre os principais grupos comerciais, neste trabalho foram empregadas as cultivares: Ouro Negro, do grupo comercial preto, que apresenta ciclo de 80-100 dias, e massa de 100 grãos de 25 g; BRS Esteio, do grupo comercial preto com ciclo de 85-95 dias, e massa de 100 grãos de 24 g, com alto potencial produtivo, grãos com excelentes propriedades de cozimento e moderada resistência à antracnose. (PEREIRA et al., 2013); e Pérola, do grupo comercial carioca, com ciclo de 85-95 dias, massa de 100 grãos de 27 g, alto potencial produtivo e grãos de elevado padrão comercial, além de apresentar resistência à doenças como mosaico-comum e ferrugem (CNPAP, 2004). As principais características destas cultivares, justificam a escolha delas neste trabalho, além de serem altamente recomendadas em estudos de fixação biológica de nitrogênio na cultura.

São muitos os fatores que podem determinar o sucesso comercial de uma cultivar, como a cor do grão, o tempo de cozimento, a porcentagem de grãos inteiros após o cozimento,

o brilho dos grãos, a produtividade e a resistência da cultivar a fatores bióticos e abióticos (CARBONELL et al., 2010).

### 2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio no Feijoeiro

O N é um elemento presente de forma abundante na atmosfera em sua forma estável, com duas moléculas unidas por uma ligação tripla ( $N\equiv N$ ). Nesta forma, a maioria dos organismos não consegue incorporar este elemento a esqueletos de carbono, sendo necessário sua conversão para íons de amônio (REIS et al. 2005). Alguns microrganismos presentes no solo, são capazes de realizar a quebra dessa ligação tripla e reduzir nitrogênio da forma gasosa para  $NH_4^+$ , sendo esse processo conhecido como fixação biológica de nitrogênio (FBN). A forma assimilável deste nutriente para os organismos se encontra disponível no solo por meio da decomposição e incorporação da matéria orgânica, pela aplicação de adubos nitrogenados ou através do processo de FBN. Em regiões de clima tropical, a decomposição da matéria orgânica acontece de forma mais intensa, o que conseqüentemente acaba resultando em uma mineralização mais rápida do N, aumentando as perdas (STRALIOTTO et al., 2002).

A aplicação de adubos nitrogenados implica em aumento de custos e danos ambientais, visto que as fontes aplicadas possuem elevada solubilidade e alta dinâmica no solo, fazendo com que ocorram perdas de N por lixiviação na forma de nitrato contaminando corpos d'água (HUNGRIA et al., 2001), ou por volatilização na forma de amônia e óxido nitroso (LARA CABEZAS et al., 1997), possuindo este último alto potencial de efeito estufa.

O uso de adubos nitrogenados na cultura do feijoeiro comum, tecnicamente deveria ser estipulada com base na estimativa de rendimento almejado; da quantidade relativa de N que pode ser fornecido pelo solo com base no histórico de cultivo da área, especialmente em regiões de fertilidade construída, onde altas doses de nitrogênio são aplicadas em cultivos anteriores; da eficiência de utilização de N proveniente do fertilizante e até mesmo do potencial de aproveitamento do processo de fixação biológica de nitrogênio. Normalmente, para produtividades variando de 2.000 a 3.600 kg ha<sup>-1</sup>, as quantidades totais de N variam entre 40 e 100 kg ha<sup>-1</sup> (FANCELLI & TSUMANUMA, 2007), no entanto aplicações acima de 150 kg ha<sup>-1</sup> são comuns em áreas de cultivo de feijoeiro sob pivô central no Cerrado brasileiro. Neste sentido a FBN torna-se uma alternativa importante, com menor custo e benefícios ao meio ambiente, quando comparada à aplicação de adubos nitrogenados (STRALIOTTO et al., 2002), uma vez que menores doses de N estão associadas ao aproveitamento do N obtido pela cultura através do processo de FBN (PELEGRIN et al., 2009).

Microrganismos procariotos, de vida livre ou associados as plantas realizam o processo da FBN através de um complexo enzimático, a nitrogenase, que em leguminosas ocorre no interior dos nódulos (REIS et al., 2005). Essa enzima é sensível a presença de oxigênio, os nódulos proporcionam condições anaeróbicas que garantem seu funcionamento. Em leguminosas, os nódulos são formados a partir da infecção radicular por bactérias do grupo dos rizóbios. Dentro dos nódulos, estão localizados os bacteroides que são os rizóbios em multiplicação ao entrar no nódulo. Embora a FBN seja um processo de redução, os rizóbios demandam oxigênio para seus processos metabólicos, enquanto a nitrogenase requer baixas concentrações de O<sub>2</sub>. Para manter esse fino controle atua a proteína leg-hemoglobina responsável pelo controle do oxigênio no nódulo, a qual confere a característica de tonalidade avermelhada dos nódulos em plena atividade (LOPES, 2007).

O estudo de bactérias fixadoras de N associadas as plantas, tem mostrado a ocorrência de uma variedade enorme de microrganismos isolados de famílias do reino vegetal (REIS et al., 2005). A simbiose promove benefícios tanto para a planta, quanto para o grupo de bactérias nodulíferas, pois o rizóbio utiliza fontes de energia da planta para sua manutenção e

multiplicação, enquanto a planta aproveita o N fixado nas raízes (CASSINI & FRANCO, 2006).

Os rizóbios são bactérias rizosféricas que, através dessas associações simbióticas com as leguminosas, favorecem seu crescimento em solos pobres de N, sendo então considerados biofertilizantes e são utilizados na agricultura como inoculantes há mais de 120 anos (ORMENO-ORRILLO et al., 2015). Os rizóbios, responsáveis pela FBN, eram classificados em quatro famílias (*Bradyrhizobiaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Phyllobacteriaceae* e *Rhizobiaceae*), seis gêneros (*Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium*), mais de 30 espécies e vários biovars, todos na ordem Rhizobiales (GARRITY & HOLT, 2001). Atualmente são conhecidos 16 gêneros em dois subfilos distinguidos de acordo com as regras padrão de taxonomia bacteriana. Além dos já conhecidos, incluem-se *Agrobacterium*, *Aminobacter*, *Devosia*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Shinella* e *Ensifer* (antigo *Sinorhizobium*), (Lindström et al., 2013 *apud* MOUSAVI, 2014) e *Neorhizobium* (MOUSAVI et al., 2014).

Com o avanço nas técnicas de biologia molecular, foi possível constatar uma ampla diversidade genética entre os microssimbiontes, permitindo assim, a definição de novas espécies: *R. tropici* (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991), *R. etli* (SEGOVIA et al., 1993), *R. freirei* (HUNGRIA et al., 2000), *R. gallicum* e *R. giardinii* (AMARGER et al., 1997), *R. leucaena* (RIBEIRO et al., 2012), *R. paranaense* (DALL'AGNOL et al., 2014) existindo ainda, diversas estirpes sem posição taxonômica definida, que podem representar novas espécies (DALL'AGNOL et al., 2013).

Embora a eficiência da FBN seja considerada baixa no feijoeiro comum em comparação com outras culturas, como a soja, a inoculação de sementes é um tema estratégico na pesquisa e desenvolvimento de tecnologias, uma vez que sua utilização pode reduzir o uso de fertilizantes minerais (GRAHAM et al., 2003). Essa baixa eficiência se dá, devido à existência de inúmeros fatores limitantes à FBN no feijoeiro comum, podendo ser agrupados em características intrínsecas da hospedeira, edáficos, climáticos, e à população nativa de bactérias (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Dentro dos fatores climáticos limitantes à FBN, a ocorrência de altas temperaturas afeta a sobrevivência do rizóbio no solo, à infecção, formação de nódulos e à atividade da FBN, inclusive sua sobrevivência também no veículo de inoculação durante o transporte e armazenamento (STRALIOTTO & RUMJANEK, 1999).

A ocorrência de déficit hídrico durante o ciclo de cultivo do feijoeiro também exerce efeito negativo em várias etapas do processo de nodulação e na atividade nodular, além de afetar a sobrevivência do rizóbio no solo (HUNGRIA & VARGAS, 2000). Os efeitos do estresse hídrico na produtividade das plantas sob condições simbióticas são distintos conforme o estágio fenológico da planta durante o período de estresse. Muitos estudos mostram as leguminosas e a iniciação nodular sendo mais afetadas pelo estresse osmótico e hídrico do que a estirpe (ZAHKAN, 1999).

Em meio a diversos fatores que limitam a simbiose, a escolha da cultivar é um fator essencial, devendo haver preferência por cultivares que atinjam elevada produtividade e que possuam alta eficiência simbiótica (BARBOSA & GONZAGA, 2012). O feijoeiro é uma cultura cultivada em diferentes regiões, sob diferentes sistemas de produção e épocas de semeadura, conseqüentemente a interação entre genótipos e ambiente deve ser de grande relevância para estudos da FBN (PEREIRA, 2012). Muitos estudos têm auxiliado na indicação de novas cultivares com alta capacidade produtiva, estabilidade e adaptabilidade, para diversas regiões. Pesquisas conduzidas por Pereira et al., 2012, constataram diferenças entre genótipos, entre ambientes e a presença da interação genótipo x ambiente, em relação ao ciclo, produtividade, massa de cem grãos, e tolerância ao acamamento, o que significa que existe resposta diferencial dos genótipos aos ambientes. Segundo Piana et al. (1999), o

feijoeiro é uma cultura com desempenho altamente influenciado pelas variações do ambiente, o que resulta em produtividade média baixa e instável ao longo dos anos. Pesquisadores sugerem a utilização de cultivares com alto grau de estabilidade de desempenho em uma ampla gama de ambientes (PIANA et al., 1999).

Fatores ambientais podem interferir na relação entre o hospedeiro e o microrganismo, a exemplo da troca de sinais entre a planta e o rizóbio. No feijoeiro, a planta excreta substâncias químicas na rizosfera que possuem a ação quimiotática sobre a bactéria, e facilitam a colonização da raiz pelo rizóbio (HUNGRIA & STACEY, 1997). A maximização desse processo se dá através de condições ideais, a qual a cultura será exposta, relacionadas ao crescimento e a sobrevivência do rizóbio, formação de nódulos e atividade da enzima nitrogenase (ARAÚJO & HUNGRIA, 1994).

Um micronutriente que pode ser citado como de grande importância na eficiência da simbiose é o molibdênio (Mo), constituinte estrutural de, pelo menos, duas enzimas relacionadas ao metabolismo do N, a nitrogenase e a nitrato redutase (JACOB-NETO & ROSSETO, 1998). Kubota et al. (2008) observaram que plantas de feijoeiro oriundas de sementes enriquecidas com Mo apresentaram maior atividade da nitrogenase. O fósforo (P) é outro elemento que além de favorecer no crescimento das plantas, geralmente contribui com aumento no número, volume e massa de nódulos (MUNNS, 1977). Araújo et al. (2002) constataram que sementes com alto teor de P propiciaram maior número de nódulos, crescimento de parte aérea e acumulação de N no feijoeiro. Pacheco (2012) verificou que sementes de feijoeiro com baixo teor de P e alto teor de Mo promoveram maior massa seca de parte aérea e maior produção de grãos. A deficiência de P na maioria dos solos tropicais tem efeito marcante sobre a atividade da nitrogenase, devido à grande quantidade de energia gasta pelo processo de FBN (STRALIOTTO & RUMJANEK, 1999). Além disso, Pacheco et al. (2012) conduzindo experimentos em condições de campo, pode concluir que sementes enriquecidas com P e Mo promovem aumento do rendimento de grãos de feijoeiro em comparação com sementes não enriquecidas, e esses aumentos foram associados a maior acúmulo de N nos grãos, maior número de vagens por planta e maior índice de colheita.

A cultura do feijão apresenta grande capacidade de aproveitamento de N disponível no solo, porém quando o mesmo se encontra prontamente disponível, há redução na nodulação e conseqüentemente na taxa de N derivado da fixação biológica (MARTINS et al., 2003).

As estirpes aprovadas para a produção de inoculantes na cultura do feijoeiro pelo MAPA, incluem as estirpes de *Rhizobium tropici*, SEMIA 4077 (= CIAT 899) e SEMIA 4088 (= H 12), e a estirpe de *Rhizobium freirei* SEMIA 4080 (= PRF 81) (BRASIL, 2011).

A inoculação de sementes é uma tecnologia que pode reduzir os custos da produção agrícola para aquelas culturas capazes de se associar simbioticamente as bactérias. Neste sentido, pesquisas relevantes que vão desde o melhoramento genético de plantas até a seleção de estirpes eficientes e competitivas, contribuem de forma direta para o avanço na produtividade de culturas como a soja e o feijoeiro (DENARDIN, 2006). O uso de inoculantes no Brasil tem se tornado crescente, e a adoção desta tecnologia se dá pelo surgimento de novas formulações e técnicas de aplicação, que proporcionam além de maior eficiência da FBN, maior praticidade à inoculação.

A princípio o critério de relevância para escolha do inoculante, deve ser baseado na garantia de que a formulação proporcionará o maior número de células viáveis no momento da inoculação (DENARDIN, 2006). O processo de inoculação variará de acordo com as formulações de inoculantes utilizadas. As formulações em pó proporcionam maior homogeneidade na cobertura da semente e requerem utilização de aditivo para melhorar a aderência do produto à semente. Os granulados são melhores utilizados, quando aplicados diretamente no sulco de semeadura. As formulações líquidas podem ser aplicadas diretamente

sobre as sementes ou no sulco de semeadura, sem a necessidade de aditivos que garantam a aderência do produto (DENARDIN, 2006). O uso de inoculantes turfosos é bastante difundido em território nacional, porém agricultores podem preferir o uso de formulações líquidas que facilitem o trabalho da inoculação e diminua o desgaste das máquinas (HUNGRIA et al., 1997).

De acordo com dados da ANPII (2017), o inoculante turfoso é o mais utilizado para inoculação do feijoeiro, com base no ano safra de 2016, tendo sido comercializado cerca de 260 e 117 mil doses para o inoculante turfoso e líquido, respectivamente. Porém para a cultura da soja, as formulações de inoculantes líquidos são as mais comercializadas, chegando a cerca de 34 milhões de doses neste mesmo ano, o que torna esta formulação a mais utilizada no Brasil. A turfa é o veículo com melhor suporte para elaboração de inoculantes em pó, porém deve atender as especificações de um bom veículo, com relação a alta retenção de umidade, ausência de toxidez, facilidade de esterilização, baixo custo e boa adesão as sementes (SMITH, 1992).

O uso de inoculantes turfosos é bastante difundido em território nacional, porém agricultores podem preferir o uso de formulações líquidas que facilitem o trabalho da inoculação e diminua o desgaste das máquinas (HUNGRIA et al., 1997).

Diversos experimentos conduzidos no Brasil respaldam os benefícios proporcionados pela turfa, isso porque este veículo é capaz de proporcionar uma pequena, porém importante proteção dos rizóbios a estresses hídricos, térmicos e toxicidade de fungicidas, e nos inoculantes de turfa esterilizada, a quantidade de células viáveis pode ser até 1000 vezes maior, que na turfa não-esterilizada (HUNGRIA et al., 1997). Estudos quanto a eficiência agrônômica de diferentes formulações de inoculantes em soja verificaram que o inoculante turfoso proporcionou maior nodulação nas plantas de soja, quando comparada com o inoculante líquido nas condições avaliadas (ALBAREDA et al., 2008; ZILLI et al., 2010).

O uso de sementes tratadas com fungicidas ou inseticidas pode afetar o desempenho das estirpes inoculadas na promoção da FBN, visto que estas sementes podem elevar a toxicidade na espermosfera e afetar a multiplicação dos microrganismos pós-inoculação. Por isso, atualmente as indicações para uso de inoculantes em sementes tratadas indicam a utilização do dobro da dose, ou a inoculação direta no sulco de semeadura (DENARDIN, 2006), buscando prevenir o contato direto dos microrganismos presentes no inoculante com os agroquímicos.

As formas de aplicação dos inoculantes devem variar de acordo com a formulação utilizada, porém alguns estudos afirmam que a inoculação tradicional via sementes nem sempre é eficiente, principalmente devido ao efeito causado pela aplicação de fungicidas junto as bactérias. Contudo, a forma de inoculação e o tipo de formulação têm potencial para alterar o padrão de nodulação radicular (DENTON et al., 2007). Uma alternativa à inoculação tradicional de rizóbios tem sido a pulverização do inoculante no sulco de semeadura durante a distribuição das sementes, muito utilizada inclusive na cultura da soja (ZHANG & SMITH, 1996). A pulverização pode ser indicada onde os solos são secos e quentes, ou quando as sementes são tratadas. Segundo Neto et al. (2008), a pulverização melhora a distribuição do rizóbio na semente e no solo, tornando-o melhor localizado para infecção das raízes das plantas. Este mesmo autor afirma que em solos com alta população nativa, a inoculação via pulverização poderia propiciar uma nodulação secundária, favorecendo o estabelecimento dos rizóbios no solo.

Alguns trabalhos encontrados na literatura encorajam o uso dessa técnica em diversas culturas como feijão e a soja (RAMOS & RIBEIRO, 1993; ZILLI et al., 2008). Porém, ainda são poucos trabalhos com relação aos benefícios dos diferentes tipos de aplicação de inoculantes em diferentes sistemas de cultivo. Neto et al. (2008), avaliando formas de aplicação de inoculante em soja, em áreas distintas, encontrou resultados similares em

nodulação para aplicação de inoculantes via sulco e via semente. Campos (1999) afirma que independente das formas de aplicação de inoculantes, os ganhos em produtividade na reinoculação em áreas com cultivos anteriores de leguminosas é menos expressivo que os obtidos no primeiro ano de inoculação. Entretanto, Hungria et al. (1996), em experimentos conduzidos no Paraná, observou que a reinoculação, promoveu incrementos no rendimento de grãos de soja.

#### 2.4 Co-inoculação em Feijoeiro com *Azospirillum brasilense*

As bactérias promotoras de crescimento em plantas compreendem um grupo que atuam por diversos mecanismos, como a fixação de nitrogênio (ASHRAF et al., 2011) e a produção de hormônios vegetais (auxina, giberelina e citocinina) (ASHRAF et al., 2011; BOTTINI et al., 1989; STRZELCZYK et al., 1994), estimulando a ramificação da raiz, aumentam a permeabilidade da raiz, melhoram a absorção de minerais em geral, e aumentam a resistência às condições adversas como seca, salinidade e compostos tóxicos, entre outros (BASHAN & BASHAN, 2005).

Dentre essas bactérias, destacam-se as do gênero *Azospirillum*, amplamente utilizadas como inoculantes no mundo (HUNGRIA et al., 2013). O gênero *Azospirillum* abrange um grupo de bactérias de vida livre que é encontrado em quase todos os lugares da Terra; há relatos, também, de que as bactérias desse gênero possam ser endofíticas facultativas (DÖBEREINER & PEDROSA, 1987; HUERGO et al., 2008). As bactérias do gênero *Azospirillum* ganharam grande destaque mundial a partir da década de 70 (DÖBEREINER & DAY, 1976), com a descoberta da capacidade de fixar biologicamente o N quando em associação com gramíneas.

Inicialmente, Döbereiner & Day (1975) descobriram a capacidade de fixação no gênero *Spirillum* que posteriormente foi nomeado para *Azospirillum* (TARRAND et al., 1978). Em resumo, este gênero está englobado no Domínio *Bacteria* na subdivisão  $\alpha$ -Proteobacteria, no qual se encontram a maioria das bactérias gram-negativas formato vibrio e/ou espirilo (MOREIRA, 2010). Atualmente são 14 espécies descritas, sendo as mais estudadas *A. lipoferum* e *A. brasilense* (REIS, 2010).

O gênero *Azospirillum* é definido como um colonizador geral de raízes, com baixa especificidade, já que não apresenta preferência por plantas cultivadas, plantas daninhas, anuais ou perenes (BASHAN & HOLGUIN, 1997).

Considerando os benefícios que podem ser agregados às plantas por estes microrganismos, uma técnica alternativa de inoculação conhecida também como inoculação mista ou co-inoculação tem sido pesquisada em leguminosas (BÁRBARO et al., 2008). Essa técnica de manejo é baseada na mistura de inoculantes com estirpes de diferentes gêneros, ou seja, combinações de microrganismos que interatuam sinergicamente, ou quando um dos gêneros está atuando como um auxílio bacteriano com objetivo de aprimorar o desempenho de outros microrganismos benéficos (FERLINI, 2006).

Alguns trabalhos afirmam que com a utilização do *Azospirillum brasilense* em leguminosas, há um efeito benéfico da associação com rizóbio, que se deve à aptidão de produção de fitormônios, resultando em aumento do sistema radicular e a possibilidade de explorar um volume mais extenso de solo (BÁRBARO et al., 2008). No feijoeiro a co-inoculação com *Azospirillum* pode aumentar a quantidade de N fixado e o rendimento de grãos (REMANS et al., 2008). Burdman et al. (1997), analisando o efeito de *Azospirillum* e *Rhizobium* na nodulação e crescimento do feijoeiro em laboratório, observaram que a co-inoculação promoveu incrementos significativos no número de nódulos e na fixação de N atmosférico comparada com a inoculação com *Rhizobium*.

A inoculação mista de *Azospirillum* e *Rhizobium* estimula a formação de nódulos, resultando em aumento no número e na massa, estimula a diferenciação das células epidérmicas nos pelos radiculares, produtividade de grãos e área da superfície radicular, em leguminosas (BASHAN & BASHAN, 2005). GITTI et al. (2012) verificaram que a inoculação em feijoeiro com *A. brasilense* não influencia significativamente o desenvolvimento de plantas, os componentes de produção e a produção de grãos. Cassán et al. (2009), em avaliação da co-inoculação de *B. japonicum* e *A. brasilense* em soja, verificaram a produção de compostos reguladores de crescimento de raiz (AIA), ocasionado pelo *A. brasilense*. Segundo Hungria (2011), a co-inoculação promove melhorias em parâmetros fotossintéticos da planta, resultando em maior produção de biomassa e maior altura das plantas.

Ferri et al. (2017), avaliando a co-inoculação *Bradyrhizobium*-*Azospirillum* em soja, verificaram que este tratamento promoveu aumento no rendimento de grãos, variando entre 10 e 20% em relação a inoculação padrão.

Diante desses resultados promissores, a co-inoculação com *Azospirillum* e outros microrganismos é uma das maiores fronteiras da tecnologia e talvez seja a principal área para aplicação futura no campo dos inoculantes microbianos (PERES, 2014).

## 2.5 O Gênero *Bradyrhizobium*

Inicialmente os rizóbios eram agrupados em apenas um gênero, o *Rhizobium* Frank 1879 (KUYKENDALL et al., 2005), e posteriormente Jordan (1982) sugeriu uma separação taxonômica baseada em curvas de crescimento, para diferenciar os rizóbios de multiplicação rápida, daqueles de multiplicação lenta. Inicialmente o agrupamento dos rizóbios, foi feito baseado nas características fenotípicas, relacionando a habilidade de nodular algumas leguminosas (STRALIOTTO & RUMJANEK, 1999; WILLEMS, 2006).

Estudos apontam que o gênero *Bradyrhizobium*, abrange cerca de 62 estirpes de bactérias, que podem viver em associações simbióticas e endofíticas com leguminosas e não-leguminosas (PIROMYOU et al., 2017). Dentre o grupo dos rizóbios, as espécies pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* possuem grande importância agrícola, pois são capazes de fixar o N atmosférico em leguminosas, a exemplo da cultura da soja e do feijão-caupi (CHUEIRE et al., 2003).

As espécies de *B. japonicum* (JORDAN, 1982), *B. elkanii* (KUYKENDALL et al., 1992) e *B. liaoningense* (XU et al., 1995) são de crescimento lento e associadas a cultura da soja, porém, apenas *B. japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) e *B. elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019) são utilizadas para inoculantes comerciais da soja no Brasil (ALBERTON et al., 2006; BRASIL, 2011). Na literatura, podemos encontrar vários trabalhos que confirmam que a associação entre a cultura da soja e bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, pode fornecer todo N necessário para o seu desenvolvimento, dispensando o uso de adubos nitrogenados (CHUEIRE et al., 2003; MENDES et al., 2010; HUNGRIA et al., 2013).

Determinadas cepas de *Bradyrhizobium* podem induzir uma elevada nodulação em leguminosas, porém estes nódulos seriam desprovidos de bacteroides (MARTINEZ et al., 1985). Surge então a hipótese de que quando co-inoculado com estirpes efetivas de rizóbio, a estirpe de *Bradyrhizobium* estimularia a nodulação e esta seria colonizada por rizóbios eficazes (CONCEIÇÃO JESUS et al., 2018).

Estudos atuais sugerem que bactérias do gênero *Bradyrhizobium* promovem incrementos ao desenvolvimento do feijão comum, quando em associação com estirpes do gênero *Rhizobium*. Porém, são poucos os estudos que avaliam a inoculação conjunta destes dois gêneros em feijão comum, buscando entender a relação entre ambos e os incrementos observados. Bastos (2016), ao avaliar a co-inoculação de promotoras de crescimento no

feijoeiro comum em casa de vegetação, observou que os tratamentos co-inoculados com *Rhizobium* + (*B. diazoefficiens*, ou *B. elkanii*) proporcionaram aumento na parte aérea comparado a testemunha absoluta, indicando que a associação de estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* foram capazes de promover incrementos a biomassa do feijoeiro. De acordo com Conceição Jesus et al. (2018), resultados encontrados avaliando a co-inoculação sugerem que incrementos obtidos no crescimento do feijoeiro co-inoculado com *R. tropici* e bactérias nodulantes contribuiu para uma melhor interação entre *R. tropici* e o feijoeiro.

Diversos estudos foram feitos avaliando a co-inoculação de *Bradyrhizobium* com microrganismos de outros gêneros. Braccini et al. (2016) relataram que a co-inoculação de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* foi capaz de promover incrementos significativos nos caracteres fisiológicos e promoveu acréscimos no rendimento de grãos da soja, quando comparado a testemunha. Rodrigues et al. (2012) também encontraram resultados positivos avaliando a co-inoculação de estirpes de *Bacillus*, *Brevibacillus* e *Paenibacillus* a estirpe de *Bradyrhizobium*, no feijão-caupi.

Trabalhos recentes afirmam ser possível isolar bactérias do gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* de raízes de cana-de-açúcar (PISA, 2013; ROUWS et al., 2015; MATOS et al., 2017). Thaweenut et al. (2011), Burbano et al. (2011), e Fischer et al. (2012), ao estudarem transcritos de *nifH* em várias cultivares de cana e sob diferentes condições de crescimento, encontraram além de transcrições de outros diazotróficos, transcrições *nif* de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, posteriormente confirmado por Rouws et al. (2015). Outros estudos afirmam que é possível encontrar *Rhizobium leguminosarum* em raízes de arroz, trigo e outras plantas não leguminosas (SCHLOTTER et al., 1997).

Embora estirpes do gênero *Bradyrhizobium* sejam conhecidas por promover a FBN em algumas leguminosas, o mesmo pode não ocorrer em outras culturas de interesse agrônomo, visto que estudos afirmam que eco tipos de *Bradyrhizobium* de vida livre, eram dominantes em solos florestais da América do Norte (VANINSBERGHE et al., 2015), indicando que este gênero pode proporcionar benefícios adicionais além da FBN.

De acordo com Antoun et al. (1998), as pesquisas sobre interações *Rhizobium-Bradyrhizobium* em plantas não leguminosas devem se concentrar em estudos sobre a troca de sinais planta-bactéria, potencial uso dessas bactérias no controle biológico e seleção de estirpes que induzam resistência em plantas, estirpes benéficas para leguminosas e não-leguminosas, principalmente no sistema de rotação de culturas e na compreensão dos mecanismos que afetam a colonização e sua interação com fatores abióticos.

Entretanto, podemos encontrar na literatura resultados significativos das pesquisas para compreensão dos mecanismos das interações entre plantas e microrganismos e como promovem o crescimento vegetal, tendo alguns produtos o sucesso como formulações comerciais, entre eles os inoculantes à base de rizóbios (MARTINEZ-ROMERO, 2003; MABOOD et al., 2014).

**3 CAPÍTULO I - AVALIAÇÃO DA CO-INOCULAÇÃO DE  
BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO NO  
DESENVOLVIMENTO INICIAL DE FEJJOEIRO COMUM**

### 3.1 RESUMO

O crescimento do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) pode ser beneficiado pelo efeito sinérgico promovido pela co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas. Com objetivo de avaliar o efeito da co-inoculação de *Rhizobium sp.* e bactérias promotoras de crescimento nas fases iniciais do desenvolvimento vegetativo em duas cultivares de feijoeiro, conduziram-se dois experimentos em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia. Os experimentos tiveram delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições e quatro tratamentos: testemunha absoluta, inoculação com *Rhizobium tropici* (CIAT 899), co-inoculação com *R. tropici* e *Bradyrhizobium elkanii* (BR 29), e co-inoculação com *R. tropici* e *Azospirillum brasilense* (BR 11005). Utilizaram-se as cultivares de dois tipos comerciais de grãos, Pérola, tipo carioca, e BRS Esteio, tipo preto, em substrato estéril com pedrisco e vermiculita em vaso de Leonard. As plantas foram coletadas durante as fases fenológicas vegetativas iniciais V3 e V4 (abertura da primeira e terceira folhas trifoliadas, respectivamente), período crítico para o estabelecimento da nodulação em feijoeiro. As variáveis analisadas foram número de nódulos, massa seca de nódulos, massa seca de parte aérea e de raiz. Na cultivar Pérola, a co-inoculação com *Bradyrhizobium* proporcionou maior número de nódulos comparado à inoculação isolada de *Rhizobium tropici* e à co-inoculação com *Azospirillum*, sendo superior à inoculação isolada nas duas fases avaliadas. O número de nódulos da cultivar Pérola, comparados com a inoculação isolada de rizóbio, apresentou aumento de 56% e 70%, respectivamente em V3 e V4. Na cultivar BRS Esteio, a co-inoculação propiciou resultados significativos apenas na fase V4, onde a co-inoculação com *R. tropici* e *B. elkanii* propiciou incrementos em número de nódulos e massa seca de nódulos, superiores à inoculação isolada com *R. tropici*. O estímulo da co-inoculação com *Azospirillum*, em comparação com o rizóbio isoladamente, foi mais evidente em V4 para ambas cultivares, com um aumento, respectivamente, para Pérola e Esteio, de 53% e 21% no número de nódulos e de 24% e 21% na massa de nódulos. Não houve diferença estatística entre a co-inoculação com promotoras de crescimento e *Rhizobium*, comparada à inoculação apenas com *R. tropici*, para massa seca de raízes. A co-inoculação com bactérias promotoras de crescimento foi capaz de propiciar incrementos no desenvolvimento inicial do feijoeiro em termos de nodulação e massa de parte aérea.

**Palavras-chave:** Nodulação; Fase fenológica; Feijoeiro comum.

### 3.2 ABSTRACT

Growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) may be benefited by the synergistic effect promoted by co-inoculation of plant growth promoting bacteria. In order to evaluate the effect of co-inoculation of *Rhizobium* and growth promoting bacteria in the initial stages of vegetative development in two common bean cultivars, two experiments were conducted in a greenhouse at Embrapa Agrobiologia. The experimental had a completely randomized design with six replicates and four treatments: absolute control, *Rhizobium tropici* (CIAT 899) inoculation, co-inoculation with *R. tropici* and *B. elkanii* (BR 29), and co-inoculation with *R. tropici* and *A. brasilense* (BR 11005). Cultivars of two commercial grain types, Pérola, type carioca, and BRS Esteio, black type, were used, in sterilized substrate with vermiculite in Leonard jars. The plants were harvested at the initial vegetative phenological phases V3 and V4 (first and third trifoliolate leaves fully expanded, respectively), critical period for the establishment of nodulation in common bean. The analyzed variables were number of nodules, dry mass of nodules, dry mass of shoot and root. In the cultivar Pérola, the co-inoculation of *Rhizobium* with *Bradyrhizobium* provided a greater number of nodules compared to the sole inoculation of *Rhizobium* and the co-inoculation with *Azospirillum*, being superior to the sole inoculation at both phases evaluated. The number of nodules of the cultivar Pérola, compared with the isolated inoculation of *Rhizobium*, showed increase of 56% and 70%, respectively in V3 and V4. In the cultivar BRS Esteio, co-inoculation provided significant results only in the V4 phase, where co-inoculation with *B. elkanii* increased nodule number and nodule mass above sole inoculation with *R. tropici*. The stimulation of the co-inoculation with *Azospirillum* compared to the isolated rhizobia was more evident in V4 for both cultivars, with an increase for Pérola and Esteio, of 53% and 21%, respectively, of the number of nodules and of 24% and 21% % in the mass of dry nodules. There was no difference between a co-inoculation with growth promoters and *Rhizobium*, compared to sole inoculation, for root dry mass. Co-inoculation with growth promoting bacteria was able to increase the initial development of common bean in terms of nodulation and shoot mass.

**Keywords:** Nodulation; Phenological phase; Common bean.

### 3.3 INTRODUÇÃO

Embora sejam muitos os fatores limitantes para que a FBN contribua de forma adequada para o crescimento de plantas de feijoeiro, aqueles que atuam na fase inicial do processo, podem ser determinantes para o ciclo da cultura. Logo após a germinação, a nodulação ainda não é eficiente na promoção de FBN e os cotilédones já não suprem essa demanda por nutrientes, fazendo que a planta passe por um período de deficiência de N (XAVIER et al., 2007). De acordo com Brito et al. (2013), apenas a partir dos 25 dias após a emergência (DAE) a necessidade de N da cultura, seria suprida pela FBN, estendendo-se até a floração.

Uma alternativa a ser utilizada como forma de minimizar os efeitos dessa deficiência inicial de N seria a adoção de estímulos para as plantas, que ocasionasse uma maior emissão de raízes, e conseqüentemente uma nodulação mais abundante e precoce. Isso auxiliaria numa maior eficiência de utilização do nitrogênio pela atividade da nitrogenase, e maior contribuição da FBN.

O uso de bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP) pode corroborar com estímulos ao enraizamento de leguminosas, pois sua ação está relacionada à produção de hormônios vegetais (CATTELAN, 1999), que induzem o crescimento de raízes, aumentando os sítios de infecção de rizóbios, além de auxiliar no funcionamento da enzima nitrogenase. Neste caso, a co-inoculação de bactérias do grupo dos rizóbios, associadas às BPCP, contribuirão para que um dos fatores limitante não interfira de forma relevante na fixação biológica de nitrogênio.

Hungria et al. (2013), analisando algumas das principais limitações para eficiência da FBN no feijoeiro, e os benefícios proporcionados pelas promotoras de crescimento, concluiu que a co-inoculação pode contribuir expressivamente no desempenho da cultura.

Trabalhos como de Naveed et al. (2015) afirmam que a utilização de microrganismos promotores de crescimento associados a rizóbios, podem contribuir expressivamente para produtividade do feijoeiro.

A partir deste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal no desenvolvimento inicial da nodulação no feijoeiro comum, bem como sua influência na produção de biomassa vegetal.

### 3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Dois experimentos foram conduzidos em vasos de Leonard (VICENT, 1970) em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia entre agosto e dezembro de 2017. O primeiro experimento utilizou a cultivar Pérola do grupo carioca, e o segundo utilizando a cultivar BRS Esteio do grupo preto.

Essas cultivares foram escolhidas com base na elevada inserção da cultivar Pérola nos sistemas produtivos de feijoeiro no Brasil e na alta produtividade da cultivar Esteio, lançada com sucesso recentemente pela Embrapa Arroz e Feijão, a qual tem demonstrado potencial para FBN em experimentações de campo conduzidas no escopo dos projetos da Embrapa Agrobiologia.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis repetições e quatro tratamentos: testemunha absoluta (sem inoculação), inoculação com *Rhizobium tropici* (CIAT 899 = BR 322), co-inoculação *Rhizobium tropici* + *Azospirillum brasilense* (Sp 245 = BR 11005) e co-inoculação *Rhizobium tropici* + *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 5019 = BR29).

As estirpes foram obtidas na coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia. A estirpe de rizóbio foi crescida em meio YM (DÖBEREINER et al., 1999) por três dias sob agitação, e a estirpe de *Bradyrhizobium* por seis dias, em meio YM. Após o crescimento a densidade ótica (DO) do inóculo foi ajustada para 1.0 em espectrofotômetro a 600 nm, para adequar a concentração de células para  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> conforme recomendado. A estirpe de *Azospirillum* foi crescida em meio DYGS (DÖBEREINER et al., 1999), com pH 6,8, por 2 dias sob agitação, e o procedimento para ajuste da densidade ótica foi o mesmo aplicado para as estirpes de rizóbio e *Bradyrhizobium*.

Para cada vaso de Leonard foi utilizada a proporção 1:1 de pedrisco: vermiculita. Os vasos foram autoclavados por 60 minutos à temperatura de 121 °C a 1 atm, e foram dispostos em mesas na casa de vegetação sob condições estéreis. Pouco antes do plantio, as sementes foram desinfestadas por 1 minuto em álcool 70% e 3 minutos em hipoclorito de sódio, seguido de lavagens sucessivas com água destilada estéril. Semearam-se quatro sementes por vaso, cada semente recebeu 1 mL de inóculo de bactérias no momento de plantio. Nos tratamentos co-inoculados cada semente recebeu a proporção de 0,5 mL de inóculo com rizóbio e 0,5 mL de inóculo contendo *Bradyrhizobium* ou *Azospirillum*. Após germinação, cada vaso recebeu uma camada de areia esterilizada com cerca de 1 cm. Semanalmente, os vasos receberam 300 mL de solução nutritiva de Norris (NORRIS, 1964) sem N e 10 dias após a emergência (DAE) foi feito o desbaste mantendo 2 plantas por vaso.

As plantas foram coletadas durante as fases fenológicas V3 e V4, que ocorreram aos 20 e 33 DAE para cultivar Pérola e 27 e 36 DAE para a cultivar BRS Esteio. Essas fases são caracterizadas pela emissão da primeira folha trifoliada e terceira folha trifoliada. A parte aérea foi cortada na altura do nó cotiledonar, e o sistema radicular foi lavado e recuperado juntamente aos nódulos que foram destacados e contados. Os nódulos foram guardados em frascos de vidros na estufa a 65 °C até atingirem massa constante. A parte aérea e as raízes foram guardadas em sacos de papel, acondicionadas separadamente, e secas em estufa de circulação forçada a 65 °C para determinação da massa da matéria seca.

Na análise estatística, adotou-se um esquema fatorial considerando as diferentes épocas de coleta do experimento como um fator. Os resultados foram analisados quanto à normalidade e a homogeneidade da distribuição de frequência usando os testes Shapiro-Wilk e Bartlett. A análise de variância foi realizada para testar os efeitos e a interação entre eles. Para o teste de comparação de médias foi utilizado o teste Duncan ao nível de 5% de significância, utilizando-se o programa estatístico R core team (2015).

### 3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados do tratamento testemunha (sem aplicação de N e sem inoculação) demonstram que não houve nodulação por estirpes nodulantes contaminantes no experimento.

A co-inoculação com *Bradyrhizobium*, no estágio V3 da cultivar Pérola, proporcionou aumento de 57% no número de nódulos comparado a inoculação isolada de *Rhizobium tropici*. A co-inoculação com *Azospirillum*, promoveu nodulação com valores intermediários entre a co-inoculação com *Bradyrhizobium* e inoculação isolada (Tabela 1), não diferindo estatisticamente de ambos tratamentos. Souza & Ferreira (2017) encontraram resultados semelhantes a este trabalho em número de nódulos, onde a co-inoculação de duas doses de *Rhizobium tropici* em sementes e três doses de *Azospirillum brasiliense* pulverizadas em plantas foi um dos tratamentos com maior número de nódulos em seis dos sete locais avaliados. Experimentos conduzidos em casa de vegetação mostraram que a inoculação dupla de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* em plantas de soja respondeu positivamente, mas não significativamente ao número de nódulos segundo Chibeba et al. (2015). Porém neste mesmo experimento o autor pode constatar aumento significativo na massa seca de nódulo e na precocidade da nodulação aos 21 DAE.

Ainda que tenha sido observado efeito da co-inoculação no número de nódulos, o mesmo não se confirmou para a massa seca de nódulos, visto que neste período inicial embora numerosos os nódulos ainda eram pequenos. O número de nódulos na fase V3 variou entre 43 e 64 nódulos, que já indicam uma boa nodulação, pois segundo Straliozzo (2002), a presença de 10 a 20 nódulos com coloração vermelha em condições de campo já é um indicativo de eficiência do processo de inoculação.

A massa de nódulos secos não diferiu estatisticamente entre os tratamentos, exceto para a testemunha absoluta que não apresentou nódulos, conforme já destacado (Tabela 1). Avaliando diferentes doses de inoculantes e co-inoculação de rizóbios com promotoras de crescimento, Bastos (2016) não observou diferenças significativas entre os tratamentos para variável massa seca de nódulos aos 35 dias após o plantio.

A massa de parte aérea também não diferiu estatisticamente entre os tratamentos no estágio V3 (Tabela 1). Isso provavelmente se deve ao fato de que, neste período, a planta ainda se encontra na fase de formação de nódulos e o processo de assimilação e incorporação de N na parte aérea encontram-se ainda em fase inicial. Devido a este fato observa-se que cultivares de feijoeiro de ciclo longo apresentam maior potencial de resposta a nodulação, visto que o feijoeiro é uma cultura que normalmente apresenta nodulação tardia, sendo os benefícios da simbiose iniciados 15 a 20 dias após a semeadura (ARAÚJO et al., 1996).

Para a variável massa seca de raízes, a testemunha absoluta foi superior aos demais tratamentos, inclusive os co-inoculados, provocado provavelmente pela “fome de N” da planta, que provoca o crescimento radicular em busca do nutriente efeito amplamente relatado na literatura. Resultados semelhantes foram encontrados por Rodrigues et al. (2012) em feijão-caupi, cuja testemunha absoluta apresentou maior comprimento de raiz em relação aos tratamentos co-inoculados com promotoras de crescimento. Estes resultados podem ser explicados pelo fato da planta investir mais em crescimento radicular como forma de aumentar sua capacidade de explorar o meio, quando em condição de baixa disponibilidade de nutrientes e/ou água (ZONTA et al., 2006), justificada neste caso pela ausência de N no substrato/solução.

No estágio V4, as plantas apresentavam a terceira folha trifoliada aberta, em fase de franco crescimento. Com isso, foram evidenciados os efeitos dos diferentes tratamentos. Os tratamentos de co-inoculação foram superiores a inoculação isolada de *R. tropici* para variável número de nódulos tanto para *Bradyrhizobium* como para *Azospirillum*, sendo observado um

aumento de 70% e 53%, respectivamente, no número de nódulos para a cultivar Pérola (Tabela 1).

A co-inoculação com *Bradyrhizobium* foi superior estaticamente a co-inoculação com *A. brasilense* e a inoculação isolada de rizóbios, promovendo incrementos na nodulação de 11 e 70%, respectivamente (Tabela 1). A massa seca de nódulos e a massa de parte aérea diferiram entre os tratamentos co-inoculados e o tratamento que recebeu inoculação isolada, sendo aquele superior em 29% e 24%, respectivamente para *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*. Os tratamentos de co-inoculação com bactérias promotoras de crescimento ou com rizóbio isoladamente proporcionaram acúmulo de massa de parte aérea em relação a testemunha. No entanto, o incremento em massa seca da parte aérea dos tratamentos de co-inoculação em relação às plantas inoculadas apenas com rizóbio foi de 67% e 51% respectivamente para *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*.

O crescimento radicular das plantas inoculadas com *Bradyrhizobium* foi superior aos demais tratamentos, mas a inoculação com *R. tropici* e a co-inoculação com *A. brasilense* não afetaram significativamente o desenvolvimento radicular.

**Tabela 1.** Número de nódulos, massa seca de parte aérea, massa seca de nódulos, e massa seca de raiz de plantas de feijoeiro cv. Pérola no estágio V3 e V4, com 20 e 33 DAE, respectivamente, submetidas a quatro fontes de N: inoculação com *R. tropici*, co-inoculação com *A. brasilense*, co-inoculação com *B. elkanii* e testemunha absoluta (sem N)

Fonte de N	Número de nódulos	Massa seca de nódulos (mg planta <sup>-1</sup> )	Massa seca de parte aérea (g planta <sup>-1</sup> )	Massa seca de raiz (g planta <sup>-1</sup> )
Estádio V3				
Inoculado com <i>R. tropici</i>	83 b	43 a	0,32 a	0,12 b
Co-inoculado com <i>A. brasilense</i>	114 ab	53 a	0,32 a	0,10 b
Co-inoculado com <i>B. elkanii</i>	130 a	64 a	0,34 a	0,13 b
Testemunha absoluta (sem N)	0 c	0 b	0,32 a	0,21 a
Média	82	40	0,32	0,14
Estádio V4				
Inoculado com <i>R. tropici</i>	202 c	201 b	1,08 b	0,40 b
Co-inoculado com <i>A. brasilense</i>	309 b	249 a	1,63 a	0,46 ab
Co-inoculado com <i>B. elkanii</i>	344 a	259 a	1,80 a	0,50 a
Testemunha Absoluta (sem N)	0 d	0 c	0,42 c	0,40 b
Média	214	177	1,23	0,44

Letras minúsculas nas colunas comparam as fontes de N pelo teste de Duncan à 5%.

Na cultivar BRS Esteio, na fase fenológica V3 os tratamentos de co-inoculação não proporcionaram incrementos a produção de biomassa (Tabela 2). O tratamento de co-inoculação com bactérias promotoras de crescimento, associada a estirpe de rizóbio CIAT

899, não diferiu estatisticamente da inoculação isolada com a referida estirpe. Em cultivo de soja, Ferri (2017), observou que a co-inoculação de *Bradyrhizobium spp.* e *Azospirillum spp.*, foi capaz de promover aumento do número de nódulos. Avaliando doses de co-inoculação de *B. japonicum* e *Serratia proteamaculans* e *S. liquefaciens*, e temperatura da zona radicular em soja, Bai et al. (2002) também foi capaz de detectar incrementos promovidos pela co-inoculação no número de nódulos e na massa de nódulos.

Pode-se observar que as características de nodulação dessas cultivares são bem distintas, sendo que Esteio na fase V3 apresenta cerca de 38% menos nódulos e praticamente metade da massa nodular da cultivar Pérola, o que poderia representar um atraso na nodulação inicial e consequente efeito retardado na promoção da nodulação pelas estirpes promotoras de crescimento, o que será verificado a seguir.

**Tabela 2.** Número de nódulos, massa seca de parte aérea, massa seca de nódulos, e massa seca de raiz de plantas de feijoeiro cv. BRS Esteio no estágio V3 e V4, com 27 e 36 DAE, respectivamente, submetidas a quatro fontes de N: inoculação com *R. tropici*, co-inoculação com *A. brasilense*, co-inoculação com *B. elkanii* e testemunha absoluta (sem N)

Fonte de N	Número de nódulos	Massa seca de nódulos (mg planta <sup>-1</sup> )	Massa seca de parte aérea (g planta <sup>-1</sup> )	Massa seca de raiz (g planta <sup>-1</sup> )
Estádio V3				
Inoculado com <i>R. tropici</i>	57 a	23 a	0,17 a	0,20 a
Co-inoculado com <i>A. brasilense</i>	66 a	25 a	0,22 a	0,21 a
Co-inoculado com <i>B. elkanii</i>	80 a	30 a	0,22 a	0,20 a
Testemunha Absoluta (sem N)	0 b	0 b	0,22 a	0,25 a
Média	51	19	0,17	0,22
Estádio V4				
Inoculado com <i>R. tropici</i>	185 c	168 b	0,91 b	0,51 a
Co-inoculado com <i>A. brasilense</i>	224 b	204 a	1,12 ab	0,50 a
Co-inoculado com <i>B. elkanii</i>	273 a	237 a	1,17 a	0,53 a
Testemunha Absoluta (sem N)	0 d	0 c	0,23 c	0,38 b
Média	170,5	152	0,86	0,48

Letras minúsculas nas colunas comparam as fontes de N pelo teste de Duncan à 5%.

Os dados obtidos na segunda coleta, em V4, mostraram que a co-inoculação foi benéfica para a nodulação do feijoeiro. Observa-se número de nódulos superior aos demais tratamentos para esta cultivar (Tabela 2), sendo superior em 47% para as plantas co-inoculadas com *Bradyrhizobium* em relação às plantas que receberam apenas rizóbio. Para as plantas co-inoculadas com *Azospirillum*, o aumento foi de 21%.

Quando se observa a massa de nódulos secos, o efeito positivo se repete, com as plantas apresentando acúmulo de massa nodular superior em 41% e 21%, respectivamente, para as plantas inoculadas com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*.

A co-inoculação com *Bradyrhizobium* promoveu o desenvolvimento inicial do feijoeiro, com incremento de 28% na produção de massa de parte aérea seca em relação à inoculação isolada com *R. tropici*. O desenvolvimento das plantas inoculadas com *Azospirillum* foi intermediário entre a inoculação isolada de rizóbio a e co-inoculação com o bradyrizóbio.

Estes dados são consistentes com os obtidos no experimento anterior com a cultivar Pérola, onde a co-inoculação com *B. elkanii* promoveu aumento significativo no número de nódulos, na massa de nódulos e na massa seca de parte aérea, quando comparado com a inoculação de *R. tropici*.

A inoculação com rizóbio apenas ou a co-inoculação associada tanto a *B. elkanii*, quanto a *A. brasilense* não interferiram na massa de raízes secas das plantas de feijoeiro.

Em ervilhas sob condições laboratoriais é possível observar os incrementos pela co-inoculação com *Rhizobium* e *Bacillus*, em relação a massa da planta fresca, teor de clorofila, número de nódulos e massa seca de nódulos (RAJENDRAN et al., 2008).

A inoculação conjunta de *Bradyrhizobium* com estirpes de *Rhizobium* e *Sinorhizobium* proporcionou aumentos significativos a massa seca de rabanetes, onde o efeito estimulante mais elevado (aumento de 60% em relação ao controle não inoculado), foi observado com uma cepa de *B. japonicum* (ANTOUN et al., 1998).

Os resultados em condições controladas de casa de vegetação apresentados nestes experimentos com feijoeiro indicaram que, para o gênero *Bradyrhizobium*, o potencial de aumento na biomassa tanto de nódulos quanto da planta na fase inicial de desenvolvimento, é superior ao obtido com a co-inoculação com *Azospirillum*. Para as cultivares utilizadas, Pérola e Esteio, em vários parâmetros avaliados as médias obtidas foram maiores e o efeito promotor de nodulação pode ser observado para os estágios V3 de V4 na cultivar Pérola.

Os resultados obtidos de co-inoculação com rizóbio e bactérias promotoras de crescimento em casa de vegetação, ou seja, em condições ambientais controladas, são promissores. Estudos envolvendo o detalhamento destes efeitos durante o desenvolvimento fenológico de cultivares são essenciais para compreensão dos fatores envolvidos no estímulo à nodulação visando desenvolver inoculantes de rizóbio mais eficientes para uso em condições de campo.

### 3.6 CONCLUSÕES

A co-inoculação com *Bradyrhizobium elkanii* e *Azospirillum brasilense* promoveu incrementos em número de nódulos, massa seca de nódulos e massa seca de parte aérea, para cultivar Pérola na fase V4, sendo superior à inoculação isolada com *R. tropici*. Nesta cultivar, o efeito de promoção da nodulação pela co-inoculação com *Bradyrhizobium elkanii* já é observável a partir do estágio V3 pelo aumento no número de nódulos.

Na cultivar Esteio, no estágio fenológico V4 a co-inoculação com *B. elkanii* promoveu aumento significativo no número de nódulos, na massa de nódulos e na massa seca de parte aérea, quando comparado com a inoculação de *R. tropici*.

A co-inoculação das plantas com rizóbio e estirpes promotoras de crescimento vegetal, *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* promoveu a nodulação e o crescimento inicial do feijoeiro, com melhor desempenho para a estirpe de *Bradyrhizobium*.

**4 CAPÍTULO II - CO-INOCULAÇÃO DE RIZÓBIOS E  
BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL  
NO FEIJOEIRO EM CONDIÇÕES DE CAMPO**

#### 4.1 RESUMO

A variabilidade de respostas do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) à inoculação de sementes com estirpes recomendadas de rizóbio demonstra a necessidade de estudos voltados para otimizar a fixação biológica de nitrogênio em condições de campo. Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento e *Rhizobium* sobre a produção de biomassa e produção de grãos do feijoeiro comum em condições de campo. Conduziram-se dois experimentos em áreas distintas localizadas em Macaé – RJ, e um experimento na área experimental da Embrapa Agrobiologia, em Seropédica – RJ. O delineamento adotado foi em blocos ao acaso, com cinco repetições e cinco tratamentos, para os experimentos I e II, e seis tratamentos e duas cultivares para o experimento III. Os tratamentos consistiram em: testemunha absoluta, testemunha nitrogenada (80 kg ha<sup>-1</sup> de N), inoculação com *Rhizobium spp.*, co-inoculação de *Rhizobium sp.* e *Bradyrhizobium elkanii*, co-inoculação de *Rhizobium* e *Azospirillum brasilense*, com a cultivar BRS Esteio. No experimento III foi adicionado o tratamento co-inoculação de *Rhizobium* e *A. brasilense* + N mineral em cobertura (30 dias após a emergência), todos os tratamentos com as cultivares BRS Esteio e Ouro Negro. As plantas foram coletadas em floração plena e na maturação de grãos. Foram analisadas a massa seca de nódulos, parte aérea e raízes, número de vagem por planta, número de grãos por vagem, massa de 100 grãos e produção de grãos. O experimento I apresentou uma alta população nativa de rizóbios no solo, não ocorrendo diferenças significativas entre as fontes de N avaliadas. No experimento II a co-inoculação com *Bradyrhizobium* proporcionou incrementos significativos em massa seca de parte aérea e de raízes. Além disso, a co-inoculação com *B. elkanii* alcançou 80% da produção de grãos da testemunha nitrogenada. No experimento III, a cultivar Esteio foi superior a cultivar Ouro Negro em grande parte das variáveis analisadas. A co-inoculação de *Rhizobium* com bactérias promotoras de crescimento, associadas à aplicação de N em cobertura ou não, não proporcionaram incrementos significativos em produção de biomassa, comparado aos tratamentos controles. Pode-se concluir que a co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento associadas a estirpes de *Rhizobium* não foi capaz de proporcionar incrementos significativos na produção de grãos do feijoeiro. Nas condições agroecológicas de campo deste estudo, não foi possível confirmar o efeito promotor de crescimento das estirpes inoculadas ou da tecnologia de co-inoculação.

**Palavras-chave:** *Phaseolus vulgaris*; Co-inoculação; Promotoras de crescimento.

## 4.2 ABSTRACT

The variability of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) responses to seed inoculation with recommended strains of rizobia demonstrates the need for studies aimed to optimize the biological nitrogen fixation under field conditions. The objective of this work was to evaluate the effect of co-inoculation of growth promoting bacteria and *Rhizobium* on biomass production and grain yield of common bean under field conditions. Two experiments were conducted in distinct areas located in Macaé - RJ, and one experiment in the experimental area of Embrapa Agrobiologia in Seropédica – RJ. The experiments had a randomized block design with five replications and five treatments for experiments I and II and six treatments and two cultivars for experiment III. The treatments consisted of: absolute control, nitrogen control (80 kg ha<sup>-1</sup> of N), inoculation with *Rhizobium spp.*, co-inoculation of *Rhizobium sp.* and *Bradyrhizobium elkanii*, co-inoculation of *Rhizobium* and *Azospirillum brasilense*, with the cultivar BRS Esteio. In the experiment III the co-inoculation treatment of *Rhizobium* and *A. brasilense* + N mineral in cover (30 days after emergence) was added, all treatments evaluated with the cultivars BRS Esteio and Ouro Negro. The plants were harvested at full flowering and grain maturation. The dry mass of nodules, shoots and roots, number of pods per plant, number of grains per pod, mass of 100 grains and grain yield, were measured. The experiment I presented a high native population of rhizobia in the soil, and no significant difference between the N sources evaluated was detected. In experiment II the co-inoculation with *Bradyrhizobium* provided significant increases in dry mass of shoots and roots. In addition, co-inoculation with *B. elkanii* reached 80% of the grain yield of the nitrogen control. In experiment III, the cultivar Esteio was superior to cultivar Ouro Negro for most of the analyzed traits. *Rhizobium* co-inoculation with growth promoting bacteria, associated with N application at covering or not, did not provide significant increases in biomass production compared to the controls. It can be concluded that co-inoculation of growth promoting bacteria associated with *Rhizobium* strains was not able to provide significant increases in bean grain yield in the field. In the agroecological field conditions of this study, it was not possible to confirm the growth promoting effect of the inoculated strains or the co-inoculation technology.

**Keywords:** *Phaseolus vulgaris*; Co-inoculation; Growth promoters.

### 4.3 INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*), por ser uma cultura que se beneficia da associação simbiótica com bactérias do grupo dos rizóbios, é capaz de aproveitar a assimilação do N pela fixação biológica (PANKIEVICZ et al., 2015). A interação do feijoeiro com bactérias fixadoras têm demonstrado a capacidade de substituição da adubação nitrogenada, pelo menos em parte, ainda com obtenção de altos rendimentos (PELEGRIN et al., 2009). Segundo Rumjanek et al. (2005), as estimativas da FBN no campo são bastante variáveis, correspondendo em cerca de 40 a 90% do total de N acumulado pela cultura oriundo da fixação.

Embora haja incentivo ao uso da tecnologia de inoculação de sementes, devido aos incrementos observados, muitos agricultores e técnicos não recomendam a prática, fazendo com que a comercialização de inoculantes para o feijoeiro seja baixa, representando apenas 0,74% do total de inoculantes comercializados em 2016 (ANPII, 2017).

Para obtenção de elevadas produtividades no feijoeiro, os inoculantes devem vencer uma de suas principais barreiras, que é a competitividade com estirpes nativas, que por vez podem ter potencial de fixação variável (CASSINI & FRANCO, 2006).

Além da seleção de estirpes capazes de fixar o N atmosférico em simbiose com o feijoeiro, a busca por novas combinações eficientes tornam-se ferramentas importantes neste processo (SOARES et al., 2006).

Diante disso, a associação de bactérias promotoras de crescimento vegetal e bactérias do grupo dos rizóbios, surge como possível alternativa para promover incrementos no crescimento vegetal e na produção de grãos. Em razão da rápida colonização desses microrganismos na rizosfera e estimulação no crescimento da planta, existe um grande interesse em estudar microrganismos promotores de crescimento existentes na rizosfera buscando otimizar a produção da cultura de interesse (FIGUEIREDO et al., 2010).

Entretanto, devido aos muitos fatores que interferem nesta simbiose em condições de campo, os estudos envolvendo a resposta a co-inoculação estão ainda em fase inicial, com elevada variabilidade e com inúmeras questões a serem respondidas, como por exemplo o efeito de diferentes condições agroecológicas, de cultivares e mesmo formas de inoculação.

Vale ressaltar que experimentos conduzidos em condições de campo geralmente se aproximam das condições de cultivo dos agricultores, isso porque as condições edafoclimáticas interferem diretamente na evolução das plantas no campo, o que não ocorre ou ocorre com menor intensidade em experimentos conduzidos em casa de vegetação. No campo, a inoculação das sementes deve ser feita momentos antes da semeadura, e é descrita como uma atividade que reduz a eficiência da semeadura em razão do tempo despendido para que seja realizada a operação (ZILLI et al., 2010). Além disso, a inoculação em campo requer alguns cuidados para que seja feita de maneira eficiente e promova retorno ao agricultor, o que pode fazer com que esta seja uma operação que necessite de mão de obra especializada. A inoculação deve ser feita à sombra utilizando a dosagem adequada e o tipo de inoculante adequados para cultura atendendo aos requisitos mínimos exigidos pelo MAPA.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento associadas às estirpes de *Rhizobium* já estabelecidas para a cultura do feijoeiro, no crescimento vegetal e produção de grãos em condições de campo, em três regiões agroecológicas distintas.

## 4.4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos três experimentos de campo, em diferentes condições agroecológicas, no Estado do Rio de Janeiro. O primeiro na região serrana, o segundo na região litorânea de Macaé, e o terceiro na área experimental da Embrapa Agrobiologia em Seropédica - RJ. Macaé está localizada na região Norte Fluminense, e responde pela maior área de cultivo de feijão (35,5%) e maior produtividade média do estado, com cerca de 1.059 kg ha<sup>-1</sup> (SOUZA FILHO & ANDRADE, 2010). A área do primeiro experimento é de cultivo tradicional de feijoeiro pelos últimos 10 anos, sendo uma região de sopé de montanhas, onde ocorre acúmulo de matéria orgânica. A área do segundo experimento encontra-se em local elevado, com histórico de cultivo de cana-de-açúcar. Ambos locais são áreas tradicionais de cultivo de feijoeiro. A classificação do clima de Macaé é Aw segundo Köppen e apresenta 22,9 °C de temperatura média. Para o terceiro experimento foi escolhida uma área no campo experimental da Embrapa Agrobiologia, sem histórico de cultivo de feijoeiro nos últimos 5 anos, onde foram instalados sistema de irrigação e de monitoramento das condições ambientais, uma vez que se trata de local vigiado que possibilitou a instalação dos equipamentos durante todo o ciclo da cultura. Nesta região o clima é classificado como Aw segundo Köppen, com temperatura média de 23,5 °C durante o ano.

### 4.4.1 Descrição e localização das áreas experimentais

Os dois primeiros experimentos foram conduzidos de maio a agosto de 2016, em parceria com a Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO) e a Secretaria Municipal de Agricultura e Agronegócios de Macaé. O experimento I foi implantado na região serrana de Macaé - RJ (22° 15' 54" S, 41° 59' 3" W), na localidade de Córrego do Ouro, numa gleba pertencente à Secretaria Municipal de Agricultura. Esta área experimental apresentava cultivos sucessivos de feijoeiro, há cerca de 3 anos antes do plantio do experimento. O solo foi caracterizado em camadas de 0-10; 10-20; 20-30 e 30-40 cm. Os teores de matéria orgânica decrescem em profundidade, com valores entre 15,0 e 28,1 g kg<sup>-1</sup>. A granulometria mostra o predomínio da areia grossa, seguido do silte e argila com valores para ambas entre 220 a 296 g kg<sup>-1</sup>. O solo foi classificado como Neossolo Fúlvico Tb Distrófico Gleissólico, caracterizado pela influência aluvial e do lençol freático em subsuperfície. Após resultados obtidos na análise química (Tabela 3), foi feita uma adubação complementar atendendo as necessidades da cultura, que consistiu na aplicação de 60 kg ha<sup>-1</sup> P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, na forma de superfosfato simples, 40 kg ha<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>O, como cloreto de potássio, e 20 kg ha<sup>-1</sup> N mineral na forma de ureia para testemunha nitrogenada, conduzida no plantio, e 60 kg ha<sup>-1</sup> N em cobertura, num total de 80 kg ha<sup>-1</sup> N.

O experimento II foi conduzido em um assentamento próximo à região litorânea de Macaé – RJ (22° 15' 23" S; 41°44'6" W), em parceria com a PESAGRO e Secretaria Municipal de Agricultura e Agronegócios de Macaé. O histórico de plantio indicou um cultivo de cana-de-açúcar por 10 anos sucessivos, o que explica a baixa fertilidade deste solo na ocasião do plantio. O solo foi caracterizado em camadas de 10 cm, até os 40 cm de profundidade e classificado como Latossolo Amarelo Distrófico típico, característico de solos que apresentam boas condições físicas de retenção de umidade e boa permeabilidade, porém com baixa fertilidade. A adubação de plantio consistiu na aplicação de 100 kg ha<sup>-1</sup> P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 80 kg ha<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>O e 20 kg ha<sup>-1</sup> N (testemunha nitrogenada), com aplicação de 60 kg ha<sup>-1</sup> N em cobertura.

**Tabela 3.** Características químicas dos solos coletados para o experimento I em Córrego do ouro, e experimento II em área de assentamento, localizados em Macaé - RJ.

	C	Al	Ca	H+Al	Mg	K	P	pH
	%	----- cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----			----- mg L <sup>-1</sup> -----			
Experimento I	1,27	0,14	2,04	3,91	0,73	170,5	17,66	5,75
Experimento II	0,65	0,07	1,24	2,94	0,38	22,5	5,83	5,64

O experimento III foi conduzido entre junho e setembro de 2017 na área experimental da Embrapa Agrobiologia, Seropédica – RJ (22°44'53" S; 43°40'14" W), onde não havia plantio de leguminosas por mais de 5 anos. Havia 2 anos que o local estava em pousio e anterior a esse período ocorreu um plantio de cana-de-açúcar por 3 anos. O solo foi caracterizado em camadas de 0-10; 10-20; 20-30; 30-40; 40-50; e 50-60 cm de profundidade, revelando um solo um Argissolo Vermelho-Amarelo, com teores de argila total que chegam a 380 g kg<sup>-1</sup> em profundidade. A análise química desta área (Tabela 4) foi realizada seguindo o mesmo protocolo das análises anteriores. A adubação de plantio consistiu na aplicação de 90 kg ha<sup>-1</sup> P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 40 kg ha<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>O e 20 kg ha<sup>-1</sup> N (testemunha nitrogenada).

**Tabela 4.** Características químicas das amostras de solo coletadas a partir da área do experimento III, na Embrapa Agrobiologia, Seropédica – RJ.

	C	Al	Ca	H+Al	Mg	K	P	pH
	%	----- cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----			----- mg L <sup>-1</sup> -----			
Experimento III								
Amostra A	1,09	0,04	1,69	2,97	0,96	27,67	3,13	5,43
Amostra B	1,05	0,02	1,53	2,95	0,78	29,13	4,28	5,51

Os tratamentos culturais adotados nos três experimentos, referem-se ao controle de plantas daninhas através da capina manual aos 30 DAE. Para o experimento III também foi feito o controle da “vaquinha” (*Diabrotica speciosa*) com inseticida DECIS 25 EC aos 40 DAE. Além disso, não foi feita irrigação nos experimentos conduzidos em Macaé, enquanto que em Seropédica a irrigação foi realizada por aspersão duas vezes por semana, ou sempre que necessário, desde a emergência até o início da maturação dos grãos.

#### 4.4.2 Delineamento experimental e tratamentos

A cultivar BRS Esteio, do grupo preto, foi utilizada nos experimentos I e II. Foi adotado um delineamento de blocos ao acaso, com cinco repetições e cinco fontes de N: testemunha absoluta (sem aplicação de N e sem inoculação), testemunha nitrogenada (20 kg N ha<sup>-1</sup> N na semeadura e 60 kg ha<sup>-1</sup> N em cobertura), inoculação com *Rhizobium tropici* (BR 322 = SEMIA 4077 e BR 534 = SEMIA 4088) e *R. freirei* (BR 520 = SEMIA 4080), co-inoculação com *Rhizobium spp.* + *Bradyrhizobium elkanii* (BR 29), e co-inoculação com *Rhizobium spp.* + *Azospirillum brasilense* (BR 11005).

O experimento III consistiu em um delineamento de blocos ao acaso, esquema fatorial 6x2, para fontes de N e cultivares, respectivamente, com cinco repetições. As fontes de N utilizadas foram iguais aos experimentos anteriores, acrescentando: co-inoculação com *Rhizobium spp.* + *Azospirillum brasilense* (BR11005) + 40 kg ha<sup>-1</sup> de N mineral em cobertura

(30 DAE). Foram utilizadas as cultivares BRS Esteio e a Ouro Negro (grão tipo preto), consideradas responsivas a FBN.

Os inoculantes turfosos contendo as estirpes usadas foram preparados pelo Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (CRB-JD), da Embrapa Agrobiologia, obedecendo aos requisitos de qualidade de inoculantes determinados pela RELARE (BRASIL, 2011). A inoculação das sementes deve ser feita momento antes do plantio, preferencialmente na sombra. As sementes foram colocadas em saco plástico com o inoculante turfoso acrescido de solução açucarada 10%, feito isto, o saco é fechado e são feitos movimentos que garantam a mistura do inoculante à semente. Após feita a mistura, as sementes são postas sobre folhas de papel à sombra para secagem adequada, antes de serem levadas ao sulco de plantio.

As parcelas experimentais foram compostas por 3 m de largura e 5 m de comprimento, totalizando 15 m<sup>2</sup> por parcela, com seis linhas espaçadas por 0,5 m. As parcelas possuíam espaçamento 1,0 m entre elas.

#### 4.4.3 Quantificação da população nativa de rizóbio

Foram instalados três experimentos em casa de vegetação entre 2016/2017 na Embrapa Agrobiologia, em Seropédica - RJ, com objetivo quantificar a população de rizóbios nativa do solo das áreas experimentais.

A quantificação da população nativa de rizóbio foi conduzida seguindo o método do número mais provável em plantas, tratando-se de um método indireto de contagem, pois envolve a verificação de presença ou ausência de nódulos em plantas inoculadas através de alíquotas de diluições seriadas decimais das amostras de solo (SOMASEGARAN & HOBEN, 1985). Para isso, foram coletadas amostras na camada de 0-20 cm, para obtenção de amostras compostas, de forma antecipada à instalação dos experimentos. Essas amostras são secas ao ar, destorroadas e homogeneizadas. A primeira diluição ( $10^{-1}$ ) foi obtida através da adição de 90 mL de solução salina estéril (0,85% NaCl) a 10 g de solo, em Erlenmeyer esterilizado. Após homogeneização em agitador por 20 minutos, uma alíquota de 1 mL foi retirada e transferida para um tubo com 9 mL da solução fisiológica para obtenção da diluição  $10^{-2}$  e assim sucessivamente (BRASIL, 2010). Os experimentos foram compostos por plantas inoculadas com alíquotas oriundas das diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-9}$ , além do controle negativo (contendo apenas solução salina 0,85% estéril), com 4 repetições. Como planta isca utilizou-se a cultivar Pérola, do grupo carioca.

As plantas foram mantidas em garrafas do tipo “*long neck*” revestidas com papel pardo, contendo 300 mL de solução nutritiva de Norris desprovida de N (NORRIS, 1964). Foram colocadas duas fitas de papel filtro de 2 cm de largura e comprimento igual à altura da garrafa para servirem de suporte às raízes, e também para promover umidade e suporte para crescimento do sistema radicular da planta. As garrafas foram esterilizadas em autoclave por 30 minutos à 121 °C e à 1 atm, já contendo a solução nutritiva.

Antes da semeadura, as sementes de feijão comum cv. Pérola foram desinfestadas superficialmente com álcool etílico 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio 2% durante 3 minutos, e submetidas a lavagens sucessivas com água destilada estéril. Após a desinfestação, as sementes foram pré-germinadas em placas de Petri com papel filtro, ambos estéreis, onde permaneceram durante cerca de 48 horas à temperatura de 30 °C, em câmara de crescimento. No momento do transplantio das sementes para as garrafas, foi adicionado 1 mL de cada diluição do solo sobre as sementes pré-germinadas e na testemunha absoluta foi inoculado 1 mL de solução salina estéril. As plantas foram mantidas por 25 dias até a coleta, para identificação das plantas que apresentavam nódulos. A quantificação da população nativa de rizóbio foi feita pelo número mais provável em plantas (ANDRADE & HAMAKAWA, 1994).

#### **4.4.4 Amostragem de biomassa e colheita de grãos**

Foi feita avaliação da biomassa de parte aérea, raízes e nódulos aos 35 DAE, no estágio de floração plena. Durante amostragem de biomassa, foram coletadas 6 plantas por parcela, na segunda linha de plantio, excluindo-se as plantas de bordadura lateral e de início da linha. As plantas foram retiradas do solo com auxílio de uma pá reta, sendo a parte aérea cortada ao nível do solo e as raízes e nódulos levados para processamento no laboratório. As raízes foram lavadas e os nódulos destacados, e o material vegetal (parte aérea, raízes e nódulos) foi seco em estufa com circulação forçada de ar a 65 °C até massa constante, obtendo-se os dados de massa seca de parte aérea, de nódulos e raízes.

Ao final do ciclo, na maturação dos grãos, a coleta de produção foi feita no metro quadrado da parcela (1 m<sup>2</sup>) e no resto da linha, excluindo as bordaduras laterais e de início de linha, e também a linha de amostragem de biomassa. As vagens colhidas foram postas em sacos de pano e levadas para um galpão até a secagem completa para processamento do material. Nas plantas colhidas na área central de 1,0 m<sup>2</sup> foram determinados o número de plantas e o número de vagens, e as vagens foram trilhadas, e os grãos de cada parcela foram pesados. Uma amostra de 100 grãos de cada parcela foi pesada, seca em estufa e pesada novamente, obtendo-se o teor de umidade dos grãos de cada parcela. Com isso, foram estimadas as variáveis de número de plantas, número de vagens por planta, massa de 100 grãos e produtividade de grãos. A produtividade de grãos foi corrigida para 13% de umidade.

#### **4.4.5 Análise estatística**

Na análise estatística, para os experimentos conduzidos em Macaé -RJ o delineamento adotado foi em blocos ao acaso, enquanto que no experimento em Seropédica – RJ o delineamento foi de blocos ao acaso, em esquema fatorial. Os resultados foram analisados quanto à normalidade e a homogeneidade da distribuição de frequência usando os testes Shapiro-Wilk e Bartlett. A análise de variância foi realizada para testar os efeitos e a interação entre eles. Para o teste de comparação de médias foi utilizado o teste Duncan ao nível de 5% de significância. Utilizou-se o programa estatístico R core team (2015).

#### 4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na área do experimento I foi detectada uma elevada população nativa de  $1,09 \times 10^7$  células  $g^{-1}$  de solo, enquanto as outras áreas experimentais não apresentaram população nativa significativa, sendo que na área II não foi detectada a presença de rizóbio no solo e na área III havia menos que 30 células  $g^{-1}$  de solo. Segundo Hungria et al. (2003), populações em torno de  $10^3 g^{-1}$  de solo já são suficientes para promover elevadas nodulações. Provavelmente a elevada população observada na área experimental I seja recorrente do estímulo radicular a proliferação de simbiontes microbianos, oriundos dos cultivos sucessivos de feijoeiro na área I. Brito et al. (2015) verificaram que áreas com cultivos anteriores de feijoeiro comum, podem favorecer o estabelecimento de estirpes nativas eficientes e competitivas, que podem resultar em baixas respostas a inoculação de estirpes comerciais e aplicação de N. Assim como Pacheco et al. (2012), que observou que plantas de feijoeiro não inoculadas apresentaram boa nodulação onde o plantio foi conduzido em área previamente cultivada com feijoeiro, porém onde o cultivo anterior era de milho, observou-se o efeito da inoculação com estirpes recomendadas nas sementes.

No experimento I, não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos para as variáveis massa seca da parte aérea, de raiz e nódulos (Tabela 5). Os tratamentos também não diferiram para o número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de 100 grãos e produção de grãos (Tabela 6), e não afetaram o estande final de plantas. A nodulação do tratamento não inoculado (testemunha absoluta) foi similar àquela observada nos tratamentos inoculados, indicando que a população de rizóbio presente no solo apresentou elevada efetividade simbiótica. A presença significativa de rizóbio no solo dificulta a infecção das raízes pela estirpe do inoculante devido à alta adaptabilidade e competitividade desta população nativa. Não houve efeito da co-inoculação sobre a nodulação das plantas, embora os valores sejam de 40 e 28 nódulos para os tratamentos co-inoculado com *Bradyrhizobium* em comparação com o tratamento inoculado apenas com rizóbio (Tabela 5). O elevado coeficiente de variação desta variável obtida a campo, acima de 80%, provavelmente interferiu no resultado obtido.

A inibição à nodulação no tratamento onde foi aplicado N mineral é bastante evidente, embora não confirmada estatisticamente pelo mesmo motivo, elevado coeficiente de variação, tem sido amplamente relatada na literatura (PACHECO et al., 2014), pois limita a contribuição do N oriundo da simbiose. Resultados similares foram encontrados por Soares et al. (2006), onde o solo apresentava alta população nativa ( $10^3$  células  $g^{-1}$  solo), todos os tratamentos apresentaram massa seca de nódulos semelhantes, exceto a testemunha nitrogenada ( $70 kg ha^{-1}$  de N) que apresentou valor bem abaixo dos outros.

**Tabela 5.** Massa seca de parte aérea, massa seca de nódulos e massa seca de raiz, de plantas de feijoeiro co-inoculado com rizóbio e bactérias promotoras de crescimento (*B. elkanii* e *A. brasilense*) no estágio de floração plena, em Córrego do Ouro, Macaé – RJ (Experimento I). Com aplicação de 80 kg ha<sup>-1</sup> N na testemunha nitrogenada

Fontes de N	Massa seca de parte aérea (g planta <sup>-1</sup> )	Massa seca de nódulos (mg planta <sup>-1</sup> )	Massa seca de raiz (g planta <sup>-1</sup> )
Testemunha absoluta	4,50	31	0,47
Testemunha nitrogenada	4,63	9	0,60
Inoculado com <i>Rhizobium</i>	4,22	28	0,40
Co-inoculado com <i>Azospirillum</i>	4,46	40	0,51
Co-inoculado com <i>Bradyrhizobium</i>	4,65	32	0,42
Média geral	4,49	28	0,48
CV (%)	27,88	82,09	28,07

Médias desprovidas de letras não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Os resultados dos componentes de produção apresentados na Tabela 6 corroboram que a população nativa de rizóbios, além de apresentar-se efetiva simbioticamente mostrou-se de elevada eficiência. A produtividade do tratamento testemunha, sem aplicação de N e sem inoculação alcançou 2.332 kg ha<sup>-1</sup>, 89% da produção da cultura quando adubada com 80 kg ha<sup>-1</sup> de N.

**Tabela 6.** Número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de 100 grãos e produtividade de grãos, de feijoeiro em função co-inoculação de rizóbio e bactérias promotoras de crescimento, em estágio de maturação de grãos, em Córrego do Ouro, Macaé – RJ (Experimento I), com aplicação de 80 kg ha<sup>-1</sup> N na testemunha nitrogenada

Fontes de N	Número de vagens por planta	Número de grãos por vagem	Massa de 100 grãos (g)	Produção de grãos (kg ha <sup>-1</sup> )
Testemunha absoluta	8,1	5,3	26,5	2332
Testemunha nitrogenada	8,9	5,8	28,6	2600
Inoculado com <i>Rhizobium</i>	7,7	5,7	27,2	2257
Co-inoculado com <i>Azospirillum</i>	9,4	5,4	26,7	2221
Co-inoculado com <i>Bradyrhizobium</i>	7,5	4,9	27,2	2380
Média geral	8,3	5,4	27,2	2358
CV (%)	25,74	11,93	4,51	13,49

Médias desprovidas de letras não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Brito et al. (2015), em experimentos conduzidos na região de Macaé-RJ, também não observaram diferenças significativas entre os tratamentos-controle, com inoculação ou com aplicação de 80 kg ha<sup>-1</sup> de N no plantio, em termos de massa seca de parte aérea e produção de grãos do feijoeiro. Devido à consistente falta de resposta à inoculação e mesmo à adubação nitrogenada na região de Macaé, pode-se afirmar que a presença de estirpes efetivas e eficiente no solo naquela região, aliado à boa fertilidade e teor de matéria orgânica das regiões

de baixada, dispensam a prática de adubação nitrogenada para obtenção de produtividades de até 2.300 kg.ha<sup>-1</sup>.

No experimento II, as plantas co-inoculadas com *Rhizobium-Bradyrhizobium* apresentaram valores de massa seca da parte aérea aos 41 dias após a emergência (DAE) superior aos demais tratamentos e similar aos valores das plantas que receberam 80 kg ha<sup>-1</sup> de N mineral no plantio. Esses dados corroboram aqueles obtidos em casa de vegetação relatados no Capítulo I desta dissertação, que indicaram favorecimento da co-inoculação com esta bactéria ao desenvolvimento inicial desta cultivar. A produção de massa seca da parte aérea das plantas co-inoculadas com *Bradyrhizobium* foi 54, 52 e 36% maior do que as observadas para a testemunha absoluta, para co-inoculação *Rhizobium-Azospirillum* e para inoculação com *R. tropici*, respectivamente, indicando o seu potencial de promoção do crescimento vegetal nas fases iniciais de desenvolvimento da cultura.

Veronezi (2012), na avaliação da inoculação de rizóbios, isoladamente, comparados com a co-inoculação de *A. brasilense*, não detectou diferenças quanto à produção de matéria seca da parte aérea, massa de nódulos secos e N total da parte aérea das plantas. Porém, foi observado um incremento de 63,3% no número de nódulos nas plantas que receberam a co-inoculação, quando comparadas com aquelas apenas inoculadas com o isolado. Entretanto, Araújo & Hungria (1999) observaram que as plantas de soja tiveram um aumento no número de nódulos devido a co-inoculação de *Bradyrhizobium* e *Bacillus subtilis*, sendo 59% maior que o tratamento não inoculado e 27% maior que o inoculado isoladamente com *Bradyrhizobium*.

**Tabela 7.** Massa seca de parte aérea, massa seca de nódulos e massa seca de raiz de feijoeiro comum em função da inoculação e co-inoculação de rizóbio com bactérias promotoras de crescimento aos 41 DAE, na área de assentamento em Macaé - RJ (Experimento II), com aplicação de 80 kg ha<sup>-1</sup> N na testemunha nitrogenada

Fonte de N	Massa seca de parte aérea (g planta <sup>-1</sup> )	Massa seca de nódulos (mg planta <sup>-1</sup> )	Massa seca de raiz (g planta <sup>-1</sup> )
Testemunha absoluta	3,09 b	14 b	0,39
Testemunha nitrogenada	3,93 ab	10 b	0,48
Inoculado com <i>Rhizobium</i>	3,49 b	79 a	0,42
Co-inoculado com <i>Azospirillum</i>	3,12 b	95 a	0,33
Co-inoculado com <i>Bradyrhizobium</i>	4,75 a	114 a	0,52
Média Geral	3,68	62,4	0,43
CV (%)	30,17	44,62	29,79

Letras minúsculas nas colunas comparam as fontes de N pelo teste de Duncan à 5%.

Na massa seca de raiz, os tratamentos não diferiram entre si, porém podemos observar que a co-inoculação com *Bradyrhizobium* promoveu incrementos em relação aos outros tratamentos (Tabela 7). É preciso ressaltar que a coleta das raízes em condições de campo é complexa devido à dificuldade inerente à obtenção de um torrão similar para cada parcela e a dificuldade de se coletar todas as raízes da amostra obtida. O aumento da produção de massa de raízes propiciaria uma maior quantidade de sítios de infecção para o rizóbio e aumento da nodulação (KROLOW et al., 2004).

Os dados relativos à produtividade do experimento II serão apresentados abaixo apesar de os dados demonstrarem a baixa produtividade da cultura, o que impede quaisquer inferências sobre o uso da tecnologia em avaliação. A ausência de chuvas na região, a impossibilidade de irrigação na área experimental, o baixo teor de matéria orgânica e a

localização do experimento em uma área elevada, fizeram com que a produtividade fosse drasticamente afetada, apesar de o plantio ter sido realizado com intervalo de tempo de um dia em relação ao experimento I.

O número de vagens por planta e o número de grãos por vagem não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 8). Contudo, alguns resultados encontrados na literatura, afirmam que a co-inoculação *A. brasilense* e *R. tropici* proporcionam maior número de vagens (PERES, 2004; MEIRELLES et al., 2014). Já em relação ao número de grãos, Soratto et al. (2014) relatam que esta variável não foi influenciada pela co-inoculação, visto que esta é uma característica que apresenta alta herdabilidade genética, sendo pouco influenciada pelo ambiente. O mesmo ocorre para massa de grãos de acordo com Meirelles et al. (2014), e relatado por Corsini (2014) que por 2 anos consecutivos observou que não houve diferença significativa na massa de 100 grãos para as combinações simbióticas.

Foi detectada diferença estatística na produção de grãos para testemunha nitrogenada, sendo superior aos tratamentos testemunha absoluta, inoculado com *Rhizobium* e co-inoculado com *Azospirillum*, e similar à co-inoculação com *Bradyrhizobium* (Tabela 8).

Porém este experimento apresentou uma produtividade muito baixa, considerada até insignificante inclusive quando comparada à média da região (1.059 kg ha<sup>-1</sup>). Este fato pode ser explicado pelas condições climáticas desfavoráveis ocorridas no período de estabelecimento da cultura, como intenso déficit hídrico na área do agricultor, e devido à ausência de sistema de irrigação, resultaram num fraco desenvolvimento da cultura. Além disso, os dados de análise de solo demonstram o baixo teor de nutrientes como Ca, P, Mg e K (Tabela 3), e, embora tenha sido realizada uma adubação complementar anterior ao plantio algum desequilíbrio nutricional pode também ter influenciado no desenvolvimento das plantas devido ao intenso cultivo anterior de cana-de-açúcar sem a devida reposição de nutrientes no solo.

**Tabela 8.** Número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de 100 grãos e produção de grãos de feijoeiro em função da inoculação e co-inoculação de rizóbio e bactérias promotoras de crescimento aos 82 DAE, no assentamento em Macaé – RJ (Experimento II), com aplicação de 80 kg ha<sup>-1</sup> N na testemunha nitrogenada

Fonte de N	Número de vagens por planta	Número de grãos por vagem	Massa de 100 grãos (g)	Produção de grãos (kg ha <sup>-1</sup> )
Testemunha absoluta	2,5	4,1	19,4 b	261 b
Testemunha nitrogenada	2,4	5,1	22,5 a	404 a
Inoculado com <i>Rhizobium</i>	2,3	4	18,7 b	267 b
Co-inoculado com <i>Azospirillum</i>	1,9	4,1	18,6 b	263 b
Co-inoculado com <i>Bradyrhizobium</i>	2,7	4,2	19,1 b	325 ab
Média Geral	2,36	4,3	19,66	304
CV (%)	22,3	17,21	11,3	28,81

Letras minúsculas nas colunas comparam as fontes de N pelo teste de Duncan a 5%.

A co-inoculação com *Bradyrhizobium* apresentou uma produção de grãos similar à testemunha nitrogenada (80 kg ha<sup>-1</sup> N), dado que deve ser interpretado com as ressalvas já elencadas, mas que corrobora com os resultados de pesquisas onde o N mineral pode ser substituído parcialmente, ou em alguns casos totalmente pelo uso de inoculantes, efeito que é evidenciado em solos com baixa população de rizóbio como é o caso desta área. Além disso, a

co-inoculação obteve na produção de grãos 58 e 64 kg ha<sup>-1</sup> acima dos valores da testemunha absoluta (sem N e sem inoculação) e a inoculação com *Rhizobium*, respectivamente. Embora, não se encontre muitos trabalhos na literatura que associem *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, este trabalho surge como uma iniciativa para essa combinação de microrganismos. Em condições de campo, em contrapartida, os resultados são variáveis devido à influência de fatores bióticos e abióticos que afetam a eficiência das bactérias promotoras de crescimento vegetal (MABOOD et al., 2014).

No experimento conduzido na área experimental da Embrapa Agrobiologia, novamente observou-se a ocorrência de condições ambientais adversas no decorrer da condução do experimento. Observou-se no período de condução do experimento a ocorrência não usual para a região, de baixas temperaturas durante o período experimental, especialmente se considerarmos a temperatura do solo. É possível verificar na Figura 3 que por diversas ocasiões a temperatura do solo oscila entre 10 e 15 °C tanto durante a fase inicial de desenvolvimento da cultura quanto posteriormente na fase de enchimento de grãos. Estas temperaturas estão bem abaixo do ótimo para atuação da enzima nitrogenase, em torno de 25 a 28 °C (ZHANG, 1996).

Neste experimento não houve interação significativa entre as cultivares e as fontes de N. Porém podemos observar mais uma vez que as plantas que receberam nitrogênio mineral (80 kg ha<sup>-1</sup> N) produziram menor massa de nódulos secos em ambas as cultivares (Tabela 9). Este resultado evidencia o efeito inibitório na nodulação pela aplicação de N mineral na cultura do feijoeiro. Segundo Mercante et al. (1992), em condições de elevada disponibilidade de nitrogênio, o feijoeiro opta por utilizar a forma prontamente disponível, e reduz o efeito da nodulação. Por outro lado, Oliveira (2013), observou que o fornecimento de N (80 kg ha<sup>-1</sup>) não propiciou efeito negativo sobre a nodulação, sendo este semelhante aos outros tratamentos, talvez, pelo fato das doses aplicadas no plantio serem sempre baixas (20 kg ha<sup>-1</sup>).

Embora dados de quantificação de população nativa pelo número mais provável deste experimento tenham apresentado uma população de rizóbio que pode ser considerada baixa (na ordem de 10<sup>1</sup>), as plantas que não foram inoculadas (tratamento controle absoluto) produziram massa de nódulos similar estatisticamente a co-inoculação com *Bradyrhizobium* e a co-inoculação com *Azospirillum* + N cobertura (Tabela 9).

A cultivar BRS Esteio apresentou desenvolvimento vegetativo superior a cv. Ouro Negro em massa seca de parte aérea e massa seca de raízes (Tabela 9). Segundo informações do CNPAF, a cv. BRS Esteio apresenta elevado rendimento e alta estabilidade (PEREIRA et al., 2013), sendo altamente indicada para uso de sistemas com fixação biológica de nitrogênio. A produção de massa de parte aérea seca desta fase de desenvolvimento da cultura indica que o N mineral aplicado favoreceu o desenvolvimento inicial das plantas em relação aos controles inoculados e co-inoculados, e ao controle sem N e sem inoculação (Tabela 9).

Avaliando o efeito da co-inoculação sob diferentes doses de inoculante em vasos com solo, Bastos (2016) observou que a inoculação com *A. brasilense* (10<sup>4</sup> UFC mL<sup>-1</sup>) associada a aplicação de N mineral foi capaz de aumentar a massa seca de parte aérea, quando comparada a testemunha nitrogenada isolada.

De maneira geral, os tratamentos co-inoculados apresentaram valores inferiores aqueles alcançados pela inoculação isolada com *Rhizobium tropici*, em massa seca de parte aérea e em massa seca de raiz. Esses resultados corroboram com dados encontrados por Burdman et al. (1997), que avaliando a inoculação com *R. tropici* e *A. brasilense* verificaram inibição do desenvolvimento das plantas comparado a inoculação isolada de *R. tropici*. Diversos estudos afirmam que estirpes de *R. tropici* são resistentes a acidez do solo, altas temperaturas e presença de metais pesados no solo (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991). Não podemos descartar o efeito das baixas temperaturas do solo na eficiência do processo de

fixação biológica de nitrogênio, tanto nas fases iniciais de desenvolvimento da cultura, quanto após os 35 DAE, fase em que ocorreria o pico da atividade da nitrogenase na cultura do feijoeiro. Pesquisas conduzidas por Silva et al. (2009) em condições de campo não foram capazes de detectar diferenças significativas entre a inoculação com *Rhizobium* e o controle absoluto, corroborando com os resultados encontrados. Do mesmo modo, Kumar Rao & Patill (1976) também não observaram diferenças significativas em massa seca de parte aérea ao comparar a inoculação isolada de *Rhizobium* com a co-inoculação de *Rhizobium* e *Azotobacter* em condições de campo.

Brito et al. (2015), em experimentos conduzidos em Macaé – RJ com a cultivar Ouro Negro, observaram que a massa seca de parte aérea da cultivar foi superior nas plantas que receberam N mineral do que as que receberam inoculação com estirpes comerciais de rizóbio e mais cobertura com 40 kg ha<sup>-1</sup> N. As plantas que receberam 80 kg ha<sup>-1</sup> N apresentaram maior massa seca de parte aérea do que as plantas co-inoculadas sem suplementação de N.

**Tabela 9.** Massa seca de parte aérea, nódulos e raízes, das cultivares de feijoeiro BRS Esteio e Ouro Negro em estágio de floração plena sob inoculação e co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento, associadas ou não a aplicação de N mineral, em Seropédica – RJ (Experimento III). Com aplicação de 80 kg ha<sup>-1</sup> N na testemunha nitrogenada

Fontes de N	Esteio	Ouro Negro	Média
	Massa seca de nódulos (mg planta <sup>-1</sup> )		
Controle absoluto (sem inoculação e sem N)	30	64	18 bc
Controle nitrogenado (80 kg ha <sup>-1</sup> N)	6	2	4 c
Inoculado com <i>Rhizobium sp.</i>	70	44	57 a
Co-inoculado com <i>Azospirillum sp.</i>	50	63	57 a
Co-inoculado com <i>Azospirillum sp.</i> + N cob	24	25	24 bc
Co-inoculado com <i>Bradyrhizobium sp.</i>	37	37	37 ab
Média	36	30	
CV (%)		90,99	
	Massa seca de parte aérea (g planta <sup>-1</sup> )		
Controle absoluto (sem inoculação e sem N)	5,32	4,43	4,88 ab
Controle nitrogenado (80 kg ha <sup>-1</sup> N)	6,16	5,6	5,88 a
Inoculado com <i>Rhizobium sp.</i>	5,80	4,81	5,30 ab
Co-inoculado com <i>Azospirillum sp.</i>	5,41	3,69	4,55 b
Co-inoculado com <i>Azospirillum sp.</i> + N cob	5,37	4,38	4,87 ab
Co-inoculado com <i>Bradyrhizobium sp.</i>	4,88	3,72	4,30 b
Média	5,49 A	4,44 B	
CV (%)		26,26	
	Massa seca de raízes (g planta <sup>-1</sup> )		
Controle absoluto (sem inoculação e sem N)	0,68	0,47	0,58
Controle nitrogenado (80 kg ha <sup>-1</sup> N)	0,68	0,73	0,71
Inoculado com <i>Rhizobium sp.</i>	0,79	0,67	0,73
Co-inoculado com <i>Azospirillum sp.</i>	0,71	0,53	0,62
Co-inoculado com <i>Azospirillum sp.</i> + N cob	0,71	0,62	0,66
Co-inoculado com <i>Bradyrhizobium sp.</i>	0,62	0,58	0,60
Média	0,70 A	0,60 B	
CV (%)		24,89	

Médias seguidas pela mesma letra ou desprovidas de letra, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem pelo teste de Duncan a 5%.

Os resultados nem sempre positivos são citados por muitos autores, pois nem sempre as bactérias promotoras de crescimento mostram consistência nos resultados de campo, embora submetidas a condições semelhantes, indicando a necessidade da continuidade das pesquisas visando identificar os fatores limitantes ao processo. Será importante conduzir mais experimentos com o monitoramento das condições ambientais visando identificar os principais fatores limitantes a esta simbiose.

Não houve interação significativa entre os tratamentos para as variáveis de número de vagens, número de grãos por vagem, massa de 100 grãos e produção de grãos (Tabela 10).

A cultivar BRS Esteio se mostrou superior a Ouro Negro no número de vagens e a produção de grãos. Ferreira et al. (2000), em experimento comparando a inoculação isolada de *R. tropici* com os controles absoluto e nitrogenado, também não observaram diferenças significativas. Gitti et al. (2012) também não observaram diferenças no número de vagens entre a inoculação com *A. brasilense* e a testemunha não inoculada em feijoeiro.

O controle nitrogenado foi superior aos outros tratamentos em relação a massa de 100 grãos (Tabela 10). Embora tenha sido relatado na literatura que esta variável está relacionada a atributos genéticos da cultivar, sendo pouco influenciada por fatores ambientais (MEIRELLES et al., 2014). Vale ressaltar que ambas as cultivares utilizadas tiveram a média da massa de 100 grãos menor do que a média atribuída para cultivar, sendo 24 g para BRS Esteio e 25 g para Ouro Negro, indicativo de que as condições ambientais podem ter afetado o pleno desenvolvimento da cultura, em especial a temperatura, uma vez que a umidade do solo foi controlada pelo sistema de irrigação.

A produção de grãos para o controle nitrogenado foi superior à inoculação isolada com *Rhizobium* e similar ao controle absoluto e a co-inoculação com *Azospirillum* (Tabela 10). Já Hungria et al. (2003), em experimentos conduzidos em condições de campo, observaram maior produtividade com a inoculação e o controle nitrogenado em relação ao controle sem adubação. Em área sem histórico de cultivo de feijoeiro comum, Brito et al. (2015) pode constatar que a inoculação com estirpes de rizóbio associada à adubação de cobertura com 40 kg ha<sup>-1</sup> de N elevou o rendimento de grãos do feijoeiro.

A co-inoculação com *Azospirillum* propiciou boa produção de grãos se comparada a co-inoculação com adição de N mineral, mesmo não apresentando diferença estatística (Tabela 10). Bastos (2016) observou maior massa seca de grãos na co-inoculação associada a adubação nitrogenada, do que na testemunha absoluta, porém também não observou diferenças estatísticas no número de grãos por vagem e na massa se 100 grãos.

Pode-se afirmar que nas condições testadas, o efeito das bactérias promotoras de crescimento foi de baixa magnitude em comparação à adubação mineral, tendo os tratamentos co-inoculados alcançado valores de produção de grãos menor que os controles absoluto e nitrogenado. O mesmo não foi relatado por Yadegari et al. (2010), que observou que a co-inoculação de rizóbio e promotoras de crescimento foi capaz de promover aumentos significativos no rendimento e produção de grãos do feijoeiro.

As respostas da inoculação com bactérias selecionadas são instáveis em diversos trabalhos, em decorrência de vários fatores edafoclimáticos e genéticos, além de suas interações que interferem nos processos simbióticos e assimióticos entre a planta e os microrganismos envolvidos (ANTOUN et al., 1998; CASSINI & FRANCO, 2006).

As condições ambientais durante o período experimental foram atípicas para a região, o que pode ser verificado no gráfico de temperatura do solo. Houve picos de baixa temperatura, em torno de 14 °C por dois períodos consecutivos. O efeito das baixas temperaturas justamente no período de desenvolvimento nodular na fase vegetativa cerca de 30-45 DAE afeta sobremaneira a efetividade da FBN (GUSS, 1972; PEREIRA, 2014).

**Tabela 10.** Número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de 100 grãos e produção de grãos das cultivares de feijoeiro BRS Esteio e Ouro Negro, no estágio de maturação de grãos, submetidas à inoculação e co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento, associadas ou não a aplicação de N mineral, em Seropédica – RJ (Experimento III). Com aplicação de 80 kg ha<sup>-1</sup> N na testemunha nitrogenada

Fonte de N	Esteio	Ouro Negro	Média
Número de vagens por planta			
Controle absoluto (sem inoculação e sem N)	5,8	5,5	5,7
Controle nitrogenado (80 kg ha <sup>-1</sup> N)	7,1	5,8	6,4
Inoculado com <i>Rhizobium sp.</i>	6	5,3	5,7
Co-inoculado com <i>Azospirillum sp.</i>	5,3	6	5,7
Co-inoculado com <i>Azospirillum sp.</i> + N cob	6	4,8	5,4
Co-inoculado com <i>Bradyrhizobium sp.</i>	5,9	5,3	5,6
Média	6,0 A	5,4 B	
CV (%)		15,88	
Número de grãos por vagem			
Controle absoluto (sem inoculação e sem N)	5,1	4,7	4,9
Controle nitrogenado (80 kg ha <sup>-1</sup> N)	5,4	4,8	5,1
Inoculado com <i>Rhizobium sp.</i>	5,1	5,1	5,1
Co-inoculado com <i>Azospirillum sp.</i>	4,9	5,1	5
Co-inoculado com <i>Azospirillum sp.</i> + N cob	4,8	5	4,9
Co-inoculado com <i>Bradyrhizobium sp.</i>	4,7	5,2	5
Média	5	5	
CV (%)		11,90	
Massa de 100 grãos (g)			
Controle absoluto (sem inoculação e sem N)	22,5	22,3	22,4 b
Controle nitrogenado (80 kg ha <sup>-1</sup> N)	24,5	24	24,3 a
Inoculado com <i>Rhizobium sp.</i>	22	21,7	21,9 b
Co-inoculado com <i>Azospirillum sp.</i>	21,4	22,8	22,1 b
Co-inoculado com <i>Azospirillum sp.</i> + N cob	22,1	22,8	22,5 b
Co-inoculado com <i>Bradyrhizobium sp.</i>	22,6	22,1	22,3 b
Média	22,5	22,6	
CV (%)		6,17	
Produção de grãos (kg ha <sup>-1</sup> )			
Controle absoluto (sem inoculação e sem N)	1870	1750	1810 ab
Controle nitrogenado (80 kg ha <sup>-1</sup> N)	2530	1760	2150 a
Inoculado com <i>Rhizobium sp.</i>	1810	1620	1720 b
Co-inoculado com <i>Azospirillum sp.</i>	1630	1900	1770 ab
Co-inoculado com <i>Azospirillum sp.</i> + N cob	1800	1500	1650 b
Co-inoculado com <i>Bradyrhizobium sp.</i>	1740	1640	1690 b
Média	1900 A	1700 B	
CV (%)		22,88	

Médias seguidas pela mesma letra ou desprovidas de letra, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem pelo teste de Duncan a 5%.

## 4.6 CONCLUSÕES

Em experimento conduzido em córrego de ouro na região serrana de Macaé - RJ, não foi observado efeito da inoculação com rizóbio e co-inoculação com bactérias promotoras de crescimento vegetal em nenhuma das variáveis avaliadas em plantas de feijoeiro comum.

No segundo experimento, também conduzido em Macaé - RJ, a co-inoculação com *Bradyrhizobium elkanii* favoreceu o desenvolvimento inicial da cultura, pelo incremento da massa de parte aérea seca comparada com a inoculação isolada de *Rhizobium*. O rendimento de grãos foi afetado pelo déficit hídrico verificado no período experimental.

A cultivar BRS Esteio foi superior a cultivar Ouro Negro no desenvolvimento inicial avaliado pela massa de parte aérea seca e de raízes e na produtividade avaliada pelo número de vagens e produção de grãos.

A co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento, associada ou não a adubação de N mineral, não proporcionou incrementos na produção de grãos, nas condições edafoclimáticas avaliadas.

## 5 CONCLUSÕES GERAIS

Em experimentos conduzidos em condições controladas pode-se observar que a co-inoculação com bactérias promotoras de crescimento promoveu incrementos no desenvolvimento inicial do feijoeiro, observados pela nodulação e biomassa vegetal, com destaque para cultivar Pérola do grupo carioca e para co-inoculação de *Rhizobium tropici* e *Bradyrhizobium elkanii*.

Não foi possível reproduzir em condições de campo os benefícios da co-inoculação verificados em condições de casa de vegetação para a cultura do feijoeiro.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBAREDA, Marta et al. Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: solid and liquid formulations. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 40, n. 11, p. 2771-2779, 2008.
- ALBERTON, O.; KASCHUK, G.; HUNGRIA, M. Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 38, n. 6, p. 1298-1307, 2006.
- AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 47, p. 996- 1006, 1997.
- ANDRADE, D. S.; HAMAKAWA, P. J. Estimativa do número de células viáveis de rizóbio no solo e em inoculantes por infecção em plantas. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. (Ed.). Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. (EMBRAPA-CNPAF. Documentos, 46), p. 63-94. 1994.
- ANPII - Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes. A qualidade dos inoculantes acompanha o aumento da produtividade da soja. Disponível em: <<http://www.anpii.org.br>>. Acesso em 22 jan. 2018.
- ANTOUN, Hani et al. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). In: *Molecular microbial ecology of the soil*. Springer, Dordrecht. p. 57-67, 1998.
- ARAÚJO, A. P.; TEIXEIRA, M. G.; LIMA, E. R. Efeitos do aumento do teor de fósforo na semente, obtido via adubação foliar, no crescimento e na nodulação do feijoeiro. *Revista brasileira de ciência do solo*, Viçosa, v. 26, n. 1, p. 183-189, 2002.
- ARAÚJO, F. F. de; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum/Bradyrhizobium elkanii*. *Pesquisa agropecuária brasileira*, v. 34, n. 9, p. 1633-1643, 1999.
- ARAÚJO, F. F. DE; MUNHOZ, R. E. V.; HUNGRIA, M. Início da nodulação em sete cultivares de feijoeiro inoculadas com duas estirpes de *Rhizobium*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 31, n. 6, p. 435-443, 1996.
- ASHRAF, Muhammad Arslan, et al. Nitrogen fixation and indole acetic acid production potential of bacteria isolated from rhizosphere of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Adv Biol Res*, v. 5, n. 6, p. 348-355, 2011.
- BAI, Yuming et al. Co-inoculation dose and root zone temperature for plant growth promoting rhizobacteria on soybean [*Glycine max* (L.) Merr] grown in soil-less media. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 34, n. 12, p. 1953-1957, 2002.
- BÁRBARO, I. M. et al. Técnica alternativa: co-inoculação de soja com *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* visando incremento de produtividade. Artigo em Hypertexto. Disponível em:< [http://www.infobibos.com/Artigos/2008\\_4/co-inoculação/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/co-inoculação/index.htm)>. v. 4, 2008. Acessado em 10 de janeiro de 2018.

BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A. C. de O. Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014. Embrapa Arroz e Feijão-Documentos (INFOTECA-E), 247 p., 2012.

BASHAN, Y.; BASHAN, L.E. de. Bacteria/Plant Growth-Promoting. In: HILLEL, D. (Ed.) Encyclopedia of soils in the environment. Oxford: Elsevier. v. 1, p. 103-115, 2005.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum* - plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1991). Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, v. 43, n. 2, p. 103-121, 1997.

BASTOS, Renan do Amaral. Co-inoculação de Rizóbio e Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal em Feijoeiro Comum. 101 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Ciência do Solo) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2016.

BOTTINI, Ruben et al. Identification of gibberellins A1, A3, and iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. Plant Physiology, v. 90, n. 1, p. 45-47, 1989.

BRACCINI, Alessandro Lucca et al. Co-inoculação e modos de aplicação de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada na nodulação das plantas e rendimento da cultura da soja. Scientia Agraria Paranaensis, v. 15, n. 1, p. 27-35, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 12, de 28 de março de 2008. Estabelece o Regulamento Técnico do Feijão, definindo o seu padrão oficial de classificação, com os requisitos de identidade e qualidade, a amostragem, o modo de apresentação e a marcação ou rotulagem. Diário da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 31 mar. 2008. Seção 1.p. 11-14.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 30, de 12 de novembro de 2010. Oficializa os métodos oficiais para análise de inoculantes, sua contagem, identificação e análise de pureza. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 17 de nov. de 2010. Seção 1, pág. 4.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 13, de 24 de março de 2011. Oficializa as normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura, bem como as relações dos micro-organismos autorizados e recomendados para produção de inoculantes no Brasil. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 25 de mar. de 2011. Seção 1, 24p.

BRITO, Luciana Fernandes de et al. Resposta do Feijoeiro Comum à Inoculação com Rizóbio e Suplementação com Nitrogênio Mineral em Dois Biomas Brasileiros. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 39, n. 4, p. 981-992, 2015.

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

BURBANO, Claudia Sofía et al. Predominant *nifH* transcript phylotypes related to *Rhizobium rosettiformans* in field-grown sugarcane plants and in Norway spruce. Environmental microbiology reports, v. 3, n. 3, p. 383-389, 2011.

BURDMAN, S.; KIGEL, J.; OKON, Y. Effects of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Soil Biology and Biochemistry*, v. 29, n. 5-6, p. 923-929, 1997.

CAMPOS, Ben-Hur Costa de. Dose de inoculante turfoso para soja em plantio direto. *Ciência Rural*, v. 29, n. 3, p. 423-426, 1999.

CARBONELL, Sérgio Augusto Moraes et al. Tamanho de grão comercial em cultivares de feijoeiro. *Ciência Rural* [online], v. 40, n. 10, p. 2067-2073, 2010.

CASSAN, Fabricio et al. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European journal of soil biology*, v. 45, n. 1, p. 28-35, 2009.

CASSINI, S. T. A.; FRANCO, M. C. Fixação biológica de nitrogênio: microbiologia, fatores ambientais e genéticos. *Feijão*, v. 2, p. 143-159, 2006.

CATÁLOGO de cultivares de feijão comum: 2014- 2015. Santo Antônio, de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2014. Não paginado. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1011166/catalogo-de-cultivares-de-feijao-comum-2014-2015>> Acesso em 10 de jan. 2018.

CATTELAN, A. J. Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal. Embrapa Soja- Documentos (INFOTECA-E), 36p, 1999.

CHIBEBA, Amaral Machaculeha et al. Co-inoculation of soybean with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* promotes early nodulation. *American Journal of Plant Sciences*, v. 6, n. 10, p. 1641, 2015.

CHUEIRE, L. M. O. et al. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento do gene 16 S rRNA. Embrapa Soja-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2003.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento [home page], 2017. Disponível em: <[www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br)> Acesso em 23 de jan. 2018.

CONCEIÇÃO JESUS, Ederson da et al. Co-inoculation of *Bradyrhizobium* stimulates the symbiosis efficiency of *Rhizobium* with common bean. *Plant and Soil*, p. 1-15, 2018.

CORSINI, Daiene Camila Dias Chaves. Inoculação de Sementes com *Azospirillum Brasilense* e *Rhizobium Tropicum* e Adubação Nitrogenada em Cobertura em Feijoeiro De Inverno Irrigado em Sistema Plantio Direto. 77 f. Dissertação (Mestre em Agronomia) -UNESP, Ilha Solteira, 2014. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/124431>>. Acesso em 08 jan. 2018.

CRONQUIST, A. Devolution and classification of flowering plants. New York: Botanical Garden. 555 p, 1988.

DALL'AGNOL, Rebeca Fuzinato et al. *Rhizobium freirei* sp. nov., a symbiont of *Phaseolus vulgaris* that is very effective at fixing nitrogen. International journal of systematic and evolutionary microbiology, v. 63, n. 11, p. 4167-4173, 2013.

DALL'AGNOL, Rebeca Fuzinato et al. *Rhizobium paranaense* sp. nov., an effective N<sub>2</sub>-fixing symbiont of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with broad geographical distribution in Brazil. International journal of systematic and evolutionary microbiology, v. 64, n. 9, p. 3222-3229, 2014.

DENARDIN, N. D. Aplicação de inoculantes define sucesso da nodulação. Visão Agrícola, Piracicaba, USP/ESALQ, v. 5, p. 35-37, 2006.

DENTON, M. D.; PHILLIPS, L. A.; PEOPLES, M. B.; PEARCE, D. J.; SWAN, A. D.; MELE, P. M.; BROCKWELL, J. Legume inoculant application methods: effects on nodulation patterns, nitrogen fixation, crop growth and yield in narrow-leaf lupin and faba bean. Plant and Soil, v. 419, n. 1-2, p. 25-39, 2017.

DÖBEREINER, J., DAY, J. M. Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganisms and nitrogen-fixing sites. In: Newton, W.E.; Nyman, C.J. (ed.) Nitrogen fixation. Washington State University, Washington, USA. p.518-538, 1975.

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. de O.; BALDANI, V. L. D. Protocolos para preparo de meios de cultura da Embrapa Agrobiologia. Embrapa Agrobiologia-Documentos (INFOTECA-E), 38p, 1999.

DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. Nitrogen-fixing bacteria in non-leguminous crop plants. Science Tech Publishers, 1987.

EARDLY, Bertrand D. et al. Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris*). Applied and Environmental Microbiology, v. 61, n. 2, p. 507-512, 1995.

FANCELLI, A. L.; TSUMANUMA, G. M. Nitrogênio e enxofre nas culturas de milho e feijão. Nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira. Piracicaba: IPNI Brasil, p. 445-486, 2007.

FERLINI, H. A. Co-Inoculación en Soja (*Glycine max*) con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense*. [S.l.: s.n.], 2006. Disponível em: <[http://www.engormix.com/co\\_inoculacion\\_soja\\_glycine\\_s\\_articulos\\_800\\_AGR.htm](http://www.engormix.com/co_inoculacion_soja_glycine_s_articulos_800_AGR.htm)>. Acesso: 25 jan. 2018.

FERREIRA, Alessandro Nunes et al. Estirpes de *Rhizobium tropici* na inoculação do feijoeiro. Scientia Agricola, p. 507-512, 2000.

FERRI, Glaucia Cristina et al. Effects of associated co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* with *Azospirillum brasilense* on soybean yield and growth. African Journal of Agricultural Research, v. 12, n. 1, p. 6-11, 2017.

FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; MARTINEZ, C. R.; CHANWAY, C. P. Alleviation of water stress effects in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation *Paenibacillus x Rhizobium tropici*. Applied Soil Ecology, Amsterdam, NL, v. 40, p. 182-188, 2008.

FISCHER, Doreen et al. Molecular characterization of the diazotrophic bacterial community in uninoculated and inoculated field-grown sugarcane (*Saccharum* sp.). *Plant and soil*, v. 356, n. 1-2, p. 83-99, 2012.

FRANCO, A. A.; DAY, J. N. et al. Effects of lime and molybdenum on nodulation and nitrogen fixation of *Phaseolus vulgaris* L. in acid soils of Brazil. *Turrialba*, v. 30, n. 1, p. 99-105, 1980.

FUSCALDI, K. da C.; PRADO, G. R. Análise econômica da cultura do feijão. *Revista de Política Agrícola*, v. 14, n. 1, p. 17-30, 2005.

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. The road map to the Manual. In: BOONE, D.R. & CATENHOLZ, R.W., eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York, Springer Verlag, v.1. p.119-166, 2001.

GITTI, Douglas Castilho et al. Inoculação de *Azospirillum brasilense* em cultivares de feijões cultivados no inverno. *Agrarian*, v. 5, n. 15, p. 36-46, 2012.

GRAHAM, P. H. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 38, p. 485-492, 1992.

GRAHAM, P. H.; ROSAS, J. C.; DE JENSEN, C. E.; PERALTA, E.; TLUSTY, B.; ACOSTAGALLEGOS, 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.

GUSS, A.; DOBEREINER, J. Efeito da adubação nitrogenada e da temperatura do solo na fixação do nitrogênio em feijão (*Phaseolus vulgaris*). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 7, n. 6, p. 87-92, 1972.

HUERGO, Luciano Fernandes et al. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. CASSÁN F. D; García salomone. *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. *Asociación Argentina de Microbiología*, Argentina, p. 17-35, 2008.

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

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. de C. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. *Embrapa Soja*; Brasília, DF: Embrapa Cerrados, 2001.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. *Biology and Fertility of Soils*, v. 49, n. 7, p. 791-801, 2013.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Testes de eficiência agrônômica da tecnologia de co-inoculação de rizóbios e *Azospirillum* em soja e feijoeiro. In: *Embrapa Soja- Artigo em anais de congresso (ALICE)*. In: Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola, 16p., 2012, Londrina. *Anais... Londrina: Embrapa Soja*, 2014., 2012.

HUNGRIA, M.; STACEY, G. Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: basic aspects and potential application in agriculture. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 29, n. 5, p. 819-830, 1997.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research*, Amsterdam, v. 65, n. 2, p. 151-164, 2000.

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.; VARGAS, M. A. T.; CAMPO, R. J. A inoculação da soja. *Embrapa Soja-Circular Técnica (INFOTECA-E)*, 1997.

HUNGRIA, Mariângela et al. Comparison between parental and variant soybean *Bradyrhizobium* strains with regard to the production of lipo-chitin nodulation signals, early stages of root infection, nodule occupancy, and N<sub>2</sub> fixation rates. *Plant and Soil*, v. 186, n. 2, p. 331-341, 1996.

HUNGRIA, Mariângela et al. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 32, n. 11-12, p. 1515-1528, 2000.

HUNGRIA, Mariângela. *Inoculação com Azospirillum brasilense: inovação em rendimento a baixo custo*. Londrina: Embrapa Soja, 2011.

HUNGRIA, Mariângela; ARAUJO, Ricardo S. *Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola*. Brasília, DF: Embrapa-Serviço de Produção e Informação, 1994.

JACOB-NETO, J.; ROSSETTO, C. A. V. Concentração de nutrientes nas sementes: o papel do molibdênio. *Floresta e Ambiente*, v. 5, n. 1, p. 171-183, 1998.

JORDAN, D. C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 32, n. 1, p. 136-139, 1982.

KROLOW, Rodrigo Holz et al. Efeito do fósforo e do potássio sobre o desenvolvimento e a nodulação de três leguminosas anuais de estação fria. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 2224-2230, 2004.

KUBOTA, Flavio Yudi et al. Crescimento e acumulação de nitrogênio de plantas de feijoeiro originadas de sementes com alto teor de molibdênio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 32, n. 4, p. 1635-1641, 2008.

KUMAR-RAO, J. V. D. K.; PATIL, R. B. Effect of inoculation with *Rhizobium* and *Azotobacter* on nodulation, growth and yield of soybean. *Current science*, 1976.

KUYKENDALL, L. David. et al. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 38, n. 6, p. 501-505, 1992.

KUYKENDALL, L. David. *Rhizobiaceae*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, 2005.

LARA CABEZAS, W. A. R.; KORNDORFER, G. H.; MOTTA, S. A. Volatilização de N-NH<sub>3</sub> na cultura de milho: II. Avaliação de fontes sólidas e fluidas em sistema de plantio direto e convencional. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 21, n. 3, p. 489-496, 1997.

LINDSTRÖM, K. et al. Taxonomy and evolution of nitrogen-fixing organisms. Biological nitrogen fixation, John Wiley & Sons, Inc, 2013.

LOPES, E. S. Fixação biológica do nitrogênio no sistema solo-planta. I Simpósio Sobre Nitrogênio e Enxofre na Agricultura Brasileira, Piracicaba. Anais, IPNI Brasil, p. 43-72, 2007.

LOVATO, P. E.; PEREIRA, J. C.; VIDOR, C. Flutuação populacional de *Rhizobium phaseoli* em solos com e sem calagem. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, MG, v. 9, n. 1, p. 9-12, 1985.

MA, W.; PENROSE, D. M.; GLICK, B. R. Strategies used by rhizobia to lower plant ethylene levels and increase nodulation. Canadian journal of microbiology, v. 48, n. 11, p. 947-954, 2002.

MABOOD, F.; ZHOU, X.; SMITH, D. L. Microbial signaling and plant growth promotion. Canadian journal of plant science, v. 94, n. 6, p. 1051-1063, 2014.

MARTINEZ, Esperanza et al. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. Microbiology, v. 131, n. 7, p. 1779-1786, 1985.

MARTÍNEZ-ROMERO, Esperanza et al. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 41, n. 3, p. 417-426, 1991.

MARTINS, L. M. V. et al. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. Biology and fertility of soils, v. 38, n. 6, p. 333-339, 2003.

MATOS, Gustavo Feitosa et al. *Bradyrhizobium sacchari* sp. nov., a legume nodulating bacterium isolated from sugarcane roots. Archives of microbiology, v. 199, n. 9, p. 1251-1258, 2017.

MEIRELLES, F. C.; CORSINI, D. C. D. C.; GERLACH, G. A. X.; DA SILVA, J. C.; GITTI, D. C.; DE SOUZA, E.; PORTUGAL, J. R.; ARF, O. Co-inoculação de *Azospirillum brasilense* e *Rhizobium tropici* em feijão em cultivo irrigado. In: Congresso nacional de pesquisa de feijão (CONAFE), 10, 2014, Londrina. Anais Web, Londrina: IAPAR, jul. 2014.

MENDES, I. de C.; DOS REIS JUNIOR, F. B.; DA CUNHA, HUNGRIA, M. 20 perguntas e respostas sobre fixação biológica de nitrogênio. Embrapa Cerrados-Documentos (INFOTECA-E), 2010.

MERCANTE, Fábio Martins et al. A inoculação do feijoeiro comum com rizóbio. EMBRAPA-CNPBS, 1992.

- MERTEN, G. H.; MINELLA, J. P. Qualidade da água em bacias hidrográficas rurais: um desafio atual para a sobrevivência futura. *Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável*, v. 3, n. 4, p. 33-38, 2002.
- MOREIRA, F. M. S; SIQUEIRA, J. O. *Microbiologia e bioquímica do solo*. 2. ed. Lavras: UFLA, 729p., 2006.
- MOREIRA, Fatima Maria de Souza et al. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae*, v. 1, n. 2, p. 74, 2010.
- MOSTASSO, Lilian et al. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. *Field Crops Research*, v. 73, n. 2, p. 121-132, 2002.
- MOUSAVI, Seyed Abdollah et al. Phylogeny of the *Rhizobium*–*Allorhizobium*–*Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. *Systematic and applied microbiology*, v. 37, n. 3, p. 208-215, 2014.
- MUNNS, D. N. Mineral nutrition and the legume symbiosis. In: HARDY, R. W. F.; GIBSON, A. H., ed. *A treatise on dinitrogen fixation*. New York: Jonh Wiley, 1977. P. 353-392. *nodule bacteria of legumes Plant and Soil*, The Hague, v. 20, p. 383-396, 1964.
- NAVEED, Muhammad et al. Perspectives of rhizobial inoculation for sustainable crop production. In: *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets*. Springer India. p. 209-239, 2015.
- NETO, Santiel Alves Vieira et al. Formas de aplicação de inoculante e seus efeitos sobre a nodulação da soja. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 32, n. 2, 2008.
- NEVES, A. C. et al. Cultivo do feijão-caupi em sistema agrícola familiar. *Embrapa Meio-Norte-Circular Técnica (INFOTECA-E)*, 15p, 2011.
- NORRIS, D. O. *Techniques used in work with Rhizobium*. 1964.
- OLIVEIRA, Dâmiany Pádua. Adubação nitrogenada, inoculação com estirpes de rizóbio e tratamentos fungicidas de sementes em feijoeiro comum cv. BRSMG Madrepérola.. 180 p. Tese (Doutor em Agronomia) - UFLA, Lavras, 2013.
- ORMENO-ORRILLO, Ernesto et al. Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the *Rhizobiaceae* family in light of genomics. *Systematic and applied microbiology*, v. 38, n. 4, p. 287-291, 2015.
- PACHECO, Rafael Sanches et al. Seeds enriched with phosphorus and molybdenum as a strategy for improving grain yield of common bean crop. *Field Crops Research*, v. 136, p. 97-106, 2012.
- PACHECO, Rafael Sanches. Fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijoeiro estimada pela abundância natural de 15n. 124 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica - RJ. 2014.
- PANKIEVICZ, Vânia et al. Robust biological nitrogen fixation in a model grass–bacterial association. *The Plant Journal*, v. 81, n. 6, p. 907-919, 2015.

PELEGRIN, R. et al. Resposta da cultura do feijoeiro à adubação nitrogenada e à inoculação com rizóbio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, MG, v. 33, n. 1, p. 219-226, 2009.

PEREIRA, Helton Santos et al. BRS Esteio: common bean cultivar with black grain, high yield potential and moderate resistance to anthracnose. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 13, n. 4, p. 373-376, 2013.

PEREIRA, Helton Santos et al. Influência do ambiente em cultivares de feijoeiro-comum em cerrado com baixa altitude. *Bragantia*, v. 71, n. 2, p. 165-172, 2012.

PEREIRA, Vinícios Gabriel Caneppele et al. Exigências agroclimáticas para a cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Brasileira de Energias Renováveis*, v. 3, n. 1, 2014.

PERES, AMANDA RIBEIRO. Co-inoculação de *Rhizobium tropici* e *Azospirillum brasilense* em feijoeiro cultivado sob duas lâminas de irrigação: produção e qualidade fisiológica de sementes. 71 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Engenharia - UNESP, Ilha Solteira, 2014.

PIANA, Clause Fátima de Brum. et al. Adaptabilidade e estabilidade do rendimento de grãos de genótipos de feijão. Área de Informação da Sede-Artigo em periódico indexado (ALICE), 1999.

PIROMYOU, Pongdet et al. Potential of Rice Stubble as a Reservoir of *Bradyrhizobial* Inoculum in Rice-Legume Crop Rotation. *Applied and environmental microbiology*, v. 83, n. 22, p. e01488-17, 2017.

PISA, GIOVANI. DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DO SOLO ADERIDO À RAIZ DE CANA-DE-AÇÚCAR. 143 f. Tese (Doutor em Ciências) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

PORTES, T. de A. Produção de feijão nos sistemas consorciados. Goiânia: EMBRAPA-CNPAF. (EMBRAPA-CNPAF. Documentos, 71), 50 p, 1996.

R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

RAJENDRAN, Geetha et al. Enhanced growth and nodulation of pigeon pea by co-inoculation of *Bacillus strains* with *Rhizobium* spp. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 11, p. 4544-4550, 2008.

RAMOS, M. L. G.; RIBEIRO, W. Q. Effect of fungicides on survival of *Rhizobium* on seeds and the nodulation of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: *Enhancement of Biological Nitrogen Fixation of Common Bean in Latin America*. Springer, Dordrecht, p. 145-150, 1993.

REIS, V. M.; PEDRAZA, R. O.; TEIXEIRA, K. R. dos S. O gênero *Azospirillum*: diversidade e relação filogenética das espécies. *Embrapa Agrobiologia-Documentos (INFOTECA-E)*, 2010.

REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. dos S. Fixação biológica de nitrogênio-estado da arte. *Processos biológicos no sistema solo-planta: Ferramentas para uma agricultura sustentável*. Brasília, DF: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, p. 151-80, 2005.

REMANS, Roseline et al. Effect of *Rhizobium*–*Azospirillum* co-inoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. *Plant and soil*, v. 312, n. 1-2, p. 25-37, 2008.

RIBEIRO, Renan Augusto et al. Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 62, n. 5, p. 1179-1184, 2012.

RIVAS, Raúl et al. Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. *Systematic and applied microbiology*, v. 26, n. 1, p. 47-53, 2003.

RODRIGUES, Artenisa Cerqueira et al. Resposta da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas e *Bradyrhizobium* sp. em caupi. *Bioscience Journal*, v. 28, n. 1, 2012.

ROUWS, Luc Felicianus Marie et al. Culture-Independent Assessment of Diazotrophic Bacteria in Sugarcane and Isolation of *Bradyrhizobium* spp. from Field-Grown Sugarcane Plants Using Legume Trap Plants. *Biological Nitrogen Fixation*, p. 955-966, 2015.

RUDNIK, P.; MELETZUS, D.; GREEN, A.; HE, L.; KENNEDY, C. Regulation of nitrogen fixation by ammonium in diazotrophic species of proteobacteria. *Soil Biology Biochemistry*, Elmsford, v. 29, n. 5, p. 831- 841, 1997.

RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P. Fixação biológica de nitrogênio. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q., eds. Feijão-caupi; avanços tecnológicos. Brasília, Embrapa/ Informação Tecnológica, p.281-335, 2005.

SCHLOTTER, M. et al. Root colonization of different plants by plant-growth-promoting *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii R39 studied with monospecific polyclonal antisera. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 5, p. 2038-2046, 1997.

SCHUH, Carlos Alberto. Biopolímeros como suporte para inoculantes. 81 p. Dissertação (Mestrado em Ciência) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

SEGOVIA, L.; YOUNG, J.; Peter W.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 43, n. 2, p. 374-377, 1993.

SILVA, Eulene Francisco da et al. Inoculação do feijoeiro com *Rhizobium tropici* associada à exsudato de *Mimosa flocculosa* com diferentes doses de nitrogênio. *Bragantia*, v. 68, n. 2, 2009.

SILVA, V. N.; SILVA, L. E. S. F.; FIGUEIREDO, M. V. B. Atuação de rizóbios com rizobactérias promotora de crescimento em plantas na cultura do caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Acta Scientiarum Agronomy*, Maringá, v. 28, n. 3, p. 407-412, 2006.

SMITH, R. S. Legume inoculant formulation and application. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 38, n. 6, p. 485-492, 1992.

SOARES, André Luis de Lima et al. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). II-Feijoeiro. 2006.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. Methods in legume-*Rhizobium* technology. Paia, Maui: University of Hawaii NifTAL Project and MIRCEN, Department of Agronomy and Soil Science, Hawaii Institute of Tropical Agriculture and Human Resources, College of Tropical Agriculture and Human Resources. p. 365, 1985.

SORATTO, R. P.; CARVALHO, M. A. C. de; ARF, O. Teor de clorofila e produtividade do feijoeiro-comum em razão da adubação nitrogenada. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 39, n. 9, p. 895-901, 2004.

SOUZA FILHO, B. F.; ANDRADE, W. A cultura do feijão no Estado do Rio de Janeiro. 1. ed. Niterói/RJ: PESAGRO-RIO, 96p, 2010.

SOUZA, G. S.; MATOSO, S. C. G.; SILVA, J. B.; PINTAR, A. F. Nodulação e crescimento do feijoeiro Pérola em resposta à aplicação de molibdênio e solução de quefir. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2., 2012, Colorado do Oeste. Anais... Colorado do Oeste: IFECTR, IFRO. p.1-3, 2012.

SOUZA, J. E. B. de; FERREIRA, E. P. de B. Improving sustainability of common bean production systems by co-inoculating rhizobia and azospirilla. Agriculture, ecosystems & environment, v. 237, p. 250-257, 2017.

STAJKOVIC, Olivera et al. Improvement of common bean growth by co-inoculation with *Rhizobium* and plant growth-promoting bacteria. Rom Biotechnol Lett, v. 16, n. 1, p. 5919-5926, 2011.

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, 51p., 1999.

STRALIOTTO, R.; TEIXEIRA, M. G.; MERCANTE, F. M. Fixação biológica de nitrogênio. In: AIDAR, H.; KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L. F. Produção de feijoeiro comum em várzeas tropicais. Santo Antônio de Goiás, Embrapa Arroz e Feijão, p.122-153., 2002.

STRZELCZYK, E.; KAMPERT, M.; LI, C. Y. Cytokinin-like substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. Microbiological Research, v. 149, n. 1, p. 55-60, 1994.

SY, Abdoulaye et al. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. Journal of bacteriology, v. 183, n. 1, p. 214-220, 2001.

TARRAND, J. J., KRIEG, N. R., DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov., and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. Canadian Journal Microbiology, v. 24, p. 976- 980, 1978.

TEIXEIRA, M. G. Influência do conteúdo de fósforo da semente na nodulação do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). 200p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ. 1994.

THAWEENUT, Nisar et al. Two seasons' study on nifH gene expression and nitrogen fixation by diazotrophic endophytes in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids): expression of nifH genes similar to those of rhizobia. *Plant and soil*, v. 338, n. 1-2, p. 435-449, 2011.

VANINSBERGHE, David et al. Non-symbiotic *Bradyrhizobium* ecotypes dominate North American forest soils. *The ISME journal*, v. 9, n. 11, p. 2435, 2015.

VERONEZI, Sandro Della Flora et al. 028-Co-inoculação de rizóbio e *Azospirillum brasilense* em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cadernos de Agroecologia*, v. 7, n. 2, 2012.

VINCENT, J. M. A manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford, Blackwell Scientific, 164p, 1970.

WILLEMS, Anne. The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant and soil*, v. 287, n. 1-2, p. 3-14, 2006.

XAVIER, Terezinha Ferreira et al. Ontogenia da nodulação em duas cultivares de feijão-caupi. *Ciência Rural*, v. 37, n. 2, 2007.

XU, L. M. et al. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 45, n. 4, p. 706-711, 1995.

YADEGARI, Mehrab et al. Plant growth promoting rhizobacteria increase growth, yield and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Plant nutrition*, v. 33, n. 12, p. 1733-1743, 2010.

YOKOYAMA, L. P.; DEL PELOSO, M. J.; DI STEFANO, J. G.; YOKOYAMA, M. Nível de aceitabilidade da cultivar de feijão "Pérola": avaliação preliminar. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 20p. (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos, 98), 1999.

YOKOYAMA, L. P.; STONE, L. F. Cultura do Feijoeiro no Brasil: Características Da Produção. CEP, v. 75375, p. 000, 2000.

ZAFAR, M.; ABBASI, M. K.; KHAN, M. A.; KHALIQ, A.; SULTAN, T.; ASLAM, M. Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Growth, Nodulation and Nutrient Accumulation of Lentil Under Controlled Conditions. *Pedosphere*, v. 22, n. 6, p. 848-859, 2012.

ZAHARAN, Hamdi Hussein. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and molecular biology reviews*, v. 63, n. 4, p. 968-989, 1999.

ZHANG, F. et al. Plant growth promoting rhizobacteria and soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] nodulation and nitrogen fixation at sub optimal root zone temperatures. *Annals of Botany*, v.77, p.453 - 459, 1996.

ZHANG, Feng; SMITH, Donald L. Inoculation of soybean (*Glycine max*.(L.) Merr.) with genistein-preincubated *Bradyrhizobium japonicum* or genistein directly applied into soil increases soybean protein and dry matter yield under short season conditions. *Plant and Soil*, v. 179, n. 2, p. 233-241, 1996.

ZILLI, J. É.; MARSON, L. C.; MARSON, B. F.; GIANLUPPI, V.; CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Inoculação de *Bradyrhizobium* em soja por pulverização em cobertura. Pesquisa agropecuária brasileira, v. 43, n. 4, p. 541-544, 2008.

ZILLI, J. E.; CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M.. Eficácia da inoculação de *Bradyrhizobium* em pré-semeadura da soja. Embrapa Soja-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2010.

ZILLI, J. É.; SMIDERLE, O. J.; FERNADES JÚNIOR, P. I. Eficiência agronômica de diferentes formulações de inoculantes contendo *Bradyrhizobium* na cultura da soja em Roraima. Revista Agro@ mbiente On-line, v. 4, n. 2, p. 56-61, 2010.

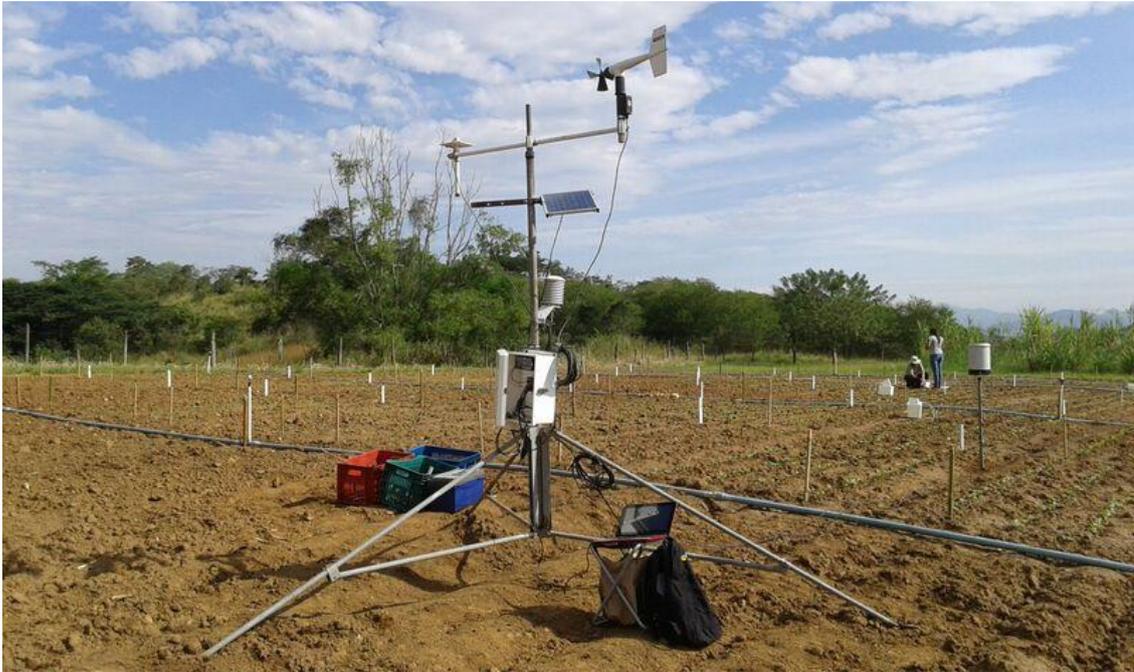
ZIMMERMANN, M. J. de O. et al. Cultura do feijoeiro comum no Brasil. Piracicaba: Potafós, 1996.

ZONTA, Everaldo. et al. O sistema radicular e suas interações com o ambiente edáfico. Nutrição mineral de plantas. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p. 7-52, 2006.

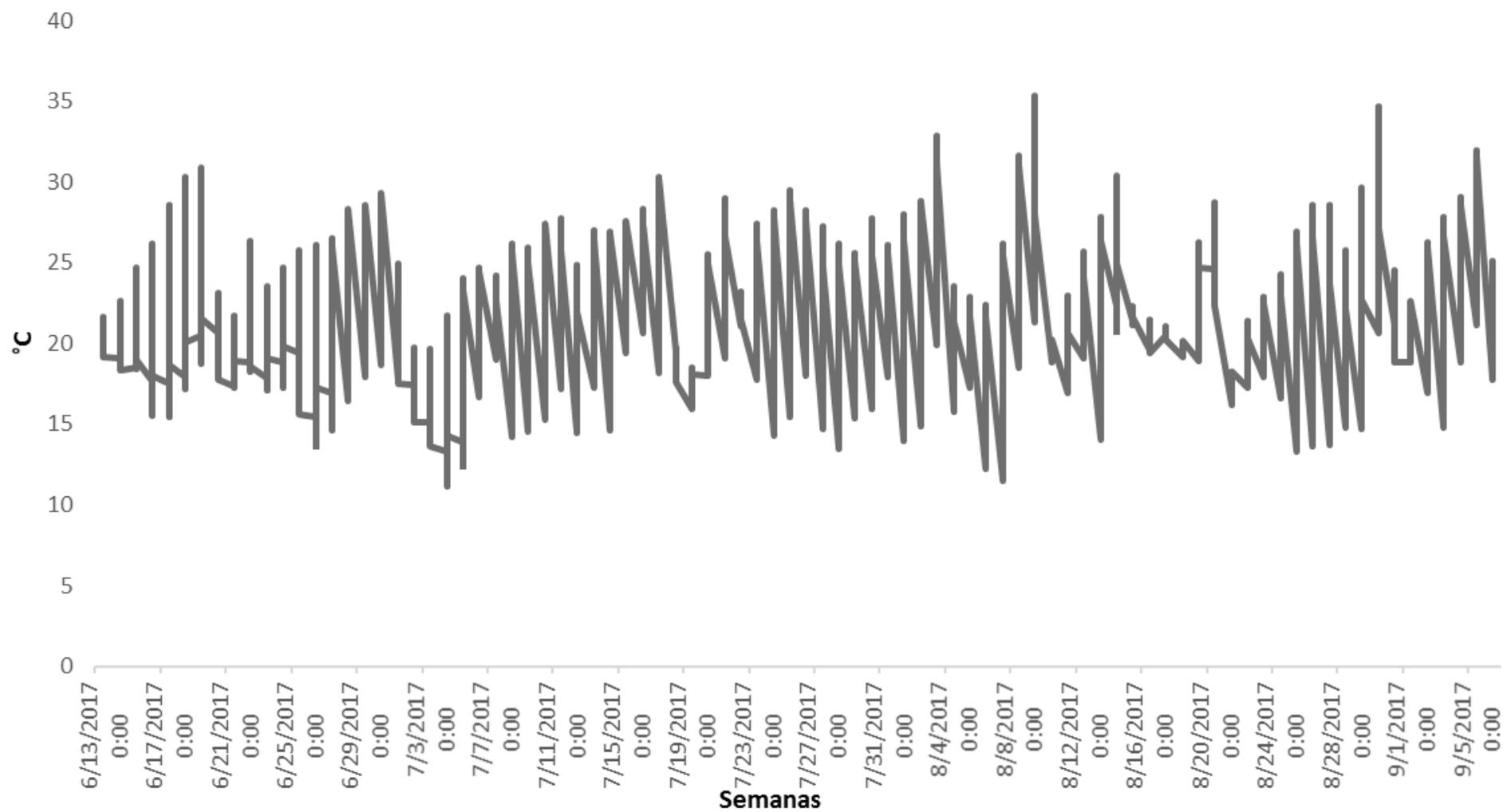
## ANEXO

No experimento III foram monitoradas as condições ambientais através de um pluviômetro e sensores colocados em diferentes locais nas parcelas para monitorar a umidade e temperatura do solo durante todo o período experimental. Os parâmetros micro meteorológicos foram avaliados entre 13/06/2017 a 06/09/2017 por um datalogger CR200 (Campbell, EUA) programado para coletas de total da precipitação e médias horárias dos outros parâmetros (Figura 2).

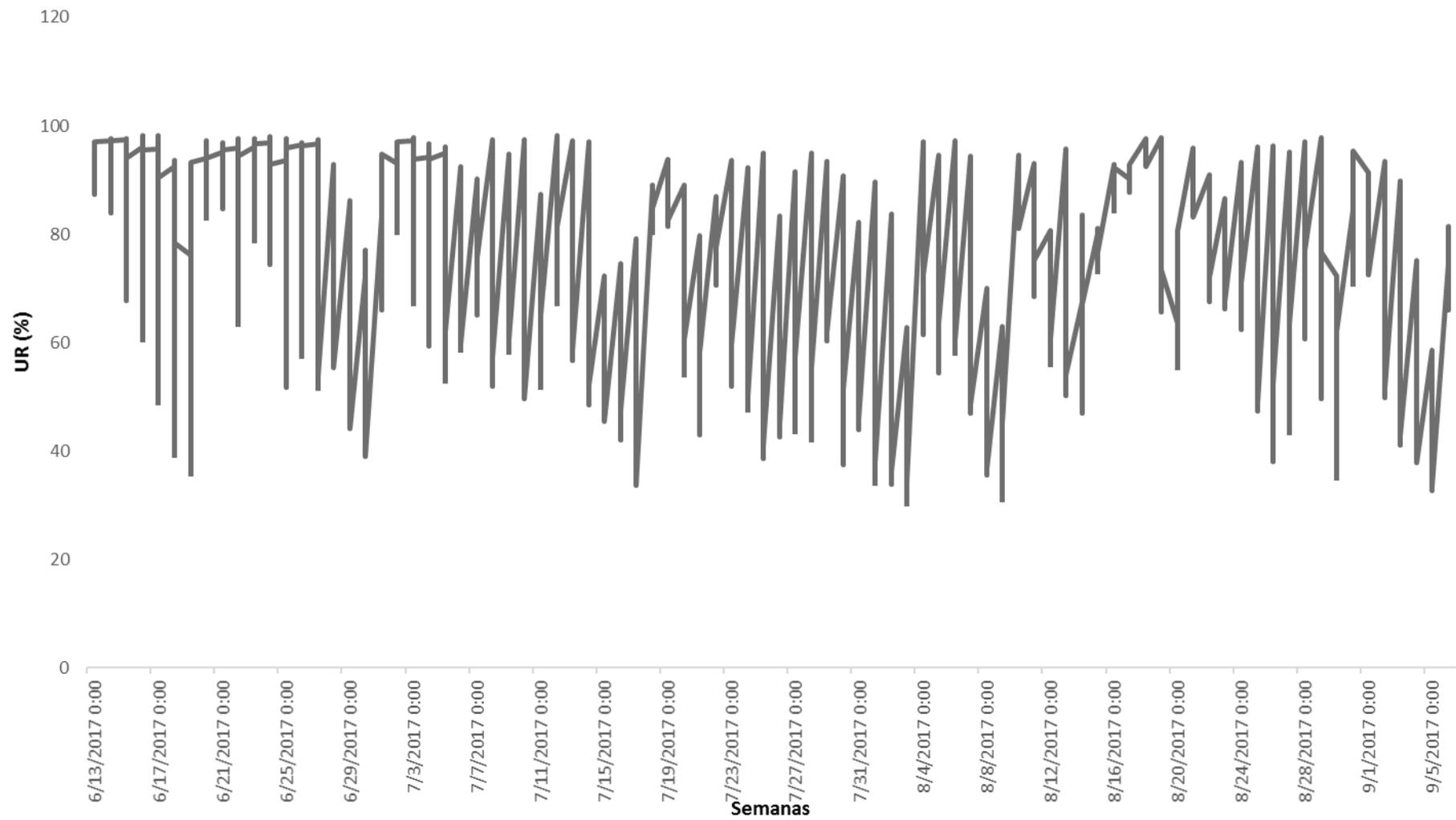
A coleta das informações contidas no equipamento foi feita semanalmente a partir de um computador e armazenada.



**Figura 1.** Estação micro meteorológica na área experimental em Seropédica – RJ. (Foto: Wenceslau Teixeira)



**Figura 2.** Dados de temperatura do solo durante condução do experimento em Seropédica - RJ.



**Figura 3.** Dados de umidade relativa durante condução do experimento em Seropédica – RJ.