# UFRRJ

## INSTITUTO DE AGRONOMIA

## CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

## CIÊNCIA DO SOLO


**DISSERTAÇÃO**

# Influência da Época de Aplicação de Nitrogênio no Crescimento e Produção de Grãos de Feijoeiro Inoculado com Rizóbio


**Bárbara Cavalheiro Zoffoli**



**2015**

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

# INFLUÊNCIA DA ÉPOCA DE APLICAÇÃO DE NITROGÊNIO NO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE GRÃOS DE FEIJOEIRO INOCULADO COM RIZÓBIO

**BÁRBARA CAVALHEIRO ZOFFOLI**

*Sob a Orientação do Professor*

**Adelson Paulo de Araújo**

*e Co-orientação da Pesquisadora*

**Rosângela Straliotto**

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

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2015

641.3565
Z85i
T

Zoffoli, Bárbara Cavalheiro, 1989-
Influência da época de aplicação de nitrogênio no crescimento e produção de grãos de feijoeiro inoculado com rizóbio / Bárbara Cavalheiro Zoffoli – 2015.
70 f.: il.

Orientador: Adelson Paulo de Araújo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo.
Bibliografia: f. 52-58.

1. Feijão – Teses. 2. Fixação biológica de nitrogênio – Teses. 3. Inoculação – Teses. 4. Adubação suplementar – Teses. I. Araújo, Adelson Paulo de, 1963-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo. III. Título.

**O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES) – Brasil – Código de Financiamento: 001.**

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

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA (CIÊNCIAS DO SOLO)

**HOMOLOGAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 56 / 2025 - CPGACS (12.28.01.00.00.00.27)**

**Nº do Protocolo: 23083.061749/2025-12**

**Seropédica-RJ, 22 de outubro de 2025.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**

**INSTITUTO DE AGRONOMIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - CIÊNCIA DO SOLO**

**BÁRBARA CAVALHEIRO ZOFFOLI**

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 24/02/2015.

Adelson Paulo de Araújo. Dr. UFRRJ

(Orientador)

Ederson da Conceição Jesus. Dr. Embrapa Agrobioloiga

Ednaldo da Silva Araújo. Dr. Embrapa Agrobioloiga

***(Assinado digitalmente em 27/10/2025 10:29 )***
ADELSON PAULO DE ARAUJO
*PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR*
*DATS (11.39.00.35)*
*Matrícula: 1104775*

***(Assinado digitalmente em 19/12/2025 14:41 )***
EDERSON DA CONCEICAO JESUS
*ASSINANTE EXTERNO*
*CPF: 084.646.497-70*

***(Assinado digitalmente em 02/12/2025 16:24 )***
EDNALDO DA SILVA ARAÚJO
*ASSINANTE EXTERNO*
*CPF: 750.960.133-91*

Visualize o documento original em **https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp** informando seu número: **56**, ano: **2025**, tipo: **HOMOLOGAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**, data de emissão: **22/10/2025** e o código de verificação: **97b87446e0**

A aquela que sente amor sincero por mim e me dá forças para continuar, minha amada irmã Esthéfane.

Dedico!!

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, criador da vida!

Ao meu pai por todo apoio e por principalmente ter me encorajado a continuar na vida acadêmica.

À minha mãe por ter me dado à vida e por todo amor.

À minha irmã, parceira de todas as horas.

À minha vozinha Odília, por toda ajuda e orações dedicadas a mim.

Ao meu professor orientador Adelson, pela confiança e extrema dedicação ao longo desses anos de trabalho.

À minha co-orientadora Dr. Rosângela Straliotto, por toda a ajuda nos experimentos e principalmente pela amizade.

A todos os funcionários da Embrapa Agrobiologia, em especial ao Claudinho,Amarildo, Adalberto, Alderi, Andreia e Marcelo e a vocês que foram peças fundamentais durante meu mestrado : Wilson, Geraldo , João e Lúcio.

Ao pesquisador Dr. Bruno pela ajuda e orientação nas análises de redução de acetileno.

Aos estagiários Neilton, Jennifer, Gizele, Juliana, Leticia e Laiz, por toda a ajuda na condução dos experimentos e processamento das amostras.

À UFRRJ e ao Departamento de Solos que tornaram minha casa, espero um dia poder retribuir tudo o que fizeram por mim.

A todos meus amigos, mas em especial a vocês que aguentam meu chororô e sempre tem uma palavra amiga, Gil Olindo, Naná, Ana Carolina, Vitor, Mayara, Marconi, Mineiro, Angelica e Bárbara.

À minha "brotinho" Samantha, que mesmo longe não me deixou desamparada.

As minhas amigas "embrapianas" que me divertiram nesse momento de estresse: Fernanda, Dani, Carlinha, Rafaela, Karine, Tati e Lúcia Helena.

Aos meus amigos Luciana e Rafael por toda amizade e ensinamentos passados.

Aos meus fieis amigos e companheiros da batalha acadêmica: Wilk, Elias, Lívia, Thiago, Jander e Bruno.

A todos meus amigos e minha família que entenderam minha ausência

Aos membros da banca, Dr. Ednaldo e Dr. Ederson, por terem aceitado o convite.
A CAPES pela concessão da bolsa.

*Que a nossa voz*
*duetada com o som deste divino instrumento*
*casados com a melodia do nosso desejo e do nosso sentimento*
*Ecoe dentro de cada coração*
*levando o sabor da verdadeira, doce e pura poesia*
*de uma sonoridade singela*
*mas que emociona e contagia*
*Som esse que nasceu lá do interior*
*veio lá do campo,lá da roça*
*veio pra falar e pra defender*
*mas só das coisas que é nossa*
*"Nóis num" tem nada contra*
*as modas lá dos exterior*
*mas "nóis num" troca o som da nossa viola caipira por um som de guitarra de rock'n'roll*
*prefiro mil vezes*
*nossos causos*
*nossas prosas*
*as nossas modas de caçador*
*o nosso jeito simples e bonito*
*que só a gente tem de falar de amor*
*Pra que melhor do que isso*
*Viola, violão, uma pinguinha pura, um cigarro de palha e dois cantador "bão"*
*Claro que tudo isso com Deus na proteção*
*Sem pisar em ninguém*
*a gente luta pra defender*
*e o que depender da gente*
*a cultura nunca vai morrer!!*

Tião Carreiro

## BIOGRAFIA

Bárbara Cavalheiro Zoffoli, filha de Ranelio Weslei Zoffoli e Rosângela Maria Cavalheiro Zoffoli, nasceu em 22 de junho de 1989 em Além Paraíba - MG. Cursou parte do ensino fundamental e o ensino médio no Colégio dos Santos Anjos (Além Paraíba), concluindo em 2007. Em março de 2008 ingressou na UFRRJ no curso de Agronomia. Foi monitora das disciplinas de Pedologia e Fundamentos da Ciência do Solo, bolsista de iniciação científica do PIBIC-CNPq por dois anos e estagiária do Sítio Roberto Burle Marx. Conclui sua graduação em março de 2013, quando ingressou no curso de Mestrado em Agronomia - Ciência do Solo na UFRRJ, onde foi bolsista da CAPES.

## RESUMO GERAL

ZOFFOLI, Bárbara Cavalheiro. **Influência da época de aplicação de nitrogênio no crescimento e produção de grãos de feijoeiro inoculado com rizóbios**. 2015. 70f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) é capaz de aproveitar o nitrogênio (N) atmosférico através da simbiose com bactérias do grupo dos rizóbios, mas problemas intrínsecos da cultura tornam esta simbiose pouco eficiente, não sendo capaz de suprir toda a demanda de N. O N em excesso pode inibir o processo de fixação biológica de N (FBN), porém a aplicação de doses suplementares pode estimular a FBN, sendo necessários estudos para identificar qual a época e a dosagem ideal de aplicação. Foram conduzidos três experimentos em casa de vegetação sob hidroponia para a avaliação da ontogenia da nodulação e da FBN, dois sob diversas fontes de N e outro sob épocas distintas de aplicação de N. Foram realizadas coletas em distintos estádios, sendo avaliados a redução de acetileno no sistema radicular, massa seca de parte aérea, raiz e nódulos, número e diâmetro de nódulos. Sob condições de campo foram realizados experimentos nos municípios de Rio das Ostras (RJ), Macaé (RJ), Santo Antônio de Goiás (GO) e Seropédica (RJ), objetivando identificar a melhor época de aplicação de N mineral em cultivares de feijoeiro inoculadas com diferentes estirpes de rizóbios. Em Seropédica, avaliou-se também o efeito da co-inoculação com bactérias promotoras de crescimento. Aos 35 dias após emergência, foram realizadas coletas para avaliação de massa seca de parte aérea e nódulos, e na maturação avaliados o rendimento de grãos e componentes de produção. Em casa de vegetação, apenas a simbiose não foi capaz de garantir produção de biomassa similar às plantas que receberam apenas adubação com N mineral. O N aplicado em todo período experimental e após 15 DAT (dias após transplante) inibiu a atividade da nitrogenase, sem afetar a nodulação das plantas inoculadas. Ao cessar o fornecimento de N após 15 DAT, as plantas apresentaram maior massa de nódulos e atingiram um pico de atividade de nitogenase, aos 35 DAT, superior às plantas apenas inoculadas. Em condições de campo, a resposta à inoculação com rizóbio foi influenciada pelo ambiente de cultivo e época de aplicação de N. A população nativa de rizóbios do solo foi eficiente e competitiva, uma vez que as plantas não inoculadas nodularam e apresentaram massa de parte aérea e produção de grãos satisfatórias em alguns experimentos. A aplicação de maiores doses de N reduziu a nodulação, porém doses suplementares de N, principalmente quando aplicadas no plantio, em conjunto com a inoculação, não inibiu a nodulação e em alguns casos aumentou a matéria seca de parte aérea e os índices de produtividade. Não houve efeito positivo da co-inoculação com bactérias promotoras de crescimento. Os resultados indicam um melhor aproveitamento da FBN quando o N é aplicado de forma suplementar, particularmente em estádios iniciais do crescimento do feijoeiro inoculado com rizóbio.



**Palavras chave:** Feijão. Fixação biológica de nitrogênio. Inoculação. Adubação suplementar.

## GENERAL ABSTRACT

ZOFFOLI, Bárbara Cavalheiro**. Influence of time of nitrogen application on growth and yield of common been inoculated with rhizobia**. 2015. 70p. Dissertation, (Master Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

The common bean (*Phaseolus vulgaris*) is capable of taking the atmospheric nitrogen (N) through symbiosis with bacteria of the group of rhizobia, but intrinsic problems of the crop make this symbiosis less efficient, not being able to feed the N demand. The excess of N may inhibit the biological nitrogen fixation (BNF) but the application of supplemental doses can stimulate the BNF, which requires studies to identify the optimal period and level for N application. Three experiments were conducted under hydroponics in greenhouse for evaluating the ontogeny of nodulation and BNF, two experiments with several N sources and other with different periods of N application. Plants were harvested at distinct growth stages, and the acetylene reduction in the root system, dry weight of shoot, root and nodules, and nodule number and diameter, were evaluated. Under field conditions, four experiments were conducted in Rio das Ostras (RJ), Macaé (RJ), Santo Antônio de Goiás (GO) and Seropédica (RJ), aiming to identify the best period of mineral N application in common bean cultivars inoculated with different rhizobia strains. In Seropédica, the co-inoculation with growth promoting bacteria was also evaluated. Plants were sampled 35 days after emergence to evaluate the dry mass of shoots and nodules, and grain yield and yield components were evaluated at maturity. Under greenhouse conditions, only the symbiosis was not capable of guaranteeing biomass production similar to plants that only received fertilization with mineral N. The N applied during whole experimental period and after 15 DAT (days after transplant) inhibited the nitrogenase activity without affecting the nodulation of inoculated plants. By ceasing the N supply after 15 DAT, plants showed greater nodule weight and a peak of nitrogenase activity at 35 DAT higher than the plants only inoculated. At field conditions, the response to inoculation with rhizobia was influenced by the growth environment and the period of N application. The native population of soil rhizobia was efficient and competitive since the non inoculated plants showed satisfactory shoot dry mass and grain yield in some experiments. The application of higher N levels reduced the nodulation but supplemental N, mainly when applied at planting associated with inoculation, did not inhibited the nodulation and in some cases increased the shoot dry mass and the yield indices. There was no positive effect of the co-inoculation with growth promoting bacteria. The results indicate an improved BNF when the mineral N is applied supplementary, particularly at initial growth stages of the common bean crop inoculated with rhizobia.



**Keywords:** Bean. Biological nitrogen fixation. Inoculation. Supplementary fertilization.

## ÍNDICE DE TABELAS

**Tabela 1.** Razão raiz: parte aérea, massa unitária de nódulos e diâmetro de nódulos de plantas de feijoeiro cultivar Ouro Negro, em cinco épocas de coleta (em dias após transplante – DAT), sob distintas fontes de N, em hidroponia. ..... 16
**Tabela 2.** Teor e conteúdo de N na parte aérea e raiz de plantas de feijoeiro cultivar Ouro Negro aos 35 e 45 dias após transplante (DAT), sob distintas fontes de N, em hidroponia. ..... 16
**Tabela 3.** Razão raiz: parte aérea, massa unitária de nódulos e diâmetro de nódulos de plantas de feijoeiro cultivar Ouro Negro em cinco épocas de coleta (em dias após transplante – DAT), sob distintas fontes de N, em hidroponia. ..... 19
**Tabela 4.** Teor e conteúdo de N na parte aérea e raiz de plantas de feijoeiro cultivar Ouro Negro aos 35 e 45 dias após transplante (DAT), sob distintas fontes de N, em casa de vegetação, crescidas em hidroponia. ..... 20
**Tabela 5.** Razão raiz: parte aérea, massa unitária de nódulos e diâmetro de nódulos de plantas de feijoeiro cultivar Ouro Negro sob distintas épocas de aplicação de N, em cinco épocas de coleta (em dias após transplante – DAT), crescidas em hidroponia. ..... 24
**Tabela 6.** Teor e conteúdo de N na parte aérea e raiz de plantas de feijoeiro cultivar Ouro Negro aos 35 e 45 dias após transplante (DAT), sob distintas épocas de aplicação de N, em hidroponia. ..... 24
**Tabela 7.** Algumas características das cultivares avaliadas nos experimentos de campo ..... 30
**Tabela 8.** Classificação morfológica e contagem da população nativa de rizóbios das áreas destinadas ao plantio dos experimentos conduzidos em Rio das Ostras - RJ, Santo Antônio de Goiás - GO, Macaé - RJ e Seropédica - RJ. ..... 34
**Tabela 9.** Resultado das análises químicas do solo (0-20 cm) das áreas destinadas ao plantio dos experimentos conduzidos em Rio das Ostras - RJ, Santo Antônio do Goiás -GO, Macaé - RJ e Seropédica - RJ. ..... 34
**Tabela 10.** Massa seca de parte aérea e massa seca de nódulos aos 35 dias após emergência, e produção de grãos na maturidade, das cultivares de feijoeiro Marfim, Notável, Pérola e Ouro Negro, sob diferentes fontes de N em condições de campo no município de Rio das Ostras - RJ, em 2013. ..... 38
**Tabela 11.** Massa seca de nódulos aos 35 dias após emergência, número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de um grão e produção de grãos da cultivar Ouro Negro, sob diversas fontes e épocas de aplicação de N em condições de campo em Macaé - RJ ..... 39
**Tabela 12.** Massa seca de nódulos aos 35 dias após emergência, número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de um grão e produção de grãos das cultivares Ouro Negro e Pérola sob diversas fontes de N em condições de campo em Macaé - RJ, em 2013. ..... 40
**Tabela 13.** Massa seca de parte área e massa seca de nódulos aos 35 DAE da cultivar Ouro Negro sob diversas fontes e épocas de aplicação de N em condições de campo em Santo Antônio de Goiás - GO, em 2013 ..... 42
**Tabela 14.** Massa de parte aérea e massa seca de nódulos aos 35 dias após emergência das cultivares Ouro Negro e Pérola sob diversas fontes de N em condições de campo no município de Santo Antônio de Goiás - GO, em 2013. ..... 42
**Tabela 15.** Número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de um grão e produção de grãos da cultivar Ouro Negro sob diversas fontes e épocas de aplicação de N em condições de campo, em Santo Antônio de Goiás - GO, em 2013. ..... 44

**Tabela 16.** Número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de um grão e produção de grãos das cultivares Ouro Negro e Pérola sob diversas fontes de N em condições de campo, em Santo Antônio de Goiás - GO, em 2013. ..... 45
**Tabela 17.** Massa seca de caule, folha, vagem e parte aérea da cultivar Ouro Negro sob distintas fontes e épocas de aplicação de N, em três épocas de coeltas (em dias após emergência – DAE), sob condições de campo em Seropédica – RJ, em 2014. ..... 47
**Tabela 18.** Massa seca de nódulos e massa seca de raiz da cultivar Ouro Negro sob distintas fontes e épocas de aplicação de N, em três épocas de coletas (em dias após emergência – DAE), sob condições de campo em Seropédica – RJ, em 2014. ..... 48
**Tabela 19.** Número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de um grão e produção de grãos da cultivar Ouro Negro sob distintas fontes e épocas de aplicação de N, sob condições de campo em Seropédica – RJ. ..... 49
**Tabela 20.** Valores de quadrado médio da análise de variância de biomassa do experimento Ontogenia da nodulação sob inoculação. ..... 59
**Tabela 21.** Valores de quadrado médio da análise de variância do teor e conteúdo de N na parte aérea e na raiz no experimento Ontogenia da nodulação sob inoculação ..... 61
**Tabela 22.**Valores de quadrado médio da análise de variância de massa de parte aérea, raiz, nódulos, número de nódulos, diâmetro de nódulos, massa unitária de nódulos, razão raiz: parte aérea e atividade da nitrogenase aos 11, 15 e 25 DAT do experimento Ontogenia da nodulação e sob diferentes fontes de N. ..... 62
**Tabela 23.** Valores de quadrado médio da análise de variância de massa de parte aérea, raiz, nódulos, número de nódulos, diâmetro de nódulos, massa unitária de nódulos, razão raiz: parte aérea e atividade da nitrogenase aos 35 e 45 DAT do experimento Ontogenia da nodulação e sob diferentes fontes de N. ..... 63
**Tabela 24.** Valores de quadrado médio da análise de variância do teor e conteúdo de N na parte aérea e raiz no experimento Ontogenia da nodulação sob diferentes fontes de N. 64
**Tabela 25.** Valores de quadrado médio da análise de variância de massa de parte aérea, raiz, nódulos, número de nódulos, diâmetro de nódulos, massa unitária de nódulos, razão raiz: parte aérea e atividade da nitrogenase do experimento Ontogenia da nodulação sob diferentes épocas de aplicação de N. ..... 65
**Tabela 26.** Valores de quadrado médio da análise de variância do teor e conteúdo de N na parte aérea e na raiz no experimento Ontogenia da nodulação sob diferentes épocas de aplicação de N. ..... 67
**Tabela 27.** Valores de quadrado médio da análise de variância de massa seca de parte aérea, massa seca de nódulos, produção de grãos (m²) e produção de grãos em 3m² da cultivar Ouro Negro do experimento de Rio das Ostras – RJ ..... 67
**Tabela 28.** Valores de quadrado médio da análise de variância de massa de parte aérea e nódulos das cultivares Ouro Negro e Pérola do experimento de Rio das Ostras –RJ..... 67
**Tabela 29.** Valores de quadrado médio da análise de variância do número de plantas, número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de um grão e produção de grãos (m²) e produção de grãos em 3m² da cultivar Ouro Negro do experimento de Rio das Ostras – RJ ..... 68
**Tabela 30.** Valores de quadrado médio da análise de variância dos dados de massa seca de nódulos, número de plantas, número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de um grão, produção por metro quadrado e produção em três metros quadrados no experimento realizado em Macaé - RJ. ..... 68
**Tabela 31.** Valores de quadrado médio da análise de variância dos dados da coleta de biomassa da cultivar Ouro Negro realizada aos 35 DAE no experimento realizado de Santo Antônio de Goiás - GO**.** ..... 68

**Tabela 32.** Valores de quadrado médio da análise de variância dos dados de produtividade da cultivar Ouro Negro do experimento realizado de Santo Antônio de Goiás - GO. .....69
**Tabela 33.** Valores de quadrado médio da análise de variância dos dados da coleta de biomassa das cultivares Ouro Negro e Pérola realizada aos 35 DAE no experimento realizado de Santo Antônio de Goiás - GO. .....69
**Tabela 34.** Valores de quadrado médio da análise de variância dos dados de produtividade das cultivares Ouro Negro e Pérola do experimento realizado de Santo Antônio de Goiás - GO. .....69
**Tabela 35.** Valores de quadrado médio da análise de variância conjunta das três coletas de biomassa do experimento realizado em Seropédica - RJ. .....70
**Tabela 36.** Valores de quadrado médio da análise de variância conjunta dos dados de massa seca de vagem, em duas coletas, do experimento realizado em Seropédica -RJ, .....70

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Condições de preparação das sementes para germinação e inoculação dos experimentos realizados em casa de vegetação: (A) sementes, após esterilização, postas em bandeja de plástico sob algodão e papel absorvente (B) plântulas germinadas, após 4 dias, e (C) inoculação das plântulas em placas de petri em fluxo. (Fonte: Próprio autor ) ..... 11

**Figura 2.**Visão geral do experimento Ontogenia da nodulação sob diferentes fontes de nitrogênio, sob condições de casa de vegetação, aos 4 (A) e 14(B) dias após transplante, na Embrapa Agrobiologia, Seropédica (RJ), em 2014.( Fonte: Próprio autor)..... 12

**Figura 3.** Etapas para o processamento de imagens para a estimativa do diâmetro e do número de nódulos de feijoeiro por análise digital de imagens pelo software Imlab: (A) imagem original, (B) imagem em tons de cinza, (C) imagem após binarização e contraste (D) imagem após remoção de impurezas, (E) contagem do número de objetos e (F) resultado do processo de estimativa da área em pixel de cada objeto..... 13

**Figura 4.** Massa de parte aérea (A), massa de raiz (B), massa de nódulos (C) e número de nódulos (D) de plantas de feijoeiro cultivar Ouro Negro em seis épocas de coleta, sob duas fontes de N: inoculação com rizóbio e inoculação mais aplicação de N mineral. Barras verticais representam a diferença mínima significativa (Ducan 5%) e comparam os tratamentos dentre de cada época de coleta..... 15

**Figura 5.** Massa seca de parte aérea (A), massa seca de raiz (B), massa seca de nódulos (C), número de nódulos (D) e atividade da nitrogenase (E) de plantas de feijoeiro cultivar Ouro Negro submetido a diferentes fontes de N (inoculação com rizóbio, inoculação mais aplicação de N mineral, N mineral), em cinco épocas de coleta. Barras verticais representam a diferença mínima significativa (Ducan 5%) e comparam os tratamentos dentre de cada época de coleta. ..... 18

**Figura 6.** Massa seca de parte aérea (A), massa seca de raiz (B), massa seca de nódulos (C), número de nódulos (D), atividade da nitrogenase (E) de plantas de feijoeiro cultivar Ouro Negro sob diferentes épocas de aplicação de N, em cinco épocas de coleta. Barras verticais representam a diferença mínima significativa (Ducan 5%) e comparam tratamentos dentro de cada época de coleta. ..... 23

**Figura 7.** Visão geral do experimento em Cantagalo no município de Rio das Ostras, - RJ, em 2013 (Foto: Próprio autor). ..... 31

**Figura 8.** Visão geral do experimento em Santo Antonio do Goiás - GO, no campo experimental da Embrapa Arroz e Feijão, em 2013 (Foto: Próprio autor). ..... 32

**Figura 9.** Visão geral do experimento no município de Macaé - RJ, Fazenda Ilha da Saudade, em 2013 (Foto: Rosângela Straliotto). ..... 33

**Figura 10.** Visão geral do experimento em Seropédica - RJ, no período reprodutivo, no Campo Experimental da Embrapa Agrobiologia, em 2014. (Foto: Próprio autor)..... 33

**SUMÁRIO**

**1 INTRODUÇÃO GERAL ..... 1**
**2 REVISÃO DE LITERATURA ..... 3**
2.1 A cultura do Feijoeiro ..... 3
2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio em Feijoeiro ..... 3
2.3 Efeito do Nitrogênio na Fixação Biológica em Feijoeiro ..... 5
**3 CAPITULO I – ..... 6**
**ONTOGENIA DA NODULAÇÃO SOB DIFERENTES FONTES E ÉPOCAS DE APLICAÇÃO DE NITROGÊNIO EM CULTIVO HIDROPÔNICO ..... 6**
3.1 RESUMO ..... 7
3.2 ABSTRACT ..... 8
3.3 INTRODUÇÃO ..... 9
3.4 MATERIAL E MÉTODOS ..... 10
3.4.1 Delineamento experimental e condições de cultivo ..... 10
3.4.2 Coletas e determinações ..... 12
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 14
3.5.1 Ontogenia da nodulação sob inoculação ..... 14
3.5.2 Ontogenia da nodulação sob diferentes fontes de nitrogênio ..... 17
3.5.3 Ontogenia da nodulação sob diferentes épocas de aplicação de nitrogênio .. 21
3.6 CONCLUSÕES ..... 25
**4 CAPÍTULO II – ..... 26**
**RENDIMENTO DE GRÃOS DO FEIJOEIRO SOB INOCULAÇÃO E DIFERENTES ÉPOCAS DE APLICAÇÃO DE NITROGÊNIO ..... 26**
4.1 RESUMO ..... 27
4.2 ABSTRACT ..... 28
4.3 INTRODUÇÃO ..... 29
4.4 MATERIAL E MÉTODOS ..... 30
4.4.1 Delineamentos experimentais ..... 30
4.4.2 Condições de cultivo ..... 34
4.4.3 Contagem de rizóbio no solo ..... 35
4.4.4 Amostragens e avaliações ..... 35
4.4.5 Análise estatística ..... 36
4.5 RESULTADOS E DISCUSÃO ..... 37
4.5.1 Experimento em Rio das Ostras ..... 37
4.5.2 Experimento em Macaé ..... 38
4.5.3 Experimento em Santo Antônio de Goiás ..... 41
4.5.4 Experimento em Seropédica ..... 45
4.6 CONCLUSÕES ..... 50
**5 CONCLUSÕES GERAIS ..... 51**
**6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 52**
**7 ANEXOS ..... 59**

# 1 INTRODUÇÃO GERAL

A modernização da agricultura proporcionou um considerável aumento na produção agrícola nacional, incrementando a exportação e contribuindo para o crescimento da economia. Porém, veio acompanhada de mudanças socioambientais no cenário agrícola, beneficiando principalmente os setores voltados para exportação e causando a exclusão de vários agricultores (TEIXEIRA, 2005). Além da recuperação da qualidade ambiental, um dos grandes desafios da atualidade é garantir a produção de alimentos em quantidade satisfatória e de qualidade, com a exploração de forma racional dos recursos naturais.

Os fertilizantes nitrogenados estão entre os mais utilizados e são os que causam maior impacto ambiental. O N é o elemento mais dinâmico no sistema solo-planta, e perdas de 50% da dosagem aplicada podem ocorrer pelos processos de lixiviação, volatilização e desnitrificação (STEVENSON & COLE, 1999), provocando a poluição dos recursos hídricos e a liberação de óxido nitroso na atmosfera, um dos principais gases do efeito estufa. Além disto, a produção dos adubos nitrogenados também demanda alto consumo de combustíveis fósseis. A introdução do $N_2$ atmosférico via fixação biológica de nitrogênio, no circuito dos ciclos biogeoquímicos, tem frequentemente efeitos positivos no ambiente e na economia (STACEY et al., 1992).

No Brasil a produção de feijão comum é realizada por diversos tipos de produtores, em diversas regiões do país, utilizando diferentes níveis tecnológicos. Dentre estes produtores, a agricultura familiar é apontada como a grande responsável pela produção de feijão no país (MAPA, 2014; EMBRAPA, 2013). Porém a produtividade média da cultura é considerada baixa, e dentre os principais fatores limitantes da produtividade estão o baixo nível tecnológico empregado pelos produtores e o cultivo em solos de baixa fertilidade, particularmente pobres em N (CABALLERO et al., 1985; MERCANTE et al., 1999 apud PELEGRIN et al., 2009).

O N é o nutriente requerido em maior quantidade pela cultura do feijoeiro, devido ao seu ciclo curto e aos altos teores exportados pelos grãos, atingindo cerca de 50% do N absorvido pelas plantas (SANTOS & SILVA, 2002). A cultura do feijoeiro em simbiose com bactérias do grupo dos rizóbios é capaz de fixar o N atmosférico, porém essa simbiose não é suficiente para garantir toda a demanda da cultura, por este motivo a inoculação de sementes de feijão não é uma pratica difundida entre os produtores (EMBRAPA, 2005).

A presença ou ausência do N no solo afeta a simbiose diazotrófica de diversas formas no feijoeiro (PEREIRA, 1982). Doses altas de N aplicado ao solo têm efeito negativo na nodulação e na FBN em feijoeiro (MULLER & PEREIRA, 1995; GRAHAM, 1981; TSAI et al., 1993), porém alguns estudos (STRALIOTTO, 2000; SILVA et al., 2009; MOSTASSO et al., 2002) indicam que a utilização de doses de N de suplementação associadas à inoculação é uma alternativa viável para a produção satisfatória de grãos, podendo resultar em um menor custo de produção e diminuição de impactos ambientais. Assim, a prática de inoculação das sementes de feijoeiro, com eliminação total ou parcial da adubação nitrogenada seria uma boa estratégia para a redução dos impactos ambientais causados pelo uso contínuo de adubos nitrogenados. Contudo, ainda são necessários estudos a fim de estabelecer a melhor dosagem e a melhor época de aplicação do nutriente, que permitam um bom crescimento da cultura sem prejudicar o estabelecimento da nodulação e o funcionamento da simbiose.

Diante dos argumentos apresentados a hipótese deste trabalho é que teores elevados de N podem limitar o processo de nodulação e de fixação biológica de nitrogênio, porém, para cultivos mais produtivos de feijoeiro sob inoculação com rizóbios são necessárias adubações nitrogenadas complementares.

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito da época de aplicação do N na nodulação, crescimento e produção de grãos do feijoeiro.

O trabalho foi dividido em dois capítulos, sendo o primeiro intitulado - Ontogenia da nodulação sob diferentes épocas de aplicação de nitrogênio em cultivo hidropônico, que teve como objetivo caracterizar a nodulação e a fixação biologia de nitrogênio em feijoeiro, sob efeito de distintas fontes de N, com o auxilio de técnicas de análise digital de imagens, e identificar o efeito da época de aplicação do nitrogênio, e na fixação biológica de nitrogênio. O segundo capítulo, intitulado - Rendimento de grãos do feijoeiro sob inoculação e diferentes épocas de aplicação de nitrogênio, teve como objetivo avaliar, em condições de campo, o efeito da época de aplicação de N mineral, sobre o rendimento de grãos e os componentes de produção do feijoeiro em cultivo sob inoculação com rizóbios e com co-inoculação com bactérias promotoras de crescimento.

# 2 REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1 A cultura do Feijoeiro

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa com alto valor nutritivo, sendo rica em proteínas e fibras, além de sais minerais como o ferro, potássio, fósforo e cálcio. Por essas qualidades nutricionais, é uma ótima alternativa de fonte de proteínas naqueles locais onde alimentos de origem animal são caros. Na safra 2011/2012, foram produzidas no Brasil 3,73 milhões de toneladas de feijão, em uma área cultivada de 3,99 milhões de hectares, com uma produtividade média de 935 kg $ha^{-1}$, sendo que em alguns estados, onde se utilizam níveis tecnológicos elevados, a produtividade média superou 2000 kg $ha^{-1}$ (CONAB, 2012). A média nacional da produtividade da cultura é considerada baixa pelo potencial produtivo da espécie.

No Brasil, o feijão é um produto de importância econômica e social: 70% da população brasileira consome feijão diariamente, com uma média de consumo de 16,5 kg per capita por ano (MAPA, 2012), sendo o país o maior produtor e consumidor do grão (CONAB, 2012). A produção do feijão sempre esteve concentrada em pequenos produtores, a agricultura familiar é responsável por 70% da produção do feijão (IBGE, 2006), mas nos últimos 20 anos produtores que fazem uso de tecnologias mais avançadas estão buscando o cultivo dessa leguminosa. Os riscos inerentes à produção de feijão, baixos rendimentos e a instabilidade dos preços, aliados a dificuldades de mecanização, têm contribuído para que a produção de feijão se concentre nas pequenas propriedades rurais. A produção nessas propriedades implica, geralmente, em uso contínuo da terra, exigindo a aplicação de recursos nem sempre disponíveis aos pequenos produtores. A baixa disponibilidade de nutrientes, especialmente N e P, tem sido apontada como um dos principais fatores limitantes à produtividade do feijoeiro em solos agrícolas tropicais (KUBOTA, 2006).

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

Embora haja variação na duração do ciclo da cultura em relação ao hábito de crescimento, as variedades cultivadas de feijão mais comuns apresentam um ciclo com duração ao redor de 90 dias (ALMEIDA & BULISANI, 1980), iniciando o período de florescimento, normalmente, a partir dos 40-45 DAE, para depois entrarem nas fases de granação e de maturação.

## 2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio em Feijoeiro

O feijoeiro, quando em simbiose com bactérias do grupos dos rizóbios, é capaz de aproveitar o N atmosférico, contribuindo para a sua nutrição nitrogenada, porém, tem sido considerado uma espécie de baixa capacidade de FBN, em comparação com outras leguminosas de grão. Isto tem sido atribuído às condições de baixa fertilidade do solo onde muitas vezes o cultivo é mantido nas regiões tropicais, à suscetibilidade da espécie a estresses

nutricionais e ambientais, ao curto período vegetativo disponível para a nodulação e FBN, à sensibilidade da simbiose ao nitrato do solo, e à competição das estirpes nativas do solo pouco eficientes (HUNGRIA & VARGAS, 2000; LEIDI & RODRÍGUEZ-NAVARRO, 2000; GRAHAM et al., 2003).

No desenvolvimento inicial da planta, o feijoeiro utiliza a reserva de nutrientes presentes nos cotilédones até por volta de 12 DAE (HUNGRIA et al., 1991), considerado o período médio para o esgotamento das reservas cotiledonares. Entretanto, o feijoeiro não apresenta sincronização entre o esgotamento das reservas nitrogenadas cotiledonares e a formação de nódulos e a fixação efetiva de N, o que culmina em um estresse nutricional por volta dos 16 a 20 DAE, até as plantas formarem nódulos efetivos (PEÑA-CABRIALES et al., 1993). No intervalo de tempo entre o fim das reservas cotiledonares e a formação dos nódulos, ocorre um amarelecimento inicial das folhas, típico da deficiência desse nutriente, por volta dos 15 a 17 dias após a emergência este amarelecimento desaparece, indicando que o processo de inoculação está ocorrendo a contento (MERCANTE et al., 1992).

Além do formação tardia, outro fator que restringe a eficiência do processo de FBN na cultura é a senescência precoce dos nódulos, pois logo após o florescimento ocorre queda da atividade da nitrogenase (FRANCO et al., 1979). No período de formação das vagens há uma grande demanda pelo N, com a FBN limitada e sem acesso a outra fonte de N, o déficit do nutriente pode acarretar em diminuição de produtividade. Por consequência da baixa eficiência da FBN na cultura, a prática de inoculação de sementes com bactérias do grupo dos rizóbios ainda é pouco utilizada, tanto pelos pequenos quanto pelos grandes produtores.

O processo de domesticação e seleção de cultivares de feijão em relação a determinadas características desejáveis do ponto de vista comercial, pode ter sido acompanhado de um processo indireto de seleção negativa em relação à capacidade de nodulação, alterando o equilíbrio simbiótico estabelecido pela seleção natural no processo evolutivo do sistema rizóbios-feijão (MYRTTON, 1984).

A diversificada população de rizóbios nativos nos solos, que embora formem nódulos e contribuam com a FBN, dificultam a introdução de estirpes mais eficientes e acarretam variabilidade da resposta à inoculação (MERCANTE et al., 1992; FERREIRA et al., 2000), sendo este um dos fatores mais limitantes da inoculação em campo. Assim, a seleção deve indicar estirpes eficientes e competitivas (FERNANDES JÚNIOR & REIS, 2008). Além da competitividade das estirpes nativas, outro fator limitante é promiscuidade das plantas de feijoeiro, que são capazes de nodular com diversos rizóbios nativos do solo (STRALIOTTO et al., 2002). BRITO (2013) obteve resultados de massa seca de nódulos na testemunha absoluta (sem inoculação e sem aplicação de N mineral) superior aos tratamentos inoculados com as estirpes recomendadas para o feijoeiro, nos municípios de Macaé e Rio das Ostras.

Entretanto, o feijoeiro pode se beneficiar da FBN, com produtividades de grãos superiores a 2.000 kg $ha^{-1}$ em cultivos com uso de inoculação (HUNGRIA et al., 2000; HUNGRIA et al., 2003), utilizando somente a prática da inoculação já foram observados rendimentos de grãos semelhante estatisticamente ao da testemunha nitrogenada (FERREIRA et al., 2009; BARROS, 2013; BRITO, 2013; OLIVEIRA, 2013). No feijoeiro, têm sido reportadas contribuições da FBN em condições de campo variando de 4 a 164 Kg $ha^{-1}$ a cada cultivo (MOREIRA & SIQUEIRA 2006), e entre 25 e 65 kg N $ha^{-1}$ (RUSCHEL et al., 1982) ou 40 a 125 kg N $ha^{-1}$ (RENNIE & KEMP, 1983) na parte aérea na maturação fisiológica, ou de 21 a 44 kg N $ha^{-1}$nos grãos (PEREIRA et al., 1989).

Mesmo que a FBN não seja suficiente para suprir todo o N requerido para o desenvolvimento do feijoeiro, e seja necessária a realização de adubações nitrogenadas complementares, a redução da necessidade de adubação na cultura pode representar um ganho ambiental e econômico. PELEGRIN et al. (2009) verificaram que a adubação com 20 kg $ha^{-1}$ de N, em conjunto com a inoculação de rizóbio no plantio, possibilitou a obtenção de

rendimento de grãos e proporcionou acréscimo de receita líquida na cultura de feijoeiro equivalente à aplicação de até 160 kg $ha^{-1}$ de N. BARROS (2013) obteve rendimento de grãos utilizando a inoculação seguida da aplicação de 20 Kg de N no plantio superior ao tratamento apenas adubado no plantio, com a mesma dosagem, tanto na época das águas quanto na época da seca, em Seropédica. Porém BRITO (2013), em Macaé e Rio das Ostras, obteve melhores resultados quando a adubação complementar de N mineral foi feita em cobertura.

## 2.3 Efeito do Nitrogênio na Fixação Biológica em Feijoeiro

O N tem sido considerado um dos principais nutrientes a limitar o crescimento e a produtividade dos vegetais, devido à sua intensa participação no metabolismo vegetal, sendo constituinte de várias estruturas fundamentais como proteínas, enzimas e cloroplastos (FIDELIS et al., 2007). O N é o nutriente absorvido em maior quantidade pelo feijoeiro: uma população de 250.000 plantas retém aproximadamente 101 kg $ha^{-1}$ de N para a produção de 1.100 kg de grãos, e para a produção de 4.000 kg $ha^{-1}$ de fitomassa seca total, a cultura de feijão absorve 138 kg $ha^{-1}$ de N (CABALLERO et al., 1985).

Em feijoeiro, a produtividade e a eficiência de uso de N diferem com o manejo de fertilizante nitrogenado (SANTOS & FAGERIA, 2008). Geralmente, é feito parcelamento da adubação nitrogenada, uma vez que a planta apresenta pouca exigência do nutriente na fase inicial. Além disso, a aplicação de N mineral em solos tropicais apresenta baixa eficiência de recuperação pelas plantas, sendo normalmente inferior a 50%, podendo, em solos arenosos, atingir entre 5% e 10% devido às grandes perdas por lixiviação e volatilização (OSINAME et al., 1983; DUQUE et al., 1985). Assim, utiliza-se apenas uma fração da dose recomendada, com a posterior aplicação em cobertura, nos períodos de maior exigência.

A baixa eficiência do uso de N, além de aumentar o custo da produção, também causa problemas de poluição ambiental. O alto custo dos fertilizantes nitrogenados desperta o interesse para o desenvolvimento de técnicas de manejo, que possam maximizar o uso eficiente desse nutriente pelas culturas (FAGERIA & BALIGAR, 2005). A inoculação do feijoeiro é uma técnica difundida pela pesquisa, mas pouco utilizada pelos agricultores. Entretanto, com o baixo poder aquisitivo da maioria dos agricultores que cultivam o feijão, e com a baixa produtividade média, a utilização desta técnica de baixo custo pode ser uma excelente alternativa para aumento da produtividade (ARAÚJO et al., 2007).

Devido à baixa eficiência do processo de FBN pelo feijoeiro, a suplementação com adubo nitrogenado é uma prática que pode trazer resultados significativos para a cultura. Porém, quando utilizar-se desta prática, esta deve ser feita com cautela, pois doses em excesso tanto na semeadura como em cobertura podem causar diminuição na eficiência simbiótica (FERREIRA et al., 2000; VENTURINI et al., 2002). Em pequenas quantidades, na semeadura, o N permite um aumento no crescimento dos nódulos e maior FBN, sendo que o teor muito baixo pode até ser limitante à atividade simbiótica (HUNGRIA et al., 2003).

A adubação com 40 kg N $ha^{-1}$ reduziu em média em 10 % a percentagem de N derivado da atmosfera em plantas de feijoeiro, mas com marcadas variações entre genótipos, indicando a possibilidade de melhoramento para aumentar a eficiência da FBN sob adubação mineral (RENNIE & KEMP, 1983). BARROS et al. (2013) relataram que a inoculação de rizóbios no plantio pode substituir a adubação nitrogenada com 20 kg $ha^{-1}$ de N na semeadura junto a uma adubação de cobertura com 45 kg $ha^{-1}$ de N, sem perda de produtividade e que a adubação com 20 kg $ha^{-1}$ de N no plantio, junto com a inoculação, não inibe a nodulação da cultura do feijoeiro, acrescentando maior massa seca de parte aérea e de produtividade.

Ainda são necessários estudos para a determinação da dosagem ideal assim como a melhor época de aplicação do adubo nitrogenado para que haja aproveitamento da FBN com produtividade satisfatória em cultivos de feijão.

# 3 CAPITULO I –

# ONTOGENIA DA NODULAÇÃO SOB DIFERENTES FONTES E ÉPOCAS DE APLICAÇÃO DE NITROGÊNIO EM CULTIVO HIDROPÔNICO

## 3.1 RESUMO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) é considerado uma planta de baixa capacidade de fixação biológica de N (FBN) quando comparada a outras leguminosas de grão, e doses suplementares de N podem estimular a FBN na cultura. Foram conduzidos três experimentos em condições de casa de vegetação em hidroponia para a avaliação da ontogenia da nodulação e da FBN no feijoeiro sob diferentes fontes e diferentes épocas de aplicação de N. O primeiro experimento tinha duas fontes de N (inoculação e inoculação com aplicação de N mineral), o segundo três fontes de N (inoculação, aplicação de N mineral e inoculação com aplicação de N mineral) e o terceiro com quatro épocas distintas de aplicação de N (inoculação sem N mineral, inoculação com aplicação de N mineral durante todo o experimento, inoculação com aplicação de N mineral até 15 dias após transplante - DAT, inoculação com aplicação de N após 15 DAT). As sementes foram pré-germinadas e as radículas foram inoculadas com as estirpes comerciais de rizóbio indicadas para a cultura, e as plantas foram transplantadas para vasos com 1 L de solução nutritiva, que foi trocada semanalmente. Nas coletas as plantas eram separadas em raízes e parte aérea. No sistema radicular foi realizada análise de redução de acetileno. Foram avaliados a biomassa de parte aérea, raiz e nódulos, e o diâmetro e número de nódulos através de análise digital de imagens. Apenas a inoculação não foi capaz de garantir produção de biomassa de parte aérea similar às plantas que receberam adubação nitrogenada, porém a aplicação suplementar de N foi capaz de garantir uma produção satisfatória. O N aplicado até os 15 DAT estimulou a nodulação e a atividade da nitrogenase, que foram superiores ao tratamento apenas inoculado, mas o N aplicado após os 15 DAT inibiu a atividade da nitrogenase, porém a nodulação não foi inibida. Os resultados indicam que o N pode ser aplicado de maneira suplementar no início do desenvolvimento do feijoeiro, sem prejudicar a nodulação e o processo de FBN.

## 3.2 ABSTRACT

The common bean (*Phaseolus vulgaris*) is considered a plant of low capacity of biological nitrogen fixation (BNF) when compared to other grain legumes, and supplemental N may stimulate the FBN in the crop. Three experiments were conducted at greenhouse conditions under hydroponics for evaluating the ontogeny of nodulation and BNF in bean plants at different sources and periods of N application. The first experiment had two sources of N (inoculation and inoculation with mineral N application), the second experiment three sources of N (inoculation, mineral N application, and inoculation with N application) and the third experiment had four different periods of N application (inoculation without N, inoculation with mineral N application throughout the experiment, inoculation with mineral N application until 15 days after transplanting - DAT, inoculation with N application after 15 DAT). Seeds were pre-germinated and the radicles were inoculated with commercial rhizobia strains for the crop. Plants were transplanted to 1 L pots with nutrient solution that was exchanged weekly. At samplings, plants were separated into roots and shoots. The acetylene reduction analysis was performed in the root system. Shoot, root, and nodule biomass were evaluated, and nodule diameter and number were measured by digital image analysis. Only the inoculation was not able to guarantee shoot biomass production similar to plants that received N fertilization, but the supplemental N application was able to ensure satisfactory biomass production. The N applied until 15 DAT stimulated the nodulation and nitrogenase activity, which were superior to the treatment only inoculated, but the N applied after 15 DAT inhibited nitrogenase activity without affecting nodulation. The results indicate that supplemental N can be applied at the beginning of common bean development without limiting the nodulation and the process of BNF.

## 3.3 INTRODUÇÃO

As bactérias do grupo dos rizóbios são capazes de associar-se simbioticamente com as espécies de plantas leguminosas, formando estruturas altamente especializadas, os nódulos, onde ocorre a redução do $N_2$ atmosférico. Este processo é complexo e envolve mudanças fisiológicas e morfológicas tanto na célula hospedeira como na bactéria (HUNGRIA, 1994), e é modulado por uma intensa troca de sinais moleculares, refletindo em diferente resposta em relação à faixa hospedeira, especificidade e eficiência simbiótica (HARTWIG, 1998). O desenvolvimento da simbiose necessita de interação precisa entre planta hospedeira e bactéria. O controle recíproco pelos dois parceiros permite que ocorra o processo simbiótico de uma maneira regulada, levando a uma associação mutuamente benéfica na qual o rizóbio fixa o nitrogênio e a planta gera os fotossintatos necessários (STRALIOTTO & TEIXEIRA, 2000).

Dentre as leguminosas agrícolas, o feijão é uma das culturas que apresenta menor potencial de FBN. Dentre os fatores limitantes à simbiose está o processo de nodulação, que ocorre de forma tardia, não conciliando com o período de esgotamento das reservas cotiledonares, cominando em um período com déficit de N no início do ciclo, denominado de "fome de N", que pode prejudicar o desenvolvimento das plantas (RIGAUD, 1981). A senescência precoce dos nódulos é outro fator que restringe a otimização do processo de FBN da cultura, pois logo após o florescimento ocorre uma queda da atividade da nitrogenase (ALCANTARA et al., 2009). Assim não há um adequado aproveitamento do N atmosférico durante todo o ciclo da cultura e são indicadas adubações de N na forma suplementar. Porém, a adubação nitrogenada deve ser feita com cautela, pois o N pode interferir de forma negativa no processo da nodulação e da FBN e o feijoeiro nodulado é considerado sensível ao N mineral (HUNGRIA et al., 1985).

Outro fator que limita a FBN na cultura do feijoeiro é a promiscuidade da cultura, que possui uma grande faixa de hospedeiro capaz de infectar as raízes (STRALIOTTO et al., 2002), o que limita o entendimento do processo de infecção das estirpes inoculadas, uma vez que as estirpes nativas do solo são muitas vezes mais competitivas. Logo, estudos em condições controladas são essenciais à pesquisa, assim como o conhecimento do processo de nodulação e por consequência da FBN.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a ontogenia da nodulação do feijoeiro sob diversas fontes de N e sob distintas épocas de aplicação de N mineral em feijoeiro, sob condições de hidroponia em casa de vegetação.

## 3.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.4.1 Delineamento experimental e condições de cultivo

Foram conduzidos três experimentos em condições de solução nutritiva em casa de vegetação, na Embrapa Agrobiologia, em Seropédica, RJ.

O primeiro experimento, intitulado - Ontogenia da nodulação sob inoculação, foi conduzido entre abril e junho de 2013, com delineamento experimental em blocos ao acaso, em arranjo fatorial 2x6 com cinco repetições, entre duas fontes de N e seis épocas de coleta, totalizando 60 vasos.

As duas fontes de N avaliadas foram inoculação com rizóbio e inoculação com rizóbio mais aplicação de N mineral, sendo efetuadas seis coletas das plantas, aos 11, 14, 21, 28, 35 e 42 dias após transplante (DAT), O segundo experimento, intitulado Ontogenia da nodulação sob diferentes fontes de nitrogênio, foi conduzido entre outubro e novembro de 2014, com delineamento experimental em blocos ao acaso, em arranjo fatorial 3x5 com cinco repetições, entre três fontes de N e cinco épocas de coleta, totalizando 75 vasos. As três fontes de N avaliadas foram: inoculação com rizóbio, aplicação N mineral, inoculação com rizóbio e aplicação de N mineral, com cinco coletas das plantas, aos 11, 15, 25, 35 e 45 DAT.

O primeiro e segundo experimentos tiveram como objetivo avaliar a ontogenia da nodulação sob diversas fontes de N e no segundo experimento o comportamento da atividade da nitrogenase sob as diversas fontes de N testadas. O terceiro experimento, Ontogenia da nodulação sob diferentes épocas de aplicação de nitrogênio, com o objetivo de avaliar a ontogenia da nodulação e o comportamento da atividade da nitrogenase sob distintas épocas de aplicação de N, foi conduzido entre outubro e novembro de 2013. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, sendo um fatorial incompleto para as duas primeiras coletas, com dois tratamentos, controle com inoculação sem N mineral e inoculação mais N mineral durante todo o experimento, e um fatorial completo, 4 x 5, nas três ultimas coletas, com quatro épocas de aplicação de N e quatro épocas de coleta, totalizando 80 vasos. As quatro épocas de aplicação de N avaliadas foram: controle com inoculação sem N mineral, inoculação com aplicação de N mineral durante todo o experimento, inoculação com aplicação de N mineral no momento da transferência até os 15 dias após a transferência (DAT), inoculação com aplicação de N após os 15 DAT. Foram efetuadas cinco coletas das plantas, aos 14, 21, 28, 35 e 42 DAT.

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

Após a emissão da radícula, as plântulas foram inoculadas por meio da submersão do sistema radicular no inoculante líquido em placa de petri por 30 min. Após a inoculação, os caules das plântulas foram envolvidos por algodão para o cultivo em solução nutritiva.

As sementes foram inoculadas com o coquetel composto pelas estirpes comerciais BR 322 (CIAT 899), BR 520 (SEMIA 4080) e BR 534 (CPAC H 12) de *Rhizobium tropici*, sendo o inoculante preparado no laboratório de meio de cultura da Embrapa Agrobiologia. As estirpes foram crescidas inicialmente em placas de petri contendo meio YMA sólido (VINCENT, 1970) para verificação da pureza. Posteriormente, as colônias isoladas foram transferidas para erlenmeyer contendo meio YMA líquido, onde permaneceram por três dias em agitador a 30 °C e 150 rpm.

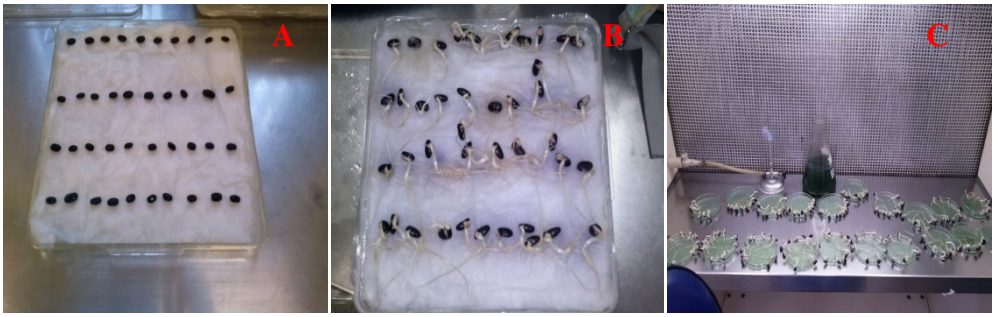



**Figura 1.** Condições de preparação das sementes para germinação e inoculação dos experimentos realizados em casa de vegetação: (A) sementes, após esterilização, postas em bandeja de plástico sob algodão e papel absorvente (B) plântulas germinadas, após 4 dias, e (C) inoculação das plântulas em placas de petri em fluxo. (Fonte: Próprio autor )

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

As plantas foram cultivadas em vasos com capacidade de 1 L abastecidos de solução nutritiva, descrita por ARAÚJO et al. (2008), a qual continha 1,65 mM de $CaCl_2$, 1,0 mM de $MgSO_4$, 0,25 mM de $KH_2PO_4$, 0,7 mM de $K_2SO_4$, 8,0 µM de Fe-EDTA, 6 µM de $MnSO_4.H_2O$, 4 µM de $H_3BO_3$, 2 µM de $ZnSO_4.7H2O$, 1 µM de $CuSO_4.5H2O$, 0,2 µM de $Na_2MoO_4.2H_2O$. Cada vaso recebeu 1 g de $CaCO_3$ para tamponar a solução para pH em torno de 7. Foram colocadas 3 plantas por vaso, e aos 9 DAT foi realizado o desbaste, permanecendo 2 plantas por vaso. As plantas foram transferidas para os vasos após a germinação e inoculação e permaneceram presas em placas de isopor sobre os vasos, deixando as raízes em contato com a solução. Nos tratamentos que receberam N mineral, o N foi adicionado na solução nutritiva, na dose de 2 mmol $L^{-1}$ como ureia, a cada troca de solução, que era realizada semanalmente. A aeração dos vasos plásticos foi realizada por bombeamento de ar com compressor de ar BOYU ®de 0,2 HP de potência acoplada a tubos de silicone de 25 mm ligados a cada vaso, com pausa de aeração por 5 min a cada 5 horas.

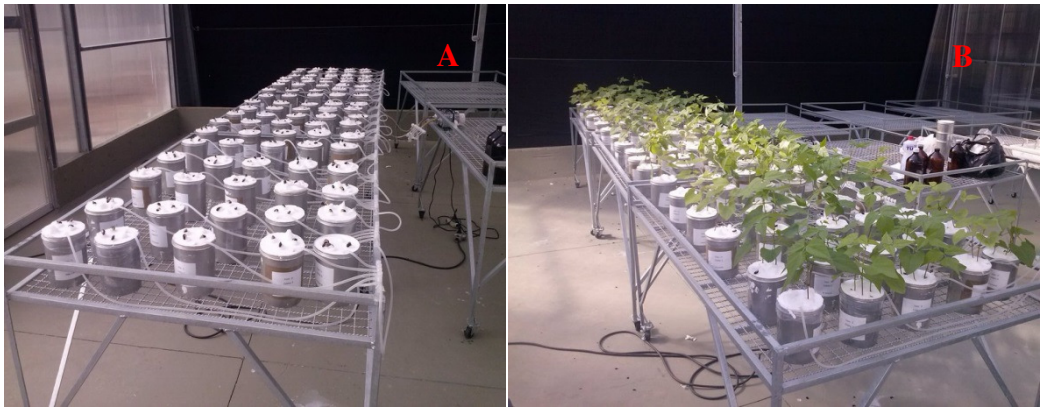



**Figura 2.**Visão geral do experimento Ontogenia da nodulação sob diferentes fontes de nitrogênio, sob condições de casa de vegetação, aos 4 (A) e 14(B) dias após transplante, na Embrapa Agrobiologia, Seropédica (RJ), em 2014.( Fonte: Próprio autor)

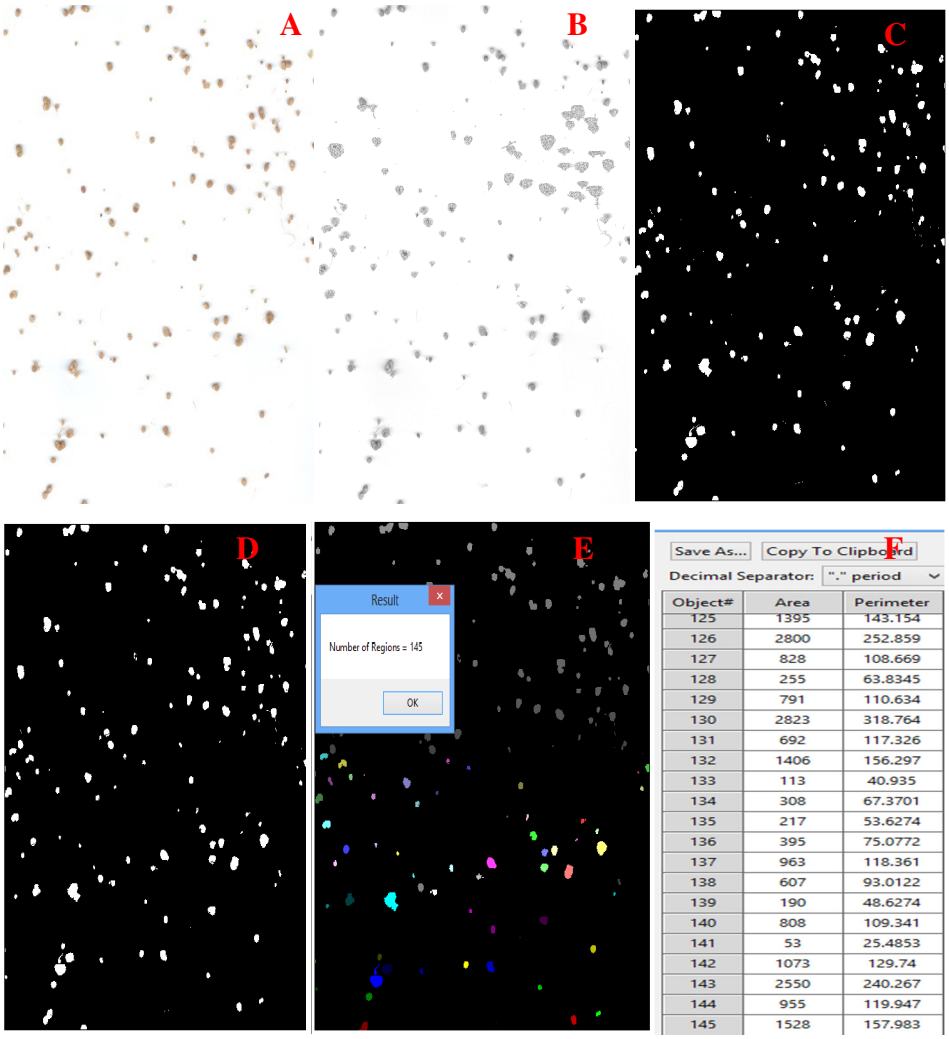
### 3.4.2 Coletas e determinações

As coletas foram efetuadas no experimento Ontogenia da nodulação sob inoculação aos 11, 14, 21, 28, 35 e 42 DAT, no experimento Ontogenia da nodulação sob diferentes fontes de nitrogênio aos 11, 15, 25, 35 e 45 DAT e no experimento Ontogenia da nodulação sob diferentes épocas de aplicação de nitrogênio aos 14, 21, 28, 35 e 42 DAT. Em todos os experimentos as coletas foram realizadas nos DAT que correspondia aos estágios fenológicos V3, V4, R5, R6 e R8, respectivamente.

No experimento Ontogenia da nodulação sob diversas fontes de N e no experimento Ontogenia da nodulação sob distintas épocas de aplicação de N, em todas as coletas, as plantas foram cortadas na altura da inserção do sistema radicular, e as raízes foram acondicionadas em erlenmeyes com 250 mL para determinação da atividade da nitrogenase por meio da redução de acetileno. Nos erlenmeyers hermeticamente fechados, foram retirados 25 mL do ar contido em seu interior, aplicando em seguida 25 mL de acetileno, usando uma seringa de injeção. Após a incubação por 30 min, foram retiradas 20 mL da solução gasosa que foi armazenada em frascos "vaconteiner", no momento da leitura eram retirados 0,5 mL para leitura da concentração de etileno em cromatografia gasosa (HARDY et al., 1973) no laboratório de Ciclagem de Nutrientes na Embrapa Agrobiologia. Foi utilizado o cromatógrafo a gás modelo Perkin-Elmer L Auto System e Integrator PE Nelson Modelo 1022, com Detector de Ionização de Chama (FID - Flame Ionization Detector) e coluna cromatográfica Poropak N. A curva padrão de etileno foi construída injetando-se no cromatógrafo o etileno nas concentrações de 6, 15 e 30 μL $mL^{-1}$. Os valores de etileno produzido foram convertidos para mmol $C_2H_4$ $h^{-1}$ $planta^{-1}$, considerados como a atividade da nitrogenase.

Em todos os experimentos, os nódulos foram destacados e colocadas em scanner de mesa EPSON® NX200, e a imagem foi digitalizada em tons de cinza (cinzento a 8 bits) e 200 dpi de resolução. Posteriormente, cada imagem foi submetida a contraste e binarização, sendo removidos elementos que foram considerados como impurezas, por meio do programa ImLab versão 2.3 (SCURI, 2010), que efetua a contagem dos objetos na imagem e fornece o número de pixels presente em cada objeto. Após a contagem do número de pixels no Imlab, os dados foram transferidos ao Excel, onde foi determinada a área de cada objeto através da equação: (número de pixels) × (25,4/200)^2/100, na qual cada pixel possuía 25,4/200 mm de largura, de acordo com a resolução da imagem de 200 dpi (dots per inch, ou pixels por polegada)

obtida quando da digitalização. Com a área de cada objeto detectado na imagem, calculou-se seu diâmetro considerando-o como um círculo.




| Object# | Area | Perimeter |
|---|---|---|
| 125 | 1395 | 143.154 |
| 126 | 2800 | 252.859 |
| 127 | 828 | 108.669 |
| 128 | 255 | 63.8345 |
| 129 | 791 | 110.634 |
| 130 | 2823 | 318.764 |
| 131 | 692 | 117.326 |
| 132 | 1406 | 156.297 |
| 133 | 113 | 40.935 |
| 134 | 308 | 67.3701 |
| 135 | 217 | 53.6274 |
| 136 | 395 | 75.0772 |
| 137 | 963 | 118.361 |
| 138 | 607 | 93.0122 |
| 139 | 190 | 48.6274 |
| 140 | 808 | 109.341 |
| 141 | 53 | 25.4853 |
| 142 | 1073 | 129.74 |
| 143 | 2550 | 240.267 |
| 144 | 955 | 119.947 |
| 145 | 1528 | 157.983 |

**Figura 3.** Etapas para o processamento de imagens para a estimativa do diâmetro e do número de nódulos de feijoeiro por análise digital de imagens pelo software Imlab: (A) imagem original, (B) imagem em tons de cinza, (C) imagem após binarização e contraste (D) imagem após remoção de impurezas, (E) contagem do número de objetos e (F) resultado do processo de estimativa da área em pixel de cada objeto.

Os nódulos, raízes e parte aérea foram postos em sacos de papel e secos em estufa de circulação de ar para determinação da massa seca.

A parte aérea e as raízes das duas últimas coletas foram moídas e o teor de N foi determinado pelo método semimicro Kjeldahl (MALAVOLTA et al., 1997). O conteúdo de N foi obtido pelo produto entre o teor e a massa seca.

Os dados foram submetidos à análise de variância para cada época de coleta separadamente, considerando um único fator (fontes de N), comparando-se as médias pelo teste de Duncan a 5%, com exceção do primeiro experimento, onde foram comparados apenas dois tratamentos, sendo utilizado o teste F a 5% de significância. Para representação das figuras, foi calculada a diferença mínima significativa entre fontes de N, dentro de cada época de coleta, pelo teste de Duncan a 5%.

## 3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.5.1 Ontogenia da nodulação sob inoculação

Em todo o período experimental, a menor produção de massa de parte aérea foi observada no tratamento que recebeu apenas inoculação (Figura 4A). O tratamento inoculado apresentou um pequeno incremento de massa de parte aérea até os 20 DAT, ao passo que o tratamento inoculado com aplicação de N apresentou crescimento de massa de parte aérea entre os 15 e 25 DAT, porém entre os 25 e 30 DAT houve pouco incremento. Os resultados indicam que apenas a simbiose com rizóbios não é suficiente para garantir elevada produção de biomassa de parte aérea em estádios iniciais de crescimento do feijoeiro e a adição de N mineral pode suprir o déficit do nutriente, reduzindo os efeitos do período de "fome de N". A massa radicular (Figura 4B) começou a aumentar a partir dos 15 DAT no tratamento inoculado com aplicação N, ao posso que no tratamento inoculado o valor de massa de raiz permaneceu relativamente constante até os 20 DAT. Aos 10 e 15 DAT não houve diferença estatística entre os tratamentos, mas a partir dos 15 DAT o tratamento inoculado com aplicação de N apresentou maior massa radicular, com exceção aos 30 DAT quando não houve diferença estatística entre os tratamentos.

Na razão raiz: parte aérea (Tabela 1), aos 11 DAT não houve diferença entre os tratamentos, porém aos 14, 21, 28 e 35 DAT o tratamento inoculado apresentou maior relação raiz: parte aérea, ou seja, na ausência do N mineral a planta investiu mais no desenvolvimento do sistema radicular, ao passo que com N na forma mineral as plantas investiram mais na produção de parte aérea. Portanto, quando um recurso é limitante, neste caso o N para a continuidade do ciclo de crescimento, a planta por estratégia de sobrevivência, estimula a produção de raiz a procura do elemento em áreas mais distantes. Aos 42 DAT não houve diferença entre tratamentos na razão raiz: parte aérea.

A massa de nódulos, em ambos os tratamentos, cresceu ao longo do período experimental, porém o tratamento inoculado apresentou massa de nódulos relativamente constante entre os 30 e 40 DAT (Figura 4C). O tratamento inoculado apresentou maior massa de nódulos, com exceção aos 20 e 40 DAT, no qual não houve diferença significativa entre os tratamentos. O tratamento inoculado também apresentou maior número de nódulos quando comparado ao tratamento inoculado com aplicação de N, porém aos 10 e 40 DAT não houve diferença entre os tratamentos (Figura 4D). A aplicação de N mineral não inibiu a formação de nódulos e não houve diferença entre os tratamentos na massa unitária e diâmetro dos nódulos (Tabela 1).

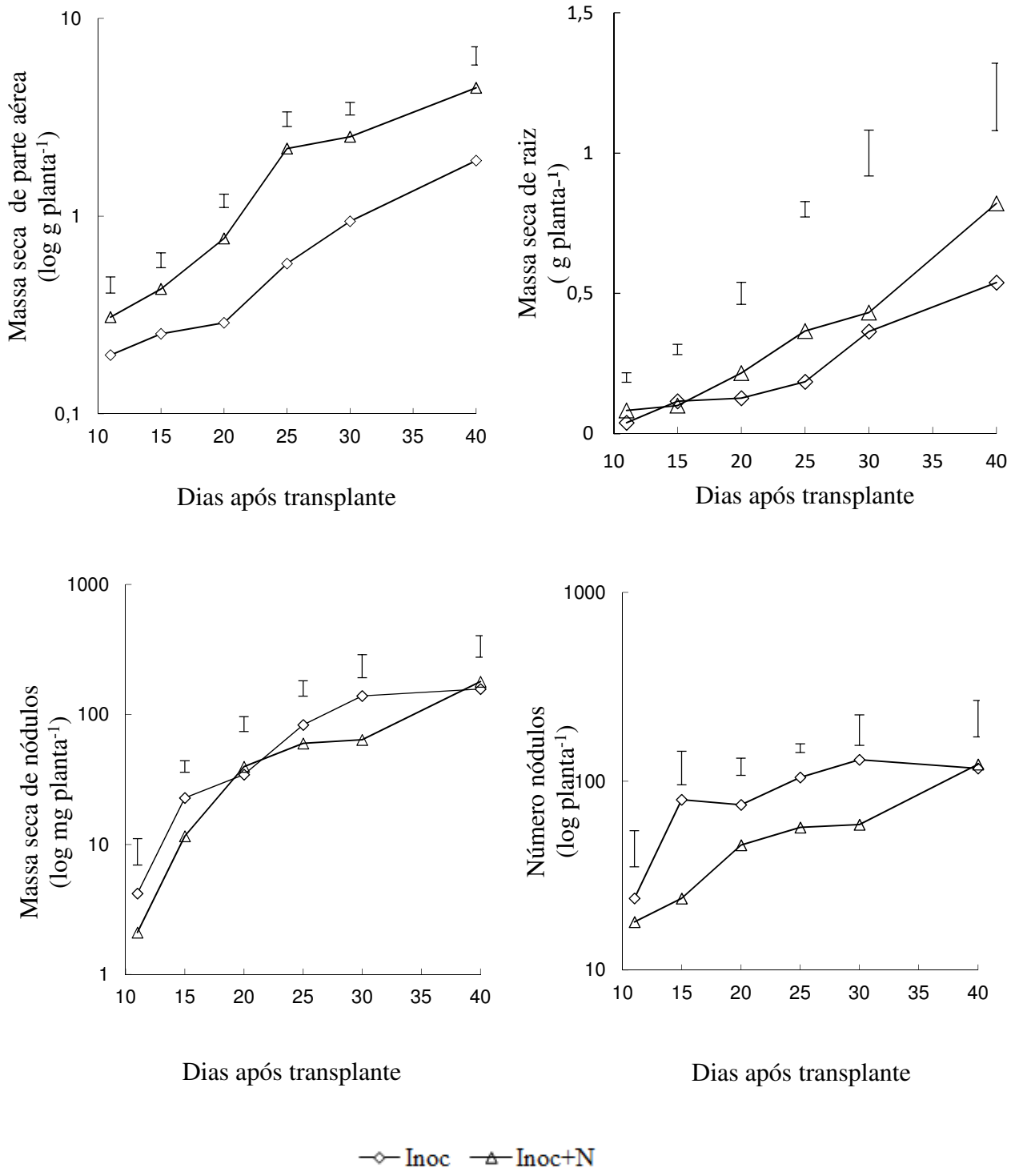



**Figura 4.** Massa de parte aérea (A), massa de raiz (B), massa de nódulos (C) e número de nódulos (D) de plantas de feijoeiro cultivar Ouro Negro em seis épocas de coleta, sob duas fontes de N: inoculação com rizóbio e inoculação mais aplicação de N mineral. Barras verticais representam a diferença mínima significativa (Ducan 5%) e comparam os tratamentos dentre de cada época de coleta.

**Tabela 1.** Razão raiz: parte aérea, massa unitária de nódulos e diâmetro de nódulos de plantas de feijoeiro cultivar Ouro Negro, em cinco épocas de coleta (em dias após transplante – DAT), sob distintas fontes de N, em hidroponia.

| Fonte de N | 11 DAT | 14 DAT | 21 DAT | 28 DAT | 35 DAT | 42 DAT |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Razão raiz: parte aérea (mg $g^{-1}$) | | | |
| Inoculado | 232 a | 551 a | 559 a | 496 a | 540 a | 367 a |
| Inoculado + N | 285 a | 258 b | 330 b | 202 b | 196 b | 233 a |
| | | | Massa unitária de nódulos (mg) | | | |
| Inoculado | 0,156 a | 0,28 a | 0,51 a | 0,79 a | 1,05 a | 1,40 a |
| Inoculado + N | 0,066 a | 0,67 a | 0,86 a | 0,86 a | 0,96 a | 1,35 a |
| | | | Diâmetro de nódulos (mm) | | | |
| Inoculado | 1,25 a | 1,54 a | 1,92 a | 1,94 a | 2,53 a | 2,59 a |
| Inoculado + N | 0,95 a | 1,30 a | 1,85 a | 1,67 a | 2,31 a | 1,95 a |

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste F a 5%.

Houve diferença estatística entre os tratamentos no teor e conteúdo de N, aos 35 e 42 DAT (Tabela 2). O teor de N na parte aérea das plantas do tratamento inoculado foi maior que o do tratamento inoculado com aplicação de N mineral, enquanto para o conteúdo ocorreu o inverso. Nas raízes o tratamento inoculado apresentou menor teor e conteúdo de N, ou seja, na ausência do N na forma mineral as plantas possuíam na parte área maior concentração de N e um menor acúmulo do elemento. MALAVOLTA et al (2007) consideram como faixa ideal de teor de N na parte aérea no período da floração, entre 3 e 5%, porém OLIVEIRA et al (1996) consideram valores a partir de 2,8 % aceitáveis a cultura. assim apenas o tratamento inoculado aos 35 DAT apresentou valor aceitável do teor de N, mostrando a eficiência do processo de FBN na assimilação do nutriente. O conteúdo de N está diretamente relacionado à massa da planta, assim as plantas do tratamento inoculado mais N apresentaram maior biomassa (Figura 4) de parte aérea ao longo de período experimental e de biomassa radicular aos 35 e 45 DAT, consequentemente apresentaram maior conteúdo de N.

**Tabela 2.** Teor e conteúdo de N na parte aérea e raiz de plantas de feijoeiro cultivar Ouro Negro aos 35 e 45 dias após transplante (DAT), sob distintas fontes de N, em hidroponia.

| Fonte de N | Teor de N (mg $g^{-1}$) | Conteúdo de N (mg $planta^{-1}$) | Teor de N (mg $g^{-1}$) | Conteúdo de N (mg $planta^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|
| | 35 DAT | | 42 DAT | |
| | | Parte aérea | | |
| Inoculado | 36,9 a | 34,8 b | 26,4 a | 50,8 b |
| Inoculado mais N | 26,4 b | 65,5 a | 27,2 a | 119,8 a |
| | | Raiz | | |
| Inoculado | 13,9 b | 5,4 b | 13,2 b | 6,9 b |
| Inoculado mais N | 22,9 a | 10,1 a | 22,0 a | 17,9 a |

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste F a 5%.

### 3.5.2 Ontogenia da nodulação sob diferentes fontes de nitrogênio

A menor produção de massa de parte aérea, em todo o período experimental, foi observada no tratamento que recebeu apenas inoculação (inoculado), sem diferenças entre os tratamentos que receberam N na forma mineral (Figura 5A). Entre os 11 e 15 DAT houve pouco incremento de produção de biomassa de parte aérea em todos os tratamentos, no entanto, a partir dos 15 DAT a produção de biomassa foi crescente, sendo que nos tratamentos com N mineral, o maior incremento de biomassa foi entre os 15 e 25 DAT e no tratamento inoculado foi entre 25 e 35 DAT. Os resultados indicam que na presença de N mineral as plantas investem na produção de biomassa de parte aérea de forma mais precoce que as plantas submetidas apenas à inoculação, que a simbiose com rizóbios não é suficiente para garantir elevada produção de biomassa de parte aérea em estádios iniciais de crescimento do feijoeiro, e que a adição de N mineral em plantas inoculadas pode suprir o déficit do nutriente.

O tratamento inoculado apresentou menor massa de raiz ao longo do período experimental, com exceção dos 11 e 15 DAT em que não houve diferença entre os tratamentos. Os tratamentos nitrogenado e inoculado mais N foram similares na produção de massa de raiz até os 25 DAT, após aos 25 DAT o tratamento inoculado mais N apresentou uma menor produção de massa de raiz que o tratamento nitrogenado; ambos tratamentos apresentaram uma diminuição de massa de raiz após os 35 DAT, ao passo que o tratamento inoculado permaneceu com crescimento de massa radicular até os 45 DAT (Figura 5B).

Em todas as épocas avaliadas, o tratamento inoculado apresentou uma maior razão raiz: parte aérea (Tabela 3). Assim, a ausência de N prontamente disponível faz com que as plantas apenas inoculadas investissem mais no desenvolvimento do sistema radicular, reduzindo a produção de parte aérea. Houve redução da razão raiz: parte aérea ao longo do período experimental, em todos os tratamentos, devido ao aumento da produção de parte aérea. Os tratamentos que receberam N apresentaram um aumento da razão raiz: parte aérea dos 25 aos 35 DAT com posterior queda do valor; no tratamento inoculado a razão raiz: parte área diminui até os 35 DAT e dos 35 aos 45 DAT houve aumento.

O tratamento nitrogenado não apresentou nodulação, indicando que não houve contaminação do experimento (Figura 5C). Os tratamentos inoculado e inoculado mais N apresentaram aumento na massa de nódulos até os 35 DAT, quando ocorreu o pico de nodulação de ambos os tratamentos. O tratamento inoculado apresentou maior massa de nódulos ao longo do período experimental e também uma produção de nódulos mais precoce, pois aos 11 DAT houve uma superioridade do tratamento inoculado em relação ao inoculado mais N. Após os 35 DAT, os tratamentos apresentaram queda na massa de nódulos, sendo mais acentuada no tratamento inoculado mais N mineral, neste período era observado com frequência, nos vasos, a presença de nódulos senescidos.

Com exceção dos 45 DAT, o tratamento inoculado apresentou maior número de nódulos comparado ao tratamento inoculado mais N (Figura 5C). O número de nódulos do tratamento inoculado cresceu de forma constante até os 15 DAT, e do tratamento inoculado mais N até os 25 DAT. Entre os 25 e 35 DAT os tratamentos apresentaram número constante de nódulos, porém após os 35 DAT o tratamento inoculado apresentou queda e o tratamento inoculado mais N um aumento no número de nódulos.

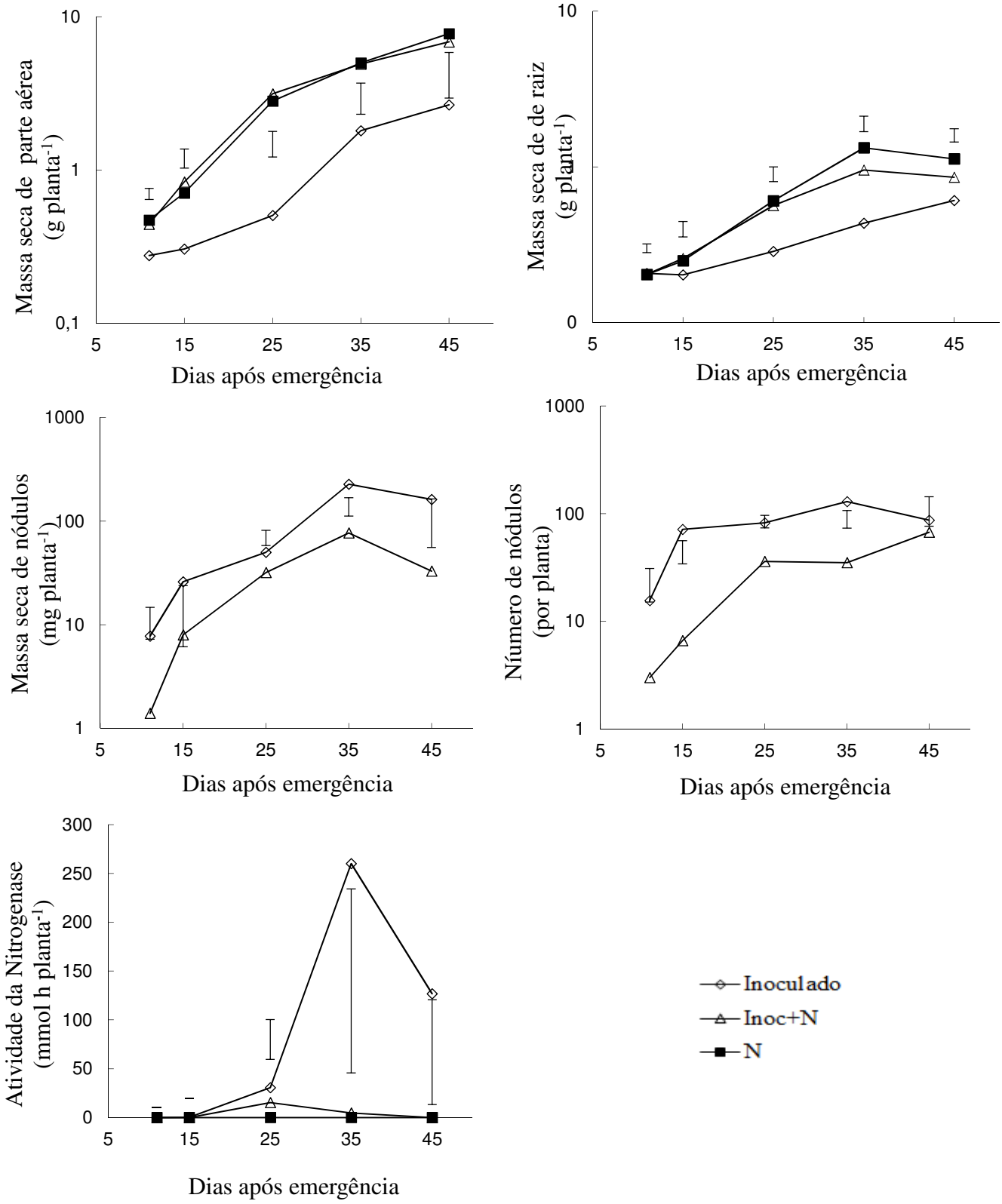



**Figura 5.** Massa seca de parte aérea (A), massa seca de raiz (B), massa seca de nódulos (C), número de nódulos (D) e atividade da nitrogenase (E) de plantas de feijoeiro cultivar Ouro Negro submetido a diferentes fontes de N (inoculação com rizóbio, inoculação mais aplicação de N mineral, N mineral), em cinco épocas de coleta. Barras verticais representam a diferença mínima significativa (Ducan 5%) e comparam os tratamentos dentre de cada época de coleta.

Os tratamentos diferiram na massa unitária de nódulos apenas aos 11 DAT e aos 45 DAT, sendo o tratamento inoculado com valor superior ao tratamento inoculado mais N (Tabela 3). O tratamento inoculado apresentou maior diâmetro de nódulos aos 11 e 15 DAT, nas demais coletas não houve diferença entre os tratamentos que receberam inoculação. Os resultados indicam que o tratamento inoculado apresenta maior produção de nódulos, nódulos com maiores massas e de tamanho superior ao tratamento inoculado mais N.

**Tabela 3.** Razão raiz: parte aérea, massa unitária de nódulos e diâmetro de nódulos de plantas de feijoeiro cultivar Ouro Negro em cinco épocas de coleta (em dias após transplante – DAT), sob distintas fontes de N, em hidroponia.

| Fonte de N | 11 DAT | 15 DAT | 25 DAT | 35 DAT | 45 DAT |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Razão raiz: parte aérea (mg $g^{-1}$) | | |
| Inoculado | 775 a | 768 a | 665 a | 378 a | 418 a |
| Inoculado mais N | 463 b | 319 b | 193 b | 207 b | 138 b |
| Nitrogenado | 436 b | 381 b | 214 b | 279 ab | 147 b |
| | | | Massa unitária de nódulos (mg) | | |
| Inoculado | 0,51 a | 0,39 a | 0,63 a | 1,81 a | 1,82 a |
| Inoculado mais N | 0,10 b | 0,37 a | 0,67 a | 2,39 a | 0,76 ab |
| Nitrogenado | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b |
| | | | Diâmetro de nódulos (mm) | | |
| Inoculado | 1,29 a | 1,81 a | 1,90 a | 2,58 a | 2,35 a |
| Inoculado mais N | 0,24 b | 0,58 b | 2,05 a | 2,35 a | 2,48 a |
| Nitrogenado | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b |

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

A atividade da nitrogenase (Figura 5E) apenas foi observada nos tratamentos que receberam inoculação com rizóbios. O início da atividade foi observada após os 15 DAT, ou seja, os nódulos presentes no início do ciclo da cultura do feijoeiro ainda não possuíam a capacidade de fixar o N atmosférico. BRITO (2013) observou que o inicio da atividade da nitrogenase em cultivares de feijoeiro, inclusive da cultivar Ouro Negro se inicia aos 11 DAE. Este dado confirma a hipótese que a cultura do feijoeiro não possui sincronismo entre a o esgotamento da reserva cotiledonar, que se dá aos 15 DAE, e o início da FBN, caracterizando o período da "fome de N" no início do ciclo (HUNGRIA et al., 1991; PEÑA-CABRIALES et al., 1993; HUNGRIA et al., 1997).

O tratamento inoculado mais N, apesar de ter apresentado nodulação, não apresentou uma atividade expressiva da nitogenase, apenas aos 25 DAT, similar ao tratamento inoculado neste período e sendo inexistente a partir dos 35 DAT. Assim, a presença do N mineral não inibiu a infecção das raízes pelos rizóbios, porém inibiu a atividade da nitogenase, reduzindo a capacidade dos nódulos de fixar o N atmosférico (Figura 5E).

O tratamento inoculado apresentou um aumento crescente na atividade da nitrogenase até os 35 DAT (Figura 5E), sendo mais acentuado entre os 25 e 35 DAT. O pico da atividade da nitrogenase, assim como a maior massa nodular no tratamento inoculado, foi aos 35 DAT, indicando a efetividade dos nódulos presentes. FELIX et al. (1981) detectaram o pico de atividade da nitrogenase em feijoeiro entre a floração plena e o início do enchimento de grãos. Após os 35 DAT houve queda acentuada da atividade da nitrogenase e também redução na massa e número de nódulos no tratamento inoculado, confirmando a senescência precoce dos nódulos do feijoeiro, no momento de alta demanda de N para a formação das vagens (FRANCO et al., 1979).

**Tabela 4.** Teor e conteúdo de N na parte aérea e raiz de plantas de feijoeiro cultivar Ouro Negro aos 35 e 45 dias após transplante (DAT), sob distintas fontes de N, em casa de vegetação, crescidas em hidroponia.

| Fonte de N | Teor de N (mg $g^{-1}$) | Conteúdo de N (mg $planta^{-1}$) | Teor de N (mg $g^{-1}$) | Conteúdo de N (mg $planta^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|
| | 35 DAT | | 45 DAT | |
| | | Parte aérea | | |
| Inoculado | 26,0 a | 46,5 b | 22,3 a | 55,6 b |
| Inoculado mais N | 20,7 a | 101,7 a | 19,7 ab | 133,0 a |
| Nitrogenado | 21,2 a | 103,7 a | 17,9 b | 139,1 a |
| | | Raiz | | |
| Inoculado | 18,3 b | 7,9 c | 21,2 b | 12,9 c |
| Inoculado mais N | 25,3 a | 23,7 b | 25,2 a | 21,2 b |
| Nitrogenado | 26,0 a | 34,0 a | 25,5 a | 28,4 a |

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

Aos 35 DAT, não houve diferença estatística entre os tratamentos no teor de N na parte aérea (Tabela 4). O tratamento inoculado apresentou menor teor de N nas raízes que as plantas que receberam adubação com N mineral. Aos 45 DAT o tratamento inoculado apresentou o maior teor de N na parte aérea e o menor teor na raiz. O tratamento inoculado mais N apresentou teor de N na parte aérea intermediário aos demais tratamentos aos 45 DAT, porém apresentou teor de na raiz semelhante ao tratamento nitrogenado.

No conteúdo de N (Tabela 4), houve diferença entre os tratamentos tanto na parte aérea quanto na raiz, nas duas épocas avaliadas. O tratamento inoculado apresentou menor conteúdo de N na parte aérea e na raiz, aos 35 DAT e 45 DAT. O tratamento inoculado mais N apresentou conteúdo de N na parte aérea semelhante ao tratamento nitrogenado, porém o conteúdo de N na raiz apresentou valor intermediário aos tratamentos inoculado e nitrogenado. Devido ao valor inexpressivo da atividade da nitrogenase no tratamento inoculado mais N, pode-se presumir que o conteúdo de N das plantas submetidas a esse tratamento advém exclusivamente da adubação nitrogenada.

Entre as coletas, houve diminuição do teor de N e um aumento do conteúdo de N na parte aérea, ao passo que nas raízes o teor de N no tratamento inoculado aumentou e nos tratamentos com N mineral houve uma redução do conteúdo de N. Em resumo, as plantas submetidas apenas à inoculação apresentam maior concentração de N na parte aérea e um menor acúmulo de N nas raízes e as plantas que receberam N na forma mineral apresentaram um maior acúmulo de N na parte aérea.

Os resultados encontrados no conteúdo de N ressaltam a hipótese que a FBN na cultura do feijoeiro não é eficiente para atender toda demanda nutricional por N, este menor conteúdo de N é evidenciado nas plantas através do amarelecimento, caracterizando o período de "fome de N".

### 3.5.3 Ontogenia da nodulação sob diferentes épocas de aplicação de nitrogênio

As plantas submetidas apenas à inoculação apresentaram menor produção de biomassa de parte aérea, porém ao período final do experimento houve pouca diferença estatística, quando comparadas aos tratamentos que receberam N mineral (Figura 6A). Isto ressalta a hipótese de que apenas a quantidade de N fixado pela simbiose não é suficiente para garantir a produção de biomassa satisfatória no início de desenvolvimento das plantas de feijoeiro. Os tratamentos que receberam N mineral apresentaram comportamento semelhante na produção de biomassa, porém aos 28 DAT as plantas que receberam N após 15 DAT apresentaram menor produção de biomassa que os demais tratamentos, provavelmente devido à ausência do N no inicio do ciclo da cultura, porém nas coletas sequentes não houve diferença entre os três tratamentos, assim entende-se que não houve déficit do nutriente.

Aos 14 e 21 DAT não houve diferença entre os tratamentos nitrogenado e inoculado na massa radicular (Figura 6B), mas aos 28 DAT o tratamento inoculado apresentou menor massa radicular que os tratamentos que receberam N mineral, porém aos 35 DAT apresentou maior massa radicular que os tratamentos nitrogenado e inoculado mais N após 15 DAT. Os tratamentos nitrogenado e inoculado mais N após 15 DAT apresentaram massa radicular semelhante. O tratamento inoculado mais N até 15 DAT apresentou maior massa de raiz, ou seja, ao cessar o fornecimento de N a planta investiu no desenvolvimento do sistema radicular à procura do nutriente.

O tratamento inoculado apresentou menor valor de razão raiz: parte área ao longo do período experimental (Tabela 6), sendo que aos 35 e 45 DAT o tratamento inoculado mais N até 15 DAT foi similar ao tratamento inoculado. Aos 25 DAT a menor razão raiz: parte área foi encontrada no tratamento nitrogenado, e os tratamentos inoculado mais N após 15 DAT e o tratamento inoculado mais N até 15 DAT apresentaram a mesma razão, sendo um valor intermediário aos tratamentos inoculado e nitrogenado. Porém, aos 35 DAT no tratamento inoculado mais N após 15 DAT houve redução da razão raiz: parte aérea comparada com a coleta anterior e no tratamento inoculado mais N até 15 DAT houve aumento no valor desta razão. Aos 45 DAT, o tratamento inoculado mais N após 15 DAT foi similar ao tratamento nitrogenado, e o tratamento inoculado mais N até 15 DAT similar ao tratamento inoculado.

O tratamento nitrogenado apresentou menor massa de nódulos que o tratamento inoculado (Figura 6C), com similaridade entre os tratamentos inoculado e inoculado mais N até 15 DAT. Entre os 35 e 42 DAT houve redução da massa de nódulos do tratamento apenas inoculado e aumento no tratamento inoculado mais N até 15 DAE, logo o N aplicado não prejudicou a nodulação e pode tê-la estimulado uma vez que permitiu uma maior produção de nódulos aos 42 DAT. O tratamento inoculado mais N após 15 DAT apresentou maior massa de nódulos que o tratamento nitrogenado aos 28 e 35 DAT, e aos 42 DAT não houve diferença estatística entre eles. Comparado ao tratamento inoculado, o tratamento inoculado mais N após 15 DAT apresentou menor massa de nódulos ao longo do período de avaliação, ou seja, o N aplicado aos 15 DAT foi prejudicial ao processo de nodulação.

O número de nódulos seguiu comportamento semelhante à massa de nódulos (Figura 6D). Assim, quando o N foi aplicado em todo o período inibiu a nodulação, ao passo que quando aplicado de forma suplementar pode ter estimulado a nodulação, como ocorreu no tratamento inoculado mais N até 15 DAT.

O tratamento inoculado apresentou maior massa unitária de nódulos ao longo do período experimental (Tabela 5), ao passo que o tratamento nitrogenado apresentou menor massa unitária, com exceção da última coleta em que o tratamento inoculado mais N após 15 DAT apresentou menor massa unitária. A massa unitária de nódulos seguiu crescente, porém a partir dos 35 DAT houve queda na massa unitária dos tratamentos inoculado, inoculado mais N após 15 DAT e inoculado mais N até 15 DAT; em contrapartida no tratamento

nitrogenado a massa unitária de nódulos ainda se encontrava em crescimento. O tratamento inoculado resultou em nódulos com maior diâmetro ao longo do período experimental, sendo que aos 15 e 35 DAT não houve diferença entre os tratamentos; aos 25 DAT o tratamento inoculado mais N até 15 DAT foi similar ao tratamento inoculado. Aos 45 DAT o tratamento inoculado mais N após 15 DAT resultou em nódulos de menor diâmetro e os demais tratamentos apresentaram nódulos de diâmetros semelhantes.

Até os 21 DAT, o tratamento inoculado apresentou baixa atividade da nitrogenase (Figura 6F). O tratamento nitrogenado não apresentou atividade da nitrogenase ao longo do período experimental, assim como o tratamento inoculado mais N após 15 DAT, ou seja, o N aplicado não inibiu a formação de nódulos, mas inibiu a atividade da nitrogenase. Porém, no tratamento inoculado mais N até 15 DAT as plantas apresentam atividade da nitrogenase, sendo aos 35 DAT até mesmo superior ao tratamento inoculado, neste caso o N fornecido até os 15 DAT serviu de estímulo ao processo de formação de nódulos e até mesmo da FBN. O pico da atividade da nitrogenase ocorreu aos 35 DAT, período de floração, após os 35 DAT houve redução da atividade da nitrogenase.

O teor de N em todos os tratamentos e coletas apresentaram teor de N considerável aceitável por OLIVEIRA et al. (1996), na parte aérea (Tabela 6). Aos 35 DAT não houve diferença estatística no teor de N na parte aérea. Porém nas raízes houve diferença, com o maior teor encontrado no tratamento inoculado mais N após 15 DAE e os menores nos tratamentos inoculado e inoculado mais N até 15 DAE. Aos 35 DAT, não houve diferença estatística entre os tratamentos no conteúdo de N na raiz, e na parte aérea o maior conteúdo foi encontrado no tratamento nitrogenado, sendo que o tratamento inoculado mais N após 15 DAT apresentou resultado similar ao tratamento nitrogenado e os tratamentos inoculados e inoculado mais N até 15 DAT apresentaram os menores conteúdos de N na parte aérea.

Aos 45 DAT não houve diferença estatística entre os tratamentos no teor de N na parte aérea e no conteúdo de N na parte aérea e na raiz (Tabela 6). Os maiores valores de teor de N na raiz foram encontrados nos tratamentos nitrogenado e inoculado mais N após 15 DAT e os menores no tratamento inoculado e inoculado mais N até 15 DAT.

Entre as coletas, o teor e o conteúdo de N aumentaram na parte aérea. Na raiz, entre as coletas, os tratamentos obtiveram comportamentos diferentes, houve redução no teor e conteúdo de N nos tratamentos inoculado e inoculado mais N até 15 DAT, e no tratamento nitrogenado houve aumento do teor e do conteúdo. No tratamento inoculado mais N após 15 DAT, entre as coletas, houve redução do teor e aumento do conteúdo de N. (Tabela 6).

Os resultados mostram uma semelhança ente o tratamento inoculado e o inoculado mais N até 15 DAT e entre o nitrogenado com o inoculado mais N após os 15 DAT (Figura 5). Devido à ausência da atividade da nitrogenase, no tratamento inoculado com aplicação de N após 15 DAT (Figura 5F) conclui-se que o teor de N das plantas submetidas ao tratamento é proveniente apenas da adubação nitrogenada. Comparando o conteúdo de N nos tratamentos inoculado e inoculado mais N até 15 DAT, aos 42 DAT, observa-se uma diferença de 31.7 mg N planta$^{-1}$ que provavelmente se deu devido à maior atividade da nitrogenase do tratamento inoculado mais N até 15 DAT, aos 35 DAT.

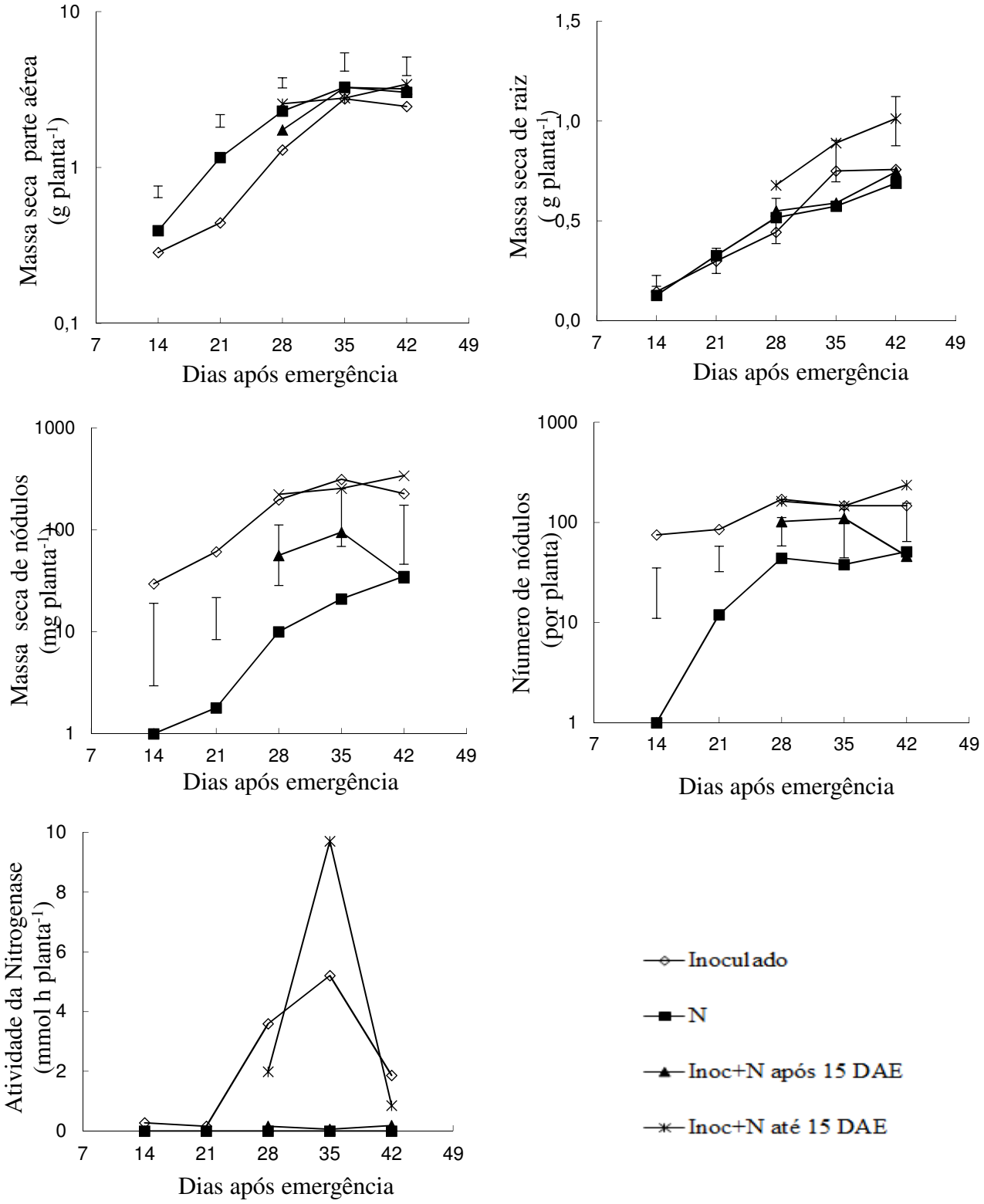



**Figura 6.** Massa seca de parte aérea (A), massa seca de raiz (B), massa seca de nódulos (C), número de nódulos (D), atividade da nitrogenase (E) de plantas de feijoeiro cultivar Ouro Negro sob diferentes épocas de aplicação de N, em cinco épocas de coleta. Barras verticais representam a diferença mínima significativa (Ducan 5%) e comparam tratamentos dentro de cada época de coleta.

**Tabela 5.** Razão raiz: parte aérea, massa unitária de nódulos e diâmetro de nódulos de plantas de feijoeiro cultivar Ouro Negro sob distintas épocas de aplicação de N, em cinco épocas de coleta (em dias após transplante – DAT), crescidas em hidroponia.

| Fonte de N | 11 DAT | 15 DAT | 25 DAT | 35 DAT | 45 DAT |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Razão raiz: parte aérea (mg $g^{-1}$) | | |
| Inoculado | 618 a | 815 a | 504 a | 413 a | 429 a |
| Nitrogenado | 321 b | 278 b | 230 c | 194 b | 248 b |
| Inoc. + N após 15 DAT | - | - | 349 b | 210 b | 266 b |
| Inoc. + N até 15 DAT | - | - | 356 b | 427 a | 394 a |
| | | | Massa unitária de nódulos (mg) | | |
| Inoculado | 0,42 a | 0,73 a | 1,15 a | 2,11 a | 1,52 a |
| Nitrogenado | 0 b | 0,11 b | 0,30 b | 0,63 c | 0,69 b |
| Inoc. + N após 15 DAT | - | - | 0,68 b | 1,00 bc | 0,58 b |
| Inoc. + N até 15 DAT | - | - | 1,37 a | 1,47 ab | 1,37 a |
| | | | Diâmetro de nódulos (mm) | | |
| Inoculado | 1,11 a | 1,03 a | 1,53 a | 1,04 a | 1,46 a |
| Nitrogenado | 0 b | 0,76 a | 1,06 b | 1,00 a | 0,99 bc |
| Inoc. + N após 15 DAT | - | - | 1,25 ab | 1,23 a | 0,77 c |
| Inoc. + N até 15 DAT | - | - | 1,49 a | 1,10 a | 1,22 ab |

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

**Tabela 6.** Teor e conteúdo de N na parte aérea e raiz de plantas de feijoeiro cultivar Ouro Negro aos 35 e 45 dias após transplante (DAT), sob distintas épocas de aplicação de N, em hidroponia.

| Fonte de N | Teor de N (mg $g^{-1}$) | Conteúdo de N (mg $planta^{-1}$) | Teor de N (mg $g^{-1}$) | Conteúdo de N (mg $planta^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|
| | 35 DAT | | 42 DAT | |
| | | Parte aérea | | |
| Inoculado | 28,7 a | 77,1 b | 32,6 a | 77,0 a |
| N | 32,5 a | 106,6 a | 36,0 a | 108,7 a |
| Inoc. + N após 15 DAT | 28,6 a | 93,7 ab | 31,9 a | 96,9 a |
| Inoc. + N até 15 DAT | 28,1 a | 76,7 b | 31,5 a | 108,7 a |
| | | Raiz | | |
| Inoculado | 22,2 c | 16,6 a | 20,3 b | 15,5 a |
| N | 25,8 b | 14,7 a | 27,0 a | 18,9 a |
| Inoc. + N após 15 DAT | 30,1 a | 17,8 a | 28,6 a | 21,4 a |
| Inoc. + N até 15 DAT | 21,6 c | 19,0 a | 18,2 b | 18,3 a |

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

## 3.6 CONCLUSÕES

Os resultados indicam que apenas a simbiose com rizóbios, em condições de casa de vegetação, não foi suficiente para garantir elevada produção de biomassa de parte aérea em estádios iniciais de crescimento do feijoeiro. Falar mais da biomassa de parte aérea.

A massa de raiz foi maior na presença do N mineral, e quando o N foi aplicado até 15 DAT houve um maior estímulo na produção de massa do sistema radicular. As plantas na ausência do N na forma mineral investiram mais na produção de massa de raiz que em parte aérea, assim como as plantas com aplicação de N até os 15 DAT.

Na parte aérea das plantas apenas inoculadas, houve uma maior concentração de N e um menor acúmulo do nutriente, ao passo que na raiz ocorreu o inverso.

Na presença de N mineral, as plantas apresentaram menor atividade da nitrogenase, porém o processo de formação dos nódulos não foi inibido, sendo estimulado com a aplicação de N até os 15 DAT. Ao cessar o fornecimento de N aos 15 DAT, as plantas inoculadas apresentaram maior atividade da nitrogenase em comparação ao tratamento apenas inoculado, ou seja, o N aplicado na fase inicial do ciclo da cultura estimulou a FBN.

Os resultados mostram que a aplicação suplementar de N é capaz de proporcionar o desenvolvimento das plantas do feijoeiro inoculadas com rizóbio, em condições controladas, de forma semelhante quando há aplicação de N em todo o ciclo. A aplicação de N no início do ciclo é capaz de estimular o processo de nodulação e a atividade da nitrogenase.

# 4 CAPÍTULO II –

# RENDIMENTO DE GRÃOS DO FEIJOEIRO SOB INOCULAÇÃO E DIFERENTES ÉPOCAS DE APLICAÇÃO DE NITROGÊNIO

## 4.1 RESUMO

Entre os fatores relacionados à menor eficiência da simbiose entre rizóbios e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) está a baixa especificidade da cultura: as estirpes nativas, que muitas vezes são mais competitivas e de capacidade de FBN inferior, inibem as estirpes introduzidas via inoculante. Em altas doses, o N inibe o processo de nodulação, porém, em pequenas doses é capaz de estimular a nodulação e o processo de FBN. Foram conduzidos quatro experimentos de campo com o objetivo de avaliar a produção de grãos do feijoeiro em resposta à inoculação associada a diferentes épocas de aplicação do N em forma suplementar. Os experimentos foram conduzidos em Rio das Ostras (RJ), Macaé (RJ), Santo Antônio de Goiás (GO) e Seropédica (RJ). Além das estirpes pertencentes ao inoculante comercial para feijoeiro, foram utilizadas as estirpes BR 923 e BR 959, a fim de avaliar sua adaptação edafoclimáticas nas regiões de cultivo, e no experimento de Seropédica avaliou-se o efeito da co-inoculação com bactérias promotoras de crescimento (BR 11.005 e BR 116). Foram realizadas coletas de biomassa aos 35 dias após emergência (época da floração), determinando-se massa seca de parte aérea, raízes e nódulos, e avaliados a produção de grãos e componentes de produção na maturação. A resposta à inoculação com rizóbio foi influenciada pelo ambiente de cultivo. A população nativa de rizóbios do solo foi competitiva e eficiente, uma vez que as plantas testemunhas não inoculadas nodularam e apresentaram produção de biomassa e de grãos satisfatórias em alguns experimentos. O N, quando aplicado em altas dosagens, reduziu a nodulação, com exceção do experimento em Santo Antônio de Goiás, onde a testemunha nitrogenada não apresentou incremento de matéria seca de parte aérea e de produção de grãos, quando comparado ao tratamento testemunha sem adubação com N e sem inoculação. Porém, doses suplementares de N, principalmente aplicadas no plantio, em conjunto com a inoculação, não inibiram a nodulação, e em alguns casos aumentaram a produção de massa seca de parte aérea e os índices de produtividade. Não houve resposta positiva da co-inoculação com as bactérias promotoras de crescimento. Em alguns cultivos, a aplicação de N na forma mineral apenas gerou maiores custos de produção, uma vez que reduziu a nodulação sem causar incrementos de produção. Os resultados indicam um melhor aproveitamento da FBN quando o N é aplicado de forma suplementar, particularmente no plantio, possibilitando uma redução das doses de N aplicadas na cultura do feijoeiro.

## 4.2 ABSTRACT

Among the factors related to lower efficiency of symbiosis between rhizobia and common bean (*Phaseolus vulgaris*) is the low specificity of the crop: the native strains, which are often more competitive and with lower FBN capacity, inhibit the strains introduced via inoculation. At high levels the N inhibits nodulation process but in small levels can stimulate the process of nodulation and BNF. Four field experiments were conducted in order to evaluate the grain yield of common bean in response to inoculation associated with different N application times in supplemental form. The experiments were conducted in Rio das Ostras (RJ), Macaé (RJ), Santo Antônio de Goiás (GO) and Seropédica (RJ). In addition to the strains of the commercial inoculant, the strains BR 923 and BR 959 were also evaluate for their adaptation to edaphoclimatic in crops regions, and in Seropédica experiment the effect of co-inoculation with bacteria promoting growth (BR 11 005 and BR 116) was assessed. Plants were sampled at 35 days after emergence to determine the dry mass of shoots, roots and nodules, and to evaluate grain yield and yield components at maturity. The response to inoculation with rhizobia was influenced by the growth environment. The native population of soil rhizobia was competitive and efficient since the non inoculated control plants reached satisfactory biomass production and grain yield in some experiments. When applied at high levels, the N reduced the nodulation, except for the experiment in Santo Antônio de Goiás where the N treatments did not have increased shoot dry matter and grain yield when compared to the control treatment that did not receive N fertilization and inoculation. However, additional N levels mainly applied at sowing together with the inoculation did not inhibit the nodulation, and in some cases increased the shoot dry matter and grain yield. There was not positive response of co-inoculation with bacteria growth promoting bacteria. In some experiments, the application of N mineral generated only higher production costs, since it reduces the nodulation without increasing grain yield. The results indicate a better use of FBN when the N is applied in supplemental form, particularly at sowing, enabling a reduction in N levels in common bean crop.

## 4.3 INTRODUÇÃO

Em ambientes tropicais, a importância da fixação biológica de nitrogênio (FBN) está relacionada com a baixa disponibilidade de N nos solos, agravada pelas perdas do nutriente através do processo de lixiviação (XAVIER et al., 2008).. A maximização da FBN na cultura do feijoeiro depende de características genéticas relacionadas à planta, da atividade e eficiência das bactérias simbiontes e de fatores ambientas.

Na cultura do feijoeiro, a inoculação nem sempre resulta em aumento de produtividade da cultura, devido a inúmeros fatores, entre eles a competição das bactérias introduzidas com aquelas nativas, que por já serem adaptadas às condições locais são muitas vezes mais competitivas, porém não tão eficientes no processo de FBN quanto as bactérias presentes nos inoculantes (CASSINI & FRANCO, 2006). O estabelecimento de estirpes eficientes no solo é dificultado devido à alta promiscuidade do feijoeiro em relação ao microssibionte (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Assim, para que a inoculação possa resultar em produtividades satisfatórias, é imprescindível a seleção de estirpes, que formem simbiose eficiente e que possuam alta capacidade competitiva.

Apesar de ser considerada uma espécie de baixa eficiência no processo de FBN, estudos indicam o efeito positivo da inoculação em cultivares de feijoeiro, podendo alcançar produtividade de 2.500 kg $ha^{-1}$ (HUNGRIA et al., 2000). ROMANINI JUNIOR et al. (2007), em dois anos consecutivos, obtiveram um aumento médio de produtividade de 17 % utilizando apenas a inoculação das sementes. Alguns trabalhos indicam que o feijoeiro pode se beneficiar de forma eficiente da FBN sem a utilização de adubos nitrogenados (MENDES et al., 1994; FERREIRA et al., 2000).

PELEGRIN et al. (2009), avaliando o efeito da adubação suplementar de N em cultivos inoculados, aplicando uma dosagem de 20 kg $ha^{-1}$ de N obteve rendimento de grãos equivalente a aplicação de 160 kg $ha^{-1}$ de N, mostrando a importância da prática da inoculação no aumento da receita líquida do produtor. Assim, técnicas que possibilitam a maximização de absorção de N pelo feijoeiro comum são de grande importância, devido ao alto custo dos fertilizantes nitrogenados (SANTOS et al., 2003) e a diminuição de impactos ambientais. Contudo, a nível de campo a resposta da inoculação é controversa, variando em função do ambiente e ano agrícola.

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

## 4.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.4.1 Delineamentos experimentais

Para a avaliação do rendimento de grãos sob inoculação, foi conduzido um experimento de campo em Rio das Ostras-RJ, e a para a determinação da influência da época de aplicação de N na produção de grãos foram realizados três experimentos, o primeiro em Santo Antônio de Goiás - GO, o segundo em Macaé - RJ e o terceiro em Seropédica. Os tipos de solo de cada área experimental estão descritos na Tabela 7.

Nestes experimentos foram testadas três estirpes distintas de rizóbio selecionadas para eficiência simbiótica na cultura do feijoeiro, visando avaliar a sua adaptação edafoclimática para as regiões de implantação dos experimentos: estirpe BR 534 pertencente ao inoculante comercial recomendado para a cultura do feijoeiro; a estirpe BR 923 de *Sinorhizobim sp* selecionada pela Embrapa Agrobiologia e BR 959 de *R. tropici*, selecionada para a região de Cerrados pela Embrapa Dourados. Todas as estirpes apresentam tolerância a altas temperaturas e competitividade e fazem parte dos programas de seleção de estirpes destas Unidades da Embrapa. As estirpes BR 11.005 (*Azospirillum,* SP 245) e BR 116 (*Bradyrhizobium*, USDA 110), utilizadas no experimento de Seropédica, foram fornecidas pelo pesquisador da Embrapa Agrobiologia Ederson da Conceição Jesus, pois apresentaram resultados promissores em ensaios de co-inoculação sob condições controladas.

O experimento em Rio das Ostras - RJ foi realizado entre maio e agosto de 2013, em uma propriedade rural na localidade de Cantagalo, em parceria com a Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO-RIO), localizada na latitude 22° 31’37’’S e longitude 41° 56’42’’ W, com altitude de 8 m. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, em arranjo fatorial 4x5 com quatro repetições. Foram utilizadas quatro cultivares de feijoeiro (Marfim, Notável, Pérola e Ouro Negro), e foram avaliados cinco tratamentos: testemunha absoluta, sem inoculação e sem aplicação de N mineral; testemunha nitrogenada, com adubação com 20 kg $ha^{-1}$ de N no plantio e 60 kg $ha^{-1}$ de N em cobertura aos 25 DAE; inoculação com a estirpe BR 534 (*Rhizobium tropici*, CPAC H12), inoculação com a estirpe BR 923 (*Sinorhizobium sp*), e inoculação com a estirpe BR 959 (*Rhizobium tropici*, CPAO 12. 5L2).

**Tabela 7.** Algumas características das cultivares avaliadas nos experimentos de campo

| Cultivar | Tipo | Grão | Massa de 100 grãos (g) | Ciclo | Duração do ciclo (dias) |
|---|---|---|---|---|---|
| Ouro Negro | III | Preto | 24 | Normal | 90-95 |
| Pérola | II/III | Carioca | 27 | Normal | 90-95 |
| Marfim | II | Mulatinho | 27 | Normal | 89 |
| Notável | II/III ereto | Carioca | 26 | Semi-precoce | 75-85 |

Tipos I, II e III: ereto determinado, ereto indeterminado, prostrado indeterminado, respectivamente.
Fonte: EMBRAPA (2013).



**Figura 7.** Visão geral do experimento em Cantagalo no município de Rio das Ostras, - RJ, em 2013 (Foto: Próprio autor).

O experimento em Santo Antônio de Goiás - GO foi conduzido de junho a setembro de 2013, no campo experimental da Embrapa Arroz e Feijão (CNPAF), localizada na latitude 16º 29' 01" S e longitude 49º 18' 40" W, com elevação próxima ao nível do mar.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com quatro repetições. Foram utilizadas as cultivares Ouro Negro e Pérola. Para a cultivar Ouro Negro foram avaliados onze tratamentos: testemunha absoluta, sem inoculação e sem aplicação de N; testemunha nitrogenada, com aplicação de 20 kg $ha^{-1}$ de N no plantio e 60 kg $ha^{-1}$ de N em cobertura aos 25 DAE; inoculação com a estirpe BR 534; inoculação com a estirpe BR 923; inoculação com a estirpe BR 959; inoculação com a estirpe BR 534 com adubação de 20 kg $ha^{-1}$ de N no plantio e adubação de cobertura com 20 kg $ha^{-1}$ de N aos 25 DAE; inoculação com a estirpe BR 923 com adubação de 20 kg $ha^{-1}$ de N no plantio e adubação de cobertura com 20 kg $ha^{-1}$ de N aos 25 DAE; inoculação com a estirpe BR 959 com adubação de 20 kg $ha^{-1}$ de N no plantio e adubação de cobertura com 20 kg $ha^{-1}$ de N aos 25 DAE; inoculação com a estirpe 534 com duas adubações de cobertura com 20 kg $ha^{-1}$ de N aos 15 e 25 DAE; inoculação com a estirpe 923 com duas adubações de cobertura com 20 kg $ha^{-1}$ de N aos 15 e 25 DAE; e inoculação com a estirpe BR 959 com duas adubações de cobertura com 20 kg $ha^{-1}$ de N aos 15 e 25 DAE.

Para a cultivar Pérola foram testados cinco tratamentos: testemunha absoluta, sem inoculação e sem aplicação de N; testemunha nitrogenada, com aplicação de 20 kg $ha^{-1}$ de N no plantio e 60 kg $ha^{-1}$ de N em cobertura aos 25 DAE; inoculação com a estirpe BR 534; inoculação com a estirpe BR 923; e inoculação com a estirpe BR 959.



**Figura 8.** Visão geral do experimento em Santo Antonio do Goiás - GO, no campo experimental da Embrapa Arroz e Feijão, em 2013 (Foto: Próprio autor).

O experimento de Macaé - RJ foi conduzido entre junho e setembro de 2013, na Fazenda Ilha da Saudade, localizada na latitude 22° 22’ 15’’ S e longitude 41º 47’ 13’’ W, com elevação de 2 m.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com quatro repetições e duas cultivares: Pérola e Ouro Negro. Para a cultivar Pérola os tratamentos adotados foram: testemunha absoluta, sem inoculação e adubação com N mineral; testemunha nitrogenada, com 20 kg $ha^{-1}$ de N no plantio e 60 kg $ha^{-1}$ de N em cobertura aos 30 DAE; inoculação com a estirpe BR 534; inoculação com a estirpe BR 923; inoculação com a estirpe BR 959. Para a cultivar Ouro Negro, foram utilizados os tratamentos citados para a cultivar Pérola, além dos seguintes: inoculação com a estirpe BR 534 com adubação de cobertura com 40 kg $ha^{-1}$ de N aos 30 DAE; inoculação com a estirpe BR 534 com adubação 20 kg $ha^{-1}$ de N no plantio e 20 kg $ha^{-1}$ de N em cobertura aos 30 DAE; inoculação com a estirpe BR 534 com duas adubações de cobertura com 20 kg $ha^{-1}$ de N aos 15 e 30 DAE.



**Figura 9.** Visão geral do experimento no município de Macaé - RJ, Fazenda Ilha da Saudade, em 2013 (Foto: Rosângela Straliotto).

O experimento em Seropédica – RJ foi conduzido entre abril e julho de 2014, no campo experimental da Embrapa Agrobiologia (Terraço). O delineamento experimental adotado foi em blocos ao acaso, com cinco repetições, com a cultivar Ouro Negro, sendo avaliados oito tratamentos de aplicação de N: testemunha absoluta, sem inoculação e sem aplicação de N; testemunha nitrogenada, com aplicação de 20 kg $ha^{-1}$ de N no plantio e 40 kg $ha^{-1}$ de N em cobertura aos 25 DAE; inoculação com as estirpes comerciais com aplicação de 20 kg $ha^{-1}$ de N no plantio; inoculação com as estirpes comerciais com aplicação de 40 kg $ha^{-1}$ de N em cobertura aos 25 DAE; inoculação com as estirpes comerciais associada à aplicação de 20 kg $ha^{-1}$ de N no plantio e 40 kg $ha^{-1}$ de N em cobertura aos 20 DAE; inoculação com as estirpes comerciais e com a estirpe de BR 11.005 (*Azospirillum,* SP 245*)*; inoculação com as estirpes comerciais e com a estirpe BR 116 (*Bradyrhizobium*, USDA 110).



**Figura 10.** Visão geral do experimento em Seropédica - RJ, no período reprodutivo, no Campo Experimental da Embrapa Agrobiologia, em 2014. (Foto: Próprio autor)

### 4.4.2 Condições de cultivo

O preparo do solo de todos os experimentos foi realizado por cultivo convencional, com duas gradagens e uma aração, sendo realizadas apenas adubações de P e K e sem a realização de calagem, diante dos resultados da ánalise química dos solos (Tabela 8)

Nos experimentos de Rio das Ostras e de Seropédica cada parcela possuía 12 $m^2$, com 6 linhas de 4 m de comprimento, com espaçamento entre linhas de 0,5 m. No experimento em Santo Antônio do Goiás cada parcela experimental possuía 9 $m^2$, com 4 linhas de 5 m de comprimento, espaçadas 0,45 m entre si. No experimento de Macaé cada parcela possuía 10 $m^2$, com 4 linhas de 5 m de comprimento, espaçadas 0,5 m entre si. Em todos os experimentos foram semeadas 12 sementes por metro linear.

Foi coletada uma amostra de terra para a realização da análise de solo, de acordo com Embrapa (1997), cujos resultados são apresentados na Tabela 9. Os fertilizantes nitrogenados, fosforados e potássicos foram colocados no fundo do sulco, na forma de uréia, superfosfato simples e cloreto de potássio, respectivamente. Nos experimentos de Rio das Ostras, Macaé e Seropédica foram aplicados 90 kg $ha^{-1}$ de $P_2O_5$ e 40 kg $ha^{-1}$ de $K_2O$, em Santo Antônio de Goiás foram aplicados 97 kg $ha^{-1}$ de $P_2O5$ e 97 kg $ha^{-1}$ de $K_2O$.

**Tabela 8.** Classificação morfológica e contagem da população nativa de rizóbios das áreas destinadas ao plantio dos experimentos conduzidos em Rio das Ostras - RJ, Santo Antônio de Goiás - GO, Macaé - RJ e Seropédica - RJ.

| **Local** | **Tipo de solo** | **População nativa de rizóbios (células $g^{-1}$ solo)** |
|---|---|---|
| Rio das Ostras | Argissolo Vermelho Amarelo Distrófico | $1{,}7.10^4$ |
| Santo Antônio de Goiás | Latossolo Vermelho | $1{,}7.\ 10^3$ |
| Macaé | Gleissolo Háplico | $1{,}7.10^3$ |
| Seropédica | Argissolo Vermelho Amarelo | $10^6$ |

**Tabela 9.** Resultado das análises químicas do solo (0-20 cm) das áreas destinadas ao plantio dos experimentos conduzidos em Rio das Ostras - RJ, Santo Antônio do Goiás -GO, Macaé - RJ e Seropédica - RJ.

| Local | Na | Ca | Mg | H+Al | Al | $pH_{água}$ | C | P | K |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ---------- $cmol_c\ dm^{-3}$ ---------- | | | | | | % | --mg $dm^{-3}$-- | |
| Rio das Ostras | | 2,00 | 0,77 | 3,07 | 0,08 | 5,74 | 0,9 | 8,57 | 120 |
| Santo Antônio de Goiás | | 1,22 | 0,69 | 3,17 | 0,00 | 6,14 | 1,15 | 4,9 | 70 |
| Macaé | 0,08 | 2,3 | 0,8 | 14,2 | 0,8 | 4,9 | 4,42 | 14 | 172 |
| Seropédica | 0,03 | 2,5 | 1,7 | 4,8 | 0,00 | 5,4 | | 3,4 | 38 |

O inoculante foi preparado por meio da injeção de caldo de cultivo das estirpes comerciais meio de cultura YMA em sacos plásticos, previamente selados, com 150 g de turfa autoclavada. A turfa utilizada foi preparada e empacotada conforme é feito para uso em inoculantes comerciais. Após o preparo do inoculante, para verificação da qualidade do inoculante, foi realizada uma contagem de rizóbio, baseando-se na metodologia recomendada pela Rede de Laboratórios para a Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE, 2004), para garantir a população mínima de $10^8$ células por grama de inoculante.

### 4.4.3 Contagem de rizóbio no solo

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

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

A partir do décimo dia após emergência (DAE), os vasos foram abastecidos com solução nutritiva de Norris modificada. Por ocasião da queda do cotilédone, as plantas foram desbastadas, mantendo-se duas por vaso. As plantas foram coletadas por ocasião da floração plena, na sexta semana após a data de emergência, e as raízes foram observadas para verificação da presença de nódulos. O cálculo do número de células por grama de solo foi realizado conforme a metodologia descrita por Vincent (1970). Os resultados destas avaliações são apresentados na Tabela 8.

### 4.4.4 Amostragens e avaliações

Foi realizada amostragem de biomassa, nos experimentos de Rio das Ostras, Macaé e Santo Antônio de Goiás, aos 35 DAE (plena floração). Foram coletadas as plantas em 0,5 m linear em cada parcela experimental. No experimento de Seropédica foram realizadas três coletas de biomassa, aos 32, 42 e 53 DAE, sendo coletadas as plantas em 0,5 m linear em cada parcela.

As plantas foram colhidas por inteiro com o auxílio de uma pá reta, e separadas em raízes e parte aérea em corte próximo à base do caule. A parte aérea foi colocada em sacos de papel, e os sistemas radiculares foram acondicionados em sacos plásticos, para serem transportados até o laboratório. As raízes foram lavadas, e os nódulos separados. A parte aérea, raízes e os nódulos foram secos em estufa a 65 ºC e pesados.

Na maturação de grãos, as plantas foram colhidas ao nível do solo em 1 $m^2$ da área útil no centro de cada parcela, e colocadas em sacos de pano. O restante da área útil de 3 $m^2$ de cada parcela foi coletada e colocada em sacos de panos. Foram determinados na área de 1 $m^2$ o número de plantas e o número de vagens. As vagens de cada parcela foram trilhadas manualmente e os grãos foram pesados. Após a determinação do peso dos grãos, foram retiradas amostras de 100 grãos, nas quais foram determinados o peso úmido e após a secagem em estufa foram pesados novamente para a determinação do teor de umidade. Com base na massa úmida da amostra de 100 grãos, e na massa total de grãos da parcela, foi estimado o número total de grãos. Foram calculados os componentes de produção: número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de um grão e produtividade de grãos a 13% de umidade. No restante de área útil da parcela foi determinado o número de plantas e a produção de grãos.

### 4.4.5 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância, com diferentes modelos de análise para cada experimento. No experimento em Seropédica, para os dados obtidos na maturação de grãos foi considerado um único fator, as fontes de N. Para os dados de biomassa, foi efetuada uma análise conjunta dos dados de diferentes coletas, em um fatorial duplo entre fontes de N e épocas de coleta, sendo as épocas de coleta consideradas como subparcelas e as fontes de N como parcelas. No experimento em Rio das Ostras, foi considerado um fatorial duplo entre cultivares e fontes de N. Nos experimentos em Santo Antônio de Goiás e em Macaé, foram efetuadas duas análises de variância, a primeira para os dados da cultivar Ouro Negro, considerando um único fator, as fontes de N, e a segunda para os dados das cultivares Ouro Negro e Pérola, considerando um fatorial duplo entre cultivares e fontes de N, para as parcelas que receberam as mesmas fontes de N. Quando da significância do teste F, as médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5%.

## 4.5 RESULTADOS E DISCUSÃO

### 4.5.1 Experimento em Rio das Ostras

A população nativa de rizóbios do solo foi de $1,7.10^4$ células $g^{-1}$ solo (Tabela 8), e esta elevada população teve elevada influencia nos resultados obtidos neste ensaio.

A menor massa de parte aérea foi encontrada na cultivar Pérola, entre as demais cultivares não houve diferença estatística (Tabela 10). Entre os tratamentos, a estirpe BR 923 proporcionou menor produção de biomassa de parte aérea, enquanto a estirpe BR 534 apresentou produção similar à testemunha nitrogenada e à testemunha absoluta. Os resultados de massa de parte aérea mostraram que a estirpe BR 923 não foi eficiente para a produção de parte aérea, de todas as cultivares avaliadas. A população nativa de rizóbios resultou em produção de massa de parte aérea semelhante a testemunha nitrogenada, provavelmente este resultado se dá devido a ausência de resposta das cultivares a adubação nitrogenada, nestas condições. A nível de campo, SILVA et al. (2009), KANEKO et al. (2010) e SOUZA et al. (2011), relatam que a produção de massa seca de parte aérea não é influenciada pela inoculação com *Rizobium tropici*. Já PELEGRIN et al. (2009) concluíram que apenas a inoculação pode ser capaz de suprir a demanda de N das plantas de feijoeiro, uma vez que não há resposta a adubação nitrogenada.

As cultivares não apresentaram diferenças estatísticas na massa seca de nódulos (Tabela 10). Entre os tratamentos, a maior massa de nódulos foi encontrada na testemunha absoluta e a menor na testemunha nitrogenada, sendo as estirpes BR 923 e BR 534, com valores intermediários, similares estatisticamente. Os resultados comprovam o efeito negativo da aplicação de N mineral no processo de nodulação e a alta eficiência e competitividade das estirpes nativas do solo, evidenciado pela alta população de rizóbios nativos do solo, que embora sejam capazes de suprir as plantas com $N_2$ fixado simbioticamente, pode ter limitado o estabelecimento das estirpes inoculadas (FERREIRA et al., 2000)

A média de produção de grãos no experimento foi relativamente baixa (1166 kg $ha^{-1}$) e inferior a média de produtividade do estado do Rio de Janeiro na safra 2012/2013, que foi de 1990 kg $ha^{-1}$ (CONAB, 2013) e superior a média encontrada por BRITO (2013) no mesmo município (888,6 kg $ha^{-1}$). Não houve diferença estatística entre as fontes de N, assim tanto as estirpes introduzidas quanto a população nativa de rizóbios do solo se mostraram tão eficientes quanto a adubação nitrogenada. Entre as cultivares, a menor produção de grãos foi encontrada na cultivar Pérola (Tabela 10).

Nestas condições a aplicação de N, na dosagem total de 80 kg $ha^{-1}$, resultou apenas em mais gastos ao cultivo, reduziu a formação de nódulos, podendo ter prejudicando a FBN e não resultou em um melhor desenvolvimento das cultivares tanto no período vegetativo quanto na produção de grãos.

**Tabela 10.** Massa seca de parte aérea e massa seca de nódulos aos 35 dias após emergência, e produção de grãos na maturidade, das cultivares de feijoeiro Marfim, Notável, Pérola e Ouro Negro, sob diferentes fontes de N em condições de campo no município de Rio das Ostras - RJ, em 2013.

| Fonte de N | Marfim | Notável | Pérola | Ouro Negro | Média |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Massa seca de parte aérea (g planta$^{-1}$) | | | |
| Testemunha absoluta | 4,14 | 3,82 | 3,68 | 4,76 | 4,10 a |
| Testemunha nitrogenada | 4,41 | 4,41 | 3,46 | 3,89 | 4,04 a |
| BR923 | 3,78 | 3,53 | 2,99 | 3,62 | 3,48 b |
| BR534 | 3,55 | 4,37 | 3,62 | 4,45 | 4,00 a |
| Média | 3,97 A | 4,03 A | 3,43 B | 4,18 A | |
| | | Massa seca de nódulos (mg planta$^{-1}$) | | | |
| Testemunha absoluta | 40 | 55 | 32 | 68 | 48 a |
| Testemunha nitrogenada | 32 | 28 | 26 | 47 | 33 b |
| BR923 | 49 | 29 | 49 | 58 | 46 ab |
| BR534 | 42 | 44 | 65 | 39 | 47 ab |
| Média | 40 A | 39 A | 43 A | 53 A | |
| | | Produção de grãos (kg ha$^{-1}$) | | | |
| Testemunha absoluta | 1272 | 1311 | 1135 | 1331 | 1262 a |
| Testemunha nitrogenada | 1454 | 1392 | 688 | 998 | 1133 a |
| BR923 | 1076 | 1058 | 878 | 1573 | 1146 a |
| BR534 | 1410 | 1125 | 825 | 1141 | 1125 a |
| Média | 1303 A | 1221 A | 881 B | 1261 A | |

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

### 4.5.2 Experimento em Macaé

A contagem de rizóbios do solo foi de 1,7.10³ células g-1 de solo.

Não foi apresentada a massa seca de parte aérea neste experimento, por ter ocorrido perdas de várias amostras durante o processamento do material. A maior massa de nódulos foi observada no tratamento inoculado com a estirpe BR 534, e a menor massa de nódulos no tratamento nitrogenado e no tratamento inoculado com a BR 534 com aplicação de N ao plantio e em cobertura; nos demais tratamentos foram encontrados valores similares de massa de nódulos (Tabela 11). A inoculação correlaciona com diversos fatores entre eles o teor de matéria orgânica do solo e com nitrogênio (BENIZRI et al., 2001). A simbiose, neste ensaio, pode ter sido favorecida pelo alto teor de C orgânico presente neste solo (Tabela 8) e o N aplicado na forma mineral prejudicou o processo de nodulação, principalmente quando aplicado em plantio e cobertura.

Não houve diferença entre os tratamentos para o número de plantas ao final do experimento (Tabela 33 no anexo), com uma média geral de 27,6 plantas m$^{-2}$, indicando que as diferentes fontes de N avaliadas não afetaram o stand final do cultivo. Não houve diferença entre os tratamentos no número de vagens por planta, número de grãos por vagem e massa de um grão (Tabela 11).

MERCANTE et al. (1992) recomendam para cultivares que apresentam boa nodulação, como a cultivar Ouro Negro, apenas a inoculação como fonte de N para níveis de produtividade superior 1500 kg $ha^{-1}$ em solos de várzea, ricos em matéria orgânica e com irrigação, o que pode ser evidenciado neste ensaio uma vez que a estirpe BR 959 proporcionou maior produção de grãos. Diante dos resultados, com exceção da estirpe BR 534, há indícios que a matéria orgânica em conjunto com a inoculação das sementes pode ter favorecido a simbiose e resultaram em elevadas produtividades, superior até mesmo ao tratamento testemunha nitrogenada. STRALIOTTO et al. (2003) afirmam que em solos com maiores teores de matéria orgânica, que liberam N lentamente, podem beneficiar a planta do feijoeiro sem reduzir a sua capacidade de fixação.

Todos os tratamentos apresentaram produção superior à média do Município de Macaé, que é de 900 kg $ha^{-1}$ (IBGE, 2006). Apesar das plantas inoculadas com a estirpe BR 534 terem apresentado maior nodulação, a produção de grãos foi inferior aos demais tratamentos, assim não houve relação entre a produtividade de grãos e a massa nodular. Os tratamentos testemunha absoluta e inoculados com a BR 534 que receberam adubação nitrogenada apresentaram produções similares (Tabela 11). Os resultados indicam uma tendência que a estirpe BR 534 pode responder à adubação nitrogenada suplementar e que a testemunha absoluta pode produzir mais que a testemunha nitrogenada, assim apenas a população nativa de rizóbios do solo seria capaz de garantir boa produtividade ao feijoeiro, o elevado teor de matéria desse solo pode contribuir para um bom estabelecimento das estirpes nativas, aumentando sua efetividade. Assim, a estirpe BR 959, que resultou em maior produção de grãos, pode ser mais competitiva e superior as demais estipes utilizadas e as nativas.

**Tabela 11.** Massa seca de nódulos aos 35 dias após emergência, número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de um grão e produção de grãos da cultivar Ouro Negro, sob diversas fontes e épocas de aplicação de N em condições de campo em Macaé - RJ.

| Fonte de N | Massa seca de nódulos (mg $planta^{-1}$) | Número de vagens por planta | Número de grãos por vagem | Massa de um grão (mg) | Produção de grãos (kg $ha^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|
| Testemunha absoluta | 15 ab [(1)] | 8,3 | 3,4 | 241 | 1929 ab |
| Testemunha nitrogenada | 2 b | 7,7 | 3,6 | 234 | 1703 b |
| Estirpe BR 959 | 13 ab | 9,0 | 3,7 | 240 | 2358 a |
| Estirpe BR 534 | 24 a | 8,1 | 3,3 | 251 | 1672 b |
| Estirpe BR 923 | 13 ab | 8,4 | 3,4 | 246 | 1942 ab |
| BR 534 + N cobertura (15-30) | 15 ab | 8,4 | 3,6 | 248 | 1952 ab |
| BR 534 + cobertura | 12 ab | 8,7 | 3,7 | 246 | 2171 ab |
| BR 534 + N plantio + N em cobertura | 7 b | 9,0 | 3,4 | 240 | 2036 ab |

Médias seguidas pela mesma letra ou desprovidas de letra não diferem pelo teste de Duncan a 5%.
(1) Teste de Duncan para massa de nódulos a 10% de significância.

Na massa seca dos nódulos, houve diferença entre as cultivares e os tratamentos (Tabela 12). A cultivar Ouro Negro apresentou maior massa de nódulos que a cultivar Pérola, embora as cultivares de grãos tipo carioca exsudam maior quantidade de indutores de nodulação comparadas às cultivares de grãos pretos (Araújo et al., 1996). Entre os tratamentos, a maior massa nodular foi encontrada nas parcelas inoculadas com a BR 923 e a

menor massa nodular na testemunha nitrogenada, confirmando que o N em excesso prejudica o processo de nodulação. A testemunha absoluta apresentou massa nodular similar aos tratamentos inoculados com as estirpes BR 534 e BR 959, indicando a alta eficiência da população de rizóbios presentes no solo, evidenciado pela contagem da população nativa.

A cultivar Ouro Negro apresentou um maior número de vagens por planta que a cultivar Pérola, porém não houve diferença entre os tratamentos (Tabela 12). Não houve diferença entre as cultivares e tratamentos no número de vagens por planta e no número de grãos por vagens. A cultivar Pérola, que apresentou um menor número de vagens por planta, obteve maior massa de um grão, o inverso ocorreu com a cultivar Ouro Negro. Não houve diferença entre os tratamentos na massa de um grão.

Houve diferença entre os tratamentos e as cultivares na produção de grãos: a cultivar Ouro Negro obteve maior produção que a cultivar Pérola (**Tabela 12**).A maior produção foi encontrada no tratamento inoculado com a estirpe BR 534 e a menor no tratamento inoculado com a estirpe 923, sendo essa estirpe a que apresentou maior massa nodular, comprovando que a massa nodular não é um indicativo de eficiência da FBN na produção de grãos. Os tratamentos testemunha absoluta, testemunha nitrogenada e inoculado com BR 959 apresentaram produção de grãos similares, apenas a estirpe BR 534 foi mais eficiente que as estirpes nativas do solo.

**Tabela 12.** Massa seca de nódulos aos 35 dias após emergência, número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de um grão e produção de grãos das cultivares Ouro Negro e Pérola sob diversas fontes de N em condições de campo em Macaé - RJ, em 2013.

| Fonte de N | Massa seca de nódulos (mg planta$^{-1}$) | | | Número de vagens por planta | | | Número de grãos por vagem | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Ouro Negro | Pérola | Média | Ouro Negro | Pérola | Média | Ouro Negro | Pérola | Média |
| Testemunha absoluta | 15 | 7 | 11 ab | 8,3 a | 6,4 b | 7,3 a | 3,4 | 2,9 | 3,2 |
| Testemunha nitrogenada | 2 | 1 | 1 b | 7,7 a | 8,3 a | 8,0 a | 3,6 | 3,5 | 3,5 |
| BR 534 | 13 | 7 | 10 ab | 9,0 a | 6,3 b | 7,6 a | 3,7 | 3,4 | 3,5 |
| BR 923 | 24 | 6 | 15 a | 8,1 a | 6,2 b | 7,1 a | 3,3 | 3,0 | 3,1 |
| BR 959 | 13 | 9 | 11 ab | 8,4 a | 6,8 ab | 7,6 a | 3,4 | 3,1 | 3,3 |
| Média | 13 A | 6 B | | 8,3 A | 6,8 B | | 3,5 A | 3,2 A | |

| Fonte de N | Massa de 100 grãos (mg) | | | Produção de grãos (kg ha$^{-1}$) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Ouro Negro | Pérola | Média | Ouro Negro | Pérola | Média |
| Testemunha absoluta | 241 | 264 | 252 | 1929 | 1430 | 1680 ab |
| Testemunha nitrogenada | 234 | 266 | 250 | 1703 | 1960 | 1831 ab |
| BR 534 | 240 | 264 | 252 | 2358 | 1689 | 2023 a |
| BR 923 | 251 | 259 | 255 | 1672 | 1368 | 1520 b |
| BR 959 | 246 | 260 | 253 | 1942 | 1570 | 1756 ab |
| Média | 242 B | 262 A | | 1921 A | 1603 B | |

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

### 4.5.3 Experimento em Santo Antônio de Goiás

A contagem de rizóbios no solo que foi de $1{,}7.10^3$ células de rizóbio por grama de solo, sendo considerada uma alta população de rizóbios nativos.

A maior produção de biomassa de parte aérea aos 35 DAE foi observada no tratamento inoculado com a estirpe BR 923 e com a aplicação de N no plantio e em cobertura aos 25 DAE, sendo similares ao tratamento que recebeu inoculação com a estirpe BR 923 com adubações de cobertura aos 15 e 25 DAE, e ao tratamento testemunha nitrogenada (Tabela 13). Não houve diferença significativa entre a testemunha absoluta e os tratamentos inoculados com as estirpes BR 534, BR 923, BR 959, BR 959 com N em cobertura aos 15 e 25 DAE, BR 534 com N em cobertura aos 15 e 25 DAE, BR 959 com N no plantio e em cobertura aos 25 DAE, BR 534 com N no plantio e em cobertura aos 25 DAE (Tabela 13). Os resultados indicam um melhor desempenho das estirpes com doses suplementares de N, garantindo produção de biomassa de parte aérea satisfatória, porém a população nativa de rizóbios do solo se mostrou competitiva e eficiente, evidenciado pela alta contagem de rizóbios no solo.

Os resultados da produção de massa seca de parte aérea em resposta à adubação nitrogenada e inoculação são bastante variáveis na literatura. PELEGRIN et al. (2009) não obtiveram efeito significativo da inoculação e da adubação nitrogenada na produção de biomassa, assim como SOARES (2013) ao avaliar o efeito da doses suplementares de N em feijoeiro quando submetidos a inoculação. Porém OLIVEIRA (2013) obteve efeito significativo ao aplicar doses suplementares de N em plantas inoculadas comparadas às plantas apenas inoculadas, a testemunha (que não recebeu aplicação de N e nem inoculação) e quando aplicado apenas 20 kg ha-1 de N no plantio, quanto às doses suplementares avaliadas, não obteve diferença estatística ao aplicar N em cobertura e com o aumento da dosagem de N de cobertura.

Não houve diferença estatística entre os tratamentos para a massa seca de nódulos por planta (Tabela 13), porém observa que quando aplicou N no plantio a massa de nódulos foi inferior aos demais tratamentos, ou seja, houve tendência do N aplicado no plantio ter sido prejudicial ao processo de nodulação. PELEGRIN et al. (2009) e OLIVEIRA (2013) também não obtiveram efeito significativo na nodulação quando a inoculação foi seguida de adubações suplementares de N em plantio e cobertura, porém SOARES (2011) obteve efeito inibitório no processo de nodulação ao aplicar N no plantio seguido de adubações de cobertura. As estirpes BR 534 e BR 923 obtiveram menor massa seca de nódulos quando comparadas ao tratamento testemunha absoluta.

Na análise estatística dos dados das cultivares Pérola e Ouro Negro, considerando as fontes de N avaliadas para as duas cultivares, verifica-se que não houve diferença entre as cultivares para os caracteres analisados (Tabela 14). A maior massa de parte aérea foi encontrada na testemunha nitrogenada e a menor na testemunha absoluta, enquanto que os tratamentos que foram inoculados apresentaram resultados similares entre as testemunhas e não houve diferença entre as estirpes (Tabela 14).

**Tabela 13.** Massa seca de parte área e massa seca de nódulos aos 35 DAE da cultivar Ouro Negro sob diversas fontes e épocas de aplicação de N em condições de campo em Santo Antônio de Goiás - GO, em 2013

| Fonte de N | Massa seca de parte área (g planta$^{-1}$) | Massa seca de nódulos (mg planta$^{-1}$) |
|---|---|---|
| Testemunha absoluta | 7,52 b | 30 |
| Testemunha nitrogenada | 9,67 ab | 2 |
| Estirpe BR 534 + N plantio + N cobertura 25 DAE | 8,91 b | 5 |
| Estirpe BR 923 + N plantio + N cobertura 25 DAE | 11,61 a | 10 |
| Estirpe BR 959 + N plantio + N cobertura 25 DAE | 8,24 b | 5 |
| Estirpe BR 534 + N cobertura 15/25 DAE | 7,10 b | 14 |
| Estirpe BR 923 + N cobertura 15/25 DAE | 9,40 ab | 25 |
| Estirpe BR 959 + N cobertura 15/25 DAE | 7,19 b | 49 |
| Estirpe BR 534 | 8,51 b | 7 |
| Estirpe BR 923 | 8,37 b | 9 |
| Estirpe BR 959 | 8,00 b | 31 |

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

**Tabela 14.** Massa de parte aérea e massa seca de nódulos aos 35 dias após emergência das cultivares Ouro Negro e Pérola sob diversas fontes de N em condições de campo no município de Santo Antônio de Goiás - GO, em 2013.

| Fonte de N | Massa seca de parte aérea (g planta$^{-1}$) | | | Massa seca de nódulos (mg planta$^{-1}$) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Ouro Negro | Pérola | Média | Ouro Negro | Pérola | Média |
| Testemunha absoluta | 7,52 | 6,75 | 7,14 b | 30 | 13 | 22 ab |
| Testemunha nitrogenada | 9,67 | 8,78 | 9,22 a | 2 | 6 | 4 b |
| Estirpe BR 534 | 8,51 | 7,86 | 8,19 ab | 7 | 26 | 17 ab |
| Estirpe BR 923 | 8,37 | 7,72 | 8,05 ab | 9 | 2 | 5 b |
| Estirpe BR 959 | 8,00 | 7,49 | 7,74 ab | 31 | 24 | 27 a |
| Média | 8,42 A | 7,72 A | | 16 A | 14 A | |

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

A análise estatística dos dados obtidos para a cultivar Ouro Negro indicou que não houve diferença entre os tratamentos para o número de plantas ao final do experimento (Tabela 30 no anexo), com uma média geral de 28,3 plantas m$^{-2}$, indicando que as diferentes fontes de N avaliadas não afetaram o stand final do cultivo. O maior número de vagens por planta foi encontrado nos tratamentos inoculados com a estirpe BR 534 com N no plantio e em cobertura aos 25 DAE, e no tratamento BR 932 com N no plantio e em cobertura aos 25 DAE, sendo similares ao tratamento testemunha nitrogenada (Tabela 15). Em média, os tratamentos que receberam adubação de N no plantio apresentaram maiores números de vagens por planta. Não houve diferença entre os tratamentos testemunha absoluta e os tratamentos inoculados com as estipes BR 534, BR 959, e ao inoculado com a BR 932, sendo que estes tratamentos foram os que apresentaram menor número de vagens por planta. ANDRADE et al. (2001) afirmam que o fornecimento de N na forma mineral resulta em maior número de vagens por planta, tanto em semeadura quanto em cobertura e quando

associado com a prática de inoculação, comparados a testemunha absoluta e apenas a inoculação.

Houve pouca diferença entre os tratamentos no número de grãos por vagem, sendo os maiores valores encontrados nos tratamentos testemunha nitrogenada, inoculado com BR 534 com N no plantio e em cobertura aos 25 DAE, no tratamento inoculado com BR 932 com N no plantio e em cobertura aos 25 DAE, e no tratamento inoculado com BR 959. O menor valor foi encontrado no tratamento BR 534 com N em cobertura aos 15 e 25 DAE, os demais tratamentos obtiveram valores intermediários, sendo semelhantes à testemunha absoluta. Não houve diferença estatística na massa de um grão entre os tratamentos, pois esta é uma característica principalmente controlada pelo genótipo da planta (Tabela 15), sendo os valores obtidos de massa de um grão, em todos tratamentos, superior a média da cultivar Ouro Negro que é de 250-270 mg (EMBRAPA, 2005).

O rendimento médio de grãos no experimento foi de 1974 kg $ha^{-1}$. A maior produção de grãos ocorreu com inoculação com a estirpe BR 534 com N no plantio e em cobertura aos 25 DAE, seguido pelo tratamento BR 923 com N no plantio e em cobertura aos 25 DAE, sendo similares à testemunha nitrogenada, sendo superiores a média de produtividade do estado de Goiás na safra 2012/2013, de 1809 kg $ha^{-1}$ (CONAB, 2013). Não houve diferença estatística entre os tratamentos testemunha absoluta, BR 534 com N em cobertura aos 15 e 25 DAE, BR 923 com N em cobertura aos 15 e 25 DAE, BR 534 e BR 923, sendo estes tratamentos os que apresentaram menores produções (Tabela 15).

Comparando os tratamentos inoculados, observa-se que não houve diferença na produção de grãos entre a testemunha absoluta, ao uso isolado das estirpes e ao uso delas com adubação em cobertura aos 15 e 25 DAE, ao passo que quando se aplicou N no plantio houve uma maior produção, com exceção da BR 959 que apresentou resultados de produções similares, ou seja, esta estirpe não respondeu à adubação nitrogenada (Tabela 15). Assim como no número de grãos por vagem, o N quando aplicado no plantio em conjunto com a inoculação proporcionou uma maior produção de grãos, portanto o N aplicado no plantio pode ser capaz de suplementar a demanda de N pela cultura. SOARES (2011) sugere que apenas a dosagem de 20 kg ha-1 de N no plantio em conjunto com a inoculação é suficiente para a manutenção de boa produtividade, uma vez que em seus experimentos não houve influencias significativas da aplicação de N em cobertura, mesmo como o aumento da dosagem sendo possível uma redução da dose de adubação nitrogenada e um aumento da receita líquida.

O número de plantas ao final do ciclo foi similar entre as cultivares Ouro Negro e Pérola, com média geral de 29,3 plantas $m^{-2}$ (Tabela 32, Anexo). Todavia, as fontes de N afetaram de forma diferenciada o número de plantas de cada cultivar: enquanto na cultivar Ouro Negro não houve diferença entre as fontes de N, na cultivar Pérola o tratamento nitrogenado apresentou número de plantas (21,5 plantas $m^{-2}$) inferior aos demais tratamentos. Plantas de feijão bem nutridas produzem mais flores e, consequentemente, mais vagens por planta, assim como aumenta o número de óvulos fertilizados por planta (PORTES, 1996), o que ocorreu e neste ensaio, senda a testemunha nitrogenada aquela que proporcionou um maior número de vagens por planta e uma maior produção de grãos, confirmando a importância do nutriente na produtividade da cultura. As estirpes, com exceção da BR 959, não foram capazes de fixar o N atmosférico em quantidade suficiente para atender a demanda nutricional da planta e estimular a alta produtividade, e também apresentaram eficiência similar à população nativa de rizóbios do solo. Não houve diferença entre os tratamentos no número de grãos por vagem e na massa de um grão (Tabela 16).

**Tabela 15.** Número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de um grão e produção de grãos da cultivar Ouro Negro sob diversas fontes e épocas de aplicação de N em condições de campo, em Santo Antônio de Goiás - GO, em 2013.

| Fonte de N | Número de vagens por planta | Número de grãos por vagem | Massa de um grão (mg) | Produção de grãos (kg $ha^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|
| Testemunha absoluta | 7,2 c | 3,0 ab | 290 | 1775 d |
| Testemunha nitrogenada | 9,6 ab | 3,3 a | 284 | 2344 abc |
| Estirpe BR 534 + N plantio + N cobertura 25 DAE | 10,2 a | 3,4 a | 293 | 2518 a |
| Estirpe BR 923 + N plantio + N cobertura 25 DAE | 10,1 a | 3,4 a | 289 | 2448 ab |
| Estirpe BR 959 + N plantio + N cobertura 25 DAE | 8,3 abc | 3,0 ab | 291 | 1884 cd |
| Estirpe BR 534 + N cobertura 15/25 DAE | 7,4 bc | 2,5 b | 293 | 1564 d |
| Estirpe BR 923 + N cobertura 15/25 DAE | 7,3 c | 3,0 ab | 297 | 1780 d |
| Estirpe BR 959 + N cobertura 15/25 DAE | 8,2 abc | 3,0 ab | 294 | 2002 bcd |
| Estirpe BR 534 | 6,7 c | 2,9 ab | 292 | 1671 d |
| Estirpe BR 923 | 7,5 bc | 2,8 ab | 291 | 1806 d |
| Estirpe BR 959 | 7,1 c | 3,2 a | 286 | 1932 cd |
| Média | 8,1 | 3,0 | 291 | 1974 |

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

Entre as cultivares não houve diferença estatística no número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de um grão e produção de grãos (Tabela 16).

Os resultados de produção de biomassa (Tabela 14) e de produtividade (Tabela 15) mostram que a inoculação com aplicação de N mineral na forma suplementar traz resultados positivos a cultivar Ouro Negro, principalmente quando aplicado no plantio e em cobertura aos 25 DAE, atingindo níveis de produtividade superiores à testemunha nitrogenada.

A estirpe BR 959 apresentou um processo de infecção mais eficiente que as demais estipes BR 534, BR 923 e que a população de rizóbio nativa do solo, uma vez que proporcionou maior massa seca de nódulos (Tabela 14). As menores massas de nódulos foram encontradas nos tratamentos testemunha nitrogenada, assim o N aplicado inibiu a infecção da planta pelas estirpes nativas do solo, e no tratamento inoculado com a estirpe BR 923, que não foi eficiente na infecção das cultivares

**Tabela 16.** Número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de um grão e produção de grãos das cultivares Ouro Negro e Pérola sob diversas fontes de N em condições de campo, em Santo Antônio de Goiás - GO, em 2013.

| Fonte de N | Ouro Negro | Pérola | Média | Ouro Negro | Pérola | Média |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Número de vagens por planta | | | Número de grãos por vagem | | |
| Testemunha absoluta | 7,2 | 5,4 | 6,3 b | 3,0 | 2,9 | 3,0 a |
| Testemunha nitrogenada | 9,6 | 10,5 | 10,0a | 3,3 | 3,4 | 3,3 a |
| Estirpe BR 534 | 6,7 | 6,6 | 6,7 b | 2,9 | 3,2 | 3,1 a |
| Estirpe BR 923 | 7,5 | 6,7 | 7,1 b | 2,8 | 3,2 | 3,0 a |
| Estirpe BR 959 | 7,1 | 7,0 | 7,0 b | 3,2 | 3,2 | 3,2 a |
| Média | 7,6 A | 7,2 A | | 3,0 A | 3,2 A | |
| | Massa de um grão (mg) | | | Produção de grãos (kg $ha^{-1}$) | | |
| Testemunha absoluta | 290 | 301 | 295 a | 1775 | 1544 | 1659 b |
| Testemunha nitrogenada | 284 | 302 | 293 a | 2344 | 2146 | 2245 a |
| Estirpe BR 534 | 292 | 286 | 289 a | 1671 | 1728 | 1699 b |
| Estirpe BR 923 | 291 | 288 | 290 a | 1806 | 1726 | 1766 b |
| Estirpe BR 959 | 286 | 289 | 288 a | 1932 | 1968 | 1950 ab |
| Média | 289 A | 293 A | | 1905 A | 1822 A | |

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

### 4.5.4 Experimento em Seropédica

A contagem de rizóbios foi de $10^6$ células de rizóbio por grama de solo, que é considerada uma elevada população nativa de rizóbios.

A massa seca de parte área, em média, apresentou valores crescentes ao longo do período experimental. Aos 32 DAE não houve diferença estatística entre os tratamentos na massa de caule, porém aos 43 DAE houve diferença, sendo o maior valor encontrado no tratamento inoculação com aplicação de N no plantio e os menores valores nos tratamentos testemunha nitrogenada e os com co-inoculação com bactérias promotoras de crescimento; os demais tratamentos obtiveram valores intermediários de massa de caule. Aos 53 DAE, a testemunha nitrogenada apresentou o maior valor de massa de caule e o menor na testemunha absoluta. Em média, o maior valor de massa caulinar foi observado no tratamento inoculado com aplicação de N apenas no plantio e o menor na testemunha absoluta (Tabela 17).

Aos 35 DAE, o tratamento inoculado com aplicação de N no plantio e em cobertura apresentou o maior valor massa seca de folha e o tratamento com inoculação com *Azospirillum* BR 11.005 o menor valor, os demais tratamentos apresentaram resultados intermediários e similares (Tabela 17). Aos 42 DAE houve pouca diferença entre os tratamentos, sendo a maior massa foliar encontrada no tratamento inoculado com aplicação de N no plantio. Aos 53 DAE, a maior diferença foi encontrada nos tratamentos testemunha absoluta e testemunha nitrogenada, com a menor e maior massa foliar, respectivamente. Em média, as maiores massas foliares foram encontradas nos tratamentos testemunha nitrogenada e inoculado mais N no plantio. O tratamento inoculado apresentou, em média, valor similar à testemunha absoluta, apresentando as menores massas encontradas, os demais tratamentos

apresentaram valores de massa intermediários e similares. Não houve diferença entre a massa de vagens, entre os tratamentos (Tabela 17).

A massa seca de parte aérea (Tabela 17), obtida pela soma das massas secas de caule, folhas e vagens, apresentou valores crescentes ao longo das avaliações. Aos 32 DAE não houve diferença entre os tratamentos. Aos 42 DAE, a testemunha nitrogenada apresentou menor massa de parte aérea, e similar à inoculação com *Bradyrhizobium* BR 116; o tratamento inoculado com aplicação de N no plantio teve a maior massa de parte aérea, e os demais tratamentos apresentaram valores intermediários. Aos 53 DAE, a testemunha nitrogenada, com menor massa de parte aérea na coleta anterior, foi o tratamento com maior massa de parte aérea, ao passo que a testemunha absoluta apresentou a menor massa. Em média, o tratamento inoculado com aplicação de N no plantio obteve massa de parte aérea similar à testemunha nitrogenada, assim a dose suplementar de N aplicada apenas no plantio seria suficiente para garantir produção de biomassa satisfatória. Os demais tratamentos, com aplicação de N mineral, apresentaram valores semelhantes à testemunha nitrogenada e superior ao tratamento inoculado e a testemunha absoluta, resultado semelhante foi encontrado por OLIVEIRA (2013), em média, em quatro municípios no estado de Minas Gerais, no qual o aumento da dosagem de N mineral na forma suplementar não resultou em incremento de massa de parte área. Os tratamentos que receberam co-inoculação com bactérias promotoras de crescimento, *Azospirillum* BR 11.005 *e Bradyrhizobium* BR 116, foram similares estatisticamente à testemunha absoluta e ao tratamento inoculado, VERONEZI et al. (2011) também não observaram incremento de peso de parte aérea da co-inoculação com diversas estirpes de *Azospirillum brasilense* e rizóbios em relação a apenas as plantas inoculadas com rizóbio.

Aos 32 DAE, a maior massa de raiz foi encontrada no tratamento inoculado com aplicação de N no plantio e em cobertura, e a menor na testemunha absoluta; os demais apresentaram resultados intermediários e similares. Aos 42 DAE não houve diferença entre os tratamentos. Aos 53 DAE, o tratamento inoculado com aplicação de N em cobertura foi similar à testemunha nitrogenada, sendo as maiores massas encontradas. A testemunha absoluta foi a que resultou em menor massa de raiz aos 42 DAE, os demais tratamentos apresentaram valores intermediários, porem entre eles, o tratamento inoculado com aplicação de N no plantio, foi o mais similar à testemunha nitrogenada. Em média, o tratamento inoculado mais N no plantio foi o que resultou em maior massa de raiz e os menores valores nos tratamentos testemunha absoluta e inoculado (Tabela 18), apesar de haver semelhança estatística há uma tendência do aumento de massa de raiz ao co-inocular as sementes com bactérias promotoras de crescimento, há diversos estudos que comprovam o efeito positivo destas bactérias ao sistema radicular do feijoeiro, como o aumento em profundidade quanto ao maior crescimento de raízes secundárias (Okon & Kapulnik, 1986; German et al., 2000).

Na massa de nódulos (Tabela 18), nas não houve diferença entre os tratamentos nas coletas. A maior massa de nódulos foi encontrada aos 42 DAE e aos 53 DAE houve queda, porém pelo estádio fisiológico da cultura, período reprodutivo é uma massa considerável de nódulos. Em média, o tratamento inoculado com aplicação de N no plantio, obteve maior massa de nódulos, apesar de similar estatisticamente, superior ao tratamento inoculado e a testemunha absoluta. As menores massas de nódulos foram encontradas na testemunha nitrogenada, inoculado mais N no plantio e em cobertura, confirmando que o N em excesso prejudica o processo de nodulação, e no *Bradyrhizobium* BR 116. Os resultados quanto a nodulação ao utilizar bactérias promotoras de crescimento no feijoeiro são bem variáveis, trabalhos mostram que a co-inoculação pode aumentar o número e o tamanho de nódulos (BURDMAN et al., 1997; REMANS et al., 2008; YADEGARI et al., 2010) , mas também pode não acarretar em incremento no processo de nodulação (VERONEZI et al., 2011),

comparado a apenas a inoculação com rizóbio, o que ocorreu neste ensaio, sendo até mesmo evidenciada tendência de redução de nodulação ao utilizar a estirpe *Azospirillum* BR 11.005.

**Tabela 17.** Massa seca de caule, folha, vagem e parte aérea da cultivar Ouro Negro sob distintas fontes e épocas de aplicação de N, em três épocas de coeltas (em dias após emergência – DAE), sob condições de campo em Seropédica – RJ, em 2014.

| Fonte de N | 32 DAE | 42 DAE | 53 DAE | Média |
|---|---|---|---|---|
| | | Massa de caule (g planta$^{-1}$) | | |
| Testemunha absoluta | 0,85 a | 2,44 ab | 2,58 e | 1,96 c |
| Testemunha nitrogenada | 1,13 a | 2,16 b | 4,33 a | 2,54 ab |
| Inoculado | 0,81 a | 2,68 ab | 3,00 de | 2,16 bc |
| Inoculação + N plantio + N cobertura | 1,14 a | 2,54 ab | 3,53 bcd | 2,40 abc |
| Inoculação + N plantio | 1,14 a | 3,13 a | 4,12 abc | 2,80 a |
| Inoculação + N cobertura | 0,91 a | 2,35 ab | 4,21 ab | 2,49 ab |
| *Azospirillum* BR 11.005 | 0,84 a | 2,12 b | 3,30 de | 2,09 bc |
| *Bradyrhizobium* BR 116 | 0,80 a | 2,04 b | 3,44 cd | 2,09 bc |
| Média | 0,95 C | 2,43 B | 3,56 A | |
| | | Massa de folha (g planta$^{-1}$) | | |
| Testemunha absoluta | 3,35 abc | 5,80 ab | 4,16 d | 4,43 c |
| Testemunha nitrogenada | 4,97 ab | 5,03 ab | 8,04 a | 6,01 a |
| Inoculado | 3,13 bc | 5,69 ab | 4,68 cd | 4,50 c |
| Inoculação + N plantio + N cobertura | 5,27 a | 5,63 ab | 5,81 bcd | 5,57 ab |
| Inoculação + N plantio | 4,21 abc | 6,85 a | 6,85 ab | 5,97 a |
| Inoculação + N cobertura | 3,59 abc | 5,59 ab | 7,21 ab | 5,46 ab |
| *Azospirillum* BR 11.005 | 2,94 c | 5,27 ab | 6,23 abc | 4,81 bc |
| *Bradyrhizobium* BR 116 | 4,02 abc | 4,60 b | 5,87 bcd | 4,83 bc |
| Média | 3,94 B | 5,56 A | 6,11 A | |
| | | Massa de vagem (g planta$^{-1}$) | | |
| Testemunha absoluta | | 0,22 | 1,36 | 0,79 |
| Testemunha nitrogenada | | 0,14 | 1,91 | 1,03 |
| Inoculado | | 0,09 | 1,42 | 0,76 |
| Inoculação + N plantio + N cobertura | | 0,08 | 1,05 | 0,57 |
| Inoculação + N plantio | | 0,14 | 1,33 | 0,74 |
| Inoculação + N cobertura | | 0,09 | 1,71 | 0,90 |
| *Azospirillum* BR 11.005 | | 0,09 | 1,57 | 0,83 |
| *Bradyrhizobium* BR 116 | | 0,11 | 0,90 | 0,51 |
| Média | | 0,12 B | 1,41 A | |
| | | Massa de parte aérea (g planta$^{-1}$) | | |
| Testemunha absoluta | 4,20 a | 8,46 ab | 8,10 e | 6,92 b |
| Testemunha nitrogenada | 6,11 a | 7,33 b | 14,28 a | 9,24 a |
| Inoculado | 3,95 a | 8,45 ab | 9,10 de | 7,17 b |
| Inoculação + N plantio + N cobertura | 6,42 a | 8,24 ab | 10,39 cde | 8,35 ab |
| Inoculação + N plantio | 5,36 a | 10,12 a | 12,31 abc | 9,26 a |
| Inoculação + N cobertura | 4,50 a | 8,03 ab | 13,13 ab | 8,55 ab |
| *Azospirillum* BR 11.005 | 3,77 a | 7,47 ab | 11,10 bcd | 7,45 b |
| *Bradyrhizobium* BR 116 | 4,82 a | 6,75 b | 10,21 cde | 7,26 b |
| Média | 4,89 C | 8,11 B | 11,08 A | |

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 de produção de biomassa indicam que a inoculação seguida de uma dose suplementar de N, principalmente no plantio, é capaz de produzir biomassa na mesma proporção que a testemunha nitrogenada, podendo também estimular a nodulação.

**Tabela 18.** Massa seca de nódulos e massa seca de raiz da cultivar Ouro Negro sob distintas fontes e épocas de aplicação de N, em três épocas de coletas (em dias após emergência – DAE), sob condições de campo em Seropédica – RJ, em 2014.

| Fonte de N | 32 DAE | 42 DAE | 53 DAE | Média |
|---|---|---|---|---|
| | | Massa de nódulo (mg planta$^{-1}$) | | |
| Testemunha absoluta | 129 | 105 | 114 | 116 ab |
| Testemunha nitrogenada | 146 | 82 | 84 | 104 b |
| Inoculado | 124 | 182 | 94 | 133 ab |
| Inoculação + N plantio + N cobertura | 84 | 145 | 76 | 102 b |
| Inoculação + N plantio | 150 | 166 | 125 | 147 a |
| Inoculação + N cobertura | 154 | 147 | 60 | 120 ab |
| *Azospirillum* BR 11.005 | 108 | 113 | 71 | 97 b |
| *Bradyrhizobium* BR 116 | 122 | 120 | 134 | 125 ab |
| Média | 127 AB | 132 A | 95 B | |
| | | Massa de raiz (g planta$^{-1}$) | | |
| Testemunha absoluta | 0,49 b | 0,89 a | 0,62 c | 0,67 b |
| Testemunha nitrogenada | 0,73 ab | 0,67 a | 1,05 a | 0,82 ab |
| Inoculado | 0,56 ab | 0,80 a | 0,72 bc | 0,69 b |
| Inoculação + N plantio + N cobertura | 0,79 a | 0,75 a | 0,87 abc | 0,80 ab |
| Inoculação + N plantio | 0,73 ab | 0,82 a | 0,95 ab | 0,83 a |
| Inoculação + N cobertura | 0,53 ab | 0,75 a | 1,08 a | 0,79 ab |
| *Azospirillum* BR 11.005 | 0,59 ab | 0,74 a | 0,84 abc | 0,72 ab |
| *Bradyrhizobium* BR 116 | 0,57 ab | 0,70 a | 0,85 abc | 0,70 ab |
| Média | 0,62 C | 0,77 B | 0,87 A | |

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

Não houve diferença entre os tratamentos para o número de plantas ao final do experimento (Tabela 31 no anexo), com uma média geral de 23,1 plantas m$^{-2}$, indicando que as diferentes fontes de N avaliadas não afetaram o stand final do cultivo. Durante a fase de enchimento das vagens, o experimento foi infectado pela antracnose, em um todo, o que pode ter contribuído para os resultados de produção encontrados. Não houve diferença estatística entre os tratamentos no número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de um grão e produção de grãos (Tabela 19). Mesmo sem diferença estatística é notável a diferença de produtividade entre as testemunhas absoluta e nitrogenada, sendo a testemunha absoluta com superioridade de 240 kg ha-1. Apesar da doença, a produção de grãos de todos os tratamentos foi superior à produção média do Estado do Rio de Janeiro (CONAB, 2013).

**Tabela 19.** Número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de um grão e produção de grãos da cultivar Ouro Negro sob distintas fontes e épocas de aplicação de N, sob condições de campo em Seropédica – RJ.

| Fonte de N | Número de vagens por planta | Número de grãos por vagem | Massa de um grão (mg) | Produção de grãos (kg $ha^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|
| Testemunha absoluta | 7,6 | 3,9 | 245 | 1700 |
| Testemunha nitrogenada | 7,3 | 3,6 | 231 | 1460 |
| Inoculado | 8,0 | 3,6 | 236 | 1610 |
| Inoculação + N plantio + N cob | 7,7 | 3,7 | 230 | 1601 |
| Inoculação + N plantio | 8,6 | 3,8 | 242 | 1773 |
| Inoculação + N cob | 8,6 | 3,8 | 237 | 1617 |
| *Azospirillum* BR 11.005 | 7,7 | 3,7 | 243 | 1676 |
| *Bradyrhizobium* BR 116 | 7,8 | 3,6 | 233 | 1500 |
| Média | 7,9 | 3,7 | 237 | 1618 |

## 4.6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos em condições de campo indicam que houve resposta do feijoeiro à inoculação com diferentes estirpes de rizóbio e à adubação nitrogenada suplementar. A população nativa de rizóbios do solo nos diferentes locais mostrou-se competitiva e eficiente e teve elevada influência sobre os resultados encontrados. De modo geral, houve melhor desempenho da cultura quando inoculada e adubada com doses suplementares de N, principalmente quando aplicado no plantio, o que permitiria a redução da aplicação de N da cultura sem perda de produtividade. Por outro lado, apenas na região de Cerrados, no experimento conduzido em Santo Antônio de Goiás, a aplicação de N teve resposta significativa comparando os tratamentos controle, ou seja, nessas condições há resposta a adubação nitrogenada. Pela análise geral dos experimentos, verifica-se que é possível a redução da aplicação da adubação nitrogenada quando associada a inoculação com rizóbio, permitindo um melhor aproveitamento do N adquirido pela FBN.

# 5 CONCLUSÕES GERAIS

Em condições de casa de vegetação, ficou evidenciado que a aplicação suplementar de N em feijoeiro inoculado com rizóbio, no início do ciclo da cultura, estimulou o processo de nodulação e aumentou a atividade da nitrogenase no sistema radicular. O N não foi capaz de inibir a nodulação, quando aplicado em todo o ciclo ou a partir dos 15 dias após transplante, porém inibiu a atividade da nitrogenase, ou seja, os nódulos presentes foram menos ativos.

Há indícios de que adubação com N na forma suplementar em condições de campo pode aumentar a eficiência da FBN na cultura do feijoeiro, reduzindo a dose de N aplicada na cultura. Porém, a população nativa de rizóbios do solo mostra-se muito eficiente no processo de nodulação, uma vez que as plantas não inoculadas apresentam uma grande massa de nódulos.

Devido à grande diversidade genética da cultura e à variação das respostas à adubação em função do ambiente de cultivo, ainda são necessários mais estudos a fim do conhecimento da melhor época de aplicação do N mineral para obter uma recomendação técnica da adubação nitrogenada aproveitando a capacidade de FBN da cultura do feijoeiro.

# 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


ALCANTARA, R.M.M.; ARAÚJO, A.P.; ZAVIER, G.R.; ROCHA, M.M.; RUMJANEK, N.G. Relações entre contribuição da fixação biológica de nitrogênio e a duração do ciclo de diferentes genótipos de leguminosas de grãos. Seropédica: Embrapa Agrobiologia Documentos 197, 2009.

ALMEIDA, L.D.; BULISANI, E.A. Técnicas para aumentar a rentabilidade do feijoeiro. Correio Agrícola, v.1, p.236-243, 1980.

ANDRADE, M.J.B.; LUCCA, P.A.; RESENDE, P.M.; KIKUT, H. Época de colheita em cinco cultivares de feijoeiro e efeitos sobre o rendimento de grãos e seus componentes primários. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v.25, p.213-219, 2001.

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

ARAÚJO, F.F.; CARMONA, F.G.; TRITAN, C.S.; CRESTE, J.E. Fixação biológica de N2 no feijoeiro submetido a dosagens de inoculante e tratamento químico na semente comparado à adubação nitrogenada. Acta Scientiarum Agronomy, v.29, n.4, p.534-540, 2007.

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

BARROS, R.L.N. Interação entre inoculação com rizóbios e adubação nitrogenada de plantio, na produtividade do feijoeiro comum. Seropédica: UFRRJ, 2013. 47p. (Dissertação de Mestrado em Agronomia/Fitotecnia).

BARROS, R.L.N.; OLIVEIRA, L.B.; MAGALHÃES, W.B.; MÉDICI, L.O.; PIMENTEL, C. Interação entre inoculação com rizóbios e adubação nitrogenada de plantio na produtividade do feijoeiro nas épocas da seca e das águas. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v.34, n.4, p.1443-1450, 2013.

BENIZRI, E.; BAUDOIN, E.; GUCKERT, A. Root colonization by inoculated plant growth promoting rhizobacteria. Biocontrol Science and Technology, v.11, p.557-574**,** 2001.

BRITO, L.F. Iniciação da nodulação em cultivares de feijoeiro. Seropédica: UFRRJ, 2013. 56p. (Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo).

BURDMAN, S.; KIGEL, J.; OKON, Y. Effects of Azospirillum brasilense on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Soil Biology & Biochemistry, v.29, n.516, p.923-929, 1997.

CABALLERO, S.V.; LIBARDI, P.L.; REICHARDT, K.; MATSUI, E.; VICTORIA, R. L. Utilização do fertilizante nitrogenado aplicado a uma cultura de feijão. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.20, n.9, p.1031-1040, 1985.

CASSINI, S.T.A; FRANCO, M.C. Fixação biológica de nitrogênio: microbiologia, fatores ambientais e genéticos. In: VIEIRA, C.; PAULA JUNIOR, T.J.; BORÉM, A (eds.). Feijão. 2.ed. Viçosa: UFV. 2006. p.143-170.

CONAB. Acompanhamento da safra 2010/2011: levantamento Dez./2013. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acessado em Janeiro de 2015.

CONAB. Acompanhamento da safra 2010/2011: levantamento Set./2011. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acessado em Agosto de 2013.

DUQUE, F.F.; NEVES, M.C.P.; FRANCO, A.A.; VICTÓRIA, R.L.; BODDEY, R.M. The response of field grown Phaseolus vulgaris to Rhizobium inoculation and qualification of $N_2$ fixation using $^{15}$ N. Plant and Soil, v. 88, p. 333-343, 1985.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2005. Disponível em < http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoPrimSegSafraSulMG/cultivares.htm> Acessado em Janeiro de 2015.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2013. Disponível em: < http://www.cnpaf.embrapa.br/transferencia/tecnologiaseprodutos/cultivares/> Acessado em Janeiro de 2015.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Manual de métodos de análise de solo. 2.ed. Embrapa Solos, p.212., 1997.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2005. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>. Acessado em Agosto de 2013

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2013. Disponível em: https://www.embrapa.br/arroz-e-feijao. Acessado em Janeiro de 2014.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia, 2013. [HOME PAGE] Disponível em <www.cnpab.embrapa.br>, Acesso em: Agosto 2014.

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

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

FERNANDES JÚNIOR, P.I.; REIS, V.M. Algumas limitações à fixação biológica de nitrogênio em leguminosas. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. (Documentos, 252). 33p.

FERREIRA, A.N.; ARF, O.; CARVALHO, M.A.C.; ARAUJO, R.S.; SÁ, M.E.; BUZETTI, S.. Estirpes de *Rhizobium tropici* na inoculação do feijoeiro. Scientia Agrícola, v.57, n.3, p.507-512, 2000.

FERREIRA, P.A.A.; SILVA, M.A.P.; CASSETARI, A.; RUFFINI, M; MOREIRA, F.M.S.; ANDRADE, J.B. Inoculação com cepas de rizóbio na cultura do feijoeiro. Ciência Rural, RS, v.39, n.7, p.2210-2212, 2009.

FIDELIS, R.R.; SANTOS, I.C.; GALVÃO, J.C.C.; PELUZIO, J.M.; LIMA, S.O. Fontes de germoplasma de milho para estresse de baixo nitrogênio. Pesquisa Agropecuária Tropical, v.37, n.3, p.147-153, 2007.

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

GERMAN, M.A.; BURDMAN, S.; OKON, Y.; KIGEL, J. Effects of Azospirillum brasilense on root morphology of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under different water regimes. Biology and Fertility of Soil, v.32, p.259-264, 2000.

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

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

HARDY, R.W.H.; BURNS, R.C.; HOLSTEN, R.D. Applications of the acetylene assay for measurement of nitrogen fixation. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v.5, p.47-81, 1973.

HARTWIG, U.A. The regulation of symbiotic N2 fixation: a conceptual model of N feedback from the ecosystem to the gene expression level. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics, v.1, p.92-120, 1998.

HUNGRIA, M. Sinais moleculares envolvidos na nodulação de leguminosas de rizóbios. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v.18, p.339-364, 1994.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; CHUEIRE, L.M.O.; PROBANZA, A.; GUTTIERREZMAÑERO, F.J.; MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. Soil Biology Biochemistry, v.32, p.1515-1528, 2000.

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

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

HUNGRIA, M.; NEVES M.C.P.; VICTORIA, R.L. Assimilação do nitrogênio pelo feijoeiro I- Atividade da nitrogenase, da nitrito redutase e transporte de N seiva do xilema. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v.9, p.1983-2000, 1985.

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

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Censo Agropecuário 2006. Rio de Janeiro

KANEKO, F. H.; ARG, O.; GITTI, D.C.; ARF, M.V.; FERREIRA, J.P.; BUZETTI, S. Mecanismos de abertura de sulcos, inoculação e adubação nitrogenada em feijoeiro em sistema plantio direto. Bragantia, v.69, n.1, p.125-133, 2010.

KUBOTA, F.Y. Aumento dos teores de fósforo e de molibdênio em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) via adubação foliar. Seropédica: UFRRJ, 2006. 61p. (Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo).

LEIDI, E.O.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, D.N. Nitrogen and phosphorus availability limit $N_2$ fixation in bean. New Phytologist, v.147, p.337-346, 2000.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2. ed. Piracicaba, SP: Potafos, 1997. 319p.

MAPA, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao, acesso em setembro de 2014.

MENDES, I.C.; SUHET, A.R.; PERES, J.R.R.; VARGAS, M.A.T. Eficiência fixadora de estirpes de rizóbio em duas cultivares de feijoeiro. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, v.18, n.3, p.421-425, 1994.

MERCANTE, F.M.; STRALIOTTO, R.; DUQUE, F.F.; FRANCO, A.A. A inoculação do feijoeiro comum com Rizóbio. Seropédica: Embrapa CNPBS, (Comunicado Técnico, 10), 1992. 8p.

MERCANTE, F.M.; TEIXEIRA, M.G.; ABBOUD, A.C.S.; FRANCO, A.A. Avanços biotecnológicos na cultura do feijoeiro sob condições simbióticas. Revista Universidade Rural: Série Ciência da Vida, v.21, p.127-146, 1999.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. 2.ed. Lavras: UFLA., 2006. 729p.

MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F.L.; DIAS, B.G.; VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Selection of bean (*Phaseulous vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. Field Crops Research, v.73, p.121-132, 2002.

MÜLLER, S.H.; PEREIRA, P.A.A. Nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by mineral nitrogen supply at different growth stages. Plant and Soil, v.177, p.55-61, 1995.

MYRTTON, L.R. Developing a breeding strategy to exploit quantitative variation in symbiotic nitrogen fixation. Plant and Soil, v. 82, p. 329-335, 1984

OKON, Y.; KAPULNIK, Y. Development and function of Azospirillum-inoculated roots. Plant and Soil, v.90, p.3-6, 1986

OLIVEIRA, I.P.; ARAUJO, R.S.; DUTRA, L.G. Nutrição mineral e fixação biológica de nitrogênio. In: ARAUJO, R. S., RAVA, C.A., STONE, L.F., & ZIMMERMANN, M.D.O. (eds.). Cultura do feijoeiro comum no Brasil. Piracicaba, SP: Potafós, 1996. p.169-221.

OLIVIERA, D.P. Adubação nitrogenada, estirpes de rizóbio e tratamento fungicida na inoculação de sementes de feijoeiro-comum. Lavras: UFLA 2013. 150p. (Tese de Doutorado em Agronomia/Fitotecnia), 2013.

OSINAME, O.; VAN GINJ, H.; ULEX, P.L.G. Effect of nitrification inhibitors on the fate and efficiency of nitrogenous fertilizers under simulated humid tropical conditions. Tropical Agriculture, v.60, p.211-217, 1983.

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

PEÑA-CABRIALES, J.J.; GRAGEDA-CABRERA, O.A.; KOLA, V.; HARDARSON. G. Time course of N2 fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant and Soil, v.152, p.115-121, 1993.

PEREIRA, P.A.A. Fixação biológica de nitrogênio do feijoeiro. Informe Agropecuário, v.8, p.41-46, 1982

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

PORTES, T.A. Ecofisiologia. In: ARAUJO, R.S., RAVA, C.A., STONE, L.F., & ZIMMERMANN, M.D.O. (eds.). Cultura do feijoeiro comum no Brasil. Piracicaba, SP: Potafós, 1996. p.169-221.

RELARE. Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola, 2004. Disponível em: <http://www.relare.org.br>. Acessado em Agosto de 2013

REMANS, R.; BEEBE, S.; BLAIR, M.; MANRIQUE, G.; TOVAR, E.; RAO, I.; CROONENBORGHS, A.; TORRES-GUTIERREZ, R.; EL-HOWEITY, M.; MICHIELS, J.; VANDERLEYDEN, J. Physiological and genetic analysis of root responsiveness to auxin-producing plant growth-promoting bacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant and Soil, v.302, p.149-161, 2008

RENNIE, R.J.; KEMP, G.A. N2 fixation in field beans quantified by $^{15}N$ isotope dilution. II. Effect of cultivars of beans. Agronomy Journal, v.75, p.645-649, 1983.

RIGAUD, J. Comparison on the efficiency of nitrate and nitrogen fixation in crop yield. In: BEWLEY, J.S. (ed.). Nitrogen and carbon metabolism. The Hague, Martinus Nijohoff, 1981. p.2405-2408.

ROMANINI JUNIOR, A.; ARF, O.; BINOTTI, F.F.S.; SÁ, M.S.; BUZETTI, S.; FERNANDES, F.A. Avaliação da inoculação de rizóbios e adubação nitrogenada no desenvolvimento do feijoeiro, sob sistema de plantio direto. Biooscience Journal, v.23, n.4, p.74-82, 2007.

RUSCHEL, A.P.; VOSE, P.B.; MATSUI, E.; VICTORIA, R.L.; SAITO, S.M.T. Field evaluation of $N_2$-fixation and N-utilization by Phaseolus bean varieties determined by 15N isotope dilution. Plant and Soil, v.65, p.397-407, 1982.

SANTOS, A.B.; FAGERIA, N.K. Resposta do feijoeiro ao manejo de nitrogênio em várzea tropicais. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.38, n.11, p.1265-1271, 2003.

SANTOS, A.B. DOS; FAGERIA, N.K.; SILVA, O.F.; MELO, M.L.B. Características fisiológicas do feijoeiro em várzeas tropicais afetadas por doses e manejo de nitrogênio. Ciência e Agrotecnologia, v.32, p.23-31, 2008.

SANTOS, A.B.; SILVA, O.F. Manejo do nitrogênio. In: AIDAR, H.; KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L.F. (Ed.). Produção do feijoeiro comum em várzeas tropicais. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2002. p.207-216.

SCURI, A. ImLab versão 2.3. TecGraf / PUC - Rio, 2010.

SILVA, E.F.; MARCHETTI, M.E.; SOUZA, L.C.F.; MERCANTE, F.M.; RODRIGUES, E.T.; VITORINO, A.C.T. Inoculação do feijoeiro com *Rhizobium tropici* associada à exsudatos de *Mimosa flocculosa* com diferentes doses de nitrogênio. Bragantia, v.68, n.2, p.443-451, 2009.

SOARES, B.L. Avaliação técnico-econômica do feijoeiro-comum inoculado com rizóbio em diferentes ambientes. 2011. 150 p. Tese de doutorado (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

SOUZA, E.F.C.; SORATTO, R.P.; PAGANI, F.A. Aplicação de nitrogênio e inoculação com rizóbio em feijoeiro-comum cultivado após milho consorciado com braquiária. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.46, n.4, p.370-377, 2011.

STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. Biological Nitrogen Fixation. New York: Chapman and Hall, 1992. 943p

STEVENSON, F.J.; COLE, M.A. Cycles of soil: Carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients. 2.ed. NewYork, John Wiley & Sons, 1999.

STRALIOTTO, R. Protocolo operacional para o preparo da turfa para inoculante rizobiano. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. 4p.

STRALIOTTO, R.; TEIXEIRA, M. G. A variabilidade genética do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.): aplicações nos estudos das interações simbióticas e patogênicas. Embrapa Agrobiologia, Documentos 126, 2000.

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, 2002. p.122-153.

STRALIOTTO, R.; TEIXEIRA, M.G.; MERCANTE, F.M.. Cultivo do feijoeiro comum. Santo Antônio de Goiás, Embrapa Arroz e Feijão, 2003. Disponivel em < http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/fbnitrogenio.htm> Acessado em Janeiro de 2015.

TEIXEIRA, J.C. Modernização da agricultura no Brasil: Impactos econômicos, sociais e ambientais. Revista Eletrônica da Associação dos Geógrafos Brasileiros- Seção Três Lagoas. Tres lagoas-MS, V2- nº 2- ano 2, setembro de 2005.

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

VENTURINI, S.F.; ANTONIOLLI, Z.I.; VENTURINI, E.F.; GIRACCA, E.M.N. Efeito da inoculação com rhizobium e aplicação de nitrogênio em cobertura na cultura do feijoeiro. UFSM, CCR, Departamento de Solos, Santa Maria-RS. 4p. 2002

VERONEZI, S.D.F.; COSTA, M.R.; SILVA, A.T.; MERCANTE, F.M. Co-inoculação de rizóbio e *Azospirillum brasilense* em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: Seminário de Agroecologia de Matogrosso do Sul, 4. 2012, Dourados. Cadernos de Agroecologia. Dourados: UEMS, 2012. v.7, n.2, p.1-5,2012.

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

XAVIER, T.F.; ARAÚJO, A.S.F.; SANTOS, V.B.; CAMPOS, F.L. Inoculação e adubação nitrogenada sobre a nodulação e a produtividade de grãos de feijão-caupi. Ciência Rural, 38: 2037-2041, 2008.

YADEGARI, M.; RAHMANI, H.A.; NOORMOHAMMADI, G.; AYNEBAND, A. Plant growth promoting rhizobacteria increase growth, yield and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. Journal of Plant Nutrition, v.33, p.1733-1743, 2010.

# 7 ANEXOS

## 7.1 Quadros das análises de variância dos experimentos em hidroponia

**Tabela 20.** Valores de quadrado médio da análise de variância de massa seca de nódulos, número de nódulos, diâmetro de nódulos, massa unitária de nódulos do experimento Ontogenia da nodulação sob inoculação.

| Fonte de variação | GL | Massa seca de nódulos | Número de nódulos | Diâmetro de nódulos | Massa unitária de nódulos |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 11 DAT | | | |
| Repetição | 4 | 678,250 | 34241,25 | 2248,250 | 51,350 |
| Fonte de N | 1 | 1188,100 | 10890,00 | 2250,00 | 202,500 |
| Erro | 4 | 818,850 | 18121,25 | 6187,250 | 115,750 |
| CV (%) | | 90,84 | 64,41 | 71,51 | 96,93 |
| | | 14 DAT | | | |
| Repetição | 4 | 17814,40 | 70016,25 | 1635,150 | 4921,600 |
| Fonte de N | 1 | 31472,100* | 970322,500* | 1440,000 | 3763,600 |
| Erro | 4 | 3198,600 | 112141,250 | 662,750 | 5584,600 |
| CV (%) | | 32,94 | 60,50 | 18,16 | 157,00 |
| | | 21 DAT | | | |
| Repetição | 4 | 23934,25 | 36646,25 | 179,850 | 707,850 |
| Fonte de N | 1 | 6760,00 | 204490+ | 115,600 | 3062,500 |
| Erro | 4 | 23244,75 | 30533,75 | 771,350 | 1870,250 |
| CV (%) | | 41,21 | 29,03 | 14,73 | 63,50 |
| | | 28 DAT | | | |
| Repetição | 4 | 156277,0 | 123290,0 | 5652,350 | 1908,600 |
| Fonte de N | 1 | | 81721,600** | 126787,600 | 115,600 |
| Erro | 4 | 89615,60 | 124465,0 | 4760,75 | 901,600 |
| CV (%) | | 41,87 | 43,80 | 38,31 | 36,35 |
| | | 35 DAT | | | |
| Repetição | 4 | 182956,3 | 55990,0 | 782,650 | 1388,600 |
| Fonte de N | 1 | 1383840 | 1270922,500 | 1210,000 | 202,500 |
| Erro | 4 | 442780,25 | 236235,0 | 647,750 | 1295,500 |
| CV (%) | | 65,65 | 51,41 | 10,53 | 35,67 |
| | | 42 DAT | | | |
| Repetição | 4 | 558606,1 | 426546,25 | 2062,90 | 855,00 |
| Fonte de N | 1 | 121660,9 | 9922,50 | 10240,00 | 52,900 |
| Erro | 4 | 799979,9 | 442291,25 | 3021,500 | 2617,400 |
| CV (%) | | 53,37 | 55,44 | 24,24 | 37,21 |

*, ** e ***: significativo aos níveis de 5, 1 e 0,1 % pelo teste F.
+: significativo a 6% pelo teste F.

**Tabela 21**: Valores de quadrado médio da análise de variância de massa seca de parte aérea, massa de raiz e razão raiz:parte aérea do experimento Ontogenia da nodulação sob inoculação.

| Fonte de variação | GL | Massa seca de parte aérea | Massa seca de raiz | Razão raiz:parte aérea |
|---|---|---|---|---|
| | | 11 DAT | | |
| Repetição | 4 | 4634,250 | 131,850 | 6546,65 |
| Fonte de N | 1 | 30470,4* | 4796,10* | 7075,60 |
| Erro | 4 | 3431,150 | 547,850 | 12456,35 |
| CV (%) | | 23,15 | 38,31 | 43,23 |
| | | 14 DAT | | |
| Repetição | 4 | 6519,350 | 1219,100 | 7846,600 |
| Fonte de N | 1 | 75516,100* | 592,900 | 214915,600* |
| Erro | 4 | 5011,850 | 650,900 | 15592,600 |
| CV (%) | | 20,75 | 23,64 | 30,88 |
| | | 21 DAT | | |
| Repetição | 4 | 6993,900 | 1108,150 | 5446,250 |
| Fonte de N | 1 | 575520,1** | 19891,6+ | 130644,9* |
| Erro | 4 | 16594,100 | 2943,850 | 6856,150 |
| CV (%) | | 24,32 | 31,69 | 18,63 |
| | | 28 DAT | | |
| Repetição | 4 | 200579,650 | 7119,650 | 23392,15 |
| Fonte de N | 1 | 6586945,600** | | 215502,400* |
| Erro | 4 | 133976,850 | 1455,350 | 12923,65 |
| CV (%) | | 26,37 | 13,83 | 32,59 |
| | | 35 DAT | | |
| Repetição | 4 | 138799,9 | 11299,35 | 3698,150 |
| Fonte de N | 1 | 6225210,0** | 11356,90 | 295840** |
| Erro | 4 | 123698,5 | 12910,15 | 5551,750 |
| CV (%) | | 20,32 | 28,54 | 20,24 |
| | | 42 DAT | | |
| Repetição | 4 | 736284,650 | 36248,000 | 3585,350 |
| Fonte de N | 1 | 16271553,6* | 197683,6* | 45292,900 |
| Erro | 4 | 912682,85 | 27652,100 | 8708,150 |
| CV (%) | | 30,02 | 24,45 | 31,12 |

*, ** e ***: significativo aos níveis de 5, 1 e 0,1 % pelo teste F.
+: significativo a 6% pelo teste F.

**Tabela 22.** Valores de quadrado médio da análise de variância do teor e conteúdo de N na parte aérea e na raiz no experimento Ontogenia da nodulação sob inoculação

| Fonte de variação | GL | Teor de N na parte aérea | Teor de N na raiz | Conteúdo de N na parte aérea | Conteúdo de N na raiz |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | 35 DAT | | |
| Repetição | 4 | 1621,900 | 2343,400 | 5915,350 | 1124,150 |
| Fonte de N | 1 | 27667,600* | 20250,000+ | 236544,400* | 5475,600 |
| Erro | 4 | 3288,600 | 2805,000 | 22806,150 | 1140,350 |
| CV (%) | | 18,14 | 28,75 | 30,12 | 43,40 |
| | | | 42 DAT | | |
| Repetição | 4 | 425,100 | 2002,100 | 48723,850 | 1096,350 |
| Fonte de N | 1 | 184,900 | 19096,900** | 1190940,100* | 30250,000* |
| Erro | 4 | 2121,900 | 682,400 | 63781,850 | 1726,250 |
| CV (%) | | 17,18 | 14,83 | 29,61 | 33,40 |

*, ** e ***: significativo aos níveis de 5, 1 e 0,1 % pelo teste F.
+: significativo a 6% pelo teste F.

**Tabela 23.** Valores de quadrado médio da análise de variância de massa de nódulos, número de nódulos, diâmetro de nódulos, massa unitária de nódulos, aos 11, 15 e 25 DAT do experimento Ontogenia da nodulação e sob diferentes fontes de N.

| Fonte de variação | GL | Massa de nódulos | Número de nódulos | Diâmetro de nódulos | Massa unitária de nódulos |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | 11 DAT | | |
| Repetição | 4 | 6,233 | 30,100 | 88575,233 | 20478,900 |
| Fonte de N | 2 | 86,467* | 342,600* | 2359944,27*** | 369874,400** |
| Erro | 8 | 18,133 | 81,100 | 123266,933 | 22277,9 |
| CV (%) | | 138,86 | 145,25 | 68,99 | 72,60 |
| | | | 15 DAT | | |
| Repetição | 4 | 119,667 | 151,000 | 301431,567 | 180161,933 |
| Fonte de N | 2 | 886,667** | 7783,800*** | 4260386,47*** | 237072,200 |
| Erro | 8 | 101,417 | 154,550 | 201446,967 | 199766,283 |
| CV (%) | | 88,86 | 47,81 | 56,45 | 177,93 |
| | | | 25 DAT | | |
| Repetição | 4 | 633,567 | 541,733 | 86122,433 | 105002,833 |
| Fonte de N | 2 | 3211,400** | 8525,600*** | 6541172,27*** | 708888,800** |
| Erro | 8 | 249,317 | 235,683 | 35869,933 | 60547,133 |
| CV (%) | | 57,63 | 38,77 | 14,37 | 56,70 |

*, ** e ***: significativo aos níveis de 5, 1 e 0,1 % pelo teste F,

**Tabela 24.** Valores de quadrado médio da análise de variância de massa de parte aérea, raiz, razão raiz: parte aérea e atividade da nitrogenase do experimento Ontogenia da nodulação e sob diferentes fontes de N.

| | GL | Massa de parte aérea | Massa de raiz | Razão raiz:parte aérea | Atividade da nitrogenase |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | 11 DAT | | |
| Repetição | 4 | 3808,40 | 942,233 | 614,567 | 114,100 |
| Fonte de N | 2 | 54916.867** | 22.400 | 177034.467*** | 309.067 |
| Erro | 8 | 4403.20 | 473.733 | 2515.717 | 127.900 |
| CV (%) | | 16.71 | 10.65 | 8.99 | 220.31 |
| | | | 15 DAT | | |
| Repetição | 4 | 37783.333 | 2627.167 | 594.000 | 1084.933 |
| Fonte de N | 2 | 383360,467** | 4577,867 | 296337,267*** | 26480,000** |
| Erro | 8 | 37518,633 | 2622,367 | 14628,600 | 1517,583 |
| CV (%) | | 31,41 | 21,67 | 24,72 | 88,14 |
| | | | 25 DAT | | |
| Repetição | 4 | 413680,733 | 37839,400 | 12230,400* | 1446160879,267 |
| Fonte de N | 2 | 10365036,200*** | 149452,800* | 355214,067*** | 1163181967,800 |
| Erro | 8 | 145603,533 | 17488,300 | 2870,900 | 760753524,717 |
| CV (%) | | 17,68 | 27,29 | 15,00 | 180,38 |
| | | | 35 DAT | | |
| Repetição | 4 | 1702335,067 | 39171,233 | 2737,500 | 14714234340,333 |
| Fonte de N | 2 | 16570838,600*** | 999234,067** | 36711,800* | 110779749620,600* |
| Erro | 8 | 869291,017 | 85089,483 | 6598,050 | 16184716302,183 |
| CV (%) | | 23,85 | 32,28 | 28,20 | 144,25 |
| | | | 45 DAT | | |
| Repetição | 4 | 1228670,100 | 83468,733 | 18446,100 | 5255880353,333 |
| Fonte de N | 2 | 37013749,067** | 334451,467* | 126427,267* | 26796517564,067* |
| Erro | 8 | 3850482,650 | 44042,883 | 25259,850 | 5257989062,983 |
| CV (%) | | 34,09 | 24,32 | 67,79 | 171,51 |

*, ** e ***: significativo aos níveis de 5, 1 e 0,1 % pelo teste F.

**Tabela 25.** Valores de quadrado médio da análise de variância do teor e conteúdo de N na parte aérea e raiz no experimento Ontogenia da nodulação sob diferentes fontes de N.

| Fonte de variação | GL | Teor de N na parte aérea | Teor de N na raiz | Conteúdo de N na parte aérea | Conteúdo de N na raiz |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | 35 DAT | | |
| Repetição | 4 | 802,667 | 415,433 | 50766,100 | 2235,267 |
| Fonte de N | 2 | 4267,400 | 9184,467** | 525783,267** | 86150,867*** |
| Erro | 8 | 1399,317 | 654,383 | 32538,600 | 3060,367 |
| CV (%) | | 16,55 | 11,02 | 21,49 | 25,32 |
| | | | 45 DAT | | |
| Repetição | 4 | 683,900 | 1462,167 | 32435,333 | 4540,267 |
| Fonte de N | 2 | 2452,267* | 2962,467* | 1084186,867* | 30320,267*** |
| Erro | 8 | 488,600 | 580,217 | 130023,283 | 1552,267 |
| CV (%) | | 11,06 | 10,05 | 33,01 | 18,89 |

*, ** e ***: significativo aos níveis de 5, 1 e 0,1 % pelo teste F.

**Tabela 26.** Valores de quadrado médio da análise de variância de massa seca de nódulos, número de nódulos, diâmetro de nódulos, massa unitária de nódulos, do experimento Ontogenia da nodulação sob diferentes épocas de aplicação de N.

| Fonte de variação | GL | Massa seca de nódulos | Número de nódulos | Diâmetro de nódulos | Massa unitária de nódulos |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 14 DAT | | | |
| Repetição | 4 | 83,90 | 757,85 | 18248,10 | 2769,65 |
| Fonte de N | 1 | 2190,400** | 13987,600* | 3070268,100*** | 439740,900*** |
| Erro | 4 | 83,900 | 757,850 | 18248,100 | 2769,650 |
| CV (%) | | 61,89 | 73,61 | 24,38 | 25,10 |
| | | 21 DAT | | | |
| Repetição | 4 | 50,600 | 331,400 | 153846,100 | 17538,150* |
| Fonte de N | 1 | 8761,600*** | 13249,600** | 192932,100 | 941262,400*** |
| Erro | 4 | 56,600 | 214,600 | 107956,100 | 1975,650 |
| CV (%) | | 23,96 | 30,02 | 36,72 | 10,60 |
| | | 28 DAT | | | |
| Repetição | 4 | 2178,800 | 1421,575 | 49400,125 | 80912,200 |
| Fonte de N | 1 | 54528,600*** | 17302,850*** | 243718,983* | 1134606,183** |
| Erro | 4 | 3151,267 | 1328,642 | 64654,192 | 115335,767 |
| CV (%) | | 46,13 | 30,41 | 19,10 | 38,80 |
| | | 35 DAT | | | |
| Repetição | 4 | 13846,175 | 6056,925 | 80808,500 | 463869,425 |
| Fonte de N | 1 | 91630,533** | 13010,533* | 50017,667 | 2034560,183** |
| Erro | 4 | 15266,242 | 3823,158 | 36348,500 | 255074,392 |
| CV (%) | | 72,34 | 56,11 | 17,45 | 38,79 |
| | | 42 DAT | | | |
| Repetição | 4 | 11406,825 | 2415,675 | 83871,875 | 157033,800* |
| Fonte de N | 1 | 113751,250*** | 41296,733** | 446606,050* | 1119456,183*** |
| Erro | 4 | 7502,958 | 3778,442 | 123742,342 | 49408,100 |
| CV (%) | | 54,43 | 51,10 | 31,67 | 21,35 |

*, ** e ***: significativo aos níveis de 5, 1 e 0,1 % pelo teste F.

**Tabela 27.**Valores de quadrado médio da análise de variância de massa seca de parte aérea, raiz, razão raiz: parte aérea e atividade da nitrogenase do experimento Ontogenia da nodulação sob diferentes épocas de aplicação de N.

| Fonte de variação | GL | Massa seca de parte aérea | Massa de raiz | Razão raiz:parte aérea | Atividade da nitrogenase |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | 14 DAT | | |
| Repetição | 4 | 1711,400 | 705,250 | 2795,750 | 24689,054 |
| Fonte de N | 1 | 29376,400+ | 864,900 | 221712,100*** | 188815,084* |
| Erro | 4 | 4756,400 | 940,150 | 1761,850 | 24689,054 |
| CV (%) | | 20,36 | 22,46 | 8,94 | 114,35 |
| | | | 21 DAT | | |
| Repetição | 4 | 53125,900 | 16891,650 | 21033,850 | 6834,958 |
| Fonte de N | 1 | 1282356,100** | 1822,500 | 721459,600** | 65464,285* |
| Erro | 4 | 44510,100 | 5167,750 | 12726,850 | 6827,774 |
| CV (%) | | 26,41 | 23,02 | 20,65 | 102,08 |
| | | | 28 DAT | | |
| Repetição | 4 | 204492,325 | 8789,825 | 1306,000 | 5095219,359 |
| Fonte de N | 1 | 1616871,267*** | 47974,267 | 63128,583** | 14398118,609+ |
| Erro | 4 | 124012,058 | 23479,392 | 5798,167 | 4454936,923 |
| CV (%) | | 17,82 | 27,98 | 21,17 | 147,27 |
| | | | 35 DAT | | |
| Repetição | 4 | 233505,125 | 4609,625 | 1978,050 | 74742762,247 |
| Fonte de N | 1 | 414424,333 | 111164,133* | 79670,317* | 108474812,899 |
| Erro | 4 | 760760,458 | 19573,425 | 14348,650 | 108259883,517 |
| CV (%) | | 28,85 | 19,96 | 38,51 | 277,93 |
| | | | 42 DAT | | |
| Repetição | 4 | 57967,075 | 26809,825 | 3951,200 | 977141,169 |
| Fonte de N | 1 | 838872,850 | 103687,650* | 41018,850* | 3560862,922 |
| Erro | 4 | 685992,142 | 27574,192 | 10772,100 | 1737192,685 |
| CV (%) | | 27,36 | 20,73 | 31,04 | 181,44 |

*, ** e ***: significativo aos níveis de 5, 1 e 0,1 % pelo teste F.

**Tabela 28.** Valores de quadrado médio da análise de variância do teor e conteúdo de N na parte aérea e na raiz no experimento Ontogenia da nodulação sob diferentes épocas de aplicação de N.

| Fonte de variação | GL | Teor de N na parte aérea | Teor de N na raiz | Conteúdo de N na parte aérea | Conteúdo de N na raiz |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | 35 DAT | | |
| Repetição | 4 | 1463,750 | 2044,550 | 26898,675 | 405,950 |
| Fonte de N | 1 | 2084,267 | 7610,983** | 104174,050 | 1647,600 |
| Erro | 4 | 1563,850 | 729,817 | 52330,342 | 1356,017 |
| CV (%) | | 13,41 | 10,85 | 25,85 | 21,61 |
| | | | 42 DAT | | |
| Repetição | 4 | 2405,750 | 285,675 | 7965,550 | 1712,825 |
| Fonte de N | 1 | 2076,133 | 12718,450** | 111766,050 | 2917,867 |
| Erro | 4 | 7947,050 | 1465,408 | 102591,217 | 3021,825 |
| CV (%) | | 27,01 | 16,25 | 32,75 | 29.65 |

*, ** e ***: significativo aos níveis de 5, 1 e 0,1 % pelo teste F.

## 7.2 Quadros das análises de variância dos experimentos de campo

**Tabela 29.** Valores de quadrado médio da análise de variância de massa seca de parte aérea, massa seca de nódulos, produção de grãos (m²) e produção de grãos em 3m² da cultivar Ouro Negro do experimento de Rio das Ostras – RJ

| Fonte de variação | GL | Massa seca de parte aérea | Massa seca de nódulos | Produção de grãos m2 | Produção de grãos $3m^2$ |
|---|---|---|---|---|---|
| Repetição | 3 | 8921,849 | 759,891 | 180435,182 | 79221,750 |
| Cultivar | 3 | 16873,849* | 626,307 | 596634,849** | 342489,875*** |
| Fonte de N | 3 | 13144,057* | 820,682 | 66329,057 | 50631,125 |
| Cult x N | 9 | 4936,974 | 626,113 | 177988,891 | 33511,528 |
| Erro | 45 | 4310,516 | 525,046 | 121976,682 | 34047,017 |
| CV (%) | | 16,82 | 52,51 | 29,94 | 23,35 |

*, ** e ***: significativo aos níveis de 5, 1 e 0,1 % pelo teste F.

**Tabela 30.** Valores de quadrado médio da análise de variância de massa de parte aérea e nódulos das cultivares Ouro Negro e Pérola do experimento de Rio das Ostras –RJ

| Fonte de variação | GL | Massa de parte aérea | Massa de nódulos |
|---|---|---|---|
| Repetição | 3 | 664281,558 | 54294,025** |
| Cultivar | 1 | 1207910,025 | 748,225 |
| Fonte de N | 4 | 1159797,787+ | 20518,600* |
| Cult x fonte | 4 | 10404,963 | 9166,850 |
| Erro | 27 | 486242,447 | 7554,025 |
| CV (%) | | 17,29 | 115,39 |

*, ** e ***: significativo aos níveis de 5, 1 e 0,1 % pelo teste F.

+: significativo a 6% pelo teste F.

**Tabela 31.** Valores de quadrado médio da análise de variância do número de plantas, número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de um grão e produção de grãos (m²) e produção de grãos em 3m² da cultivar Ouro Negro do experimento de Rio das Ostras – RJ

| Fonte de variação | GL | Número de plantas | Número de vagens por planta | Número de grãos por vagem | Massa de 1 grão | Produção de grãos $m^2$ | Produção de grãos 3m2 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Repetição | 3 | 31,292* | 25,667 | 18,425 | 129,358 | 248825,967 | 347017,233 |
| Cultivar | 1 | 0,225 | 152,100 | 21,025 | 207,025 | 69056,100 | 539632,900+ |
| Fonte de N | 4 | 72,038*** | 1795,150*** | 19,975 | 75,188 | 461933,688* | 289017,600 |
| Cult x fonte | 4 | 20,163 | 212,975 | 8,275 | 194,213 | 34528,538 | 7098,650 |
| Erro | 27 | 8,366 | 260,148 | 25,240 | 477,692 | 145825,874 | 189238,826 |
| CV (%) | | 9,86 | 21,77 | 16,25 | 7,51 | 20,49 | 22,33 |

*, ** e ***: significativo aos níveis de 5, 1 e 0,1 % pelo teste F.
+: significativo a 6% pelo teste F.

**Tabela 32.** Valores de quadrado médio da análise de variância dos dados de massa seca de nódulos, número de plantas, número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de um grão, produção por metro quadrado e produção em três metros quadrados no experimento realizado em Macaé - RJ.

| Fonte de variação | GL | Massa seca de nódulos | Número de plantas | Número de vagens por planta | Número de grãos por vagem | Massa de 1 grão | Produção de grãos m2 | Produção de grãos 3 m2 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Repetição | 3 | 226,031 | 15,531* | 450,458** | 48,542 | 114,615 | 29035,448 | 75215,875 |
| Fonte de N | 7 | 157,924 | 7,067 | 77,982 | 8,839 | 126,103 | 204732,39 | 48231,125 |
| Erro | 21 | 118,865 | 4,079 | 86,935 | 40,018 | 175,948 | 124366,64 | 82021,875 |
| CV (%) | | 87,88 | 7,32 | 11,06 | 18,04 | 5,45 | 17,90 | 13,54 |

*, ** e ***: significativo aos níveis de 5, 1 e 0,1 % pelo teste F.

**Tabela 33.** Valores de quadrado médio da análise de variância dos dados da coleta de biomassa da cultivar Ouro Negro realizada aos 35 DAE no experimento realizado de Santo Antônio de Goiás - GO**.**

| Fonte de variação | GL | Massa seca de parte aérea | Massa seca de nódulos |
|---|---|---|---|
| Repetição | 3 | 199488,326*** | 199841,636 |
| Fonte de N | 10 | 67563,764* | 86148,668 |
| Erro | 30 | 24952,909 | 79427,020 |
| CV (%) | | 18,39 | 165,16 |

*, ** e ***: significativo aos níveis de 5, 1 e 0,1 % pelo teste F.

**Tabela 34.** Valores de quadrado médio da análise de variância dos dados de produtividade da cultivar Ouro Negro do experimento realizado de Santo Antônio de Goiás - GO.

| Fonte de variação | GL | Número de plantas | Número de vagens por planta | Número de grãos por vagem | Massa de 1 grão | Produção de grãos m2 | Produção de grãos 3 m2 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Repetição | 3 | 11,788 | 161,545 | 7,061 | 94,091 | 371527,417 * | 609513,780 * |
| Fonte de N | 10 | 15,605 | 623,018** | 30,305+ | 51,768 | 413487,241 ** | 223335,768 |
| Erro | 30 | 8,805 | 198,545 | 14,644 | 356,108 | 105335,550 | 138039,180 |
| CV (%) | | 10,48 | 17,37 | 12,62 | 6,49 | 16,44 | 17,49 |

*, ** e ***: significativo aos níveis de 5, 1 e 0,1 % pelo teste F.
+: significativo a 6% pelo teste F.

**Tabela 35.** Valores de quadrado médio da análise de variância dos dados da coleta de biomassa das cultivares Ouro Negro e Pérola realizada aos 35 DAE no experimento realizado de Santo Antônio de Goiás - GO.

| Fonte de variação | GL | Massa seca de parte aérea | Massa seca de nódulos |
|---|---|---|---|
| Fonte de variação | 3 | 664281,558 | 54294,025** |
| Repetição | 1 | 1207910,025 | 748,225 |
| Cultivar | 4 | 1159797,787+ | 20518,600* |
| Fonte de N | 4 | 10404,963 | 9166,850 |
| Cult x fonte | 27 | 486242,447 | 7554,025 |
| Erro | | 17,29 | 115,39 |
| CV (%) | | | |

*, ** e ***: significativo aos níveis de 5, 1 e 0,1 % pelo teste F.
+: significativo a 6% pelo teste F.

**Tabela 36.** Valores de quadrado médio da análise de variância dos dados de produtividade das cultivares Ouro Negro e Pérola do experimento realizado de Santo Antônio de Goiás - GO.

| Fonte de variação | GL | Número de plantas | Número de vagens por planta | Número de grãos por vagem | Massa de 1 grão | Produção de grãos $m^2$ | Produção de grãos 3 $m^2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Repetição | 3 | 31.292* | 25,667 | 18,425 | 129,358 | 248825,967 | 347017,233 |
| Cultivar | 1 | 0,225 | 152,100 | 21,025 | 207,025 | 69056,100 | 539632,900 + |
| Fonte de N | 4 | 72,038*** | 1795,150** * | 19,975 | 75,188 | 461933,688 * | 289017,600 |
| Cult x fonte | 4 | 20,163 | 212,975 | 8,275 | 194,213 | 34528,538 | 7098,650 |
| Erro | 27 | 8,366 | 260,148 | 25,240 | 477,692 | 145825,874 | 189238,826 |
| CV (%) | | 9,86 | 21,77 | 16,25 | 7,51 | 20,49 | 22,33 |

*, ** e ***: significativo aos níveis de 5, 1 e 0,1 % pelo teste F.

**Tabela 37.** Valores de quadrado médio da análise de variância conjunta das três coletas de biomassa do experimento realizado em Seropédica - RJ.

| Fonte de variação | GL | Massa seca de caule | Massa seca de folha | Massa seca de parte aérea | Massa seca de raiz | Massa seca de nódulos |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Repetição | 4 | 14448,688 | 43595,221 | 136793,363* | 425,217 | 8496,779 |
| Fonte de N | 7 | 12377,138 | 60534,808* | 134175,789* | 609,104 | 4335,581 |
| Erro A | 28 | 6077,111 | 18160,264 | 42924,501 | 374,455 | 4749,441 |
| Coleta | 2 | 684780,308*** | 509254,158*** | 3829592,475*** | 6211,525*** | 16819,633 |
| N x coleta | 14 | 7221,413* | 39669,187* | 89837,789** | 740,096* | 3809,052 |
| Erro B | 64 | 3143,015 | 18324,621 | 35154,927 | 334,900 | 6090,052 |
| CV (%) | | 24,21 | 26,04 | 23,37 | 24,26 | 66,12 |

*, ** e ***: significativo aos níveis de 5, 1 e 0,1 % pelo teste F,

**Tabela 38.** Valores de quadrado médio da análise de variância conjunta dos dados de massa seca de vagem, em duas coletas, do experimento realizado em Seropédica -RJ,

| Fonte de variação | GL | Massa de vagem |
|---|---|---|
| Repetição | 4 | 4962,644 |
| Fonte de N | 7 | 2861,714 |
| Erro A | 28 | 1966,665 |
| Coleta | 1 | 331283,800*** |
| N x coleta | 7 | 2710,143 |
| Erro B | 32 | 2006,163 |
| CV (%) | 58,63 | |

*, ** e ***: significativo aos níveis de 5, 1 e 0,1 % pelo teste F.