

UFRRJ

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

TESE

**Fixação Biológica de Nitrogênio em Cultivares de
Feijoeiro Estimada pela Abundância Natural de ^{15}N**

Rafael Sanches Pacheco

2014



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

**FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM CULTIVARES DE
FEIJOEIRO ESTIMADA PELA ABUNDÂNCIA NATURAL DE ^{15}N**

RAFAEL SANCHES PACHECO

Sob a Orientação do Professor
Adelson Paulo de Araújo

e Co-orientação dos Pesquisadores
Rosângela Stralotto
Enderson Petrônio de Brito Ferreira

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

Seropédica, RJ
Agosto de 2014

641.3565

P116f

T

Pacheco, Rafael Sanches, 1981-

Fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijoeiro estimada pela abundância natural de ^{15}N / Rafael Sanches Pacheco – 2014.

140 f.: il.

Orientador: Adelson Paulo de Araújo.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo.

Bibliografia: f. 85-100.

1. Feijão-comum – Cultivo – Teses. 2. Nitrogênio – Fixação – Teses. 3. Isótopos – Teses. 4. Rhizobium leguminosarum – 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.

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

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

RAFAEL SANCHES PACHECO

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

TESE APROVADA EM 19/08/2014.

Adelson Paulo de Araújo. Dr. UFRRJ
(Orientador)

Carlos Pimentel. Ph.D. UFRRJ

Robert Michael Boddey. Ph.D. Embrapa Agrobiologia

Jean Luiz Simões de Araújo. Dr. Embrapa Agrobiologia

Iêda de Carvalho Mendes. Ph.D. Embrapa Cerrados

Aos meus pais, minha irmã e meus sobrinhos, pela forte estrutura familiar e por me apoiarem e estarem sempre ao meu lado em todas as importantes decisões da minha vida.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Vida... Por tudo que ela nos ensina!

Aos meus pais, Juarez Torres Pacheco e Regina Lúcia Sanches Pacheco, que com muito amor, carinho, compreensão e apoio incondicional me deram forças no que fosse necessário para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

À minha irmã Érika Sanches Pacheco pela amizade, apoio e incentivo, sempre valiosos.

Ao Professor Dr. Adelson Paulo de Araújo pelas longas conversas, orientação e ensinamentos sobre pesquisa científica.

À Pesquisadora Dr^a. Rosângela Straliozzo pela orientação, e exemplo de dedicação ao trabalho.

Ao Pesquisador Dr. Enderson Petrônio de Brito Ferreira pela orientação e apoio nos experimentos conduzidos na Embrapa Arroz e Feijão.

À UFRRJ por proporcionar minha formação acadêmica e alguns dos melhores anos da minha vida.

Ao CPGA-CS e toda sua equipe pela atenção e competência no trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

Aos membros da Banca avaliadora, pela valiosa contribuição oferecida para a construção deste trabalho.

À toda equipe da EMBRAPA Agrobiologia, pela ajuda imprescindível sem a qual este trabalho não poderia ser realizado.

À EMBRAPA Arroz e Feijão pela concessão da área do experimento e aos funcionários do campo experimental pela ajuda sempre que necessária.

À amiga Luciana Fernandes de Brito pela grande ajuda na condução dos experimentos e ao amigo Adriano Knupp pela ajuda nos experimentos conduzidos na Embrapa Arroz e Feijão e pelas conversas sempre produtivas.

A todos os meus amigos e colegas que convivi ao longo de toda minha vida, pelas experiências proporcionadas e que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Muito Obrigado!!

BIOGRAFIA

Rafael Sanches Pacheco nasceu em 3 de setembro de 1981, na cidade de Nova Friburgo-RJ, filho de Juarez Torres Pacheco e Regina Lúcia Sanches Pacheco. Coursou o ensino fundamental e médio em escolas públicas estaduais. Em 2000 serviu às Forças Armadas brasileiras e trabalhou como agente censitário no Censo Demográfico do IBGE. Em 2003, ingressou no curso de graduação em Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), diplomando-se Engenheiro Agrônomo em 2008. Durante a graduação, foi bolsista de iniciação científica do CNPq por 42 meses, trabalhando no Laboratório de Ecologia Microbiana da Embrapa Agrobiologia. Em agosto de 2010, titulou-se Mestre em Ciências em Agronomia, área de concentração em Ciência do Solo pela UFRRJ. Em setembro de 2010, ingressou como aluno de Doutorado no curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo da UFRRJ, onde foi bolsista do CNPq.

RESUMO GERAL

PACHECO, Rafael Sanches. **Fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijoeiro estimada pela abundância natural de ^{15}N** . 2014. 123f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

A técnica da abundância natural de ^{15}N para mensurar a fixação biológica de nitrogênio (FBN) em leguminosas baseia-se no ligeiro enriquecimento de ^{15}N observado nos solos em relação à atmosfera e não exige a aplicação de fertilizantes marcados. Os objetivos deste trabalho foram: quantificar, através da técnica da abundância natural de ^{15}N , a contribuição da FBN em cultivares de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) em condições de campo; avaliar o desempenho agrônomico dessas cultivares sob inoculação; estimar o valor do fracionamento isotópico durante a FBN (valor B) de cultivares de feijoeiro crescidas em solução nutritiva. Foram conduzidos dois experimentos em casa de vegetação, em solução nutritiva isenta de N, nos anos de 2012 e 2013, em Seropédica, RJ. Foram avaliadas três cultivares de feijoeiro, efetuando-se coletas de biomassa em diferentes estádios e analisando-se a abundância natural de ^{15}N do material vegetal. No experimento em 2012, os nódulos apresentaram $\delta^{15}\text{N}$ positivo, com deltas de 6,63‰ e 8,18‰ nas cultivares Grafite e Radiante, respectivamente. O valor B da parte aérea foi de -0,92‰, -0,73‰ e -0,72‰, nas cultivares Grafite, Ouro Negro e Radiante, respectivamente. No experimento em 2013, os nódulos apresentaram deltas de 9,11‰ e 8,36‰ nas cultivares Radiante e Grafite. O valor B da parte aérea foi de -1,06‰ e -1,40‰ nas cultivares Radiante e Grafite, respectivamente. O valor B médio da parte aérea das cultivares foi de -1,23‰, sendo o valor B de -1,2 utilizado nos cálculos da contribuição da FBN nos experimentos de campo desse estudo. Oito cultivares de feijoeiro foram crescidas em condições de campo em 2011 e 2012, sob duas fontes de N (inoculação com inoculante comercial com rizóbio ou adubação com 90 kg ha⁻¹ de N mineral), com quatro repetições, na Embrapa Arroz e Feijão, em Santo Antonio de Goiás, GO. Foram efetuadas amostragens de biomassa de parte aérea, raiz, nódulos e grãos e análises de N total e abundância natural de ^{15}N na parte aérea e grãos. No experimento em 2011, a cultivar Ouro Negro produziu maior massa de nódulos sob inoculação, inclusive nos estádios reprodutivos, e as cultivares Jalo Precoce e Radiante apresentaram a menor massa de nódulos. O rendimento médio de grãos das oito cultivares foi de 1614 e 2942 kg ha⁻¹ sob inoculação ou N mineral, respectivamente. Sob inoculação, a cultivar Ouro Negro apresentou os maiores acúmulos de N na parte aérea e nos grãos e a maior produtividade, atingindo 2200 kg ha⁻¹ de grãos, equivalente a 73% da produção sob N mineral. Em 2011, o acúmulo de N derivado da FBN nos grãos das oito cultivares variou de 5,8 a 16,4 kg ha⁻¹, que correspondeu a 17% e 33% de contribuição da FBN nas cultivares Marfim e Ouro Negro, respectivamente. Em 2012, a maior massa de nódulos ocorreu nas cultivares Vereda e Estilo, na primeira e segunda coletas, respectivamente, e a cultivar Radiante apresentou a menor massa de nódulos. O rendimento médio de grãos das oito cultivares foi de 3284 e 3919 kg ha⁻¹ sob inoculação e N mineral, respectivamente. O acúmulo de N derivado da FBN nos grãos foi de 68,4 kg ha⁻¹ na cultivar Ouro Negro, 38,7 kg ha⁻¹ na cultivar Grafite e 21,6 kg ha⁻¹ na cultivar Radiante, que correspondeu a 49, 29 e 32% de contribuição da FBN, respectivamente. A técnica da abundância natural de ^{15}N possibilita a identificação do potencial de FBN para o fornecimento de N em diferentes genótipos de feijoeiro, e mostra-se como uma ferramenta capaz de fornecer subsídios para orientar os programas de melhoramento da espécie, visando aumentar a eficiência da FBN.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*. Genótipo. Nodulação. Isótopos. *Rhizobium*.

GENERAL ABSTRACT

PACHECO, Rafael Sanches. **Biological nitrogen fixation in common bean cultivars estimated by ^{15}N natural abundance.** 2014. 123p. Thesis (Doctor Science in Agronomy, Soil Science) Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

The ^{15}N natural abundance technique to measure the biological nitrogen fixation (BNF) in legumes is based on the slight enrichment of ^{15}N observed in soils to the atmosphere and does not require the application of labelled fertilizers. The objectives of this work were: to quantify the BNF contribution in common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars under field conditions through the ^{15}N natural abundance technique; to evaluate the agronomic performance of these cultivars under inoculation; to estimate the isotopic fractionation value during BNF (B value) of common bean cultivars grown in nutrient solution. Two experiments were conducted in greenhouse in nutrient solution without N, in the years 2012 and 2013 in Seropédica, RJ. Three common bean cultivars were evaluated. Plant biomass was sampled at different growth stages, where the ^{15}N natural abundance was analyzed. In 2012 experiment, the nodules showed positive $\delta^{15}\text{N}$, with deltas of 6.63‰ and 8.18‰ in Grafite and Radiante cultivars, respectively. The B value in shoot was -0.919‰, -0.734‰ and -0.724‰ for cultivars Grafite, Ouro Negro and Radiante, respectively. In 2013 experiment, the nodules showed great enrichment in ^{15}N , with 9.11‰ and 8.36‰ deltas in Radiante and Grafite cultivars. The B value in shoot was -1.06‰ and -1.40‰ for cultivars Radiante and Grafite, respectively. The average B value in shoots of common bean cultivars was -1.23‰, and the B value of -1.2 was used in the calculation of the BNF contribution in the field experiments of this study. Eight common bean cultivars were grown in field conditions in 2011 and 2012, with two N sources (inoculation with commercial inoculant with rizhobia or fertilization with 90 kg ha⁻¹ of mineral N), with four replications, at Embrapa Rice and Bean in Santo Antonio de Goias, GO. Biomass of the shoot, root, nodules and grains were sampled, and total N and ^{15}N natural abundance were analyzed in shoots and grains. In the experiment in 2011, the Ouro Negro cultivar produced higher nodule mass under inoculation, also at reproductive stages, and the Jalo Precoce and Radiante cultivars showed the lowest nodule mass. The grain yield of the eight cultivars was 1614 and 2942 kg ha⁻¹ under inoculation or mineral N, respectively. Under inoculation, the Ouro Negro cultivar showed the highest N accumulation in shoots and grains and the highest grain yield, reaching 2200 kg ha⁻¹, equivalent to 73% of yield under mineral N. In 2011, the N accumulation derived from BNF in grains of the eight cultivars ranged from 5.8 to 16.4 kg ha⁻¹, which corresponded to a BNF contribution of 17% and 33% in Marfim and Ouro Negro cultivars, respectively. In 2012, the higher nodule mass occurred in Vereda and Estilo cultivars, in the first and second samples, respectively, whereas Radiante cultivar had the lowest nodule mass. The average grain yield of the eight cultivars was 3284 and 3919 kg ha⁻¹ under inoculation and mineral N, respectively. The N accumulation derived from BNF in grains was 68.4, 38.7, and 21.6 kg ha⁻¹ in Ouro Negro, Grafite and Radiante cultivars, respectively, corresponding to a BNF contribution of 49, 29 and 32%. The method of ^{15}N natural abundance provided the identification of BNF potential for the supply of N in different common bean genotypes, arising as a tool for providing subsidies to guide breeding programs in order to increase BNF efficiency.

Key words: *Phaseolus vulgaris*. Genotype. Nodulation. Isotopes. *Rhizobium*.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Características das cultivares de feijoeiro avaliadas no presente trabalho.	15
Tabela 2. Massa seca de parte aérea e massa seca de raiz, no período de pré-floração, de três cultivares de feijoeiro inoculado com <i>Rhizobium</i> , crescido em cultivo hidropônico com solução nutritiva isenta de N, no ano de 2012.	24
Tabela 3. Massa seca de parte aérea e de raiz, em três estádios fenológicos, de duas cultivares de feijoeiro inoculado com <i>Rhizobium</i> , crescido em cultivo hidropônico com solução nutritiva isenta de N, no ano de 2013.	25
Tabela 4. Massa seca de vagem, duas semanas após floração plena, de duas cultivares de feijoeiro inoculado com <i>Rhizobium</i> , crescido sob sistema de cultivo hidropônico, abastecido com solução nutritiva isenta de N, no ano de 2013.	26
Tabela 5. Número de nódulos por planta, obtidos a partir do software ImLab versão 2.3, e massa seca de nódulos, no período de pré-floração de três cultivares de feijoeiro inoculado com <i>Rhizobium</i> , crescido sob sistema de cultivo hidropônico, abastecido com solução nutritiva isenta de N, no ano de 2012.	26
Tabela 6. Número de nódulos por planta e diâmetro médio dos nódulos, obtido a partir do software ImLab versão 2.3, e massa seca de nódulos, em três estádios fenológicos de duas cultivares de feijoeiro inoculado com <i>Rhizobium</i> , crescido sob sistema de cultivo hidropônico, abastecido com solução nutritiva isenta de N, no ano de 2013.	27
Tabela 7. Abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}\%$) no caule, folha, raiz, nódulos, cotilédone + tegumento e valor B na planta inteira ou somente na parte aérea, no período de pré-floração de três cultivares de feijoeiro inoculado com <i>Rhizobium</i> , crescido sob sistema de cultivo hidropônico, abastecido com solução nutritiva isenta de N, no ano de 2012.	30
Tabela 8. Abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}\%$) no caule, folha, vagem, raiz e nódulos e valor B, na planta inteira ou somente na parte aérea, duas semanas após floração plena de duas cultivares de feijoeiro inoculado com <i>Rhizobium</i> , crescido sob sistema de cultivo hidropônico, abastecido com solução nutritiva isenta de N, no ano de 2013.	31
Tabela 9. Resultado da análise de amostra de solo coletada na área do experimento em 2011.	42
Tabela 10. Número de dias após a emergência correspondente às coletas de biomassa e produção de grãos de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha^{-1}), em experimento de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.	43
Tabela 11. Resultado da análise de amostra de solo coletada na área do experimento em 2012.	44
Tabela 12. Número de dias após a emergência correspondente às coletas de biomassa e produção de grãos de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha^{-1}), em experimento de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.	44
Tabela 13. Comparação da análise de variância dos dados de massa seca de parte aérea na floração em 2012, considerando duas abordagens: cada fonte de N como um experimento com análise conjunta de dois experimentos, ou um esquema fatorial em parcelas subdivididas, com as fontes de N como parcelas e as cultivares como subparcelas.	46
Tabela 14. Número de nódulos por planta de cultivares de feijoeiro inoculado com <i>Rhizobium</i> , na época da floração plena (1ª coleta), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, nos anos de 2011 e 2012.	49

Tabela 15. Massa seca de nódulos de cultivares de feijoeiro inoculado com <i>Rhizobium</i> , em experimento de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.	50
Tabela 16. Massa seca de nódulos de cultivares de feijoeiro inoculado com <i>Rhizobium</i> , em experimento de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.	51
Tabela 17. Massa seca de raiz de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha).	52
Tabela 18. Massa seca de parte aérea de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha)	54
Tabela 19. Massa seca de vagens de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha)	55
Tabela 20. Produção de grãos de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha)	56
Tabela 21. Número de vagens por planta, número de grãos por vagem em massa de cem grãos de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha ⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, nos anos de 2011 e 2012.	58
Tabela 22. Índice de colheita de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha ⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, nos anos de 2011 e 2012.	59
Tabela 23. Acúmulo de N na folha de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha ⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, nos anos de 2011 e 2012.	61
Tabela 24. Acúmulo de N no caule de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha ⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, nos anos de 2011 e 2012.	63
Tabela 25. Acúmulo de N na vagem, duas semanas após a floração plena (2ª coleta), de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha ⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, nos anos de 2011 e 2012.	64
Tabela 26. Acúmulo de N na parte aérea de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha ⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, nos anos de 2011 e 2012.	65
Tabela 27. Acúmulo de N na parte aérea de cultivares de feijoeiro inoculado com <i>Rhizobium</i> , em experimento de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.	67
Tabela 28. Teor de N no grão e acúmulo de N no grão de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha ⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, nos anos de 2011 e 2012.	69
Tabela 29. Acúmulo de N na palha do caule e na palha da vagem de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha ⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, nos anos de 2011 e 2012.	70
Tabela 30. Índice de colheita de N de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha ⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, nos anos de 2011 e 2012.	71
Tabela 31. Contribuição do nitrogênio derivado da fixação atmosférica (%Ndfa) e quantidade de N fixado através da FBN, na folha, no caule, e na vagem de cultivares de feijoeiro inoculado com <i>Rhizobium</i> , em experimento de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.	73

Tabela 32. Contribuição do nitrogênio derivado da fixação atmosférica (%Ndfa) e quantidade de N fixado através da FBN, na folha, no caule, e na vagem de cultivares de feijoeiro inoculado com <i>Rhizobium</i> , em experimento de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.....	75
Tabela 33. Contribuição do nitrogênio derivado da fixação atmosférica (%Ndfa) e quantidade de N fixado através da FBN, na parte aérea de cultivares de feijoeiro inoculado com <i>Rhizobium</i> , em experimento de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.	76
Tabela 34. Contribuição do nitrogênio derivado da fixação atmosférica (%Ndfa) e quantidade de N fixado através da FBN, na parte aérea de cultivares de feijoeiro inoculado com <i>Rhizobium</i> , em experimento de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.	77
Tabela 35. Contribuição do nitrogênio derivado da fixação atmosférica (%Ndfa) e quantidade de N fixado através da FBN, na palhada do caule, na palhada da vagem, e nos grãos de cultivares de feijoeiro inoculado com <i>Rhizobium</i> , em experimento de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.....	78
Tabela 36. Contribuição do nitrogênio derivado da fixação atmosférica (%Ndfa) e quantidade de N fixado através da FBN, na palhada do caule, na palhada da vagem, e nos grãos de cultivares de feijoeiro inoculado com <i>Rhizobium</i> , em experimento de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.....	80
Tabela 37. Análise de variância dos caracteres de nodulação e de acumulação de biomassa, na 1ª coleta de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha ⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.	101
Tabela 38. Análise de variância dos caracteres de nodulação e de acumulação de biomassa, na 2ª coleta de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha ⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.	102
Tabela 39. Massa seca de caule e massa seca de folha, na 1ª e na 2ª coleta de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha ⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.....	103
Tabela 40. Análise de variância conjunta, da 1ª e da 2ª coletas, dos caracteres de nodulação e de acumulação de biomassa, de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha ⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.	104
Tabela 41. Número de plantas e biomassa seca de nódulos, de raiz, de folha, de caule e de parte aérea, analisadas conjuntamente na 1ª e na 2ª coletas de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha ⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.....	105
Tabela 42. Análise de variância dos caracteres teor de N no caule, na folha e conteúdo de N no caule, na folha, e na parte aérea, na 1ª coleta de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha ⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.	106
Tabela 43. Análise de variância dos caracteres teor de N na folha, no caule, e na vagem e conteúdo de N na folha, no caule, na vagem e na parte aérea, na 2ª coleta de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha ⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.....	106

Tabela 44. Análise de variância do parâmetro massa seca de nódulos e conteúdo de N na parte aérea nas quatro coletas de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> , em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.....	107
Tabela 45. Massa seca de parte aérea e massa seca de raiz, nas quatro coletas de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> , em experimento de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.	108
Tabela 46. Análise de variância dos caracteres número de plantas, produção de grão (g m^{-2}), número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de 1 grão, índice de colheita e produção de grãos (3 m^{-2}), de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha^{-1}), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.	109
Tabela 47. Análise de variância dos caracteres teor e conteúdo de N no grão, e na palhada do caule e da vagem e índice de colheita de N de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha^{-1}), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.....	109
Tabela 48. Análise de variância dos caracteres conteúdo de N, contribuição da FBN e quantidade de N fixado no grão, e na palhada do caule e da vagem, de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> , em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.	110
Tabela 49. Análise de variância dos caracteres de nodulação e de acumulação de biomassa, na 1ª coleta de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha^{-1}), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.	111
Tabela 50. Análise de variância dos caracteres de nodulação e de acumulação de biomassa, na 2ª coleta de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha^{-1}), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.	111
Tabela 51. Massa seca de caule e massa seca de folha, na 1ª e na 2ª coleta de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha^{-1}), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.....	112
Tabela 52. Análise de variância conjunta, da 1ª e da 2ª coletas, dos caracteres de nodulação e de acumulação de biomassa, de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha^{-1}), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.	113
Tabela 53. Número de plantas e biomassa seca de nódulos, de raiz, de folha, de caule e de parte aérea, analisadas conjuntamente na 1ª e na 2ª coleta de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha^{-1}), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.....	114
Tabela 54. Análise de variância dos caracteres teor no caule e na folha, e conteúdo no caule, na folha e na parte aérea, na 1ª coleta de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha^{-1}), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.	115
Tabela 55. Análise de variância dos caracteres teor de N no caule, na folha e na vagem e conteúdo de N no caule, na folha, na vagem e na parte aérea, na 2ª coleta de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha^{-1}), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.....	115

Tabela 56. Análise de variância conjunta, da 1ª e da 2ª coletas, dos caracteres teor de conteúdo no caule, na folha e na parte aérea, de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha ⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.....	116
Tabela 57. Teor e conteúdo de N na folha e no caule, analisadas conjuntamente nas duas coletas de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha ⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.	117
Tabela 58. Análise de variância dos caracteres número de plantas, produção de grão (g m ⁻²), número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de 1 grão, índice de colheita e produção de grãos (3 m ⁻²), de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha ⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.	118
Tabela 59. Análise de variância dos caracteres teor e conteúdo de N no grão, e na palhada do caule e da vagem e índice de colheita de N de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha ⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.....	118
Tabela 60. Correlação entre fontes de N, produção de grãos e componentes de produção de cultivares de feijoeiro, inoculado com <i>Rhizobium</i> ou adubado com N mineral (90 kg ha ⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.....	119
Tabela 61. Análise de variância dos parâmetros massa seca de folha, caule, parte aérea, raiz, nódulos, cotilédones e tegumento, no período de pré-floração de três cultivares de feijoeiro inoculado com <i>Rhizobium</i> , crescido em cultivo hidropônico com solução nutritiva isenta de N, no ano de 2012.	119
Tabela 62. Massa seca de folha, caule, no período de pré-floração de três cultivares de feijoeiro inoculado com <i>Rhizobium</i> , crescido em cultivo hidropônico com solução nutritiva isenta de N, no ano de 2012.	120
Tabela 63. Análise de variância dos parâmetros massa seca de parte aérea, de raiz, de nódulos, de cotilédones e número e tamanho de nódulos, aos 13 DAT de duas cultivares de feijoeiro inoculado com <i>Rhizobium</i> , crescido em cultivo hidropônico com solução nutritiva isenta de N, no ano de 2013.	120
Tabela 64. Análise de variância dos parâmetros massa seca de folha, de caule, de flor, de parte aérea, de raiz, de cotilédones, na floração plena de duas cultivares de feijoeiro inoculado com <i>Rhizobium</i> , crescido em cultivo hidropônico com solução nutritiva isenta de N, no ano de 2013.	121
Tabela 65. Análise de variância dos parâmetros massa seca de nódulos, e número e tamanho de nódulos, na floração plena de duas cultivares de feijoeiro inoculado com <i>Rhizobium</i> , crescido em cultivo hidropônico com solução nutritiva isenta de N, no ano de 2013. ...	121
Tabela 66. Massa seca de folha, de caule, e de flor na floração plena de duas cultivares de feijoeiro inoculado com <i>Rhizobium</i> , crescido em cultivo hidropônico com solução nutritiva isenta de N, no ano de 2013.	122
Tabela 67. Análise de variância dos parâmetros massa seca de folha, de caule, de vagem de parte aérea, de raiz, e de cotilédones, duas semanas após floração plena de duas cultivares de feijoeiro inoculado com <i>Rhizobium</i> , crescido em cultivo hidropônico com solução nutritiva isenta de N, no ano de 2013.	122
Tabela 68. Análise de variância dos parâmetros massa seca de nódulos, e número e tamanho de nódulos, duas semanas após floração plena de duas cultivares de feijoeiro inoculado	

com <i>Rhizobium</i> , crescido em cultivo hidropônico com solução nutritiva isenta de N, no ano de 2013.....	123
Tabela 69. Massa seca de folha, e de caule, duas semanas após floração plena de duas cultivares de feijoeiro inoculado com <i>Rhizobium</i> , crescido em cultivo hidropônico com solução nutritiva isenta de N, no ano de 2013.....	123

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Ilustração do método da abundância natural de ^{15}N para estimar a FBN. Determinação do valor B (vaso A), ou o valor de $\delta^{15}\text{N}$ de plantas leguminosas quando completamente dependente da FBN para o seu crescimento, ou seja com $\delta^{15}\text{N}$ de 0‰. Plantas crescendo no solo e que são capazes de obter do ar parte do N necessário para sua nutrição (vaso B), apresentarão valores de $\delta^{15}\text{N}$ próximos a zero, uma vez que parte do N virá do ar. Por outro lado, as espécies não fixadoras crescendo no mesmo solo (vaso C) terão valores de $\delta^{15}\text{N}$ mais elevados e próximos aos do solo, uma vez que todo ou a maior parte do N necessário para o seu desenvolvimento é derivado do solo. Adaptado de UNKOVICH et al., 2008. 8
- Figura 2.** Precipitação pluviométrica, umidade relativa do ar média, temperatura máxima e temperatura mínima do ar, em Santo Antônio de Goiás, durante o período de duração dos experimentos de campo, nos anos de 2011 e 2012. Fonte: Estação meteorológica da Embrapa Arroz e Feijão. 39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Fixação Biológica em Feijoeiro	3
2.2. Técnica Isotópica da Abundância Natural de ¹⁵ N.....	6
2.3. Escolha da Planta Controle	9
2.4. Características das Cultivares Avaliadas	10
3. CAPÍTULO I VALOR B E FRACIONAMENTO ISOTÓPICO DURANTE A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE N ₂ CULTIVARES DE FEIJOEIRO.....	16
3.1. RESUMO.....	17
3.2. ABSTRACT.....	18
3.3. INTRODUÇÃO	19
3.4. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.4.1. Condições experimentais	20
3.4.2. Experimento em 2012	21
3.4.3. Experimento em 2013	21
3.4.4. Determinações.....	22
3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
3.5.1. Biomassa	24
3.5.2. Nodulação	26
3.5.3. Valor B e fracionamento isotópico	28
3.6. CONCLUSÕES	33
4. CAPÍTULO II QUANTIFICAÇÃO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM CULTIVARES DE FEIJOEIRO EM CONDIÇÕES DE CAMPO ATRAVÉS DA TÉCNICA DA ABUNDÂNCIA NATURAL DE ¹⁵ N.....	34
4.1. RESUMO.....	35
4.2. ABSTRACT.....	36
4.3. INTRODUÇÃO	37
4.4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.4.1. Avaliação da população nativa de rizóbio no solo das áreas experimentais, contagem de rizóbios no inoculante e na superfície das sementes inoculadas	41
4.4.2. Tratos culturais.....	41
4.4.3. Experimento em 2011	42
4.4.4. Experimento em 2012	43
4.4.5. Determinações.....	44
4.4.6. Análise estatística.....	46
4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.5.1. Avaliação da população nativa de rizóbio nos solos das áreas experimentais, contagem de rizóbio nos inoculantes e na superfície das sementes inoculadas.....	47

4.5.2. Nodulação	49
4.5.3. Produção de biomassa	52
4.5.4. Produção de grãos e componentes de produção.....	55
4.5.5. Acumulação de nitrogênio-total	60
4.5.6. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio	72
4.6. CONCLUSÕES	82
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	83
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
8. ANEXOS	101

1. INTRODUÇÃO GERAL

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é de extrema importância social e econômica no Brasil, sendo cultivado em todo território nacional, estando presente em mais de 460 mil estabelecimentos agropecuários, com predomínio da agricultura familiar, que responde por 65% da produção nacional (IBGE, 2009). Uma análise do Censo Agropecuário 2006 do IBGE indica que a cultura do feijão no Brasil ainda se caracteriza pelo baixo emprego de tecnologias e insumos, que se refletem nos baixos rendimentos médios (PACHECO, 2010). Em 2006, apenas 3,2% dos produtores de feijão utilizaram irrigação em suas lavouras, 1,7% fizeram a colheita mecânica e 6,5% utilizaram sementes certificadas (IBGE, 2009). Além disso, 68,2% dos estabelecimentos que plantaram feijão não utilizaram nenhum tipo de adubação em suas lavouras, o que se refletiu no rendimento médio de 587 kg ha⁻¹, bem abaixo da média nacional (IBGE, 2009). Apesar de progressos na produtividade do feijão nos últimos anos, o Brasil produziu na safra 2012/2013, pouco mais de 2,8 milhões de toneladas de grãos de feijão em uma área cultivada de 3,1 milhões de hectares, o que resultou em uma produtividade média de 910 kg ha⁻¹ (CONAB, 2013), considerada baixa, levando-se em conta o potencial produtivo da espécie. Todavia, verifica-se nos últimos anos, crescente interesse de grandes produtores, que vêm adotando tecnologias como irrigação, controle fitossanitário, colheita mecanizada, e aplicação de fertilizantes minerais em cultivos de feijão em grande escala, os quais chegam a alcançar produtividades que superam 2500 kg ha⁻¹ (FERREIRA et al., 2004).

Contudo, aumentos de produtividade geralmente requerem, entre outros recursos, a utilização de fertilizantes, os quais contribuem significativamente com o custo de produção e tem sua parcela de contribuição na poluição ambiental. Assim, é importante que alternativas que garantam a produtividade do feijoeiro e que reduzam a utilização de fertilizantes químicos sejam desenvolvidas, contribuindo para a sustentabilidade da cultura através da utilização de tecnologias limpas. Para expressar todo seu potencial produtivo, há uma exigência muito grande de nitrogênio (N) pelo feijoeiro. No entanto, em razão das perdas que ocorrem no sistema solo-planta, o manejo da adubação nitrogenada é tido como um dos mais difíceis, fazendo com que sua eficiência, na maioria das vezes, seja baixa (OSINAME et al., 1983).

Além da aplicação de fertilizantes nitrogenados, o N pode ser obtido pelas plantas na decomposição de matéria orgânica do solo e no processo da fixação biológica de nitrogênio (FBN). A FBN é realizada apenas por microrganismos procariotos, de vida livre ou em associação com plantas, em especial as leguminosas. Estes organismos possuem um complexo enzimático, a nitrogenase, capaz de quebrar a ligação tripla do N₂ atmosférico, transformando esta forma molecular não assimilável pelas plantas, em NH₃ que pode ser prontamente absorvido. Apesar da capacidade do feijoeiro em fixar o N₂ pela simbiose com bactérias denominadas de rizóbio, a quantidade de N suprida por esse processo normalmente tem sido insuficiente se comparada com outras leguminosas de grão (PIHA & MUNNS, 1987a,b; STRALIOTTO & RUMJANEK, 1999), o que pode não proporcionar a quantidade de N necessária para atingir altos níveis de produtividade, em condições comerciais de cultivo.

Historicamente, a FBN não tem sido utilizada como um dos parâmetros de avaliação durante o processo de seleção de cultivares de feijoeiro em programas de melhoramento. Portanto, um método adequado e acessível para estimar a quantidade fixada de N₂ torna-se requisito importante em qualquer programa que objetiva a maximização da FBN. Dentre as várias metodologias disponíveis, as que utilizam o isótopo ¹⁵N são as mais sofisticadas e geralmente consideradas como valores de referência, contra as quais outras medidas de FBN devem ser comparadas (UNKOVICH et al., 2008).

Os principais resultados de quantificação da FBN em cultivares de feijão em condições de campo foram gerados com a técnica da diluição isotópica de ^{15}N , onde se aplicou fertilizante marcado com ^{15}N no solo (RUSCHEL et al., 1982; PEREIRA et al., 1989; KIPE-NOLT & GILLER, 1993; KIPE-NOLT et al., 1993; BODDEY et al., 1996). Todavia, após a adição do fertilizante solúvel marcado com ^{15}N , ocorre uma rápida queda no enriquecimento de ^{15}N no N mineral do solo, em razão da contínua mineralização do N não marcado da matéria orgânica, que vai diluindo o ^{15}N do N mineral do solo (WITTY, 1983; DANSO & KUMARISHINGE, 1990). Isto pode resultar em diferenças no enriquecimento de ^{15}N do N absorvido do solo pelas plantas fixadoras, comprometendo a precisão das avaliações efetuadas em genótipos com ciclos e hábitos de crescimento diferentes. Possivelmente materiais de ciclo mais curto absorvam mais ^{15}N do adubo no início do ciclo, enquanto materiais mais tardios tenham acesso a um ^{15}N com maior diluição, apontando menor FBN nos genótipos de ciclo curto, introduzindo incertezas na avaliação do potencial para FBN de diferentes genótipos de feijoeiro.

A técnica da abundância natural de ^{15}N baseia-se no ligeiro enriquecimento de ^{15}N observado nos solos em relação à atmosfera, o que permite distinguir a proporção do N na planta oriunda da FBN, e não exige a aplicação de fertilizantes marcados com ^{15}N , evitando efeitos do fertilizante no processo de FBN e estando menos sujeita a erros advindos de variações temporais e espaciais na marcação isotópica do solo (UNKOVICH & PATE, 2000). Deste modo, a utilização da técnica da abundância natural de ^{15}N pode diminuir as incertezas na quantificação da FBN de genótipos de feijoeiro com diferentes portes e durações de ciclo e em vários estádios de crescimento. Esta avaliação mais precisa aumentaria a possibilidade da inserção da FBN nos programas de melhoramento do feijoeiro, obtendo-se uma indicação se o potencial para FBN nessa cultura está intrinsecamente associado a materiais de ciclo mais longo e de hábito de crescimento indeterminado, ou se é possível progressos na contribuição da FBN em materiais precoces e de crescimento determinado, características estas buscadas nos atuais programas de melhoramento do feijoeiro.

Desta forma, a hipótese do trabalho é que é possível quantificar em condições de campo a contribuição da FBN em cultivares de feijoeiro com distintos hábitos de crescimento e duração do ciclo, através da técnica da abundância natural de ^{15}N .

Portanto, os objetivos deste trabalho foram quantificar, através da técnica da abundância natural de ^{15}N , em condições de campo, a contribuição da FBN de cultivares de feijoeiro inoculado com *Rhizobium*, avaliar o desempenho agrônômico dessas cultivares sob inoculação, em comparação à adubação nitrogenada, e determinar o fracionamento isotópico (valor B) de cultivares de feijoeiro, durante o processo de FBN.

Esta Tese é apresentada em dois capítulos, sendo o Capítulo I intitulado “Valor B e fracionamento isotópico durante a fixação biológica de N_2 em cultivares de feijoeiro”, e tem como objetivo determinar o valor B e o fracionamento isotópico do N durante o processo de FBN em cultivares de feijoeiro. O Capítulo II é intitulado “quantificação da fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijoeiro em condições de campo através da técnica da abundância natural de ^{15}N ”, e tem como objetivo quantificar, através da técnica da abundância natural de ^{15}N , a contribuição da FBN em cultivares sob inoculação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fixação Biológica em Feijoeiro

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um dos mais importantes processos que ocorre na natureza. A incorporação de nitrogênio via FBN é bastante elevada, nos diferentes ecossistemas do planeta (JENSEN & HAUGGAARD-NIELSEN, 2003), e estima-se que cerca de 40 Tg de N₂ seja fixado por ano, só nas culturas leguminosas, dando a esse processo enorme importância na manutenção da vida no planeta (HERRIDGE et al., 2008).

O processo de FBN é realizado por microrganismos procariotos, de vida livre ou em associação com plantas, que possuem um complexo enzimático, a nitrogenase, que no caso das leguminosas ocorre no interior de estruturas especializadas conhecidas como nódulos, localizados nas raízes. A nitrogenase é capaz de transformar a forma molecular N₂, encontrada na atmosfera e não assimilável pelas plantas, em NH₃, que pode ser prontamente absorvido pelos vegetais, conforme a reação:



A formação dos nódulos em feijoeiro é induzida pela infecção radicular por bactérias do grupo dos rizóbios, cuja caracterização taxonômica envolve um grande número de espécies e gêneros distintos (KAHINDI et al., 1997; MARTÍNEZ-ROMERO, 2003).

O feijoeiro comum tem sido considerado uma espécie de baixa capacidade de FBN em comparação com outras leguminosas de grão (PIHA & MUNNS, 1987 a, b), pois quando se consideram os valores médios de produtividade, evidencia-se a baixa capacidade da planta em atingir seu máximo potencial produtivo, quando dependente apenas da FBN (STRALIOTTO & RUMJANEK, 1999).

Entretanto, estudos demonstram que é possível a introdução desta tecnologia no sistema produtivo do feijoeiro, pois a seleção de combinações simbióticas adequadas é capaz de promover aumentos na produtividade da cultura sob condições de FBN (HUNGRIA et al., 2000; MOSTASSO et al., 2002). Isto, tanto na agricultura familiar, onde o nível de produtividade é compatível com o uso da tecnologia (OLIVEIRA et al., 1998), quanto nos cultivos de inverno ou terceira safra, sob irrigação, onde é possível substituir parcialmente a adubação nitrogenada (ROMANINI-JÚNIOR et al., 2007). Portanto, o uso da FBN nestes sistemas produtivos é uma alternativa tecnológica acessível e os níveis de produtividade atualmente obtidos com a inoculação abrem perspectivas para a sua inserção nos sistemas mais intensivos em tecnologia.

Se considerarmos que uma taxa de FBN de 50 kg ha⁻¹ de N, embora seja modesta, na ausência desta simbiose seria necessário fornecer às plantas 100 kg ha⁻¹ de N fertilizante, já que, de acordo com OSINAME et al. (1983), a eficiência de utilização do N fertilizante raramente excede 50%, especialmente em condições tropicais. No entanto, mesmo que a FBN não seja suficiente para suprir todo o N requerido para o desenvolvimento da planta 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, sobretudo econômico. PELEGRIN et al. (2009) verificaram que a adubação com 20 kg ha⁻¹ de N, no plantio, em conjunto com a inoculação de rizóbio nas sementes, 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. Segundo FERREIRA et al. (2000), a inoculação de estirpes eficientes de *Rhizobium* em feijoeiro da cultivar Carioca, ou seu cultivo

em solos com populações de estirpes nativas eficientes, pode possibilitar a não utilização de N em cobertura na cultura, sem afetar a produtividade. A inoculação no campo com estirpes selecionadas contribuiu, de forma significativa, para o aumento no rendimento de grãos feijão (SOARES et al., 2006) sendo que as produtividades alcançadas foram semelhantes as da testemunha, com 70 kg ha⁻¹ de N. A inoculação de sementes da cultivar Talismã com uma estirpe de *R. etli* promoveu rendimento de grãos semelhantes ao da testemunha com 80 kg ha⁻¹ de N, superando inclusive a estirpe de referência CIAT 899 (FERREIRA et al., 2009). Em experimento de campo, PACHECO et al. (2012) observaram que a inoculação do feijoeiro com rizóbio, combinada com 40 kg ha⁻¹ de N em cobertura, forneceu rendimento de grãos e acumulação de N nos grãos similar à aplicação de 60 kg ha⁻¹ de N.

Com a crescente preocupação da sociedade com a sustentabilidade da agricultura, a perspectiva da aplicação dos recursos tecnológicos associados à FBN é cada vez maior, uma vez que a produção de fertilizantes nitrogenados é extremamente intensiva em energia fóssil e o seu uso e baixo aproveitamento contribuem para a poluição dos recursos hídricos e para a emissão de gases de efeito estufa (GRANLI & BOCKMAN, 1995; BOCKMAN & OLFS, 1998; STOUT et al., 2000).

Por esses motivos, o incentivo aos processos baseados em FBN é um dos compromissos assumidos pelo Governo brasileiro durante a 15^a Conferência das Partes (COP-15) da Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudanças do Clima (UNFCCC), realizada em Copenhague em 2010, o que tornou a FBN uma das tecnologias agrícolas contempladas pelo Programa Agricultura de Baixo Carbono (Programa ABC). Dentre as diversas ações de mitigação que pretende implementar com o Programa ABC, o Governo brasileiro estima uma amplitude de redução de 16 a 20 milhões de toneladas equivalentes de CO₂ pela promoção da FBN em sistemas agrícolas até o ano de 2020 (NOTIFICAÇÃO..., 2010).

O potencial de fixação de N via simbiose, pode alcançar 300 kg ha⁻¹, dependendo da espécie, sendo que no feijoeiro há registros de acúmulos da ordem de 125 kg ha⁻¹ (PEOPLES et al., 1995), demonstrando que, dependendo do potencial genético dos simbiotes, é possível que o feijoeiro se beneficie unicamente do processo de FBN, em condições de campo, podendo alcançar produtividades acima de 2.000 kg ha⁻¹ (BLISS, 1993a; HUNGRIA et al., 2003). Outros resultados apontam a possibilidade de se recomendar a redução da adubação nitrogenada de plantio, se aproveitando da FBN como forma de fornecimento deste nutriente na fase inicial de crescimento da planta, sem redução na produção (HUNGRIA et al., 2003; PELEGRIN et al., 2009; PACHECO et al., 2012). Porém, ainda é um desafio para a ciência determinar qual a melhor época e a dose ideal de N a ser aplicada.

A cultura da soja é exemplo de uma leguminosa cujo sucesso no Brasil se deve ao desenvolvimento de inoculantes contendo rizóbios adaptados às condições e solos brasileiros, em paralelo a um programa de melhoramento direcionado à obtenção de cultivares com alta produção sem adubação nitrogenada (DÖBEREINER, 1989), sendo possível substituir totalmente a adubação pelo uso da inoculação com rizóbios (HUNGRIA et al., 2001; MENDES et al., 2008). Segundo HUNGRIA et al. (2001), essa simbiose reduz os custos de produção, visto que, sem a FBN seriam necessários aproximadamente 240 kg ha⁻¹ de N para uma produção esperada de 3000 kg ha⁻¹ de grãos de soja.

Baseado no sucesso para a soja é necessário aprimorar o processo de FBN em feijoeiro, para que a cultura torne-se ambientalmente e economicamente mais viável. Porém, ao contrário da soja, não foi conduzido para o feijoeiro um programa de melhoramento voltado ao uso da FBN e redução de fertilizantes nitrogenados, o que contribuiu para que o sucesso alcançado na cultura da soja, não se estendesse para a cultura do feijoeiro.

Vários fatores interferem na eficiência simbiótica entre o feijoeiro e as estirpes de rizóbio em nível de campo (GRAHAM, 1981). A falta de respostas à inoculação tem sido

atribuída à população numerosa, mas ineficiente, de rizóbios nativos na maioria dos solos, e à sensibilidade da simbiose a estresses ambientais, tais como temperaturas elevadas, baixa umidade e acidez do solo (GRAHAM, 1981; HUNGRIA & VARGAS, 2000), por isso, a população do rizóbio inoculado que consegue se estabelecer no solo é bastante variável, pois depende da combinação entre uma série de condições ambientais.

A acidez do solo afeta todos os aspectos da nodulação e fixação biológica, desde a sobrevivência e multiplicação do rizóbio até o processo de infecção e desenvolvimento do nódulo (GRAHAM et al., 1994; HUNGRIA & VARGAS, 2000). A ocorrência de deficiências hídricas durante o ciclo de cultivo do feijoeiro tem efeito negativo em diferentes etapas do processo de nodulação e na atividade nodular, além de afetar a sobrevivência do rizóbio no solo (HUNGRIA & VARGAS, 2000; MNASRI et al., 2007). A salinidade do solo e as flutuações osmóticas associadas aos períodos de déficit hídrico resultam em diminuição da sobrevivência das populações de rizóbio no solo ou redução no seu crescimento (ZAHNAN, 1999).

A ocorrência de altas temperaturas no solo afeta a sobrevivência do rizóbio, o processo de infecção e a formação dos nódulos (PIHA & MUNNS, 1987c; HUNGRIA & VARGAS, 2000; HOFFMANN JÚNIOR et al., 2007). Além disso, quando se considera o rizóbio no inoculante, altas temperaturas afetam a sua sobrevivência no veículo tanto durante o transporte quanto no armazenamento (STRALIOTTO & RUMJANEK, 1999).

Um dos fatores que historicamente contribuíram para a baixa eficiência dos inoculantes rizobianos utilizados no cultivo do feijão é a promiscuidade da planta hospedeira, capaz de nodular com as estirpes de rizóbio naturalmente presente na maioria dos solos brasileiros, altamente competitivas e adaptadas às condições tropicais e menos eficientes no processo de FBN (MICHIELS et al., 1998; MARTÍNEZ-ROMERO, 2003). A baixa ocupação nodular do feijoeiro, pelas estirpes inoculadas, está associada à existência no solo de uma população indígena abundante, cuja densidade, eficácia e habilidade competitiva afetam as respostas à inoculação (SINGLETON & TAVARES, 1986).

Por causa da variabilidade encontrada no feijoeiro quanto à eficiência do processo de FBN, tem sido enfatizada a importância do melhoramento genético da planta para otimizar o fornecimento de N via fixação biológica. Nos estudos da FBN, muita atenção tem sido dada à seleção do microssimbionte, sendo a seleção de estirpes o principal recurso para a otimização da FBN. Por outro lado, a seleção de cultivares para essa finalidade tem sido pouco utilizada.

Uma preocupação recente tem sido a inclusão da FBN nos programas de melhoramento do feijoeiro, porém, esta introdução é dificultada pela falta de marcadores, sejam estes fenotípicos ou genotípicos, para seleção de plantas com maior potencial para FBN.

Tradicionalmente, a identificação de plantas sob simbiose é feita pela escavação do solo, retirada do sistema radicular e pesagem dos nódulos. Contudo, essa é uma atividade laboriosa e pouco produtiva, pois poucas plantas podem ser coletadas de forma eficiente e muitos nódulos são perdidos nesse processo. Portanto, um método adequado para medir com a máxima precisão possível a quantidade fixada de N torna-se requisito fundamental em qualquer programa que objetiva a maximização da FBN.

Há vários métodos disponíveis de quantificação da FBN, todos tendo algumas vantagens e desvantagens. Dentre todas as metodologias, as que utilizam o isótopo ^{15}N são as mais sofisticadas e geralmente consideradas como valores de referência, contra as quais outras medidas de fixação de N_2 devem ser comparadas (UNKOVICH et al., 2008).

2.2. Técnica Isotópica da Abundância Natural de ^{15}N

Na natureza, existem somente dois isótopos estáveis de N, um de peso atômico 14 (^{14}N) e outro com peso atômico 15 (^{15}N). As técnicas isotópicas com uso de ^{15}N partem do princípio de que o isótopo ^{15}N , mais pesado, aparece no ar atmosférico em uma abundância constante de 0,3663% em átomos (JUNK & SVEC, 1958; MARIOTTI, 1983). Assim, se uma planta cresce utilizando N de duas fontes, como por exemplo, do solo e do ar atmosférico, e uma delas for naturalmente ou artificialmente enriquecida com ^{15}N , é possível determinar a contribuição de cada uma dessas fontes para a nutrição da planta.

Para estimar a FBN pelas técnicas isotópicas, há necessidade da utilização de uma planta referência, não fixadora de N_2 , que seja cultivada nas mesmas condições que a leguminosa fixadora, mas que tenha como única fonte de N, o N disponível do solo. A estabilidade da marcação do solo com ^{15}N é uma das condições que permite o atendimento da premissa básica das técnicas isotópicas com ^{15}N para quantificação da FBN: a planta testemunha, ou controle, e a planta fixadora de N_2 devem absorver N do solo com o mesmo enriquecimento de ^{15}N (SHEARER & KOHL, 1986; BODDEY, 1987; UNKOVICH & PATE, 2000). Uma vez obedecida essa condição, sempre que uma planta leguminosa crescer em um meio isento de N mineral, ou seja, completamente dependente da FBN para o seu crescimento, a composição isotópica desta planta será semelhante à do N_2 . Por outro lado, o enriquecimento de ^{15}N de uma planta não fixadora de N_2 , que tem o solo como única fonte de N, deve se assemelhar ao enriquecimento de ^{15}N do N assimilado deste solo.

Portanto, plantas de referência, não fixadoras de N_2 , crescendo no mesmo local que as espécies fixadoras de N_2 , podem ser usadas para fornecer uma medida da marcação de ^{15}N do N do solo disponível para as plantas, desde que estas plantas de referência sejam totalmente dependentes do N mineral do solo para seu crescimento e, durante o seu desenvolvimento, acessem os mesmos estoques de N do solo com as mesmas marcações de ^{15}N do que as espécies fixadoras de N_2 (PEOPLES et al., 1989; UNKOVICH et al., 2008). Esta é uma das limitações potenciais de todas as metodologias baseadas em ^{15}N , pois a eficácia das plantas de referência, não fixadoras de N_2 , para fornecer uma medida exata da composição isotópica do N disponível do solo, é comprometida por diferenças nas profundidades de enraizamento e padrões de absorção de N entre a espécie referência e as plantas fixadoras de N_2 , considerando-se também que a marcação de ^{15}N do solo pode mudar com a profundidade e com o tempo durante o período de crescimento da planta (CHALK, 1985). Esta limitação pode ser contornada selecionando-se espécies-referência, com desenvolvimento radicular e demanda de N semelhantes à planta avaliada, e as diferenças que possam existir na exploração do volume do solo e nas curvas de absorção de N entre as plantas teste e controle permitem sugerir o uso de mais de uma espécie como referência (SHEARER & KOHL, 1986; HENSON, 1993; UNKOVICH & PATE, 2000). Tem sido considerado inclusive, que a transferência de N fixado da leguminosa para a planta controle, modifica a marcação de ^{15}N do N do solo, disponível para ambas as plantas, fixadora e não fixadora (CARLSSON & HUSS-DANELL, 2014), reforçando a necessidade do uso de plantas controle misturadas às leguminosas para retratar com mais confiabilidade a fixação de N_2 .

No caso de uma planta assimilar tanto N_2 como o N mineral do solo, o ^{15}N da planta irá diminuir gradualmente conforme o N_2 , de menor abundância em ^{15}N , é progressivamente fixado pela planta. Sendo assim, o conteúdo ^{15}N desta planta estará em algum lugar entre a marcação ^{15}N do N disponível no solo e um valor próximo de 0,3663% em átomos de ^{15}N , que equivaleria a 100% do N da planta derivado da FBN (SHEARER & KOHL, 1986).

Outras limitações das técnicas isotópicas incluem o alto custo de um espectrômetro de massa, além das habilidades técnicas necessárias para determinar com precisão a composição isotópica das amostras, o que encarece em muito o custo das análises.

Seguindo todos os princípios e premissas exigidas pelas técnicas isotópicas, a quantidade de N₂ fixada por uma leguminosa pode ser calculada a partir de expressões matemáticas simples.

É possível medir a ligeira elevação na abundância de ¹⁵N que ocorre naturalmente em muitos solos, comparado com o N₂, desde que se possua um espectrômetro de massa adequadamente preciso. Esta pequena diferença pode ser utilizada, em leguminosas, para se distinguir entre o N proveniente do solo e do ar através de um método conhecido como abundância natural de ¹⁵N (SHEARER & KOHL, 1986).

Esta técnica baseia-se no fato de que, devido à discriminação isotópica que ocorre durante as transformações do N no sistema solo-planta, ambos podem apresentar valores de ¹⁵N um pouco maiores que os encontrados na atmosfera (SHEARER & KOHL, 1986). A maioria dos processos de transformação do N no solo, como mineralização e imobilização e desnitrificação e nitrificação, resultam num fracionamento isotópico do ¹⁵N (MARIOTTI et al., 1982). Este efeito natural gera um pequeno incremento na abundância natural de ¹⁵N no solo, comparado ao ar atmosférico, diferença esta expressa em unidades de delta ¹⁵N (δ¹⁵N).

Para que seja possível medir a FBN em plantas por esta técnica isotópica, a abundância do ¹⁵N no solo deve ser diferente da abundância do ¹⁵N do ar. Estas variações são extremamente pequenas, convencendo-se então que cada unidade de delta ¹⁵N seria a abundância natural dividida por mil, ou seja, 0,0003663 átomos % de ¹⁵N em excesso.

Espécies que são capazes de obter do ar a maior parte do N necessário para sua nutrição, apresentarão valores de δ¹⁵N bem próximos a zero, uma vez que a maior parte do N virá do ar, possui 0,3663 % de ¹⁵N, ou seja, zero unidades de δ¹⁵N em excesso. Por outro lado, as espécies não fixadoras crescendo no mesmo solo terão valores de δ¹⁵N mais elevados e próximos aos do solo, uma vez que todo ou a maior parte do N necessário para o seu desenvolvimento é derivado do solo (BODDEY, 1987; UNKOVICH&PATE, 2000). Assim a abundância natural de ¹⁵N no solo pode ser utilizada para estimar a FBN para as plantas, pois a planta não fixadora de N₂ apresentará uma abundância de ¹⁵N muito semelhante ao solo e maior do que o da planta fixadora (Figura 1).

A contribuição da FBN, ou seja, a proporção de N derivado da atmosfera (%Ndfa) em uma planta leguminosa, é calculada a partir da abundância de ¹⁵N da planta leguminosa e da planta de referência não-fixadora de N₂ (Figura 1), conforme indicado na equação (SHEARER & KOHL, 1986):

$$\%Ndfa = \frac{\delta^{15}N_{ref} - \delta^{15}N_{fix}}{\delta^{15}N_{ref} - B} \times 100$$

Onde: δ¹⁵N_{ref} é a abundância natural de ¹⁵N das espécies controle não fixadoras; δ¹⁵N_{fix} é a abundância natural de ¹⁵N da planta fixadora, e B é o valor da discriminação isotópica de ¹⁵N da planta fixadora durante o processo de FBN (Valor B).

Um pré-requisito importante para o cálculo da proporção de N derivado da atmosfera (%Ndfa), utilizando a técnica da abundância natural de ¹⁵N, é a determinação do valor B, ou seja, o valor de δ¹⁵N de plantas leguminosas quando completamente dependente da FBN para o seu crescimento (Figura 1). O valor B é melhor determinado em plantas cultivadas em condições controladas, com substrato totalmente livre de N, e de preferência usando a mesma estirpe ou grupo de estirpes de rizóbios responsável pela fixação do N₂ no experimento de campo (UNKOVICH et al., 2008).

As estirpes de rizóbio envolvidas nas simbiose podem influenciar o valor B (STEELE et al., 1983; BERGERSEN et al., 1986; YONEYAMA et al., 1986; LEDGARD, 1989; KYEI-BOAHEN et al., 2002; GUIMARÃES et al., 2008; PAUFERRO et al., 2010). Essa variação

não é totalmente compreendida, mas especula-se que possa ser reflexo da massa nodular produzida por cada estirpe ou grupo de estirpes (SHEARER et al., 1984).

Na maioria das situações, plantas leguminosas coletadas no campo estão susceptíveis de serem noduladas por muitas estirpes de rizóbios desconhecidas, nativas do solo onde estão plantadas. UNKOVICH & PATE (2000) sugeriram que esta incerteza pode ser diminuída através da inoculação de leguminosas cultivadas, em substrato estéril, com misturas de estirpes de rizóbios isoladas a partir de uma gama diversificada de ambientes e solos. Embora tais estudos utilizando múltiplas estirpes de rizóbios, em condições controladas, possam não necessariamente prever ou refletir as respostas das plantas no campo, eles podem proporcionar um valor B mais preciso do que a determinação com base em uma única estirpe (UNKOVICH et al., 2008).

A estimativa do valor B também pode apresentar variações de acordo com a parte da planta que é analisada (BERGERSEN et al., 1988). A parte aérea das plantas, em muitas espécies de leguminosas fixadoras de N_2 , é empobrecida em relação a $\delta^{15}N$, ou seja, geralmente apresenta valores negativos de $\delta^{15}N$, enquanto que os nódulos são enriquecidos, apresentando valores positivos de $\delta^{15}N$ (TURNER & BERGERSEN, 1983; SHEARER et al., 1984; BERGERSEN et al., 1986). Consequentemente, quando a FBN é calculada com base somente na biomassa da parte aérea, não está se considerando a distribuição desuniforme de $\delta^{15}N$ entre os nódulos e a parte aérea. Isto torna-se especialmente importante no campo, onde a recuperação completa do sistema radicular com todos os seus nódulos é praticamente impossível, fazendo com que as estimativas de fixação de N_2 considere apenas a parte aérea, em vez de a planta inteira.

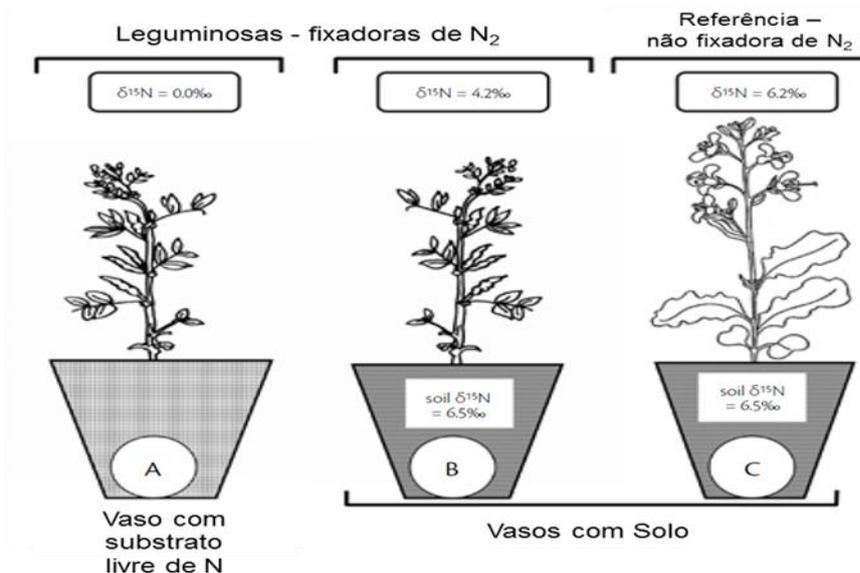


Figura 1. Ilustração do método da abundância natural de ^{15}N para estimar a FBN. Determinação do valor B (vaso A), ou o valor de $\delta^{15}N$ de plantas leguminosas quando completamente dependente da FBN para o seu crescimento, ou seja com $\delta^{15}N$ de $0‰$. Plantas crescendo no solo e que são capazes de obter do ar parte do N necessário para sua nutrição (vaso B), apresentarão valores de $\delta^{15}N$ próximos a zero, uma vez que parte do N virá do ar. Por outro lado, as espécies não fixadoras crescendo no mesmo solo (vaso C) terão valores de $\delta^{15}N$ mais elevados e próximos aos do solo, uma vez que todo ou a maior parte do N necessário para o seu desenvolvimento é derivado do solo. Adaptado de UNKOVICH et al., 2008.

2.3. Escolha da Planta Controle

Um requisito essencial para a aplicação da técnica isotópica da abundância natural de ^{15}N é a utilização de plantas controle ou espécies referência que tenham como característica principal a incapacidade de fixar N_2 .

A utilização do crescimento simultâneo de uma planta referência (não fixadora de N_2) com a planta teste (fixadora de N_2) é justificado para que esta planta referência possa ser um extrator natural do enriquecimento de ^{15}N disponível no solo. Esta característica possibilita a amostragem do solo de forma integrativa e não somente de forma pontual como seria o caso da amostragem direta do solo via tradagem. No entanto, para que esta planta controle possa realmente expressar esta condição da melhor forma possível, algumas características se fazem necessárias, como: a planta controle deve explorar o mesmo estoque de N do solo que a espécie leguminosa, além de ter um tempo de crescimento e um padrão de absorção de N semelhantes ao da espécie leguminosa (PEOPLES et al., 1989; UNKOVICH et al., 2008). Muitos autores utilizaram como plantas controle, genótipos não nodulantes ou nodulantes, mas não fixadores, das leguminosas teste em estudo (HERRIDGE & PEOPLES, 1990; PEOPLES et al., 1992; SCHWENKE et al., 1998; CADISCH et al., 2000). Porém, em virtude das muitas variações no hábito de crescimento e enraizamento dentro de uma mesma espécie, estas podem não ser apropriadas para todas as situações. Não havendo variedade não fixadora disponível, a testemunha deve possuir um sistema radicular semelhante, que explore o mesmo volume de solo.

Leguminosas não inoculadas também podem ser utilizadas como plantas de referência (BERGERSEN et al., 1989), mas a sua utilização no campo é restrita a locais em que o solo é reconhecidamente livre de estirpes indígenas de rizóbio, o que é muito difícil de ocorrer em solos tropicais, especialmente no Brasil, ainda mais, se tratando do feijoeiro, uma planta considerada promíscua em relação a associação simbiótica com rizóbios (MICHIELS et al., 1998).

Caso houvesse segurança em se afirmar que a marcação em ^{15}N do solo fosse estável em profundidade e ao longo do tempo, qualquer planta não-fixadora de N_2 poderia ser utilizada como testemunha. Entretanto, tal estabilidade é extremamente difícil de obter em condições de campo, devido à dinâmica do N no solo.

Portanto, no que se refere às plantas-controle, quando não se tem certeza da uniformidade de marcação do solo com ^{15}N , recomenda-se o uso de pelo menos três espécies que não fixem N_2 e que tenham comportamento de crescimento e de enraizamento bem diferentes entre si (BODDEY et al., 1995). Se o enriquecimento de ^{15}N das plantas-controle forem similares, pode-se concluir que a marcação do solo apresenta certa uniformidade e não haverá problema para quantificação da FBN. Diz-se então que nesta condição o solo está estável em ^{15}N , podendo então ser utilizado em estudos da quantificação da FBN (BODDEY, 1987).

Deve-se destacar que é muito difícil determinar a curva de absorção de N do solo de uma planta fixadora de N_2 , contudo, quanto mais lentas as mudanças do enriquecimento de ^{15}N no N disponível do solo com o tempo, menos crítica é a seleção da planta-controle.

Na realidade, é muito difícil ter satisfeita a condição de estabilidade no enriquecimento de ^{15}N do solo, sendo, portanto de grande importância a seleção de plantas-controle adequadas (HENSON, 1993).

A marcação do solo em termos de área não apresenta grandes dificuldades, o maior problema é a marcação uniforme em ^{15}N em uma profundidade onde as raízes extraem o N para sua nutrição, o que diminuiria muito a influência das diferenças do padrão de distribuição das raízes tanto entre as variedades testadas quanto entre estas e a planta-controle. Ainda mais complicada é a possibilidade de se ter uma marcação com ^{15}N no N disponível do solo estável

com o tempo. Se a amplitude e a frequência de variação do enriquecimento de ^{15}N no solo são grandes, a única alternativa para se ter êxito na quantificação da FBN é o uso de uma planta-controle que apresente um padrão de absorção de N do solo com o tempo muito semelhante ao da planta teste (WITTY, 1983; DANSO et al., 1993; DANSO, 1995).

2.4. Características das Cultivares Avaliadas

Para que a FBN no feijoeiro seja consolidada, é necessário que se centralize esforços em pesquisa, na busca de se aumentar a eficiência desse processo, sendo uma das alternativas mais viáveis, o uso de cultivares plenamente adaptadas a este tipo de tecnologia.

O melhoramento do feijoeiro geralmente visa plantas com arquitetura ereta, ciclo precoce, resistência a doenças, tolerância a seca e elevado potencial produtivo (FARIA et al., 2013). No entanto a FBN tem sido pouco utilizada como um dos parâmetros de avaliação durante o processo de seleção de cultivares de feijoeiro, devido principalmente à inconsistência dos resultados relativos à eficiência do processo nessa cultura e às trabalhosas metodologias que envolvem o estudo deste processo.

A obtenção de novas cultivares que substituam com vantagem as já existentes é um desafio crescente para os melhoristas e novas cultivares têm sido desenvolvidas pelos programas de melhoramento nos últimos anos, apresentando um bom potencial produtivo em diferentes condições agroecológicas, sem que seus desempenhos sob condições de FBN tenham sido avaliados.

Portanto uma avaliação mais precisa da contribuição potencial da FBN para essas cultivares de feijoeiro torna-se necessária, o que permitiria uma adoção mais ampla do procedimento de inoculação das sementes nos cultivos comerciais.

Abaixo estão descritas algumas das principais características das oito cultivares de feijoeiro utilizadas no presente estudo e que foram indicadas pela equipe de melhoristas da Embrapa Arroz e Feijão (Tabela 1).

a) Cultivar BRS Radiante

A cultivar BRS Radiante originou-se do cruzamento biparental entre Pompadour e Iraí, realizado na Embrapa CNPAF (Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão). Nas gerações F_2 e F_3 foi utilizado o método massal de seleção. Na geração F_4 , após inoculação com o fungo causador da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*), foi realizada seleção massal modificada, sendo eliminadas as plantas suscetíveis e, nas remanescentes resistentes, procedeu-se à colheita de uma vagem por planta, objetivando a reconstituição da população. Na geração F_5 foi utilizada a mesma metodologia de seleção, sendo realizada a colheita por planta individual, dando origem às famílias F_6 , de onde foi selecionado, por produtividade e tipo das plantas, a linhagem PR 93201472, que foi avaliada, juntamente com mais 16 linhagens e quatro testemunhas, em ensaio nacional, conduzido em seis ambientes, nos Estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Espírito Santo (FARIA et al., 2002a).

A análise conjunta dos dados obtidos permitiu que a linhagem PR 93201472 fosse promovida para o ensaio de valor de cultivo e uso (VCU), sendo avaliada com mais oito linhagens e quatro testemunhas, num total de 14 ambientes onde mostrou superioridade média de 4,6% em rendimento de grãos, quando comparada com a média das testemunhas. Estes dados embasaram sua indicação, com o nome fantasia de BRS Radiante, para diversos Estados, contemplando as cinco regiões brasileiras (CARVALHO, 2003).

A BRS Radiante é uma cultivar de ciclo precoce (inferior a 75 dias, da emergência à maturação fisiológica) apresenta porte semi-ereto, hábito de crescimento determinado, tipo I, com boa resistência ao acamamento, porém não está adaptada à colheita mecânica. Possui

grãos grandes do tipo manteigão rajado, com massa de 100 grãos de 44 g e potencial produtivo de 3759 kg ha⁻¹. Em relação à qualidade tecnológica do grão, tem tempo de cozimento de 38 minutos e 19,4% de proteína, com excelente qualidade culinária e ótima aparência após o cozimento (NASCENTE et al., 2006).

A cultivar BRS Radiante é resistente ao mosaico comum e oídio, moderadamente resistente à antracnose, ferrugem, mancha angular e fusarium e é susceptível ao crestamento bacteriano e mosaico dourado (EMBRAPA, 2012).

b) Cultivar Jalo Precoce

A cultivar Jalo Precoce, desenvolvida pela Embrapa CNPAF, é resultante de seleção massal realizada na cultivar Goiano Precoce. É uma cultivar precoce (80 dias da emergência à maturação fisiológica, em média) com plantas de porte semi-ereto, hábito de crescimento tipo II, não adaptada a colheita mecânica. Com grãos grandes do tipo jalo, uniformidade de coloração e massa média de 100 grãos de 35 g, a cultivar Jalo Precoce tem potencial produtivo de 2.745 kg ha⁻¹ (EMBRAPA, 2012).

Em condições de campo apresenta moderada resistência à ferrugem, crestamento bacteriano e fusarium. É suscetível à antracnose, mancha angular e ao mosaico comum e mosaico dourado.

A cultivar Jalo Precoce é indicada para cultivo nos Estados de Goiás, São Paulo, Minas Gerais e Distrito Federal nas safras das águas, seca e inverno; para os Estados do Paraná e Santa Catarina nas safras das águas e seca; para os Estados de Sergipe, Bahia e Alagoas na safra das águas; para os Estados de Mato Grosso do Sul e Tocantins na safra de inverno; e para o Estado de Mato Grosso do Sul na safra da seca, contemplando assim as cinco regiões brasileiras (EMBRAPA, 2012).

c) Cultivar BRS Estilo

A cultivar BRS Estilo originou-se do cruzamento EMP 250 /4/ A 769 /// A 429 / XAN 252 // V 8025 /PINTO VI 114, realizado em 1991, pelo CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) localizado em Cali, Colômbia (MELO et al., 2010).

Esta cultivar apresenta ciclo normal (de 85 a 90 dias, da emergência à maturação fisiológica). Suas plantas são arbustivas, com hábito de crescimento indeterminado tipo II, arquitetura ereta, tendo boa tolerância ao acamamento, sendo adaptada a colheita mecânica, inclusive direta (EMBRAPA, 2012). Suas flores são brancas, e na maturação fisiológica, as vagens são bicolors, amarelas levemente estriadas de vermelho. Já na maturação de colheita, as vagens têm coloração amarelo areia, uniforme. Os grãos são do tipo carioca (bege com rajas marrons), de forma elíptica semi-cheia, sem brilho (MELO et al., 2010).

Apresenta alto potencial produtivo (4.011 kg ha⁻¹), demonstrando que a cultivar tem potencial genético elevado, e que se o ambiente for favorável e existirem boas condições de cultivo, altas produtividades podem ser alcançadas.

Com relação às características de qualidade tecnológica e industrial dos grãos, a cultivar BRS Estilo possui uniformidade de coloração e de tamanho de grãos e a massa média de 100 grãos é de 26 g. O tempo médio de cocção é de 26 minutos, e o teor médio de proteína está em torno de 23% (MELO et al., 2010).

A cultivar BRS Estilo, é susceptível à mancha-angular, ao mosaico-dourado e a murcha de fusarium. Já para a ferrugem e para o crestamento bacteriano mostrou-se moderadamente susceptível e para antracnose, apresentou moderada resistência (EMBRAPA, 2012).

A cultivar BRS Estilo é indicada para cultivo nos Estados de Goiás, São Paulo, Espírito Santo, Paraná, Santa Catarina, Pernambuco, Sergipe e Rio Grande do Sul, na

semeadura das águas; em Goiás, Mato Grosso e Tocantins, na semeadura de inverno; e para a época de semeadura da seca em Goiás, Paraná, Santa Catarina, Espírito Santo, Rondônia, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, contemplando as cinco regiões brasileiras (EMBRAPA, 2012).

A BRS Estilo foi registrada junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, em 15/05/2009, com o número 25.746, e protegida em 15/09/2009, recebendo o certificado de número 20100058 (MELO et al., 2010).

d) Cultivar BRS Grafite

A cultivar BRS Grafite originou-se do cruzamento entre as linhagens AN 512567 x México 168, realizado na Embrapa CNPAF, em 1986. Nas gerações F₂ a F₄ foi utilizado o método de seleção massal. Na geração F₅, as plantas foram inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum* e, após a eliminação das plantas suscetíveis, procedeu-se à colheita individual das plantas remanescentes, dando origem às famílias F₆, de onde selecionou-se, por produtividade e porte das plantas, a linhagem LM 95103904, que foi avaliada, juntamente com mais 26 linhagens e três testemunhas, no ensaio nacional, conduzido em nove ambientes, nos Estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Bahia, Espírito Santo e Mato Grosso (RAVA et al., 2003).

A análise conjunta dos dados de produtividade e outras características agronômicas permitiram que a referida linhagem fosse promovida para o ensaio de valor de cultivo e uso (VCU), sendo avaliada juntamente com 11 linhagens e três testemunhas, num total de 11 ambientes nos Estados de Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais e Rio de Janeiro, e em 2003 foi indicada para plantio nestes Estados, na safra de outono-inverno (3ª safra), com o nome fantasia de BRS Grafite (RAVA et al., 2003). Além destes quatro Estados, a cultivar também é indicada para o plantio de 3ª safra nos Estados de São Paulo e Tocantins e para o plantio de 1ª safra em Sergipe, Bahia e Alagoas e também para os Estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina para o plantio de 1ª e 2ª safras (EMBRAPA, 2012).

A cultivar BRS Grafite tem porte semi-ereto, tipo II, com boa resistência ao acamamento, durante todo seu ciclo (média de 90 dias, da emergência à maturação fisiológica) e está adaptada a colheita mecânica direta. Seu potencial produtivo é de 3697 kg ha⁻¹ e a massa média de 100 grãos é de 25 g (EMBRAPA, 2012).

Possui excelentes qualidades culinárias com uniformidade de coloração, tempo de cozimento de 20 minutos e 20,06% de proteína.

A cultivar BRS Grafite apresenta resistência à ferrugem, reação intermediária à mancha angular, antracnose e fusarium e suscetibilidade ao mosaico dourado, mancha angular e crestamento bacteriano (EMBRAPA, 2012).

e) Cultivar BRS Marfim

A cultivar BRS Marfim originou-se do cruzamento múltiplo BAT 85 x [(A 375 x G 17702) x (A 445 x XAN 112)], realizado pelo CIAT. A Embrapa CNPAF recebeu do CIAT, a linhagem fixada denominada A 774, que foi avaliada junto com dez linhagens e cinco testemunhas num total de 14 ambientes dos Estados de Goiás, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Ceará e Paraíba (DEL PELOSO et al., 2002).

Nesses 14 ensaios de VCU, a linhagem A 774 mostrou superioridade média de 11% em produtividade de grãos, quando comparada com a média das testemunhas. Estes dados embasaram sua indicação com o nome fantasia de BRS Marfim, para os seguintes Estados: Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Ceará, Alagoas, Sergipe, Goiás e Distrito Federal para a 1ª safra e para os Estados de Goiás e Distrito Federal para a 2ª e 3ª safras.

A cultivar apresenta arquitetura da planta semi-ereta, boa resistência ao acamamento, porém não está adaptada a colheita mecânica. Tem porte intermediário II/III e ciclo semi-precoce de 89 dias, da emergência à maturação fisiológica, em média. Possui tipo de grão mulatinho com uniformidade de coloração e de tamanho de grão, com massa média de 100 grãos de 27 g, e potencial produtivo de 3851 kg ha⁻¹.

Apresenta suscetibilidade ao crestamento bacteriano e mosaico dourado, resistência ao mosaico-comum, e reação intermediária a antracnose, ferrugem, mancha angular e fusarium (EMBRAPA, 2012).

A cultivar de feijão BRS Marfim tem excelentes qualidades culinárias, com 22,1% de proteína, tempo de cocção é de 30 minutos e ótima aparência após o cozimento (DEL PELOSO et al., 2002).

f) Cultivar Ouro Negro

A cultivar Ouro Negro é originária de Honduras e através do CIAT, foi introduzida no Brasil pela Embrapa CNPAF, com o nome de Honduras 35.

Uma das características mais marcantes desta cultivar é a sua alta capacidade de fixação simbiótica de nitrogênio (HENSON et al., 1993).

Cultivar do grupo preto, a planta apresenta hábito de crescimento tipo III, arquitetura semi-prostada, ciclo vegetativo de 80 a 100 dias, e massa de 100 grãos de 24 g. Suas flores tem coloração violeta e suas vagens tem coloração arroxeada durante o período de maturação e amarelo-areia, tendendo para marrom, quando maduras.

A cultivar Ouro Negro é recomendada para os Estado de Minas Gerais e Rio de Janeiro. Em Minas Gerais, a cultivar Ouro Negro foi avaliada em 14 ensaios de competição, entre 20 genótipos localizados em quatro municípios da Zona da Mata, no período de 1987 a 1990. Nesses ensaios, em média, a produtividade da Ouro Negro superou as duas testemunhas em 7 e 18%, tendo rendimento máximo de 2805 kg ha⁻¹. No Rio de Janeiro foram considerados os resultados de 15 ensaios, conduzidos no período de 1989 a 1991, nas safras da seca e inverno (com irrigação). Nessas avaliações, a Ouro Negro superou em 24% a cultivar mais plantada no Estado, produzindo, em média 1.776 kg ha⁻¹ (EPAMIG, 2012).

A cultivar Ouro Negro é tolerante ao frio e se mostra resistente às raças predominantes dos agentes causadores da ferrugem e da antracnose. A cultivar é ainda, medianamente suscetível à mancha angular e suscetível ao mosaico comum e ao crestamento bacteriano e por isso não se recomenda seu plantio na safra das águas, em condições de altas temperaturas e umidade.

g) Cultivar BRS Pontal

A cultivar BRS Pontal originou-se do cruzamento BZ3836 // FEB 166 / AN 910523 realizado pela Embrapa CNPAF. Nas gerações F₂ e F₃ foi utilizado o método massal de seleção. Na geração F₄, após inoculação com *Colletotrichum lindemuthianum*, foi realizada seleção massal modificada, eliminando-se as plantas suscetíveis e, nas resistentes remanescentes, procedeu-se a colheita de uma vagem por planta objetivando a reconstituição da população. Na geração F₅ fororigem às famílias F₆, de onde foi selecionada, por produtividade e resistência a doenças, a linhagem LM 95102774. No ano de 1997, esta linhagem foi avaliada, juntamente com mais 42 linhagens e três testemunhas, no ensaio nacional, conduzido em 11 ambientes distintos (DEL PELOSO et al., 2004).

A análise conjunta dos dados de produtividade e outras características agrônômicas permitiram que a linhagem LM 95102774 fosse promovida para o ensaio de valor de cultivo e uso (VCU) nos anos de 1999/2000 sendo avaliada com mais 12 linhagens e cinco

testemunhas, num total de 36 ambientes, mostrando superioridade média de 15% em rendimento, quando comparada com a média das testemunhas. Os dados obtidos permitiram sua indicação, utilizando o nome fantasia BRS Pontal, para diversos Estados, contemplando as cinco regiões brasileiras (DEL PELOSO et al., 2003).

Além da resistência a onze patótipos de antracnose, a cultivar BRS Pontal também é resistente ao mosaico comum, além de ser moderadamente resistente à ferrugem, fusarium e ao crestamento bacteriano e suscetível à mancha angular e ao mosaico dourado (EMBRAPA, 2012).

Com arquitetura prostrada, tipo III, as plantas desta cultivar apresentam baixa resistência ao acamamento, e não estão adaptadas à colheita mecânica. Seu ciclo, da emergência à maturação fisiológica, é de 87 dias em média (NASCENTE et al., 2006).

Com massa de 100 grãos de 26 g, a cultivar BRS Pontal apresenta como principal característica, o alto potencial produtivo, que pode alcançar 4.271kg ha^{-1} .

Com relação às características tecnológicas do grão esta cultivar apresenta tempo de cocção de 26 minutos e 21,4% de proteína, apresentando boas qualidades culinárias (ALBRECHT, 2006).

h) Cultivar BRS Vereda

A cultivar BRS Vereda originou-se do cruzamento múltiplo (HI 822510 x CB 733743) x (LM 30013 x Rosinha G2 RMC), realizado na Embrapa CNPAF. Nas gerações F₂ e F₃ foi utilizado o método massal de seleção. Na geração F₄, após inoculação com *Colletotrichum lindemuthianum*, foi realizada seleção massal modificada, sendo eliminadas as plantas suscetíveis e, nas remanescentes resistentes, procedeu-se à colheita de uma vagem por planta objetivando a reconstituição da população. Na geração F₅ foi utilizada a mesma metodologia de seleção, sendo realizada a colheita por planta individual, dando origem às famílias F₆, de onde se selecionou, por produtividade e tipo das plantas, a linhagem LM 93203304, que foi avaliada, juntamente com mais 24 linhagens e três testemunhas, no ensaio nacional, conduzido em nove ambientes, nos Estados de Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais e Espírito Santo (FARIA et al., 2002b).

A análise conjunta dos dados de produtividade de grãos aliada à resistência a doenças e tipo comercial de grão, permitiu que a LM 93203304 fosse promovida para o ensaio de valor de cultivo e uso (VCU), sendo avaliada junto com oito linhagens e quatro testemunhas, num total de 28 ambientes, mostrando superioridade média de 11,2% em rendimento de grãos, quando comparada com a média das testemunhas, resultado que embasou sua indicação com o nome fantasia de BRS Vereda, para todos os Estados do Centro Oeste e mais São Paulo, Espírito Santo, Minas Gerais, Santa Catarina, Paraná, e Sergipe (FARIA et al., 2002b).

A cultivar BRS Vereda tem resistência à ferrugem e ao mosaico comum, apresenta reação intermediária a antracnose, fusarium e mancha angular e é suscetível ao crestamento bacteriano e ao mosaico dourado. Tem ciclo longo (média de 93 dias, da emergência à maturação fisiológica), apresenta porte prostrado, tipo III, boa resistência ao acamamento, durante todo seu ciclo, porém não está adaptada à colheita mecânica. Tem potencial produtivo de 3758 kg ha^{-1} , e massa média de 100 grãos de 26 g (EMBRAPA, 2012).

A cultivar BRS Vereda, do grupo comercial rosinha, com tipo de grão diferenciado dos tradicionais carioca e preto, possui uniformidade de coloração e de tamanho de grão, tem tempo de cozimento de 27 minutos e 22,8% de proteína, com excelentes qualidades culinárias e ótima aparência após o cozimento (ALBRECHT, 2003).

Tabela 1. Características das cultivares de feijoeiro avaliadas no presente trabalho.

Cultivar	Tipo*	Arquitetura da planta	Tipo de grão	Massa de 100 grãos (g)	Ciclo	Duração do ciclo (dias)	Potencial produtivo (kg ha ⁻¹)
BRS Radiante	I	Semi-ereto	Rajado	44	Precoce	< 75	3759
Jalo Precoce	II	Semi-ereto	Jalo	35	Precoce	< 75	2745
BRS Estilo	II	Ereto	Carioca	26	Normal	85 – 95	4011
BRS Grafite	II	Semi-ereto	Preto	25	Tardio	> 95	3697
BRS Marfim	II / III	Semi-ereto	Mulatinho	27	Semi-Precoce	75 – 85	3851
Ouro Negro	III	Semi-prostrado	Preto	24	Normal	80 – 95	3500
BRS Pontal	III	Prostrado	Carioca	26	Normal	85 – 95	4271
BRS Vereda	III	Prostrado	Rosinha	26	Tardio	>95	3758

Fonte: Embrapa CNPAF. *Tipo I: Hábito de crescimento determinado, arbustivo; Tipo II: Hábito de crescimento indeterminado, arbustivo e caule pouco ramificado; Tipo III: Hábito de crescimento indeterminado, com ramificação bem desenvolvida e aberta.

3. CAPÍTULO I

VALOR B E FRACIONAMENTO ISOTÓPICO DURANTE A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE N₂ CULTIVARES DE FEIJOEIRO

3.1. RESUMO

Um requisito para a estimativa da fixação biológica de N₂ (FBN), utilizando a técnica da abundância natural de ¹⁵N, é a determinação do valor B, ou seja, o valor de δ¹⁵N de plantas leguminosas quando completamente dependentes da FBN para o seu crescimento. As variações das estimativas do valor B das leguminosas fixadoras se dão ao nível de espécie da planta, das estirpes das bactérias envolvidas, do estágio fenológico e das condições de crescimento das plantas. O objetivo deste trabalho foi determinar o valor B de cultivares de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*), em dois estádios fenológicos e detectar o fracionamento isotópico do N durante o processo de FBN nessas cultivares. Foram conduzidos dois experimentos, nos anos de 2012 e 2013, em casa de vegetação em Seropédica, RJ, em cultivo hidropônico com solução nutritiva isenta de N. Foram avaliadas três cultivares de feijoeiro (Radiante, Ouro Negro, Grafite) com características contrastantes quanto à arquitetura da planta, hábito de crescimento e duração de ciclo. O experimento em 2012 tinha delineamento em blocos ao acaso com cinco repetições, em fatorial composto por três cultivares de feijoeiro e dois inoculantes de *Rhizobium tropici* (CIAT 899 e inoculante comercial). As plantas foram coletadas na emissão do botão floral de cada cultivar. O experimento em 2013 tinha delineamento em blocos ao acaso com quatro repetições, em fatorial entre duas cultivares (Radiante e Grafite), inoculadas com inoculante comercial, e três épocas de coleta (13 dias após o transplante, floração plena e duas semanas após floração plena). Nas coletas, as plantas foram divididas em caule, folha, vagem, nódulos e raiz. O material coletado (inclusive cotilédone e tegumento das sementes), no experimento em 2012 e na terceira coleta do experimento em 2013, foi analisado quanto ao teor de N total e abundância de natural ¹⁵N. O N da semente pode constituir uma proporção significativa do total de N acumulado pela planta, portanto foi necessário determinar a abundância de ¹⁵N derivada da semente, e descontá-la da abundância de ¹⁵N da planta inteira, encontrando o δ¹⁵N ajustado. Em 2012, não houve diferença entre os inoculantes testados para a massa seca de parte aérea, de raiz, e de nódulos e para o número de nódulos, das cultivares avaliadas. A cultivar Grafite apresentou maior massa seca de nódulos do que a cultivar Radiante, que não diferiram da cultivar Ouro Negro. Não houve diferença no número de nódulos entre as três cultivares. Os nódulos apresentaram δ¹⁵N positivo, com deltas variando de 6,63‰ a 8,18‰, nas cultivares Grafite e Radiante, respectivamente. O valor B médio da parte aérea da cultivar Grafite foi de -0,92‰, enquanto que das cultivares Ouro Negro e Radiante foi de -0,73‰ e -0,72‰, respectivamente. Em 2013, a cultivar Grafite produziu maior massa seca de nódulos nas duas primeiras coletas, maior número de nódulos nas três coletas, e maior diâmetro de nódulos na primeira coleta. Os nódulos apresentaram grande enriquecimento em ¹⁵N, com deltas de 9,11‰ e de 8,36‰ nas cultivares Radiante e Grafite, respectivamente. O valor B da parte aérea da cultivar Radiante foi de -1,06‰ e da cultivar Grafite foi de -1,40‰. O valor B médio da parte aérea das cultivares de feijoeiro foi de -1,23‰, sendo o valor B de -1,2 utilizado nos cálculos da contribuição da FBN nos experimentos de campo desse estudo.

Palavras-chave: Discriminação isotópica. *Phaseolus vulgaris*. Abundância natural de ¹⁵N.

3.2. ABSTRACT

A requirement for estimating the biological N fixation (BNF) using the ^{15}N natural abundance technique is the determination of the B value, the value of $\delta^{15}\text{N}$ in leguminous plants when completely dependent of BNF for their growth. Changes in the B value estimated in fixing legumes are related to the plant specie, the bacteria strains involved, the growth stage and plant growth conditions. The objective of this work was to determine the B value of common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars in two growth stages and detect the isotopic fractionation of N during the process of BNF in these cultivars. Two experiments were conducted in the years 2012 and 2013 in greenhouse in Seropédica, RJ, in hydroponics with nutrient solution without N. Three common bean cultivars (Radiante, Ouro Negro and Grafite) were evaluated, with contrasting characteristics in terms of plant architecture, growth habit and growth cycle. The 2012 experiment had a randomized block design with four replications in a factorial composed of three cultivars of common bean and two inoculants of *Rhizobium tropici* (CIAT 899 and commercial inoculant). The plants were sampled at the emission of the flower bud of each cultivar. The 2013 experiment had a randomized block design with four replications in a factorial composed of two cultivars inoculated with commercial inoculant and three sampling times (13 days after transplanting, full flowering and two weeks after full flowering). At samples, plants were divided in nodules, root, stem, leaves and pods. The sampled material (including cotyledon and seed tegument), in the 2012 experiment and in the third sample of the 2013 experiment, was analyzed for total N content and the ^{15}N natural abundance. The seed N can be a significant proportion of total N uptake by the plant, then it was necessary to determine the ^{15}N abundance derived from the seed, and deducted it from the ^{15}N abundance of whole plant to find the $\delta^{15}\text{N}$ adjusted. In 2012, there was no difference between the inoculants for shoot, root, and nodule dry weight and nodule number of the cultivars. The Grafite cultivar showed higher nodule mass than Radiante cultivar, which did not differ from Ouro Negro cultivar. There was no difference in the nodule number among the three cultivars. The nodules had positive $\delta^{15}\text{N}$, with deltas of 6.63‰ and 8,18‰ in Grafite and Radiante cultivars, respectively. The B value in shoot of Grafite cultivar was -0.919‰ , while the B value of Ouro Negro and Radiante cultivars little differed, with -0.734‰ and -0.724‰ , respectively. In 2013 the Grafite cultivar produced higher nodule mass at the two first samples, higher nodule number at the third sample, and higher nodule diameter in the first sample. In the 2013 experiment nodules showed great enrichment in ^{15}N , with deltas of 9.11‰ and 8.36‰ in Radiante and Grafite cultivars, respectively. The B value in shoot was -1.06‰ and -1.40‰ in the Radiante and Grafite cultivars. The mean shoot B value of common bean cultivars was -1.23‰ , and the B value of -1.2 was used for the calculation of the BNF contribution in the field experiments of this study.

Keywords: Isotopic discrimination. *Phaseolus vulgaris*. ^{15}N natural abundance

3.3. INTRODUÇÃO

Os métodos que utilizam isótopos estáveis surgiram recentemente como uma das ferramentas mais poderosas para o avanço na compreensão das relações entre as plantas e seu ambiente (DAWSON et al., 2002). A espectrometria de massa tem sido utilizada para detectar pequenas variações na abundância de ^{15}N no solo e nas plantas, sendo essas mudanças usadas para avaliar a fixação de N_2 em condições de campo, sem os custos adicionais de fertilizantes enriquecidos com ^{15}N , tornando a técnica da abundância natural ^{15}N uma ferramenta muito útil para avaliar o N_2 fixado por leguminosas, tanto em ecossistemas naturais, quanto agrícolas (PATE et al., 1994).

Porém, uma limitação potencial para se calcular a quantidade de N oriundo da FBN, utilizando a técnica da abundância natural de ^{15}N , é a necessidade de se ajustar o valor B da leguminosa, durante o processo de fixação biológica (DOUGHTON et al., 1992). O valor B é definido como o valor de $\delta^{15}\text{N}$ de plantas leguminosas quando completamente dependente da FBN para o seu crescimento (UNKOVICH & PATE, 2000).

As variações das estimativas do valor B das leguminosas fixadoras crescendo em meios livres de N se dão ao nível de espécie da planta (STEELE et al., 1983; TURNER & BERGERSEN, 1983; LÓPEZ BELLIDO et al., 2010), da cultivar (NEBIYU et al., 2014), do estágio fenológico (KYEI-BOAHEN et al., 2002), e das condições de crescimento das plantas (LEDGARD, 1989). Além disso, outros fatores como as estirpes das bactérias envolvidas nasimbiose, e a parte da planta que é analisada, também podem ter influência na determinação do valor B (BERGERSEN et al., 1988; GUIMARÃES et al., 2008; PAUFERRO et al., 2010). Portanto, não existe um único valor de B que possa representar todas as plantas, e que possa expressar a discriminação isotópica de ^{15}N feita para cada espécie, estirpe, período fenológico ou condição ambiental (UNKOVICH et al., 2008).

Quando os valores de B são calculados com base apenas em tecidos da parte aérea, não está se levando em consideração a distribuição desuniforme de ^{15}N dentro dos diferentes tecidos vegetais, visto que a parte aérea das plantas, em muitas espécies de leguminosas, é empobrecido em relação a $\delta^{15}\text{N}$, ou seja, geralmente apresenta valores negativos de $\delta^{15}\text{N}$, enquanto que os nódulos são enriquecidos, apresentando valores positivos de $\delta^{15}\text{N}$ (TURNER & BERGERSEN, 1983; SHEARER et al., 1984; BERGERSEN et al., 1986), e, conseqüentemente, quando a FBN é calculada com base somente na biomassa da parte aérea, não está se levando em conta o fracionamento isotópico dentro da planta e as estimativas indicadas podem variar consideravelmente (BODDEY et al., 2000).

Neste mesmo sentido, o impacto do tamanho das sementes tem sido muitas vezes negligenciado em estudos para determinações do valor B e da FBN. O N da semente pode constituir uma proporção significativa do total de N acumulado pela cultura, especialmente para espécies ou cultivares de sementes grandes e com alto conteúdo de N na semente (OKITO et al., 2004; LÓPEZ-BELLIDO et al., 2010; NEBIYU et al., 2014). Portanto, a fim de se obter o correto valor B, deve ser considerado nos cálculos, um ajuste adicional para o N da semente.

Este trabalho teve o objetivo de determinar o valor B de cultivares de feijoeiro, em dois estádios fenológicos e detectar o fracionamento isotópico do N durante o processo de FBN nessas cultivares.

3.4. MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1. Condições experimentais

Foram conduzidos dois experimentos, nos anos de 2012 e 2013, na Embrapa Agrobiologia, em Seropédica, RJ, para determinar o valor B e o fracionamento isotópico durante o processo de FBN, de cultivares de feijoeiro.

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação com iluminação natural e com temperatura e umidade controladas. As plantas foram crescidas sob sistema de cultivo hidropônico abastecidos com solução nutritiva isenta de N, descrita por ARAÚJO et al. (2008), preparada com água destilada, deionizada e autoclavada, cuja concentração final era de: 1,65 mM de CaCl_2 , 1,0 mM de MgSO_4 , 0,25 mM de KH_2PO_4 , 0,7 mM de K_2SO_4 , 8,0 μM de Fe-EDTA, 6 μM de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 4 μM de H_3BO_3 , 2 μM de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 μM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,2 μM de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Cada vaso recebeu 1 g de CaCO_3 , para tamponar a solução para pH em torno de 7 (ARAÚJO et al., 2008). Cada vaso tinha capacidade para 1,1 L de solução nutritiva, que era trocada semanalmente. A aeração da solução nos vasos plásticos foi efetuada por bombeamento intermitente, com compressor de ar BOYU[®] de 0,2 HP de potência acoplada a tubos de silicone de 25 mm de espessura ligados a cada vaso.

As sementes utilizadas nos experimentos foram tamisadas e em seguida pesadas, uma a uma, com a finalidade de garantir homogeneidade de tamanho e peso dentro de cada cultivar. As sementes selecionadas da cultivar Radiante tinham massa de 440 ± 40 mg e ficaram retidas nas peneiras com tamanho de malha entre 5,5 e 5 mm; as sementes da cultivar Ouro Negro tinham massa de 240 ± 40 mg; e as sementes da cultivar Grafite tinham massa de 250 ± 40 mg e as sementes dessas duas cultivares ficaram retidas nas peneiras com tamanho de malha entre 5,0 e 4,5 mm.

As sementes foram desinfestadas superficialmente com etanol a 70% por 5 minutos, e hipoclorito de sódio a 1% por 3 minutos. Em seguida foram lavadas dez vezes com água destilada, deionizada, estéril e postas para germinar por quatro dias no escuro, em câmara de germinação a 29 °C, em bandejas plásticas de 30x20x10 cm, forradas com uma camada de algodão sob papel absorvente umedecido em água destilada, deionizada e estéril.

Para o plantio, os caules das plântulas pré-germinadas foram envolvidos por algodão estéril e presos a placas circulares de isopor (poliestireno expandido) que encaixavam-se nos vasos, deixando as raízes das plantas em contato com a solução. Foram plantadas quatro plântulas por vaso e feito o desbaste, para duas plantas por vaso, uma semana após o plantio, preenchendo os espaços deixados pelas plantas com algodão, para impedir a incidência de luz no interior dos vasos.

Para o preparo dos inoculantes, as estirpes foram crescidas inicialmente em placas de petri contendo meio YMA sólido (VINCENT, 1970) para verificação da pureza das colônias bacterianas. Posteriormente, as colônias isoladas foram transferidas para erlenmeyer contendo meio YMA líquido, onde permaneceram por três dias em agitador a 30 °C e 150 rpm. Para obter uma quantidade elevada de células nos inoculantes, foram transferidos 20 ml de cada inoculante líquido para tubos do tipo Falcon para centrifugação, e o precipitado celular foi lavado com solução salina 0,85%; esse procedimento foi repetido três vezes. O material resultante, após a lavagem das células bacterianas, foi transferido para erlenmeyer contendo 250 ml de solução salina permanecendo em agitador a 150 rpm por 10 min.

Após o preparo do inoculante, foi feita uma contagem de rizóbio: foram retiradas três alíquotas de 0,10 ml do inoculante líquido com pipetador automático, sendo transferidas para microtubos do tipo Eppendorf. As amostras foram diluídas em 0,9 mL solução salina (0,85%,

acrescida de 0,1% de Tween-20) e agitadas em vortex PARSEC[®], foi feita 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) de acordo com VINCENT (1970).

Para a inoculação, uma alíquota de 4000 µL da solução salina contendo as células bacterianas foi transferida do erlenmeyer para a solução nutritiva, no interior dos vasos plásticos, através de pipetador automático.

3.4.2. Experimento em 2012

O experimento ocorreu no período de 20/04/2012 a 25/05/2012. Foram avaliadas três cultivares, com características contrastantes quanto à arquitetura da planta, hábito de crescimento e duração de ciclo (Tabela 1): BRS Radiante (hábito de crescimento tipo I, porte ereto e ciclo precoce); BRS Grafite (hábito de crescimento tipo II, porte semi-ereto e ciclo tardio); Ouro Negro (hábito de crescimento tipo III, porte prostrado e ciclo normal).

O delineamento experimental adotado foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições, composto por três cultivares de feijoeiro (Radiante, Grafite e Ouro Negro), dois inoculantes de rizóbio (CIAT 899 e o inoculante comercial) e as respectivas plantas controle não inoculadas, perfazendo 45 vasos.

Os inoculantes utilizados neste experimento foram compostos pela estirpe BR 322 (CIAT 899 ou SEMIA 4077) ou uma mistura de três estirpes, que compõe o inoculante comercial recomendado para a cultura do feijoeiro no Brasil, composto pela combinação das estirpes BR 322 (CIAT 899 ou SEMIA 4077); BR 520 (PRF81 ou SEMIA 4080) e BR 534 (CPAC H12), todas classificadas como *Rhizobium tropici*, eobtidas junto à coleção de estirpes da Embrapa Agrobiologia. A contagem de rizóbio dos inoculantes utilizados foi de 5,5 x 10⁹ unidades formadoras de colônia, para o inoculante contendo exclusivamente a estirpe CIAT 899, e de 8,5 x 10⁹ unidades formadoras de colônia, para o inoculante comercial contendo a mistura de três estirpes.

As plantas foram coletadas na emissão do botão floral de cada cultivar, o que correspondeu a 29 dias após o transplante (DAT) para a cultivar Radiante, 32 para a cultivar Ouro Negro e 35 DAT para a cultivar Grafite. Após a coleta as plantas foram separadas em parte aérea e raiz. A parte aérea foi dividida em folha e caule e os nódulos foram destacados da raiz e levados para análise digital do número de nódulos.

3.4.3. Experimento em 2013

O experimento ocorreu no período de 13/09/2013 a 09/11/2013. Foram avaliadas duas cultivares, com características contrastantes quanto ao hábito de crescimento e duração de ciclo, selecionadas dentre as três utilizadas no primeiro experimento em casa de vegetação, em 2012: BRS Radiante (porte semi-ereto, hábito de crescimento tipo I, e ciclo precoce) e BRS Grafite (porte semi-ereto, hábito de crescimento tipo II, e ciclo tardio).

O delineamento experimental adotado foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições, composto por duas cultivares de feijoeiro (Radiante e Grafite), três épocas de coleta (13 DAT; floração plena; e metade do enchimento de vagens), um inoculante comercial e as respectivas plantas controle não inoculadas, perfazendo 48 vasos.

As estirpes de rizóbio que foram utilizadas neste experimento compõe o inoculante comercial, recomendado para a cultura do feijoeiro no Brasil, formado pela combinação das estirpes BR322 (CIAT 899 ou SEMIA 4077); BR520 (PR-F81 ou SEMIA 4080) e BR534 (CPAC H12), todas classificadas como *Rhizobium tropici*, eobtidas junto à coleção de estirpes

da Embrapa Agrobiologia. A contagem de rizóbio do inoculante foi de $7,0 \times 10^9$ unidades formadoras de colônia.

As plantas foram coletadas em três ocasiões distintas: a primeira coleta ocorreu aos 13 DAT, para as duas cultivares concomitantemente; a segunda coleta ocorreu na floração plena de cada cultivar o que correspondeu aos 35 DAT para a cultivar Radiante e aos 42 DAT para a cultivar Grafite; a terceira coleta ocorreu duas semanas após a floração plena de cada cultivar, correspondendo aos 49 DAT e aos 56 DAT para as cultivares Radiante e Grafite respectivamente.

Em todas as coletas as plantas foram divididas em parte aérea e raiz, e os nódulos foram destacados da raiz, limpos e levados para análise digital do tamanho e do número dos nódulos. Na segunda coleta a parte aérea foi dividida em folha, caule e flores, e na terceira coleta em folha, caule e vagem. Neste experimento, apenas as amostras obtidas na 3ª coleta foram analisadas quanto à abundância natural de ^{15}N .

3.4.4. Determinações

O número e o tamanho dos nódulos foram determinados por análise digital de imagens. Para este procedimento, os nódulos destacados de cada raiz foram espalhados em folhas de acetato transparentes com dimensões de 20x30 cm. As folhas de acetato foram colocadas em *scanner* de mesa EPSON® NX200, e a imagem foi digitalizada em tons de cinza (cinzento a 8 bits) e 300 dpi de resolução. Posteriormente, cada imagem foi submetida a contraste e binarização, sendo removidos elementos que foram considerados como impurezas. A mensuração do número nódulos nas imagens digitalizadas foi efetuada com o *software* ImLab versão 2.3, desenvolvido pela PUC-Rio (SCURI, 2010), que efetua a contagem dos objetos na imagem e fornece o número de pixels presente em cada objeto.

O tegumento das sementes, os cotilédones e as folhas senescentes foram coletados, quando estes se soltavam da planta a partir de um leve toque com as mãos. Para efeito de análises, as folhas senescentes coletadas durante o experimento, foram adicionadas às folhas coletadas no momento das amostragens de biomassa. Uma amostra das sementes das cultivares plantadas também foram levadas para análise.

Todas as diferentes partes coletadas das plantas foram lavadas em água destilada e deionizada, e em seguida postas para secar em sacos de papel em estufa com circulação forçada de ar a ± 65 °C. Após a secagem, as amostras foram pesadas e posteriormente o material foi finamente moído de forma manual, com gral e pistilo.

Parte do material coletado nos dois experimentos (semente, cotilédone, tegumento, raiz, nódulo, folhas, caule, e vagem) teve analisado os seus teores de N-total e de ^{15}N em um espectrômetro de massas Finnigan modelo Delta Plus acoplado a um autoanalisador de CN COSTECH para análises de razões isotópicas, no laboratório “John M. Day” de Isótopos Estáveis na Embrapa Agrobiologia.

A abundância de natural ^{15}N foi calculada de acordo com a seguinte fórmula (HÖGBERG et al., 1997):

$$\delta^{15}\text{N} = \frac{\text{atom}\% \text{ } ^{15}\text{N}_{(\text{amostra})} - \text{atom}\% \text{ } ^{15}\text{N}_{(\text{padrão})}}{\text{atom}\% \text{ } ^{15}\text{N}_{(\text{padrão})}} \times 1000$$

Onde o padrão é a concentração de N_2 atmosférico (0,3663% de átomos de ^{15}N). O valor B se refere ao valor $\delta^{15}\text{N}$ da leguminosa efetivamente nodulada, cultivada em meio totalmente livre de N. No entanto, as sementes podem fornecer uma proporção significativa do N-total acumulado pela planta (OKITO et al., 2004). Portanto, é necessário determinar a

abundância de ^{15}N derivada da semente, e descontá-la da abundância de ^{15}N da planta inteira, encontrando o $\delta^{15}\text{N}$ ajustado. Para este trabalho, este ajuste foi feito indiretamente, através dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ obtidos das plantas controle. Partiu-se do princípio que o N encontrado nestas plantas controle (sem inoculação ou adubação com N mineral) refletia o N oriundo exclusivamente das sementes, e por consequência, as plantas controle seriam uma representação fiel do N encontrado nas sementes já que esta seria a única fonte de N disponível para estas plantas. Portanto, para o cálculo do $\delta^{15}\text{N}$ ajustado foi usada a fórmula adaptada de KYEI-BOAHEN et al. (2002):

$$\delta^{15}\text{N}_{ajustado} = \frac{(\text{Total N}_{\text{(planta inteira)}} \times \delta^{15}\text{N}_{\text{(planta inteira)}}) - (\text{Total N}_{\text{(planta controle)}} \times \delta^{15}\text{N}_{\text{(planta controle)}})}{\text{Total N}_{\text{(planta inteira)}} - \text{Total N}_{\text{(planta controle)}}}$$

O Valor B das cultivares de feijoeiro foi calculado de acordo com a fórmula (NGULUU et al., 2001):

$$B = \frac{(\delta^{15}\text{N}_{\text{(planta fix.)}} \times \text{Total N}_{\text{(planta fix.)}}) - (\delta^{15}\text{N}_{\text{(controle)}} \times \text{Total N}_{\text{(controle)}})}{\text{Total N}_{\text{(planta fix.)}} - \text{Total N}_{\text{(controle)}}}$$

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, para cada época de coleta isoladamente, considerando um fatorial duplo entre cultivar e estirpe, comparando-se as médias pelo teste de Duncan a 5%.

3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1. Biomassa

No experimento em 2012, o tratamento controle, sem inoculação, gerou plantas com menor massa seca de raiz e parte aérea do que as plantas inoculadas, porém não houve diferença na massa seca de raiz entre a estirpe CIAT 899 ou as estirpes do inoculante comercial (Tabela 2). Não houve diferença na massa seca de parte aérea entre as três cultivares de feijoeiro no estágio de pré-floração (Tabela 2). A cultivar Grafite produziu mais massa seca de raiz do que Radiante, porém, sem diferir de Ouro Negro (Tabela 2).

Tabela 2. Massa seca de parte aérea e massa seca de raiz, no período de pré-floração, de três cultivares de feijoeiro inoculado com *Rhizobium*, crescido em cultivo hidropônico com solução nutritiva isenta de N, no ano de 2012.

Estirpe	Massa de parte aérea (mg planta ⁻¹)				Massa de raiz (mg planta ⁻¹)			
	Ouro Negro	Radiante	Grafite	Média	Ouro Negro	Radiante	Grafite	Média
CIAT 899	1006	647	1177	943 a	414	298	468	393 a
Comercial	786	672	1026	828 a	338	282	427	349 a
Controle	198	529	156	294 b	250	348	207	268 b
Média	663 A	616 A	786 A		334 AB	309 B	367 A	
CV(%)		31,9				20,5		

Letras minúsculas comparam colunas e letras maiúsculas comparam linhas pelo teste Duncan a 5%.

No experimento em 2013, na 1ª coleta, a massa seca de parte aérea e raiz foi similar entre os tratamentos inoculado e controle (Tabela 3), o que se deve provavelmente ao efeito das reservas cotiledonares, que ainda não haviam permitido que os efeitos dos tratamentos pudessem se expressar nas plantas, ainda muito jovens. YAN et al. (1995) observaram que a produção da biomassa da parte aérea e da raiz e a acumulação de P de genótipos de feijoeiro foram correlacionadas com a massa da semente, indicando que a eficiência de utilização de P está associada às reservas da semente. Além disso, em condições de campo, sementes grandes aumentaram o índice de área foliar e a biomassa de parte aérea e raiz de cultivares de feijoeiro, particularmente no início do ciclo da cultura (LIMA et al., 2005), demonstrando a importância da reserva nutricional da semente.

Entre as cultivares, a massa seca de parte aérea e raiz foi maior na cultivar Radiante (Tabela 3), fato que se explica por esta cultivar, com hábito tipo I e crescimento determinado, apresentar sementes grandes (440 ± 40 mg), e gerar plântulas mais agressivas, com caules mais espessos e folhas primárias grandes, aumentando o peso inicial das plantas. Na 2ª e na 3ª coleta, as plantas do tratamento inoculado já apresentavam massa seca de parte aérea e raiz maiores do que as do tratamento controle (Tabela 3). Na 2ª coleta, a cultivar Grafite superou a massa seca de parte aérea e igualou a massa seca de raiz da cultivar Radiante (Tabela 3). Na 3ª coleta, não houve diferença entre cultivares na massa seca de parte aérea e raiz (Tabela 3).

Tabela 3. Massa seca de parte aérea e de raiz, em três estádios fenológicos, de duas cultivares de feijoeiro inoculado com *Rhizobium*, crescido em cultivo hidropônico com solução nutritiva isenta de N, no ano de 2013.

Fonte de N	Massa de parte aérea (mg planta ⁻¹)			Massa de raiz (mg planta ⁻¹)		
	Radiante	Grafite	Média	Radiante	Grafite	Média
13 dias após o transplantio						
Inoculado	448	273	360 a	262	153	207 a
Controle	446	221	333 a	262	145	203 a
Média	447 A	247 B		262 A	149 B	
CV(%)		15,93			11,92	
Floração plena						
Inoculado	1193	3204	2198 a	552	850	701 a
Controle	563	291	427 b	619	267	443 b
Média	878 B	1747 A		585 A	559 A	
CV(%)		21,75			17,92	
Doas semanas após floração plena						
Inoculado	6519	5616	6068 a	944	1149	1046 a
Controle	511	389	450 b	638	332	485 b
Média	3515 A	3003 A		791 A	741 A	
CV(%)		31,55			19,91	

Letras minúsculas comparam colunas e letras maiúsculas comparam linhas pelo teste Duncan a 5%.

A produção de biomassa destas cultivares mostra comportamento bastante diferente do observado no campo, onde a biomassa de raiz e parte aérea da cultivar Radiante foi bastante inferior à da cultivar Grafite (Tabelas 17 e 18).

Provavelmente, a massa seca de parte aérea da cultivar Radiante, na 3ª coleta do experimento em 2013, só se igualou à da cultivar Grafite, devido à contribuição da massa seca de vagens da cultivar Radiante, que foi o triplo da observada na cultivar Grafite (Tabela 4). O tratamento controle não produziu vagens (Tabela 4). Novamente observa-se resposta bastante diferenciada da obtida no campo, onde a massa seca de vagens da cultivar Grafite, duas semanas após floração plena, foi 120% maior, na média dos dois experimentos (Tabela 19).

A ausência de produção de vagens no tratamento controle mostra que, embora a reserva das sementes tenha capacidade para nutrir as plantas, esta capacidade é limitada e não é suficiente para prover a planta de forma suficiente para permiti-la atingir a fase reprodutiva. LIMA et al. (2005) observaram que as sementes grandes eram capazes de aumentar a biomassa de parte aérea e raiz de cultivares de feijoeiro, em especial no início do ciclo da cultura, porém estas eram incapazes de modificar a massa de vagens.

Tabela 4. Massa seca de vagem, duas semanas após floração plena, de duas cultivares de feijoeiro inoculado com *Rhizobium*, crescido sob sistema de cultivo hidropônico, abastecido com solução nutritiva isenta de N, no ano de 2013.

Fonte de N	Massa de vagem (mg planta ⁻¹)		
	Radiante	Grafite	Média
Inoculado	3750	1251	2501 a
Controle	0	0	0 b
Média	1875 A	625 B	
CV(%)		55,88	

Letras minúsculas comparam colunas e letras maiúsculas comparam linhas pelo teste Duncan a 5%.

3.5.2. Nodulação

O resultado do número de nódulos por planta no experimento em 2012 e 2013, e do diâmetro médio dos nódulos no experimento em 2013, foi obtido por imagem digitalizada através de *scanner*, imediatamente após os nódulos terem sido destacados das raízes, e a contagem feita pelo *softwareImLab* versão 2.3 (SCURI, 2010).

No experimento em 2012, não houve diferença, tanto no número quanto na massa seca de nódulos, das plantas inoculadas pela estirpe CIAT 899 ou pelo inoculante comercial, composto por um conjunto de três estirpes (Tabela 5). Também não houve diferença no número de nódulos por planta entre as três cultivares, avaliadas no estágio de pré-floração (Tabela 5). Em média cada planta, independente da estirpe ou da cultivar, gerou 78 nódulos. A cultivar Grafite apresentou maior massa seca de nódulos por planta do que a cultivar Radiante, porém sem diferir da cultivar Ouro Negro (Tabela 5). A massa seca de nódulos por planta da cultivar Grafite, foi 69 mg superior a da cultivar Radiante e 32 mg superior a da cultivar Ouro Negro.

Tabela 5. Número de nódulos por planta, obtidos a partir do software ImLab versão 2.3, e massa seca de nódulos, no período de pré-floração de três cultivares de feijoeiro inoculado com *Rhizobium*, crescido sob sistema de cultivo hidropônico, abastecido com solução nutritiva isenta de N, no ano de 2012.

Estirpe	Número de nódulos (planta ⁻¹)			
	Ouro Negro	Radiante	Grafite	Média
CIAT 899	75	95	88	86
Comercial	70	72	71	71
Média	72	83	79	
Massa de nódulos (mg planta ⁻¹)				
CIAT 899	129	74	150	118
Comercial	102	84	146	111
Média	115,5 AB	79 B	148 A	

Letras minúsculas comparam colunas e letras maiúsculas comparam linhas pelo teste Duncan a 5%.

Os dados mostram que não há diferença no potencial de nodulação e de produção de biomassa de inoculantes preparados somente com uma única estirpe ou com uma mistura de três estirpes diferentes.

No experimento em 2013, a cultivar Grafite produziu maior número de nódulos por planta do que a cultivar Radiante, nas três épocas de amostragem (Tabela 6). Na 1ª coleta, uma planta da cultivar Grafite tinha quatro vezes mais nódulos do que Radiante, na 2ª coleta, Grafite tinha 56% mais nódulos por planta, e na 3ª coleta, 76% mais nódulos por planta do que a cultivar Radiante (Tabela 6). O tamanho médio de nódulos, na 1ª coleta foi de 1,41 mm, na 2ª coleta foi de 2,30 mm e na 3ª coleta foi de 2,59 mm (Tabela 6). De acordo com ISOI & YOSHIDA (1991), o feijão comum é caracterizado por um elevado número de nódulos de tamanho pequeno (<2 mm), com uma atividade muito baixa fixação de N, o que pode explicar a baixa fixação de N em feijoeiro. Na 1ª coleta, a cultivar Grafite apresentou nódulos com diâmetros maiores, já na 2ª e 3ª coletas, ambas as cultivares apresentavam nódulos com tamanhos semelhantes (Tabela 6). Da 1ª para a 2ª coleta, os nódulos da cultivar Grafite aumentaram 48%, e da cultivar Radiante aumentaram 83% de tamanho, enquanto na média da 2ª para a 3ª coleta, os nódulos das duas cultivares aumentaram 12,6% de tamanho. A cultivar Grafite produziu maior massa seca de nódulos nas duas primeiras coletas, entretanto, na 3ª coleta, a cultivar Radiante conseguiu igualar estatisticamente a massa de nódulos (Tabela 6).

Tabela 6. Número de nódulos por planta e diâmetro médio dos nódulos, obtido a partir do software ImLab versão 2.3, e massa seca de nódulos, em três estádios fenológicos de duas cultivares de feijoeiro inoculado com *Rhizobium*, crescido sob sistema de cultivo hidropônico, abastecido com solução nutritiva isenta de N, no ano de 2013.

Estirpe	Número de nódulos (planta ⁻¹)			Diâmetro médio de nódulos (mm)			Massa de nódulos (mg planta ⁻¹)		
	Radiante	Grafite	Média	Radiante	Grafite	Média	Radiante	Grafite	Média
13 dias após transplante									
Comercial	10 B	40 A	25	1,19 B	1,63 A	1,41	4 B	19 A	11
Floração plena									
Comercial	138 B	216 A	177	2,18 A	2,42 A	2,30	148 B	351 A	249
Dois semanas após floração plena									
Comercial	265 B	469 A	367	2,60 A	2,58 A	2,59	338 A	502 A	420

Letras maiúsculas comparam linhas pelo teste Duncan a 5%.

ISOI & YOSHIDA (1991) criaram padrões de distribuição de nódulos de feijão, agrupados em quatro classes de tamanho (<2 mm, 2-3 mm, 3-5 mm, 5 mm <), e estabeleceram uma relação entre a atividade de redução de acetileno e o tamanho do nódulo, e viram que os nódulos formados nas raízes de feijão aos 50 DAE eram numerosos e a maioria deles pertencia à classe de menor tamanho (<2 mm), que foi inferior à média encontrada no presente trabalho, para o mesmo período de avaliação. ISOI & YOSHIDA (1991) verificaram que a redução de acetileno em grande parte dependeu do tamanho do nódulo e a maior atividade foi observada nos nódulos de tamanho médio (2-3 mm), classe da qual se enquadram os nódulos encontrados na 2ª e na 3ª coleta do presente estudo. Os maiores nódulos de feijoeiro (3-5 mm) apresentavam coloração esverdeada, indicando senescência, e

sua atividade fixadora de nitrogênio foi muito baixa (ISOI & YOSHIDA, 1991). O feijoeiro comum pode ser caracterizado por um elevado número de nódulos de tamanho pequeno (< 2 mm), com uma atividade muito baixa fixação de N, o que pode explicar a baixa fixação de N na espécie (ISOI & YOSHIDA, 1991). SHEARER et al. (1984) encontraram correlação positiva entre o tamanho dos nódulos de soja, seu conteúdo de N e enriquecimento em ^{15}N , e viram que os nódulos maiores (3-5 mm) eram mais enriquecidos em ^{15}N (7,1‰), enquanto que os menores nódulos (< 2 mm) eram menos enriquecidos em ^{15}N (1,7‰).

Os resultados seugerem que a formação dos nódulos na cultivar Radiante ocorre posteriormente à nodulação da cultivar Grafite, deixando um espaço de tempo curto para acultivar Radiante efetuar a formação e o desenvolvimento de nódulos, o que possivelmente prejudica a FBN nesta cultivar. Uma hipótese para explicar tal resultado é que a nodulação tardia na cultivar de ciclo precoce pode ser ocasionada pela maior reserva cotiledonar devido ao maior tamanho do grão em comparação com os grãos da cultivar Grafite. Tais resultados corroboram os encontrados por BRITO (2013), que viu que a nodulação e atividade da nitrogenase no início da ontogenia das plantas, eram menores nas cultivares de ciclo precoce e sementes grandes. Além disso, os dados de massa seca de parte aérea e raízes, associados aos dados de atividade da nitrogenase, obtidos por BRITO (2013) permitiram a autora levantar a hipótese de que a nodulação tardia em cultivares de ciclo precoce é ocasionada pela maior reserva cotiledonar, devido ao maior tamanho do grão em comparação com as demais cultivares, confirmando um menor potencial de FBN das cultivares precoces.

3.5.3. Valor B e fracionamento isotópico

Foi detectada forte discriminação isotópica de ^{15}N nos tecidos das cultivares de feijoeiro, com $\delta^{15}\text{N}$ da parte aérea negativo e $\delta^{15}\text{N}$ positivo nas raízes e principalmente nos nódulos.

No experimento em 2012, os tecidos do caule foram os únicos a apresentarem valores negativos para as três cultivares. O $\delta^{15}\text{N}$ no tecido do caule variou de $-0,115\%$ a $-1,280\%$, para as cultivares Radiante e Grafite respectivamente (Tabela 7). Os valores negativos de $\delta^{15}\text{N}$ observados nos tecidos do caule, mostram o empobrecimento de ^{15}N destes tecidos em relação ao N_2 atmosférico (0‰), indicando que ocorreu discriminação isotópica preferencial para o átomo de menor peso atômico (^{14}N) (KYEI-BOAHEN et al., 2002). São poucos os resultados de $\delta^{15}\text{N}$ exclusivamente do caule, pois geralmente este tecido é avaliado juntamente com as folhas, no entanto nossos resultados corroboram os da literatura que também mostram valores de abundância natural negativos nos caule variando entre $-1,0\%$ e $-2,7\%$, no caule de trevo branco, dependendo da estirpe inoculada (STEELE et al., 1983), ou de $-1,1$ a $-0,7\%$ no caule de soja, dependendo do estágio fenológico da planta (SHEARER et al., 1984), mostrando que esses são tecidos bastante empobrecidos em termos de abundância de ^{15}N .

A cultivar Grafite foi a única que apresentou valores negativos de $\delta^{15}\text{N}$, no tecido da folha ($-0,050\%$), enquanto Radiante e Ouro Negro mostraram maior enriquecimento em ^{15}N nos tecidos da folha, com deltas positivos de $1,570\%$ e $0,246\%$, respectivamente (Tabela 7).

As raízes e principalmente os nódulos das três cultivares avaliadas apresentaram $\delta^{15}\text{N}$ positivo, com a raiz variando de $0,732\%$ a $2,008\%$, e os nódulos com deltas de $6,632\%$ a $8,180\%$, nas cultivares Grafite e Radiante respectivamente (Tabela 7). Outros trabalhos mostram que os nódulos de várias leguminosas geralmente são enriquecidos em ^{15}N (TURNER & BERGERSEN, 1983; SHEARER & KOHL, 1986; BODDEY et al., 2000; GUIMARÃES et al., 2008; PAUFERRO et al., 2010). Para *Phaseolus vulgaris*, não existem dados relatados na literatura sobre o nível de $\delta^{15}\text{N}$ dos nódulos, o que reforça a importância do

presente estudo para a identificação do fracionamento isotópico do feijoeiro sob condições de FBN.

Diversos trabalhos que visaram determinar o valor B em leguminosas consideraram que as sementes podem constituir uma proporção significativa do total de N acumulado pela cultura e realizaram um ajuste nos seus cálculos, para descontar o N das sementes (OKITO et al., 2004; GUIMARÃES et al., 2008; LÓPEZ-BELLIDO et al., 2010; NEBIYU et al., 2014). No entanto, a planta não utiliza a totalidade deste N, já que uma parte fica retida nos tecidos dos cotilédones e do tegumento das sementes, tecidos estes que geralmente não são analisados e portanto deixam de ser levados em consideração nos cálculos para a definição do valor B. LÓPEZ-BELLIDO et al. (2010) quantificaram a abundância de ^{15}N nos cotilédones de grão de bico e viram que estes tecidos são enriquecidos em $\delta^{15}\text{N}$, apresentando delta positivo de 1,35‰. No presente estudo, também se levou em consideração esta porção do N perdida nos tecidos do cotilédone, e também no tegumento que recobre as sementes, sendo que o delta destes tecidos também apresentou valores positivos, que variaram de 1,008‰ na cultivar Ouro Negro a 2,6‰ nas cultivares Radiante e Grafite (Tabela 7). As sementes das três cultivares também apresentaram valores de delta positivos, sendo de 2,4‰ para as cultivares Ouro Negro e Radiante, e de 3,041‰ para a cultivar Grafite (Tabela 7). Aparentemente não existe relação entre o tamanho da semente e a sua abundância em ^{15}N , já que a cultivar Ouro Negro, que possui sementes com massa unitária de 240 mg (Tabela 1), apresentou o mesmo $\delta^{15}\text{N}$ da cultivar Radiante, que possui sementes com massa unitária de 440 mg (Tabela 1). Este fato também foi observado por NEBIYU et al. (2014) em sementes de cultivares de *Vicia faba* que diferenciavam-se em 170 mg de massa, e no entanto apresentaram o mesmo valor de $\delta^{15}\text{N}$, porém eram empobrecidas em ^{15}N , e mostraram valores negativos de -0,6‰.

O valor B foi apresentado de duas formas: uma, considerando valores de delta da planta inteira e outra, considerando-se apenas valores de delta da parte aérea, excluindo os deltas da raiz e dos nódulos.

No experimento em 2012, o valor B foi definido no período de pré-floração do feijoeiro. Considerando a planta inteira, o valor B da cultivar Ouro Negro variou entre estirpes, com o maior delta encontrado na estirpe comercial (1,836‰), já na cultivar Radiante, ocorreu diferença entre o valor B das estirpes, porém, neste caso foi a estirpe CIAT 899 que apresentou um valor B superior (1,871‰) enquanto que o valor B da cultivar Grafite não variou entre as duas estirpes testadas (Tabela 7). KYEI-BOAHEN et al. (2002) encontraram resultados semelhantes, ao avaliarem o fracionamento isotópico em duas cultivares de grão de bico inoculado com três estirpe ou com uma única estirpe, e viram que o valor B de uma cultivar foi mais adequado com o *mix* de estirpes, e o valor B da outra cultivar ficou mais apropriado com a estirpe solteira. O menor valor B médio entre as três cultivares foi encontrado na cultivar Grafite (1,323‰), seguido por Ouro Negro (1,555‰), e depois por Radiante (1,680‰), que exibiu o maior valor B médio (Tabela 7).

O valor B, considerando apenas a parte aérea das plantas, foi bem menor, visto que não havia mais a influência dos tecidos enriquecidos em ^{15}N das raízes e dos nódulos, e, portanto os valores de B apresentaram-se negativos (Tabela 7). O valor B médio da parte aérea da cultivar Grafite foi o mais negativo de todos (-0,919‰), enquanto que o valor B das cultivares Ouro Negro e Radiante diferiu muito pouco, ficando entre -0,734‰ e -0,724‰, respectivamente (Tabela 7).

No experimento em 2013, assim como em 2012, os caules das plantas apresentaram-se com valores negativos de $\delta^{15}\text{N}$ (Tabela 8). No entanto, na cultivar Radiante os deltas ficaram mais negativos, passando de -0,115‰ em 2012, para -0,417‰ em 2013, enquanto que na cultivar Grafite, os deltas ficaram menos negativos, passando de -1,280‰ em 2012, para 0,656‰ em 2013 (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7. Abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}\%$) no caule, folha, raiz, nódulos, cotilédone + tegumento e valor B na planta inteira ou somente na parte aérea, no período de pré-floração de três cultivares de feijoeiro inoculado com *Rhizobium*, crescido sob sistema de cultivo hidropônico, abastecido com solução nutritiva isenta de N, no ano de 2012.

Tecido	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)*		
	Ouro Negro	Radiante	Grafite
Caule	$-0,993 \pm 0,211$	$-0,115 \pm 0,157$	$-1,280 \pm 0,093$
Folha	$0,246 \pm 0,309$	$1,570 \pm 0,318$	$-0,050 \pm 0,111$
Raiz	$1,237 \pm 0,246$	$2,008 \pm 0,122$	$0,732 \pm 0,140$
Nódulo	$7,734 \pm 0,425$	$6,632 \pm 0,194$	$8,180 \pm 0,175$
Cotilédone + tegumento	$1,008 \pm 0,199$	$2,621 \pm 0,086$	$2,613 \pm 0,272$
Semente	2,441	2,411	3,041

Estirpe	Valor B [#]		
	Planta inteira		
CIAT 399	$1,344 \pm 0,252$	$1,871 \pm 0,382$	$1,316 \pm 0,200$
Comercial	$1,836 \pm 0,261$	$1,489 \pm 0,212$	$1,330 \pm 0,199$
Média	$1,555 \pm 0,204$	$1,680 \pm 0,228$	$1,323 \pm 0,141$

Estirpe	Parte Aérea		
	CIAT 399	$-0,947 \pm 0,283$	$-0,428 \pm 0,204$
Comercial	$-0,450 \pm 0,200$	$-0,946 \pm 0,299$	$-0,916 \pm 0,268$
Média	$-0,734 \pm 0,205$	$-0,724 \pm 0,215$	$-0,919 \pm 0,204$

*Médias de dois tratamentos (inoculante comercial e inoculação com CIAT 899) e quatro repetições; (média \pm erro padrão).

[#]Médias de quatro repetições (média \pm erro padrão); valores corrigidos para descontar a abundância de ^{15}N das plantas controle, não inoculadas.

A abundância natural de ^{15}N na folha da cultivar Radiante foi menos negativa do que na cultivar Grafite (Tabela 8). As vagens das duas cultivares também estavam empobrecidas em ^{15}N , e apresentaram delta médio de $-0,788\%$, com pouca diferença entre as cultivares (Tabela 8).

No experimento em 2013, as raízes das cultivares Radiante e Grafite estavam com valores positivos de $\delta^{15}\text{N}$ (Tabela 8), assim como em 2012. No entanto, na cultivar Radiante, o enriquecimento em ^{15}N caiu de $2,008\%$ em 2012, para $1,473\%$ em 2013, enquanto que na cultivar Grafite, o enriquecimento da raiz aumentou de $0,732\%$ em 2012 para $1,815\%$ em 2013 (Tabelas 7 e 8).

Os nódulos de ambas as cultivares em 2013 apresentaram grande enriquecimento em ^{15}N , com deltas bastante positivos, sendo que o enriquecimento dos nódulos da cultivar Radiante foi maior (Tabela 8). O aumento no enriquecimento dos nódulos no período de pré-floração (experimento em 2012) para o período de duas semanas após a floração (experimento em 2013) foi de apenas $0,183\%$, na cultivar Grafite, enquanto que na cultivar Radiante foi de $2,474\%$.

O valor B das cultivares, considerando a planta inteira, continuou sendo positivo (Tabela 8), assim como em 2012 (Tabela 7), porém, menos positivo. O valor B da planta inteira da cultivar Radiante foi de 0,556‰ e da cultivar Grafite foi de 0,414‰ (Tabela 8). Quando não se considerou os deltas da raiz e do nódulo, o valor B das cultivares ficou bastante negativo. O valor B da parte aérea da cultivar Radiante foi de -1,056‰ e da cultivar Grafite foi de -1,401‰ (Tabela 8).

Tabela 8. Abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$ ‰) no caule, folha, vagem, raiz e nódulos e valor B, na planta inteira ou somente na parte aérea, duas semanas após floração plena de duas cultivares de feijoeiro inoculado com *Rhizobium*, crescido sob sistema de cultivo hidropônico, abastecido com solução nutritiva isenta de N, no ano de 2013.

Tecido	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)*		
	Ouro Negro	Radiante	Grafite
Caule	-0,417 ± 0,118	-0,656 ± 0,057	-0,536 ± 0,078
Folha	-1,220 ± 0,114	-1,615 ± 0,130	-1,418 ± 0,111
Vagem	-0,815 ± 0,142	-0,762 ± 0,208	-0,788 ± 0,126
Raiz	1,473 ± 0,258	1,815 ± 0,093	1,644 ± 0,150
Nódulo	9,106 ± 0,351	8,363 ± 0,538	8,734 ± 0,347
Valor B[#]			
Planta inteira	0,556 ± 0,094	0,414 ± 0,135	0,485 ± 0,086
Parte aérea	-1,014 ± 0,081	-1,395 ± 0,056	-1,204 ± 0,078

*Médias de quatro repetições dos tratamentos inoculados (média ± erro padrão).

[#]Médias de quatro repetições (média ± erro padrão); valores corrigidos para descontar a abundância de ^{15}N das sementes.

O valor B médio da parte aérea das cultivares de feijoeiro foi definido com igual a -1,204‰, sendo o valor B de -1,2 utilizado como referência para os cálculos da contribuição da FBN em cultivares de feijoeiro, utilizadas nos experimentos de campo do presente estudo. Isto concorda com OKITO et al. (2004) e GUIMARÃES et al. (2008), que sugerem que a parte aérea das plantas é a mais adequada para a determinação do valor B, por refletir melhor as condições de experimentação a nível de campo, cuja recuperação completa do sistema radicular e nódulos é praticamente impossível.

Uma observação comum nas leguminosas fixadoras de N_2 é o enriquecimento em ^{15}N dos nódulos e uma depleção de ^{15}N na parte aérea, fenômeno que seria provocado pela desnitrificação dos nódulos, preferencialmente liberando ^{14}N (SHEARER et al., 1980), ou através da difusão de NH_3 dos bacteróides resultando em discriminação isotópica, com consequente enriquecimento dos nódulos (YONEYAMA et al., 1991). A importação de aminoácidos enriquecidos em ^{15}N para o interior dos nódulos (BERGERSEN et al., 1988), ou a desaminação de aminoácidos dos próprios nódulos, como a prolina ou glutamina, podem resultar no enriquecimento dos nódulos (KOHL et al., 1989). Outros estudos fornecem evidências de que a exportação a partir dos nódulos de ureídos pobres em ^{15}N provoca um consequente enriquecimento dos nódulos (SHEARER et al., 1982). No entanto, nenhuma dessas hipóteses forneceu uma explicação suficiente para os diversos resultados mostrando a discriminação positiva de ^{15}N dos nódulos. UNKOVICH (2013) apoia a teoria de PRELL & POOLE (2006) de que as reações de desaminação no bacteroide são altamente fracionadoras e

produzem NH_3 empobrecidos em ^{15}N , e nesta forma, os rizóbios são incapazes de assimilar este NH_3 discriminado, que são exportados a partir dos nódulos em direção à parte aérea, dando origem ao enriquecimento em ^{15}N dos nódulos e empobrecimento em ^{15}N da parte aérea. A evidência para a produção de NH_3 empobrecido em ^{15}N nos bacteróides vem do grande enriquecimento observado na homospermidine poliamina rizobiana, uma enzima catalizadora de reações químicas (YONEYAMA et al., 1998), que é produzida a partir da combinação de duas moléculas putrescine (que quebram aminoácidos), com posterior liberação associada de NH_3 (FUJIHARA, 2009), que deve ser substancialmente empobrecido em ^{15}N para suportar o alto grau de enriquecimento da homospermidine. Embora as quantidades de homospermidine produzidos nos nódulos não sejam suficientes para induzir os enriquecimentos dos nódulos, quando combinada com outras reações potenciais de desaminação no bacteróide, estas reações podem fornecer uma explicação plausível para o enriquecimento dos nódulos e empobrecimento da parte aérea em ^{15}N em muitas leguminosas fixadoras de N_2 (UNKOVICH, 2013).

O valor B pode variar de acordo com o estágio fenológico da planta (KYEI-BOAHEN et al., 2002). Isso foi comprovado neste estudo, haja vista os pequenos deltas encontrados nas plantas no experimento em 2012, onde as plantas foram colhidas em pré-floração e que quase inviabilizaram os cálculos do valor B na parte aérea das cultivares de feijão, quando comparados com o experimento em 2013, onde as plantas foram colhidas durante o enchimento de vagens. Um fato importante, e que certamente deve ter contribuído para isso, foi o N contido nessas sementes que é indistinguível do N_2 fixado nas plantas, e constitui uma proporção muito mais significativa de N total das plantas nos estádios iniciais de crescimento, causando, portanto, maiores erros do que nos estádios finais de crescimento, quando o N da semente torna-se insignificante graças a um efeito de diluição (OKITO et al., 2004; LÓPEZ-BELLIDO et al., 2010), portanto, recomenda-se que os futuros estudos que visem determinar o valor B e o fracionamento isotópico em plantas leguminosas, voltem-se para as plantas em seus estádios mais tardios, evitando assim maior influência do N da semente, preferencialmente em espécies ou cultivares de sementes grandes (NEBIYU et al., 2014).

3.6. CONCLUSÕES

A inoculação do feijoeiro com o inoculante comercial, constituído pela mistura de três estirpes (CIAT 899, PRF81 e CPAC H12), ou com uma única estirpe (CIAT 899) não afetou significativamente as características avaliadas, incluindo o valor B.

Foi identificado fracionamento isotópico durante a fixação biológica de N₂ com diferentes padrões entre as cultivares avaliadas.

O valor B médio na parte aérea das cultivares de feijão foi de -1,20 ‰, no estágio fenológico de metade do enchimento de vagens. Este valor de B pode ser utilizado para o cálculo da contribuição da FBN pela técnica da abundância natural de ¹⁵N em plantas de feijão.

4. CAPÍTULO II

QUANTIFICAÇÃO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM CULTIVARES DE FEIJOEIRO EM CONDIÇÕES DE CAMPO ATRAVÉS DA TÉCNICA DA ABUNDÂNCIA NATURAL DE ^{15}N

4.1. RESUMO

Novas cultivares de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) têm sido desenvolvidas pelos programas de melhoramento nos últimos anos, sem que seus potenciais para a fixação biológica de N₂ (FBN) tenham sido avaliados. A técnica isotópica da abundância natural de ¹⁵N baseia-se no ligeiro enriquecimento de ¹⁵N observado nos solos em relação à atmosfera e não exige a aplicação de fertilizantes marcados com ¹⁵N, estando menos sujeita a erros advindos de variações temporais na marcação isotópica do solo. Este trabalho teve por objetivo quantificar, através da técnica da abundância natural de ¹⁵N, a contribuição da FBN em cultivares de feijoeiro em condições de campo e avaliar o desempenho agrônomico dessas cultivares sob inoculação. Oito cultivares de feijoeiro, com características diferentes quanto ao tipo de grão, hábito de crescimento, arquitetura da planta e duração do ciclo, foram crescidas em condições de campo, sob duas fontes de N (inoculação com inoculante comercial com rizóbio ou adubação com 90 kg ha⁻¹ de N mineral), com quatro repetições, nos anos de 2011 e 2012, em Latossolo Vermelho na Embrapa Arroz e Feijão, em Santo Antônio de Goiás, GO. Foram efetuadas amostragens de parte aérea, raiz e nódulos em diferentes estádios de crescimento a partir da floração plena, e a colheita de grãos na maturidade fisiológica. Foram feitas análises de N_{total} e abundância natural de ¹⁵N na parte aérea e nos grãos. No experimento em 2011, a cultivar Ouro Negro produziu a maior massa de nódulos sob inoculação, inclusive nos estádios reprodutivos, e as cultivares Jalo Precoce e Radiante apresentaram menor massa de nódulos. O rendimento médio de grãos das oito cultivares foi de 1614 e 2942 kg ha⁻¹, respectivamente, sob inoculação ou N mineral. Sob inoculação, a cultivar Ouro Negro apresentou os maiores acúmulos de N na parte aérea e no grão e a maior produtividade, atingindo 2200 kg ha⁻¹ de grãos, equivalente a 73% da produção sob N mineral. Em 2011, o acúmulo de N derivado da FBN nos grãos das oito cultivares variou de 5,8 a 16,4 kg ha⁻¹, o que correspondeu a 17% e 33% de contribuição da FBN nas cultivares Marfim e Ouro Negro, respectivamente. No experimento em 2012, a maior massa de nódulos ocorreu nas cultivares Vereda e Estilo, na primeira e segunda coletas respectivamente, enquanto a cultivar Radiante apresentou a menor massa de nódulos em ambas as coletas. O rendimento médio de grãos das oito cultivares foi de 3284 kg ha⁻¹ e 3919 kg ha⁻¹ sob inoculação e N mineral, respectivamente. Os rendimentos sob inoculação variaram de 63% a 95% do rendimento obtido com a aplicação de 90 kg ha⁻¹ de N. O acúmulo de N nos grãos derivado da FBN foi de 68,4 kg ha⁻¹ na cultivar Ouro Negro, 38,7 kg ha⁻¹ na cultivar Grafite e 21,6 kg ha⁻¹ na cultivar Radiante, que correspondeu a 49, 29 e 32% de contribuição da FBN, respectivamente. A técnica da abundância natural de ¹⁵N possibilita a identificação do potencial de FBN para o fornecimento de N em diferentes genótipos de feijoeiro, e mostra-se como uma opção de ferramenta capaz de fornecer subsídios para orientar os programas de melhoramento da espécie, visando aumentar a eficiência da FBN.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*. $\delta^{15}\text{N}$. %Ndfa.

4.2. ABSTRACT

New common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars have been developed by breeding programs in recent years, but their potential for biological N₂ fixation (BNF) has not been evaluated. The ¹⁵N natural abundance isotope technique is based on the slight enrichment of ¹⁵N observed in soils to the atmosphere and does not require the application of ¹⁵N labelled fertilizer, being less subject to errors arising from temporal variations in the isotopic labelling of soils. This study aimed to quantify, through the ¹⁵N natural abundance technique, the contribution of BNF in common bean cultivars under field conditions and to evaluate the agronomic performance of these cultivars under inoculation. Eight common bean cultivars with different characteristics of the grain type, growth habit, plant architecture and growth cycle were grown at field conditions with two N sources (inoculation with commercial inoculant with rizhobia or fertilization with 90 kg ha⁻¹ of mineral N), with four replications, in 2011 and 2012, in a Red Oxisol at Embrapa Rice and Bean in Santo Antônio de Goias, GO. Shoots, roots and nodules were sampled at different growth stages after full flowering, and the grains were harvested at physiological maturity. Total N and ¹⁵N natural abundance were analyzed in shoots and grains. In the 2011 experiment, the Ouro Negro cultivar produced the highest nodule mass under inoculation, also at the reproductive stages, and the Jalo Precoce and Radiante cultivars showed the lowest nodule mass. The average grain yield of the eight cultivars was 1614 and 2942 kg ha⁻¹, under inoculation or mineral N, respectively. Under inoculation, the Ouro Negro cultivar showed the highest N accumulation in shoot and grain and higher grain yield, reaching 2200 kg ha⁻¹ of grain, equivalent to 73% of yield under mineral N. In 2011, the N accumulation derived from BNF in the grains of the eight cultivars ranged from 5.8 g m⁻² to 16.4 kg ha⁻¹, which corresponded to a BNF contribution of 17% and 33% in Marfim and Ouro Negro cultivars, respectively. In 2012 experiment, the higher nodule mass occurred in Vereda and Estilo cultivars, in the first and second samples respectively, whereas Radiante cultivar had the lowest nodule mass in both samples. The grain yield of the eight cultivars was 3284 kg ha⁻¹ and 3919 kg ha⁻¹ under inoculation and mineral N, respectively. Grain yields under inoculation ranged from 63% to 95% of the respective yields with application of 90 kg ha⁻¹ of N. The N accumulation derived from BNF in the grains was 6.84 kg ha⁻¹ in Ouro Negro cultivar, 3.87 kg ha⁻¹ in Grafite cultivar and 2.16 kg ha⁻¹ in Radiante cultivar, which corresponded to a BNF contribution of 49, 29 and 32%, respectively. The ¹⁵N natural abundance technique allows the identification of the BNF potential for the supply of N in different common bean genotypes, arising as a tool for providing data to guide the breeding programs to increase the efficiency of BNF.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*. $\delta^{15}\text{N}$. %Ndfa.

4.3. INTRODUÇÃO

A capacidade de fixar N biologicamente pode variar entre e dentro de espécies de leguminosas, em virtude da grande variabilidade genética desta família, o que representa um material inesgotável para seleção genética. Dentro de *Phaseolus vulgaris*, essa variabilidade já foi demonstrada, refletindo em diferenças na produção de massa vegetal e de grãos, no peso, número e eficiência dos nódulos, na atividade da nitrogenase, no N total acumulado pelas plantas, e nas taxas de FBN (ROSAS & BLISS, 1986; KIPE-NOLT & GILLER, 1993; ARAÚJO et al., 1998, 2000; TAJINI et al., 2008).

No feijoeiro, a inoculação de sementes com rizóbio ainda é de baixa previsibilidade, e por este motivo não se tem ainda uma recomendação generalizada sobre a inoculação de sementes para esta cultura, razão pela qual o N mineral é sempre recomendado nas adubações, e por consequência a prática de inoculação de sementes com bactérias fixadoras de N₂ ainda é pouco utilizada, tanto pelos pequenos quanto pelos grandes produtores (CABALLERO et al., 1985; FERREIRA et al., 2004).

No entanto, na cultura do feijoeiro, têm sido reportadas contribuições relevantes da FBN em condições de campo, com valores de N₂ fixado atingindo 90 kg ha⁻¹ de N, correspondendo a 50% do N acumulado na maturação (WESTERMANN et al., 1981), entre 40 e 125 kg ha⁻¹ de N em diferentes cultivares (RENNIE & KEMP, 1983b), entre 21 e 44 kg ha⁻¹ de N nos grãos de diversos genótipos (PEREIRA et al., 1989), e valores médios em sete diferentes países de 35% do N derivado da atmosfera, com valores máximos de 70% sob condições favoráveis (HARDARSON et al., 1993).

Avaliações com diferentes cultivares de feijão em condições de campo indicam que os materiais de ciclo longo apresentam maior potencial para FBN, com pouca eficiência simbiótica em materiais precoces. RUSCHEL et al. (1982) observaram que as cultivares de ciclo de 90 dias apresentaram uma contribuição média de 62% da FBN, enquanto que a cultivar precoce de 60 dias apresentou 40%. Experimentos de campo em sete países mostraram que a FBN contribuiu com 35% do N acumulado pelo cultivo, com valores máximos de 70% em cultivares de ciclo mais longo em condições ambientais favoráveis (HARDARSON et al., 1993).

Há evidências também de diferenças na FBN entre cultivares com hábitos de crescimento distintos (GRAHAM & ROSAS, 1977). Resultados de experimentos de campo no Chile evidenciaram maior FBN em cultivares tipo III, que chegou a alcançar 90 kg ha⁻¹ de N embora algumas cultivares tipo I e II também apresentaram bom desempenho, porém nenhuma delas ultrapassou 75 kg ha⁻¹ de N (HARDARSON et al., 1993). Em experimento de campo com uma cultivar de hábito de crescimento indeterminado trepador, KUMARASINGHE et al. (1992) observaram que as taxas de assimilação de N₂ no período de enchimento das vagens, época de maior demanda de N pela planta, foi da ordem de 119 kg ha⁻¹, sendo que 84 % eram derivados da FBN, satisfazendo quase totalmente as necessidades de N durante todo o ciclo da cultura.

Esses trabalhos de quantificação da FBN em feijoeiro, em condições de campo, foram realizados há mais de 10 anos, evidenciando na época, grande variabilidade na eficiência da simbiose do feijoeiro nos diferentes cultivares, além de mostrarem que os programas de melhoramento, até aquela época, ainda não haviam sido bem sucedidos na tentativa de aumentar a eficiência da FBN na cultura (BLISS, 1993b). KIPE-NOLT et al. (1993), avaliando nove cultivares de feijão de diferentes programas de melhoramento, obtiveram nas melhores cultivares, 51 kg ha⁻¹ de N, cuja contribuição da FBN variou apenas de 38 a 50%. KIPE-NOLT & GILLER (1993), comparando cultivares selecionadas pelo

CIAT e suas linhagens parentais, mais rústicas, não encontraram diferenças significativas no conteúdo da N na parte aérea, na quantidade de N fixado e na contribuição da FBN entre os materiais avaliados.

Em todos estes trabalhos foi utilizada a técnica da diluição isotópica de ^{15}N , onde fertilizante marcado é aplicado ao solo. Entretanto, esta técnica é muito influenciada por variações temporais e espaciais da marcação de ^{15}N (DANSO et al., 1993; UNKOVICH & PATE, 2000), e estas variações podem comprometer a precisão das avaliações efetuadas em genótipos com ciclos e hábitos de crescimento diferentes. É provável que materiais de ciclo mais curto, possam absorver mais ^{15}N do adubo no início do ciclo, enquanto materiais mais tardios teriam acesso a um ^{15}N com maior diluição, o que indicaria necessariamente menor FBN nos genótipos de ciclo curto. Estas deficiências metodológicas da técnica da diluição isotópica podem ter introduzido incertezas na avaliação do potencial de genótipos com diferentes ciclos. Como alternativa tem-se a opção de se utilizar a técnica da abundância natural de ^{15}N , que, por não exigir a aplicação de fertilizantes marcados com ^{15}N , está menos sujeita a erros advindos de variações temporais e espaciais na marcação isotópica do solo, além de evitar efeitos do fertilizante marcado no processo de FBN (UNKOVICH & PATE, 2000).

Alguns estudos utilizando a técnica da abundância natural de ^{15}N foram conduzidos com a cultura da soja (AMARGER et al., 1979; KOHL et al., 1980; HOUNGNANDAN et al., 2008), trevo subterrâneo (BOLGER et al., 1995), ervilha (HAUGGAARD-NIELSEN et al., 2010), feijão fava (KILIAN et al., 2001) e caupi (BELANE & DAKORA, 2010). Na cultura do feijoeiro, KIMURA et al. (2004), em experimentos de campo no Japão, utilizaram a abundância natural de ^{15}N para mensurar a FBN, porém estes autores utilizaram apenas uma cultivar de feijoeiro, com hábito de crescimento determinado, além de não terem feito a inoculação das sementes com alguma estirpe selecionada de rizóbio, deixando que a infecção ocorresse naturalmente através das estirpes nativas do solo da área.

Portanto os objetivos deste trabalho foram quantificar, através da técnica da abundância natural de ^{15}N , em condições de campo, a contribuição da FBN, em diferentes estádios de crescimento, de cultivares de feijoeiro inoculado com *Rhizobium*, além de avaliar o desempenho agrônômico dessas cultivares sob inoculação, em comparação à adubação nitrogenada.

4.4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos dois experimentos de campo, em área de Cerrado, dentro do campo experimental da Embrapa Arroz e Feijão (CNPAPF), em Santo Antônio de Goiás, GO, nos anos de 2011 e 2012, que serviram para quantificar, através da técnica da abundância natural de ^{15}N , a FBN em cultivares de feijoeiro, previamente inoculadas com estirpes de rizóbio. Em área contígua, as mesmas cultivares receberam adubação nitrogenada mineral, sem inoculação, com a finalidade de avaliar o desempenho agrônômico e seus potenciais produtivos, sem limitação de N.

O Município de Santo Antônio de Goiás, GO, está localizado na latitude de $16^{\circ}28'00''\text{S}$, longitude de $49^{\circ}17'00''\text{W}$ e altitude de 823 m. Segundo a classificação de Köppen, o município apresenta clima Aw, tropical de savana, megatérmico. Os dados meteorológicos referentes ao período de 1983 a 2008, obtidos junto à Estação Climatológica da Embrapa Arroz e Feijão, indicam que a região apresenta temperatura média anual do ar de 23°C , sendo que o mês de junho apresenta a menor média de temperatura mínima do ar ($14,2^{\circ}\text{C}$), enquanto o mês de setembro apresenta a maior média de temperatura máxima do ar ($31,7^{\circ}\text{C}$). O regime pluvial é bem definido, com período chuvoso de outubro a abril e período seco de maio a setembro. A precipitação pluvial média anual é de 1.485 mm e a umidade relativa do ar média anual é de 71%, com o mês de agosto apresentando o menor índice (48%). A perda de água por evaporação média anual, medida pelo tanque classe “A”, é da ordem de 1.935 mm (SILVA et al., 2010). Os dados meteorológicos referentes ao período de instalação e condução dos experimentos de campo, nos anos de 2011 e 2012, estão apresentados na Figura 2.

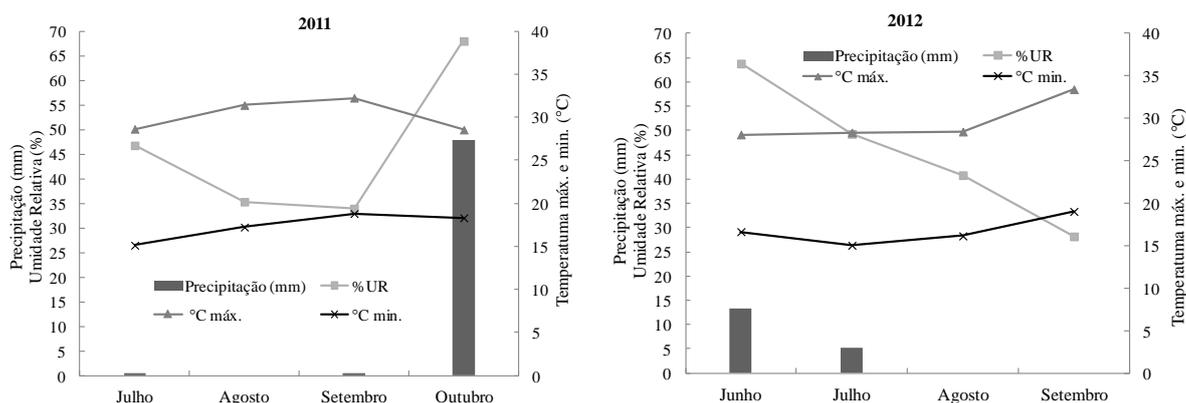


Figura 2. Precipitação pluviométrica, umidade relativa do ar média, temperatura máxima e temperatura mínima do ar, em Santo Antônio de Goiás, durante o período de duração dos experimentos de campo, nos anos de 2011 e 2012. Fonte: Estação meteorológica da Embrapa Arroz e Feijão.

O experimento no ano de 2011 foi instalado no dia 30 de junho, a emergência das plantas ocorreu sete dias após (07 de julho) e a colheita da última cultivar, Vereda, ocorreu no dia 05 de outubro, 97 dias após a instalação do experimento. As informações meteorológicas obtidas no período de duração do experimento (Figura 2) demonstram que durante o primeiro mês de experimento (julho), a precipitação acumulada foi de apenas 0,5 mm, com as médias da temperatura máxima de $28,6^{\circ}\text{C}$ e mínima de $15,1^{\circ}\text{C}$, e umidade relativa média de 46,8%. Em agosto, não ocorreram chuvas, as médias de temperatura se elevaram um pouco, com

máxima de 31,4°C e mínima de 17,2°C e a umidade relativa caiu para 35,3%. No mês de setembro voltou a chover 0,5 mm acumulados, a média da temperatura máxima foi de 32,3°C e a média da temperatura mínima foi de 18,8°C, com umidade relativa de 34%. No mês de outubro a avaliação foi somente até o dia 5, quando foram colhidos os grãos da cultivar mais tardia, Vereda, e neste curto período de 5 dias, choveu mais que todo o acumulado anterior: a precipitação acumulada foi de 47 mm, a média de temperatura máxima baixou para 28,6°C e a mínima para 18,3°C, e a umidade relativa aumentou para 68%. Durante todos os 97 dias de duração do experimento, da sementeira à colheita da última cultivar, a precipitação acumulada foi de 48,5 mm, a média de temperatura máxima foi de 30,2°C, a média da temperatura mínima de 17,4 °C, e a temperatura média foi de 23,1°C e a umidade relativa de 47,9% (Figura 2).

O experimento no ano de 2012 foi instalado no dia 31 de maio, a emergência das plantas ocorreu seis dias após e a colheita da última cultivar, Vereda, ocorreu no dia 13 de setembro, 105 dias após a instalação do experimento. As informações meteorológicas obtidas no período de duração do experimento (Figura 2) indicam que durante o primeiro mês (junho), a precipitação acumulada foi de 13,2 mm, com as médias da temperatura máxima de 28,1°C e mínima de 16,7°C, e umidade relativa média de 63,8%. Em julho, a precipitação acumulada foi de 5,2 mm, as médias de temperatura foram de 28,3°C a máxima e 15,1°C a mínima, e a umidade relativa caiu para 49,3%. No mês de agosto as chuvas cessaram e o acumulado foi de 0,0 mm, a média da temperatura máxima foi de 28,4°C e a média da temperatura mínima foi de 16,2°C, com umidade relativa de 40,8%. No mês de setembro a avaliação foi até o dia 13, dia da colheita da cultivar mais tardia, Vereda, e neste período não ocorreram chuvas e a precipitação acumulada foi de 0,0 mm, a média de temperatura máxima subiu para 33,4°C e a mínima para 19°C, e a UR% baixou para 28,2%. Durante todos os 105 dias de duração do experimento, da sementeira à colheita da última cultivar, a precipitação acumulada foi de 18,4 mm, a média de temperatura máxima foi de 29,6°C, a média da temperatura mínima foi de 16,7°C, e a temperatura média foi de 22,6°C, e a umidade relativa foi de 45,5% (Figura 2).

O solo predominante na região é o Latossolo Vermelho-distrófico, textura argilosa, fase cerradão subperenifólio, com relevo plano (SANTOS et al., 2010). O preparo do solo nos dois anos de experimento consistiu de uma aração e duas gradagens. Para as análises de solo, amostras de terra das áreas experimentais foram coletadas na profundidade de 0-20 cm, e analisadas no Laboratório de Química Agrícola da Embrapa Agrobiologia.

O histórico de plantio dos últimos três anos nas duas áreas experimentais é de uma rotação entre gramíneas, especialmente milho, arroz e pastagem. Especificamente no ano de 2011, a cultura antecessora à instalação do experimento foi o milho, cultivar (BRS 1010), no ano de 2012, o que antecedeu a instalação do experimento foi a cultura do arroz de sequeiro.

As cultivares utilizadas nos dois anos de experimentos foram escolhidas levando-se em conta características contrastantes quanto a arquitetura da planta, hábito de crescimento e a duração do ciclo (Tabela 1).

Nos tratamentos inoculados, utilizou-se inoculante comercial turfoso recomendado para a cultura do feijoeiro, composto pela combinação das estirpes BR 322 (CIAT 899 ou SEMIA 4077), BR520 (PRF 81 ou SEMIA 4080) e BR 534 (CPAC H12) de *Rhizobium tropici*, obtido junto à coleção de estirpes da Embrapa Agrobiologia. Os inoculantes foram preparados por meio da injeção de caldo de cultivo contendo as estirpes comerciais, em sacos plásticos previamente selados, com 50 g de turfa autoclavada.

4.4.1. Avaliação da população nativa de rizóbio no solo das áreas experimentais, contagem de rizóbios no inoculante e na superfície das sementes inoculadas

Anteriormente ao plantio de cada experimento de campo, foi retirada uma amostra de terra das áreas dos dois experimentos na profundidade de 0-10 cm, que foi utilizada para a quantificação da população nativa de rizóbio, através da técnica do Número Mais Provável (VINCENT, 1970), em casa-de-vegetação na Embrapa Agrobiologia. Foi utilizada como planta-isca, a cultivar Carioca crescida em vasos de Leonard contendo 500 cm³ de uma mistura 1:1 v:v de areia e vermiculita e supridos com solução nutritiva de Norris modificada, isenta de N. A solução nutritiva foi autoclavada, e após o preparo, os vasos foram autoclavados.

As sementes utilizadas foram desinfestadas superficialmente com etanol a 70 %, por 5 minutos, e hipoclorito de sódio a 1 % por 3 minutos e em seguida lavadas dez vezes com água destilada estéril. Foram semeadas quatro sementes por vaso e, posteriormente, foi feita a inoculação, colocando-se junto a cada semente 1 mL da suspensão proveniente das diluições seriadas do solo das áreas experimentais, que variaram de 10⁻¹ a 10⁻⁸. Foi colocada, sobre a superfície do vaso, uma fina camada de areia esterilizada, com a finalidade de evitar possíveis contaminações. Uma semana depois as plantas foram desbastadas, deixando-se duas plantas por vaso.

As plantas foram colhidas 30 dias após emergência, sendo obtido o sistema radicular e efetuada a avaliação da nodulação, para se proceder a determinação do Número Mais Provável de colônias formadoras de nódulos no solo, determinada através da tabela de Fisher & Yates (VINCENT, 1970).

A contagem de rizóbios nos inoculantes foi feita em uma amostra dos mesmos lotes utilizados nos respectivos experimentos, de 2011 e de 2012, 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). Usou-se 10 g de inoculante turfoso para a primeira série de diluição (90 mL de solução de sais do meio de cultura 79 Básico) e 1 mL dessa série em cada uma das demais séries de diluições. Foram plaqueadas alíquotas de 0,1 mL das diluições 10⁻³ a 10⁻⁸ em meio de cultura 79 Básico, com cinco repetições, sendo as placas incubadas a 28 °C. Posteriormente, fez-se a contagem do número de unidades formadoras de colônia por grama de inoculante.

Para a contagem de rizóbios na superfície das sementes, utilizou-se uma amostra de 50 sementes inoculadas que foram imersas em solução (90 mL de solução de sais do meio de cultura 79 Básico) para a primeira série de diluição e 1 mL dessa primeira série em cada uma das demais séries de diluições. Foram plaqueadas alíquotas de 0,1 mL das diluições 10⁻³ a 10⁻⁸ em meio de cultura 79 Básico, com cinco repetições, sendo as placas incubadas a 28 °C. Posteriormente, fez-se a contagem do número de unidades formadoras de colônia na superfície das sementes inoculadas.

4.4.2. Tratos culturais

Os tratos culturais foram os mesmos para os dois anos de experimentos. O controle fitossanitário de pragas e doenças foi feito com uma combinação de defensivos registrados para a cultura do feijoeiro, ao longo do ciclo de cultivo: em torno dos 10 dias após emergência (DAE) foi aplicado o inseticida Actara[®] 250 WG (ingrediente ativo Thiamethoxan), na dosagem de 200g ha⁻¹, para o controle da mosca branca (*Bemisia tabaci*) e vaquinha (*Diabrotica speciosa*); aproximadamente aos 25 DAE foram aplicados os inseticidas Actara[®] 250 WG, na dosagem de 100 g ha⁻¹ + Sevim[®] 480 SC (ingrediente ativo: Carbaryl) na dosagem de 1L ha⁻¹, para o controle da mosca branca, vaquinha e tripes (*Caliothrips phaseoli*);

aproximadamente aos 35 DAE foi reaplicado o inseticida Sevim[®] 480 SCna dosagem de 1L ha⁻¹ para controle de vaquinha e tripses; na fase de enchimento dos grãos foi aplicado o inseticida Lorsban[®] 480 BR (ingrediente ativo: Clorpirifós) na dosagem de 1L ha⁻¹ para o controle de brocas e insetos sugadores da vagem.

Para o controle de plantas invasoras: aos 10 DAE, foi aplicada a combinação de herbicidas: Flex[®] (ingrediente ativo: Fomesafen), na dosagem de 0,4 L ha⁻¹ + Fusilade[®] 250 EW (ingrediente ativo: Fluazifope-P-butílico), na dosagem de 0,5 L ha⁻¹ + Adesil[®], na dosagem de 0,8 L ha⁻¹; quando as plantas se encontravam na fase do terceiro trifólio, repetiu-se a aplicação dos herbicidas Flex[®] na dosagem de 1 Lha⁻¹ + Fusilade[®] 250 EWna dosagem de 0,75 L ha⁻¹. Os herbicidas foram aplicados em toda área experimental, exceto nas parcelas que continham as plantas testemunhas.

O sistema de irrigação utilizado, para os dois experimentos, foi por canhão hidráulico auto-propelido.

4.4.3. Experimento em 2011

O plantio do experimento ocorreu no dia 30/06/2011, a emergência das plantas no dia 07/07/2011, e a colheita dos grãos ocorreu em dias diferentes, à medida que cada cultivar ia atingindo a maturidade fisiológica.

Cada parcela experimental que foi inoculada possuía 8 linhas de 5 m de comprimento espaçadas em 0,45 m. Em área contígua, as mesmas oito cultivares foram crescidas sob adubação mineral, sem inoculação, em parcelas com 4 linhas de 5 m de comprimento e quatro repetições.O delineamento experimental em cada tratamento foi em blocos ao acaso, com quatro repetições para cada cultivar. Foram semeadas 12 sementes por metro linear, para uma população esperada de plantas de aproximadamente 265.000 plantas ha⁻¹.

O resultado da análise de solo da área experimental está apresentado na Tabela 9. Nas parcelas sob inoculação, por ocasião do plantio, foi feita uma adubação com 488 kg ha⁻¹ de uma formulação 0-20-20, equivalente a 95 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e K₂O. Nas parcelas sob adubação nitrogenada mineral, no plantio foram aplicados 488 kg ha⁻¹ de uma formulação 8-20-15, equivalente a 40 kg ha⁻¹ de N, 95 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 70 kg ha⁻¹ de K₂O. A adubação de cobertura foi com 50 kg ha⁻¹ de N na forma de sulfato de amônio, aos 18 DAE, nas cultivares de ciclo precoce e semi-precoce, e aos 26 DAE nas cultivares de ciclo normal e tardio.

Tabela 9. Resultado da análise de amostra de solo coletada na área do experimento em 2011.

Profund. (cm)	Ca	Mg	H+Al	Al	pH	N	C _{org}	P	K
	----- cmol _c dm ⁻³ -----					----- % -----		--- mg L ⁻¹ ---	
0 - 20	1,38	0,61	7,28	0,12	5,41	0,10	0,94	6,32	130

Nas parcelas sob inoculação, foram feitas quatro coletas em diferentes estádios de crescimento da cultura (Tabela 10): 1^a coleta, correspondente à floração plena de cada cultivar; 2^a coleta, duas semanas após a floração plena; 3^a coleta, três semanas após a floração plena; 4^a coleta, quatro semanas após a floração plena.Foram coletadas as plantas presentes em 0,5 m das linhas das parcelas destinadas às amostragens de biomassa. Em todas as quatro amostragens foram coletadas a parte aérea, o sistema radicular e os nódulos. A parte aérea, na 1^a coleta, foi dividida em caule e folhas, e na 2^a, 3^a e 4^a coletas, divida em caule, folhas e vagens. Em todas as coletas os nódulos foram destacados, secos e pesados e na primeira coleta os nódulos também foram contados. Em cada parcela sob inoculação, foi demarcada

com estacas, uma área de 1,0 m², de onde foram coletadas as folhas senescentes, uma vez por semana, a partir da 2^a coleta de biomassa.

Em cada bloco, foram inseridas também as parcelas com as testemunhas não fixadoras, correspondentes a uma variedade de feijão não-nodulante (NORH 54), uma cultivar de milho, *Zea mays* (BRS 1010) além de uma espécie de braquiária (*Brachiaria* spp.) que germinou espontaneamente na área. As plantas foram amostradas simultaneamente com as coletas de biomassa das cultivares de feijoeiro.

Nas parcelas sob adubação nitrogenada, em dois diferentes estádios de crescimento, na floração plena e duas semanas após a floração plena (correspondendo à 1^a e 2^a coletas de biomassa do tratamento inoculado), foram coletadas as plantas presentes em 0,5 m das linhas das parcelas destinadas às amostragens de biomassa, tal qual foi feito para os tratamentos inoculados.

Tabela 10. Número de dias após a emergência correspondente às coletas de biomassa e produção de grãos de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha⁻¹), em experimento de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.

Cultivar	Dias após a emergência (DAE)				
	1 ^a coleta*	2 ^a coleta*	3 ^a coleta	4 ^a coleta	Colheita de grãos
Radiante	34	48	53	63	71
Jalo Precoce	39	53	63	67	75
Estilo	48	64	70	78	84
Grafite	49	68	76	82	89
Marfim	43	54	63	69	81
Ouro Negro	46	63	69	76	83
Pontal	47	64	70	78	85
Vereda	50	68	76	82	91
Plantas controle	55	80	---	---	---

*Correspondente às coletas no tratamento inoculado e N mineral.

4.4.4. Experimento em 2012

O plantio do experimento ocorreu no dia 31/05/2012, a emergência das plantas no dia 06/06/2012, e a colheita dos grãos ocorreu em dias diferentes, à medida que cada cultivar atingia a maturidade fisiológica.

Cada parcela experimental que foi inoculada possuía 6 linhas de 5 m de comprimento espaçadas em 0,45 m. Em área contígua, as mesmas oito cultivares foram crescidas sob adubação mineral, sem inoculação, em parcelas com 4 linhas de 5 m de comprimento. O delineamento experimental em cada fonte de N avaliada foi em blocos ao acaso, com quatro repetições para cada cultivar. Foram semeadas 12 sementes por metro linear, para uma população esperada de plantas de aproximadamente 265.000 plantas ha⁻¹.

O resultado da análise de solo da área experimental é apresentado na Tabela 11. Para ambos os tratamentos (inoculação com rizóbio ou adubação com N mineral), na ocasião do plantio, foi realizada uma adubação com 488 kg ha⁻¹ de uma formulação 0-20-20, equivalente a 95 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e de K₂O. Nas parcelas do tratamento com adubação nitrogenada mineral, foram aplicados, na forma de ureia, 40 kg ha⁻¹ de N no plantio, e 50 kg ha⁻¹ de N em

cobertura, aos 19 DAE nas cultivares de ciclo precoce e semi-precoce, e aos 23 DAE nas cultivares de ciclo normal e tardio.

Tabela 11. Resultado da análise de amostra de solo coletada na área do experimento em 2012.

Profund. (cm)	Ca	Mg	H+Al	Al	pH	N	C _{org}	P	K
	----- cmol _c dm ⁻³ -----					----- % -----		--- mg L ⁻¹ ---	
0 - 20	1,34	0,64		0,11	4,63	0,14	0,87	3,45	120

Tanto nas parcelas sob inoculação, quanto nas parcelas sob adubação nitrogenada, foram coletadas as plantas presentes em 0,5 m das linhas das parcelas destinadas às amostragens de biomassa, em dois estádios de crescimento (Tabela 12), na floração plena (1ª coleta) e duas semanas após a floração plena (2ª coleta).

Tabela 12. Número de dias após a emergência correspondente às coletas de biomassa e produção de grãos de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha⁻¹), em experimento de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.

Cultivar	Dias após a emergência (DAE)		
	1ª coleta	2ª coleta	Colheita de grãos
Radiante	36	49	79
Jalo Precoce	40	54	83
Estilo	51	63	92
Grafite	55	71	97
Marfim	44	58	86
Ouro Negro	47	61	90
Pontal	49	62	91
Vereda	57	72	99
Plantas controle	51	72	---

Foram coletadas a parte aérea, o sistema radicular e os nódulos. A parte aérea foi dividida em folha e caule, na 1ª coleta, e os nódulos foram destacados das raízes, contados, secos e pesados. Na 2ª coleta a parte aérea foi dividida em folha, caule e vagem, e os nódulos foram destacados das raízes, secos e pesados.

Em cada bloco, foram inseridas as parcelas com as testemunhas não fixadoras, correspondentes a uma variedade de feijão não-nodulante (NORH 54), uma cultivar de arroz (*Oryza sativa*), além de plantas de trapoeraba (*Commelina* spp.) que germinaram espontaneamente na área. As plantas foram amostradas em duas oportunidades concomitantes às coletas de biomassa das cultivares de feijoeiro.

4.4.5. Determinações

Em ambos os experimentos, a colheita de grãos foi efetuada em uma área de 1,0 m² nas duas linhas centrais de cada parcela, a partir da qual foram determinados o número de

plantas e o número de vagens, que foram trilhadas manualmente. Os grãos de cada parcela foram pesados, e foi retirada uma amostra de 100 grãos que foi pesada, seca em estufa e pesada novamente, obtendo-se o teor de umidade dos grãos de cada parcela. O rendimento de grãos foi padronizado para 13% de teor de umidade. Com base na massa úmida da amostra de 100 grãos, e na massa total de grãos da parcela, foi estimado o número total de grãos. Os caules e vagens obtidos após trilhagem dos grãos foram secos em estufa e pesados. Com base nesses dados, foram estimados os componentes de produção: número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de 100 grãos e o índice de colheita (razão entre a massa seca dos grãos e a massa seca total de parte aérea). As plantas da área restante de 3,0 m² da área útil das duas linhas centrais de cada parcela também foram colhidas, trilhadas e secas para a estimativa da produção total de grãos. O acúmulo de N foi obtido pelo produto entre o teor de N de cada tecido vegetal e a sua respectiva massa seca. O índice de colheita de N foi obtido pela razão entre N-total dos grãos e o N-total completo de parte aérea.

No experimento em 2011, ocorreu um problema no sistema de irrigação, que fez com que um dos blocos do tratamento inoculado, que se encontrava mais distante do ramal de irrigação do canhão hidráulico auto-propelido, sofresse uma sub-irrigação. Esta falha foi detectada e solucionada, mas o rendimento destas parcelas foi reduzido, e optou-se por excluir este bloco, sendo utilizadas apenas três repetições para os dados de teor de N, abundância natural de ¹⁵N e produção de grãos.

A parte aérea do feijoeiro (folha, caule e vagem) e das plantas-controle, os grãos e a palhada do caule e da vagem coletada ao final dos experimentos, após serem secas em estufa e pesados, foram pré-moídos em moinho tipo Willey (peneiras de 2 mm) e posteriormente levadas para moinho de rolagem, por dois dias, até a pulverização (ARNOLD & SCHEPERS, 2004). Neste material, para todas as oito cultivares nas duas fontes de N, foram feitas as análises de teor de N-total, pelo método semi-micro Kjeldahl. As análises da abundância natural de ¹⁵N foram feitas apenas nas plantas no tratamento de inoculação com *Rhizobium*. Para as análises da abundância natural de ¹⁵N, no ano de 2011, foram avaliadas as contribuições da FBN no grão e na palhada do caule e da vagem das oito cultivares. Para as duas primeiras coletas de biomassa do ano de 2011 e para todas as coletas do ano de 2012, foram escolhidas três cultivares (Radiante, Grafite e Ouro Negro), por serem as mais representativas dos distintos grupos de cultivares avaliados, para terem os seus tecidos (folha, caule, vagem, grãos e a palhada do caule e da vagem) analisados para delta ¹⁵N. Foram também analisadas a parte aérea das plantas controle de ambos os experimentos.

As análises da abundância natural de ¹⁵N foram feitas em um espectrômetro de massas Finnigan modelo DeltaPlus acoplado a um autoanalisador de CN COSTECH para análises de razões isotópicas, no laboratório “John M. Day” de Isótopos Estáveis na Embrapa Agrobiologia.

A composição isotópica das amostras foi estimada de acordo com a fórmula (MARIOTTI, 1983):

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

A contribuição da FBN foi estimada empregando-se a fórmula (SHEARER & KOHL, 1986):

$$\% N_{dfa} = \frac{\delta^{15}N_{ref} - \delta^{15}N_{fix}}{\delta^{15}N_{ref} - B} \times 100$$

Onde $\delta^{15}N_{ref}$ é a abundância natural de ^{15}N das espécies controle não fixadoras, $\delta^{15}N_{fix}$ a abundância natural de ^{15}N do feijoeiro, e B o valor da discriminação isotópica de ^{15}N do feijoeiro durante o processo de FBN.

4.4.6. Análise estatística

Nos dois anos de experimentação, os tratamentos com N mineral ficaram localizados em uma área contígua aos tratamentos inoculados, e desta forma não fica caracterizado um esquema fatorial entre fontes de N e cultivar. Na análise de variância, uma alternativa mais usual seria considerar um esquema fatorial em parcelas subdivididas, no qual as fontes de N correspondem às parcelas e as cultivares às subparcelas, mas que não corresponde estritamente ao delineamento experimental. Outra abordagem seria considerar dois experimentos distintos, um inoculado e outro com N mineral, e efetuar uma análise conjunta dos dois experimentos. Estas duas abordagens são bastantes similares, como pode ser verificado na Tabela 13.

Na análise conjunta de dois experimentos, a soma dos quadrados do Erro A corresponde ao somatório da soma dos quadrados de repetição e do Erro A da análise no esquema fatorial. Na análise conjunta, não são avaliados os efeitos de repetição, pois os blocos dos dois experimentos não estão intrinsecamente associados, e ficam assim confundidos com o Erro A. A principal diferença das duas abordagens é na avaliação do efeito do N, pois os efeitos de cultivar e da interação entre N e cultivar são iguais.

Adotou-se então a análise de variância como uma análise conjunta de dois experimentos, um inoculado e outro com N mineral, isoladamente para cada ano de experimentação (2011 e 2012), e para cada época de avaliação. Para alguns caracteres avaliados apenas nos tratamentos inoculados, foi efetuada uma análise de variância considerando apenas o fator cultivar. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5%. As análises foram conduzidas com o software MSTAT-C (1991).

Tabela 13. Comparação da análise de variância dos dados de massa seca de parte aérea na floração em 2012, considerando duas abordagens: cada fonte de N como um experimento com análise conjunta de dois experimentos, ou um esquema fatorial em parcelas subdivididas, com as fontes de N como parcelas e as cultivares como subparcelas.

Análise conjunta de dois experimentos			Esquema fatorial com parcelas subdivididas		
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados
			Repetição	3	2018086
N	1	5844306	N	1	5844306
Erro A	6	2669619	Erro A	3	651533
Cultivar	7	24727262	Cultivar	7	24727262
N x cul	7	3256110	N x cul	7	3256110
Erro B	42	10602236	Erro B	42	10602236
Total	63	47099533	Total	63	47099533

4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias totais de temperatura máxima, temperatura mínima e umidade relativa do ar, diferiram pouco entre os dois anos de experimentação, com as médias de máximas e mínimas mais elevadas no ano de 2011 do que em 2012. De acordo com VIEIRA (1967), a faixa de temperatura considerada ótima para o feijoeiro seria de 18 a 24°C. No presente estudo, a temperatura média ficou dentro desta faixa, temperaturasmédias de 23,1 °C em 2011 e 22,6 °C, em 2012, portanto dentro da faixa ideal sugerida por VIEIRA (1967). No entanto, no ano de 2011, as temperaturas acima dos 30 °C foram mais constantes, e, justamente nos meses em que a cultura se encontrava no início do período reprodutivo (agosto, com média máxima de 31,4 °C e setembro, com média máxima de 32,3 °C), enquanto que em 2012, nos meses em que a cultura se encontrava no início da fase reprodutiva, julho e agosto, as médias máximas foram de 28,3 °C e 28,4 °C, respectivamente. A ocorrência de temperaturas superiores a 30°C durante o transcorrer do dia resulta em prejuízos ao feijoeiro (PORTES, 1996), especialmente no período reprodutivo. Temperaturas superiores a 30°C, no período de formação dagema floral e início do enchimento da vagem em feijoeiro, interferem no metabolismo da reprodução, aumentando abscisão de flores e de vagens, diminuindo o vingamento e a retenção final de vagens e o número de sementes por vagem (GROSS & KIGEL, 1994; SHONNARD & GEPTS 1994). A maior variação ocorrida entre os dois experimentos foi quanto à precipitação acumulada, visto que em 2011 a precipitação foi 30 mm maior do que em 2012, porém as chuvas, no experimento em 2011 ficaram totalmente concentradas em um curtíssimo período de cinco dias no final da colheita de grãos das duas últimas cultivares, Grafite e Vereda, ambas cultivares de ciclo longo, ao passo que em 2012, as chuvas, embora menores, concentraram-se no início do crescimento da cultura. No entanto, cabe ressaltar que os experimentos foram irrigados periodicamente, por sistema de canhão hidráulico auto-propelido, eliminando assim os prejuízos que poderiam ser causados pela escassez de chuvas.

4.5.1. Avaliação da população nativa de rizóbio nos solos das áreas experimentais, contagem de rizóbio nos inoculantes e na superfície das sementes inoculadas

A população de rizóbio no solo, na área do experimento de campo em 2011, na ocasião do plantio, era da ordem de $1,2 \times 10^2$ unidades formadoras de colônia (UFC) de rizóbios por grama de solo, estimada pela técnica do número mais provável (VINCENT, 1970). Cada grama do inoculante utilizado no experimento, em 2011, continha $5,1 \times 10^9$ UFC de rizóbios, resultado que se enquadra dentro do preconizado pela RELARE (2004). As sementes, após inoculadas, apresentaram uma população de rizóbios da ordem de 6×10^5 UFC.

Na área do experimento de campo em 2012, a população de rizóbio no solo, na ocasião do plantio, era da ordem de $2,0 \times 10^2$ UFC de rizóbios por grama de solo. Cada grama do inoculante utilizado no experimento, em 2012, continha $5,4 \times 10^9$ UFC de rizóbios, resultado que se enquadra dentro do preconizado pela RELARE (2004). As sementes, depois de inoculadas, apresentaram uma população de rizóbios da ordem de $6,5 \times 10^5$ UFC.

A presença em solos brasileiros, de população nativa de rizóbio bem estabelecida e com elevada diversidade, a baixa ocupação nodular do feijoeiro pelas estirpes inoculadas (VARGAS et al., 2000), além da capacidade da planta em nodular com grande diversidade de espécies de rizóbio (MICHIELS et al., 1998) são algumas das principais limitações para o sucesso da inoculação no feijoeiro comum (HUNGRIA et al., 2000; GRANGE & HUNGRIA,

2004; KASCHUK et al., 2006), trazendo reflexos diretos sobre os parâmetros de nodulação (Tabela 14, Tabelas 15 e 16).

Em áreas sem cultivo prévio de feijoeiro, em Planaltina - DF, as populações indígenas de rizóbios eram baixas (<10 UFC g^{-1}) e altos rendimentos puderam ser alcançados apenas com a inoculação das sementes, mas, em solo anteriormente cultivado com feijão, com população de rizóbios nativos de 7×10^2 UFC g^{-1} , a formação de nódulos pelas estirpes inoculadas foi limitada, demandando a complementação com fertilizante nitrogenado para obter maiores rendimentos (VARGAS et al., 2000).

VLISSAK et al. (1996), em uma área sem histórico de plantio de feijão, verificaram que a inoculação com rizóbio resultou em aumentos na nodulação e na atividade da nitrogenase, no sistema radicular, no primeiro ano de cultivo, mas a reintrodução do inoculante no terceiro ano de plantio não teve qualquer efeito, já que a população de rizóbios da área saltou de 30 células g^{-1} de solo, no primeiro ano, para 10^4 células g^{-1} de solo no terceiro ano de cultivo. Por outro lado, MOSTASSO et al. (2002), em solos do Cerrado, sem cultivo de feijão por 3 anos, mas com população nativa de rizóbio de 10^4 UFC g^{-1} , obtiveram respostas à inoculação, que foram ainda maiores após a re-inoculação das bactérias no ano seguinte, e HUNGRIA et al. (2003) verificaram que a inoculação de estirpes selecionadas aumentou a ocupação dos nódulos de feijoeiro com estas estirpes, mesmo em solos com elevada população autóctone de rizóbios, com um aumento da ocupação obtido com a re-inoculação em cultivo posterior, evidências que indicam a adequação da inoculação das sementes em todos os anos de cultivo do feijoeiro.

THIES et al. (1991) observaram que em geral, o número e a massa nodular nos tratamentos com e sem inoculação não foram significativamente diferentes quando o número de rizóbios do solo foi maior que 10^2 rizóbios g^{-1} de solo. Porém, houve exceções entre as espécies estudadas, uma delas o *Phaseolus vulgaris*, que apresentou resposta à inoculação mesmo quando a população de rizóbio na área era de 437 UFC g^{-1} de solo (THIES et al., 1991).

De acordo com WEAVER & FREDERICK (1974), a estirpe carregada no inoculante de soja, para se estabelecer no solo, deve apresentar uma superioridade numérica de, pelo menos, mil vezes em relação à população nativa do solo. Conseqüentemente, inoculantes com baixas concentrações de células são impraticáveis, sendo desejável, até, uma concentração de 10^9 células g^{-1} de inoculante. Este mesmo pressuposto pode ser estendido para o inoculante de feijão, visto a elevada população de rizóbio que naturalmente ocorre nos solos tropicais, capazes de nodular em feijoeiro, associado à promiscuidade dessas plantas. Os dados obtidos por BRANDÃO JUNIOR & HUNGRIA (2000) em soja, indicam que o uso de inoculante turfoso, com concentração de 10^8 células g^{-1} de inoculante, aplicado na dose de 500 g de inoculante/50 kg de semente, com solução açucarada como adesivo, aumenta a FBN e o rendimento da cultura, mesmo em solos já inoculados anteriormente e com população autóctone elevada.

Um inoculante com concentração de $8,3 \times 10^{10}$ UFC g^{-1} , correspondeu à concentração de $6,6 \times 10^7$ células de *Bradyrhizobium* por semente de feijão-caupi. Esta taxa de inóculo promoveu aumento da massa seca da parte aérea, forneceu maior quantidade de N para as plantas, e correspondeu ao aumento de 75 % no número de nódulos em relação à menor taxa de inóculo aplicada, que foi de $6,6 \times 10^3$ células de *Bradyrhizobium* por semente, obtida de um inoculante com concentração de $8,3 \times 10^6$ células g^{-1} de inoculante (SILVA et al., 2012). À medida que se elevou a taxa de inóculo na semente, aumentaram a nodulação e a contribuição da FBN em plantas de feijão-caupi (SILVA et al., 2012).

4.5.2. Nodulação

A análise de variância dos dados de massa seca de nódulos indicou interação significativa entre as fontes de N avaliadas e as cultivares.

A contagem do número de nódulos foi feita somente na ocasião da 1ª coleta de biomassa, realizada à medida que cada cultivar atingia a floração plena. No ano de 2011, o maior número de nódulos foi observado na cultivar Ouro Negro, atingindo 51 nódulos por planta, ao passo que as cultivares Radiante, Jalo Precoce e Marfim, todas de ciclo precoce ou semi-precoce, não conseguiram superar 20 nódulos por planta (Tabela 14).

No ano de 2012, a baixa produção de nódulos das cultivares precoces (Radiante e Jalo Precoce) se repetiu, com menos que 25 nódulos por planta (Tabela 14). As cultivares Estilo, Grafite e Vereda, demonstraram excelente nodulação, com mais de 100 nódulos por planta (Tabela 14). Em média, o número de nódulos, no experimento em 2012, foi três vezes maior do que no experimento de 2011 (Tabela 14).

Não é comum encontrar uma produção de nódulos por planta tão grande, em condições de campo, quanto às encontradas no segundo experimento. VARGAS et al. (1991), avaliando mais de 70 linhagens de feijão inoculadas com *Rhizobium* em cinco experimentos de campo, não encontraram em nenhuma das linhagens, mais de 43 nódulos por planta, enquanto PERES et al. (1994), avaliando sete cultivares de feijão em três experimentos de campo, encontraram um máximo de 74 nódulos por planta, e BARROS et al. (2013) encontraram 29 nódulos por planta na cultivar Ouro Negro em experimento na época da seca e 38 nódulos por planta na época das águas. Porém, mesmo não atingindo nodulação tão expressiva quanto a encontrada no experimento em 2012, todos estes trabalhos mostram a enorme variabilidade da capacidade de nodulação existente entre genótipos de feijoeiro, corroborando os resultados do presente trabalho. Como exemplo, temos no experimento em 2012, uma nodulação que variou de 8 a 190 nódulos por planta, nas cultivares Radiante e Vereda respectivamente (Tabela 14).

Tabela 14. Número de nódulos por planta de cultivares de feijoeiro inoculado com *Rhizobium*, na época da floração plena (1ª coleta), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, nos anos de 2011 e 2012.

Cultivar	Número de nódulos por planta	
	2011	2012
Radiante	1	8
Jalo Precoce	3	25
Estilo	38	146
Grafite	40	117
Marfim	20	66
Ouro Negro	51	63
Pontal	31	45
Vereda	28	190
Média	27	82

Quando a questão é a eficiência de nodulação das estirpes de rizóbio, a variabilidade também se confirma, embora aparentemente menor. MENDES et al. (1994), avaliando 17 estirpes de rizóbio, em duas cultivares de feijoeiro, encontraram produção entre 4 e 64 nódulos por planta, na cultivar Capixaba Precoce e entre 10 e 69 nódulos, na cultivar CNPAF-

178, dependendo da estirpe que era inoculada. Os resultados de MENDES et al. (1994) mostram que além da variação da capacidade de nodulação entre estirpes, há também variabilidade na interação entre macro emicrossimbionte, já que estirpes que nodularam muito bem em uma cultivar, não repetiram o desempenho na outra cultivar, como no caso da estirpe CIAT 899, que produziu 57 nódulos na cultivar Capixaba Precoce e 109 nódulos na cultivar CNPAF-178.

Avaliando as quatro coletas no tratamento inoculado com *Rhizobium*, no experimento em 2011, observa-se que a cultivar Ouro Negro, com hábito de crescimento tipo III e ciclo normal, foi a que mais se destacou no parâmetro massa seca de nódulos (Tabela 15). Embora na 1ª coleta, a maior massa de nódulos tenha sido encontrada na cultivar Vereda (Tabela 15), que possui hábito de crescimento tipo III e ciclo tardio, nas quatro coletas seguintes, a cultivar Ouro Negro foi a que produziu a maior massa de nódulos, apresentando aumento constante na nodulação até a 3ª coleta (terceira semana após floração plena), quando então começou a declinar (Tabela 15). Esta grande produção de massa nodular, até períodos mais tardios do desenvolvimento da planta, foi observada unicamente na cultivar Ouro Negro.

Tabela 15. Massa seca de nódulos de cultivares de feijoeiro inoculado com *Rhizobium*, em experimento de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.

Cultivar	Massa de nódulos por planta (mg)				
	Semanas após floração				
	0	2	3	4	Média
Radiante	3	5	12	0	5
Jalo Precoce	5	6	11	0	4
Estilo	31	26	7	23	26
Grafite	46	32	16	2	21
Marfim	13	18	7	1	10
Ouro Negro	53	133	169	48	95
Pontal	30	7	1	9	10
Vereda	93	28	9	6	32
Média	34	32	29	11	
CV (%)	84,59	107,21	71,29	174,43	

Na média de todas as cinco coletas, as cultivares de ciclo precoce, Radiante e Jalo Precoce, produziram apenas 5 mg de nódulos por planta, ao passo que Ouro Negro produziu 95 mg de nódulos por planta.

No experimento em 2012, na ocasião da 1ª coleta, quando da floração plena, a maior massa seca de nódulos foi encontrada na cultivar Vereda (Tabela 16). As cultivares Estilo e Grafite também apresentaram expressiva nodulação e não diferiram estatisticamente de Vereda (Tabela 16). A cultivar Radiante apresentou a menor massa seca de nódulos (Tabela 16), porém não diferiu estatisticamente da nodulação das cultivares Jalo Precoce e Pontal (Tabela 16). Na 2ª coleta, a cultivar Estilo foi a que apresentou a maior nodulação, enquanto que a cultivar Radiante continuou apresentando a menor massa de nódulos (Tabela 16).

Geralmente espera-se que o maior número de nódulos se reflita em maior matéria seca de nódulos, como foi observado no experimento em 2012, onde a maior massa seca de nódulos na 1ª coleta foi encontrada na cultivar Vereda (Tabela 16), que também apresentou número de nódulos muito superior às demais cultivares (Tabela 14). No entanto, isto não foi

observado no experimento em 2011, onde a cultivar Ouro Negro produziu quase o dobro do número de nódulos da cultivar Vereda (Tabela 14), porém, 40 mg de massa seca de nódulos a menos (Tabela 15). MENDES et al. (1994) encontraram resultado semelhante com a cultivar CNPAF-178, onde a estirpe de rizóbio CIAT 899 produziu o dobro de nódulos produzidos pela estirpe UMR 1020, porém, ambas estirpes produziram a mesma massa nodular (50 mgplanta⁻¹). A importância deste dado reside no fato de que o N₂ fixado pela simbiose *Rhizobium*-leguminosa, na maioria dos casos, está na dependência do tecido nodular formado, e não tanto da unidade nodular por planta (DÖBEREINER et al., 1966).

Tabela 16. Massa seca de nódulos de cultivares de feijoeiro inoculado com *Rhizobium*, em experimento de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.

Cultivar	Massa de nódulos por planta (mg)	
	Floração plena	Dois semanas após floração plena
Radiante	5 e	16 c
Jalo Precoce	34 de	83 bc
Estilo	166 ab	238 a
Grafite	180 ab	125 b
Marfim	101 bcd	117 b
Ouro Negro	132 bc	128 b
Pontal	76 cde	102 b
Vereda	246 a	140 b
CV (%)	84,99	81,76

Letras minúsculas comparam colunas pelo teste Duncan a 5%.

Embora o feijoeiro possa apresentar aumentos na nodulação e atividade nodular até os 70 dias após o plantio (GRAHAM & ROSAS, 1977; FERNÁNDEZ-LUQUEÑO et al., 2008), é comum uma redução na nodulação, a partir dos 40 dias (SAITO, 1982). Entretanto, em 2011, a cultivar Ouro Negro apresentou elevada massa nodular até a terceira semana após a floração plena, 67 DAE, alcançando 169 mg de nódulos por planta (Tabela 15). FERNÁNDEZ-LUQUEÑO et al. (2008), em experimento em casa-de-vegetação, observaram que a maior massa fresca de nódulos de feijoeiro foi atingida entre 9 e 10 semanas após a emergência, período que coincidiu com a máxima taxa de redução de acetileno.

Por isso, um dos objetivos do melhoramento de leguminosas visando eficiência da FBN, especialmente na cultura do feijoeiro, que tem como um dos fatores limitantes o ciclo curto da cultura, é obter plantas com características de nodulação precoce e senescência tardia dos nódulos (BARRADAS et al., 1989). Entretanto, a nodulação tardia apresentada pela cultivar Ouro Negro, não significa necessariamente que esta cultivar tenha fixado mais N do que as outras com nodulação menos duradoura. PEÑA-CABRIALES et al. (1993) observaram, no campo, que mesmo mantendo nodulação expressiva até os 97 dias após o plantio, a cultivar Bayocel teve menor translocação desse N fixado para as vagens, do que a cultivar Flor de Mayo, que no mesmo período já apresentava nódulos senescentes.

4.5.3. Produção de biomassa

A análise estatística indicou que a maioria das interações entre as fontes de N (inoculação com rizóbio ou adubação com N mineral) e os genótipos estudados, não foram significativas para os caracteres massa seca de raiz, massa seca de parte aérea e massa seca de vagem, nos dois anos de experimento (Tabelas 37, 38, 48 e 49). Desta forma, a maioria das comparações entre médias foi efetuada apenas para as médias das fontes de N e das cultivares.

A produção de massa seca de raiz, no ano de 2011, não diferiu entre plantas inoculadas e adubadas com N mineral, nas avaliações realizadas nos períodos da floração plena e duas semanas após a floração plena (Tabela 17).

Tabela 17. Massa seca de raiz de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha).

Cultivar	Massa seca de raiz (g m ⁻²)					
	Floração plena			Duas semanas após floração plena		
	Inoculado	N mineral	Média	Inoculado	N mineral	Média
	2011					
Radiante	10,1	11,7	10,9 d	12,3	15,2	13,7 d
Jalo Precoce	17,4	15,1	16,2 bc	15,0	17,5	16,3 bcd
Estilo	25,5	22,7	24,1 a	20,2	21,5	20,9 ab
Grafite	21,4	26,5	24,0 a	26,7	23,4	25,0 a
Marfim	15,2	18,4	16,8 bc	18,0	18,1	18,0 bcd
Ouro Negro	13,6	13,8	13,7 cd	15,4	13,4	14,4 d
Pontal	14,8	18,0	16,4 bc	16,0	14,7	15,4 cd
Vereda	17,0	19,9	18,5 b	20,9	19,8	20,3 abc
Média	16,9 A	18,2 A		18,0 A	17,9 A	
CV (%)		21,5			24,0	
2012						
Radiante	7,6	8,8	8,2 e	9,1	12,0	10,6 e
Jalo Precoce	8,2	11,5	9,8 de	14,2	14,7	14,5 cde
Estilo	22,9	32,5	27,7 a	28,6	27,6	28,1 a
Grafite	19,9	23,1	21,5 b	25,1	23,3	24,2 a
Marfim	11,4	15,5	13,5 c	17,2	20,8	19,0 b
Ouro Negro	12,4	16,3	14,3 c	12,2	15,8	14,0 de
Pontal	11,6	13,6	12,6 cd	17,1	19,9	18,5 bc
Vereda	18,6	19,0	18,8 b	19,3	16,1	17,7 bcd
Média	14,6 B	17,5 A		17,8 A	18,8 A	
CV (%)		21,9			22,3	

No ano de 2012, na 1ª coleta, a adubação com N mineral proporcionou maior matéria seca de raiz, enquanto na avaliação da 2ª coleta, esta diferença não foi mais detectada (Tabela 17). Este resultado pode estar ligado ao menor desenvolvimento das raízes nas plantas

adubadas com N mineral nos estádios mais tardios do ciclo, ao contrário das plantas inoculadas, que tiveram maior desenvolvimento radicular neste período. Em ervilha, a biomassa das raízes noduladas aumentou quase linearmente com o tempo até o período da floração, porém com taxa de crescimento das raízes do tratamento sem N mineral mais baixa do que com N mineral (VOISIN et al., 2002). Então, a partir da floração, a biomassa radicular dos tratamentos com N mineral diminuiu fortemente, mas a biomassa de raiz do tratamento sem N mineral manteve-se estável até o início do enchimento de grãos (VOISIN et al., 2002).

É muito variável a resposta do crescimento radicular à aplicação de N mineral, tanto no campo quanto em condições controladas. MÜLLER & PEREIRA (1995) observaram, em casa-de-vegetação, que a utilização de sulfato de amônio em plantas de feijoeiro inoculadas com rizóbio, aumentou a massa seca das raízes, porém em apenas uma das duas cultivares avaliadas, enquanto BARROS et al. (2013) não observaram efeito entre aplicação de N no plantio ou inoculação com rizóbio, em duas épocas de cultivo do feijoeiro no campo. ARAÚJO & TEIXEIRA (2008) afirmaram que o estabelecimento de um profuso sistema radicular durante a emissão de vagens, associado com a contínua aquisição de N e P durante o início de enchimento de vagens, pode assumir relevância para obtenção de maiores rendimentos de grãos na cultura do feijão.

Além da importância na aquisição de água e nutrientes, como o N e P, a maior produção de raiz também está ligada a maior área disponível para sítios de infecção radicular pelo rizóbio (BAUER, 1981). Quando se compara a massa seca de raiz das cultivares, observa-se de maneira geral, nos dois anos de experimento, que a cultivar Radiante, que tem a menor massa de nódulos por planta entre todas as cultivares, também teve menor massa seca de raiz, enquanto que a maior massa de raiz foi encontrada nas cultivares Estilo e Grafite (Tabela 17), que chegaram a apresentar mais de cem nódulos por planta no ano de 2012.

A aplicação de N mineral proporcionou maior massa seca de parte aérea do que a inoculação com *Rhizobium*, em todas as cultivares, nas duas épocas de amostragem (floração plena e duas semanas após a floração plena), nos dois anos de experimento, com exceção das cultivares Grafite e Vereda, no ano de 2012, na 2ª coleta (Tabela 18). Contrariando estes dados, diversos resultados da literatura mostram que, em experimentos de campo com feijoeiro, a inoculação com rizóbio pode proporcionar produção de parte aérea similar à aplicação de N mineral (FERREIRA et al., 2009; PELEGRIN et al., 2009; MULAS et al., 2011; BARROS et al., 2013), ocorrendo resposta diferenciada entre estirpes (RAPOSEIRAS et al., 2006; SOARES et al., 2006) e entre genótipos (RUSCHEL et al., 1982).

A cultivar Radiante foi a que apresentou a menor matéria seca de parte aérea, nos dois períodos de avaliação, nos dois anos de experimento (Tabela 18). A menor produção de biomassa, tanto de parte aérea quanto de raiz, observada na cultivar Radiante, pode ser explicada pelo fato desta cultivar ser a única, entre as cultivares avaliadas, a apresentar hábito de crescimento determinado, do tipo I, com porte ereto e menor número de ramificações, o que faz com que estas plantas naturalmente apresentem menor porte. KAPPES et al. (2008), ao avaliar as características morfo-agronômicas de onze cultivares de feijoeiro comum de diversos grupos comerciais, entre elas Radiante e Grafite, observaram que a menor altura de inserção da primeira vagem foi encontrada justamente na cultivar Radiante (9,6 cm), enquanto que a maior altura foi observada na cultivar Grafite (18,6 cm), que no presente trabalho apresenta uma das maiores biomassas entre todas as cultivares estudadas.

Tabela 18. Massa seca de parte aérea de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha)

Cultivar	Massa seca de parte aérea (g m ⁻²)					
	Floração plena			Duas semanas após floração plena		
	Inoculado	N mineral	Média	Inoculado	N mineral	Média
2011						
Radiante	66,4	101,5	84,0 c	129,7	248,3	189,0 d
Jalo Precoce	136,7	183,6	160,1 ab	187,7	262,7	225,2 cd
Estilo	168,0	194,5	181,2 ab	200,2	416,6	308,4 abc
Grafite	156,3	232,3	194,3 a	314,3	508,9	411,6 a
Marfim	120,2	203,7	161,9 ab	209,9	281,8	245,8 bcd
Ouro Negro	159,1	189,9	174,5 ab	322,6	378,0	350,3 ab
Pontal	113,6	181,2	147,4 b	201,0	309,8	254,9 bcd
Vereda	135,8	177,7	156,7 ab	207,5	368,4	288,0 bcd
Média	132,0 B	183,1 A		221,6 B	346,7 A	
CV (%)		25,6			31,5	
2012						
Radiante	70,6	85,9	78,2 d	177,1	247,6	212,3 d
Jalo Precoce	99,8	125,3	112,5 cd	240,1	264,9	252,5 cd
Estilo	182,9	338,5	260,7 a	303,1	392,1	347,6 b
Grafite	208,5	295,2	251,8 a	442,3	417,2	429,7 a
Marfim	125,7	192,2	158,9 bc	298,4	437,1	367,8 ab
Ouro Negro	166,1	251,5	208,8 ab	255,5	327,5	291,5 bcd
Pontal	144,2	169,1	156,6 bc	290,2	342,8	316,5 bc
Vereda	218,7	242,3	230,5 a	451,1	429,8	440,4 a
Média	152,0 B	212,5 A		307,2 B	357,4 A	
CV (%)		27,5			23,5	

A avaliação da massa seca de vagens foi realizada duas semanas após a floração plena. A adubação com N mineral proporcionou maior massa seca de vagens, nos dois anos de experimento, superando a inoculação (Tabela 19), seguindo a mesma tendência da produção de massa seca de parte aérea. Provavelmente, houve translocação de parte desta matéria seca da parte aérea para as vagens e, em consequência, maiores produções de massa seca de vagens nas plantas adubadas com N mineral.

A maior massa seca de vagens, no ano de 2011, foi encontrada nas cultivares Grafite e Ouro Negro, sendo que a cultivar Estilo não diferiu estatisticamente dessas duas (Tabela 19). No ano de 2012, a maior massa de vagens foi obtida novamente na cultivar Grafite e também nas cultivares Marfim e Vereda (Tabela 19).

A maior biomassa tanto de raiz quanto de parte aérea cultivar Grafite pode ter contribuído para seu melhor desempenho quanto à produção de massa de vagens, provavelmente devido à realocação de fotoassimilados destes tecidos para as vagens em formação. No ano de 2012, as únicas cultivares sob inoculação que conseguiram superar a massa seca de parte aérea das plantas com N mineral foram Grafite e Vereda, e este resultado

se repetiu na produção de massa seca de vagens. GOMES et al. (2000), avaliando o efeito do estresse hídrico sob cultivares de feijoeiro, observaram que as plantas sob este tipo de estresse tiveram redução na massa das vagens, provavelmente em resposta à menor produção de fotoassimilados. GOMES et al. (2000) relataram também que nas cultivares de ciclos mais curtos, houve aumento contínuo na produção de massa seca de vagens; já nas de ciclos mais longos observou-se redução após 77 DAS, indicando abscisão de vagens. Este resultado pode explicar o fato de mesmo tendo as menores produções de biomassa entre todas as cultivares, a cultivar Radiante obteve massa seca de vagens similar a outras cultivares bem mais produtivas em termos de biomassa de raiz e parte aérea.

Tabela 19. Massa seca de vagens de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha)

Cultivar	Massa seca de vagem (g m ⁻²)					
	2011			2012		
	Inoculado	N mineral	Média	Inoculado	N mineral	Média
Radiante	48,8	101,4	75,1 b	67,4	84,4	75,9 b
Jalo Precoce	97,5	126,5	112,0 b	82,8	88,0	85,2 b
Estilo	56,4	208,5	132,4 ab	49,6	65,7	57,7 b
Grafite	104,9	265,6	185,3 a	165,4	132,2	148,8 a
Marfim	45,2	96,2	70,7 b	108,6	143,0	125,8 a
Ouro Negro	161,0	203,9	182,4 a	81,4	80,9	81,2 b
Pontal	47,7	131,5	89,6 b	53,1	63,3	58,2 b
Vereda	41,2	130,6	85,9 b	163,5	145,2	154,4 a
Média	75,3 B	158,0 A		96,4 B	100,3 A	
CV (%)		42,5			38,0	

4.5.4. Produção de grãos e componentes de produção

A análise estatística dos dados de produção de grãos e componentes de produção indicou que a maioria das interações entre as fontes de N (inoculação com rizóbio ou adubação com N mineral) e os genótipos estudados, não foram significativas nos dois anos (Tabelas 45 e 57). Desta forma, a maioria das comparações entre médias foi efetuada apenas para as médias gerais das fontes de N e das cultivares.

O rendimento médio de grãos das oito cultivares, em 2011, foi de 1614 kg ha⁻¹ e de 2942 kg ha⁻¹, respectivamente sob inoculação ou aplicação de N mineral. Nenhuma das cultivares sob inoculação conseguiu alcançar a produtividade proporcionada pela aplicação de 90 kg ha⁻¹ de N mineral (Tabela 20). O maior rendimento de grãos sob inoculação foi registrado na cultivar Ouro Negro, que atingiu uma produtividade de 2200 kg ha⁻¹ (Tabela 20), sendo, dentre todas as cultivares inoculadas, a que conseguiu produtividade mais próxima das respectivas plantas adubadas com N mineral, com 73% do rendimento obtido, enquanto as outras cultivares inoculadas alcançaram, no máximo, 60% do rendimento das respectivas plantas adubadas com N mineral. Ao avaliar a média de produtividade de 14 cultivares de feijão inoculadas com rizóbio frente às suas produtividades proporcionada pela aplicação de 50 kg ha⁻¹ de sulfato de amônio, VARGAS et al. (1991) verificaram que a fertilização com N mineral + enxofre aumentou o rendimento de grãos, porém não diferiu do tratamento em que se utilizou apenas a inoculação com rizóbio como fonte de N.

O rendimento médio de grãos, no ano de 2012, das oito cultivares estudadas, foi de 3284 kg ha⁻¹ para as plantas inoculadas e 3919 kg ha⁻¹ para as plantas adubadas com N mineral. Nenhuma cultivar inoculada conseguiu superar o rendimento de grãos obtido com a aplicação de 90 kg ha⁻¹ de N mineral (Tabela 20). Dentre todas as cultivares inoculadas, as que conseguiram produtividades mais próximas dos seus relativos tratamentos com N mineral, foram as cultivares Jalo Precoce, Estilo, Pontal, Vereda, Grafite e Ouro Negro, respectivamente, todas com rendimentos variando de 95% a 82% do rendimento obtido com a aplicação de 90 kg ha⁻¹ de N mineral, ao passo que a cultivar Radiante, quando inoculada, obteve apenas 63% do rendimento do seu respectivo tratamento com N mineral (Tabela 20).

Tabela 20. Produção de grãos de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha)

Cultivar	Produção de grãos (kg ha ⁻¹)					
	2011			2012		
	Inoculado	N mineral	Média	Inoculado	N mineral	Média
Radiante	1618	2645	2131 ab*	1826	2881	2353 c
Jalo Precoce	1457	2550	2003 b*	2830	2969	2899 b
Estilo	1543	3288	2415 ab*	3936	4273	4104 a
Grafite	1452	2910	2181 ab*	3364	3980	3672 a
Marfim	1553	3039	2296 ab*	3177	4471	3824 a
Ouro Negro	2201	3095	2648 a*	3724	4494	4109 a
Pontal	1790	2786	2288 ab*	3839	4206	4023 a
Vereda	1296	3222	2259 ab*	3576	4078	3827 a
Média	1614 B	2942 A		3284 B	3919 A	
CV (%)		22,29			12,81	

Entretanto, vale ressaltar que mesmo não atingindo a produtividade proporcionada pela aplicação de 90 kg ha⁻¹ de N mineral, todas as cultivares inoculadas alcançaram produção de grãos superior a 1100 kg ha⁻¹ no ano de 2011 e de 1800 kg ha⁻¹ no ano de 2012, o que significa que a inoculação das sementes permitiu às cultivares superar a média brasileira de produtividade de feijão nas safras 2011/2012 e 2012/2013, que foi de 890 kg ha⁻¹ e de 910 kg ha⁻¹ respectivamente (CONAB, 2013). As produtividades obtidas com a inoculação com rizóbio, mostram que, mesmo não atingindo produtividades equivalentes à aplicação de 90 kg ha⁻¹ de N mineral, algumas cultivares de feijoeiro, com bom potencial para FBN, podem atingir uma expressiva produtividade de grãos em cultivos com uso exclusivo da inoculação com estirpes eficientes de rizóbio (HUNGRIA et al., 2003).

Vários resultados demonstram a capacidade do feijoeiro em responder de forma significativa à inoculação, apesar de constatada grande variação na dimensão destas respostas. FERREIRA et al. (2009) observaram que uma, entre as cinco estirpes testadas, proporcionou produtividade de grãos de feijão equivalente à dosagem de 80 kg ha⁻¹ de ureia aplicada na testemunha, enquanto que SOARES et al. (2006), testando as mesmas cinco estirpes, observaram que quatro delas conseguiram produtividade de grãos semelhantes à testemunha com 70 kg ha⁻¹ de ureia. HUNGRIA et al. (2000), estudando a eficiência de novos isolados de rizóbio, obtiveram, em uma série de quatro experimentos de campo, rendimentos com algumas cepas de 1527 a 3425 kg ha⁻¹, tendo proporcionado rendimento de grãos semelhantes aos das testemunhas com 60 kg ha⁻¹ de N mineral.

No entanto, em todos estes estudos as doses de N mineral utilizadas foram inferiores às doses utilizadas no presente trabalho (90 kg ha^{-1}), o que pode ter favorecido o desempenho das estirpes inoculadas frente aos tratamentos com N mineral. Porém, quando se compara a doses mais elevadas, 100 kg ha^{-1} de N, ainda existe alguma respostas positivas do feijoeiro inoculado. DUQUE et al. (1985) obtiveram em duas cultivares de feijão, produtividades de grãos de 991 e 883 kg ha^{-1} quando inoculadas, e 663 e 620 kg ha^{-1} quando adubadas com 100 kg ha^{-1} de N, no entanto os autores atribuíram tal resultado inferior da aplicação de N mineral às grandes perdas do fertilizante por lixiviação, devido ao experimento ter sido implantado em uma área com solo muito arenoso, no município de Seropédica – RJ. Em experimentos testando a eficiência de 17 estirpes de rizóbio em duas cultivares de feijoeiro, MENDES et al. (1994) relataram que em uma das cultivares (Capixaba Precoce), nenhuma das estirpes promoveu ganhos superiores ao tratamento com 100 kg ha^{-1} de N, porém três estirpes conseguiram rendimentos semelhantes; na outra cultivar avaliada (CNPAF-178), três estirpes não diferiram estatisticamente do tratamento com 100 kg ha^{-1} de N, mas causaram um acréscimo de até 27% na produção de grãos. MENDES et al. (1994) puderam concluir, de acordo com o nível de resposta obtido, que ambas as cultivares de feijoeiro avaliadas podem se beneficiar da inoculação, a ponto de dispensar totalmente o uso de adubação nitrogenada.

Porém, quando se considera o avanço no melhoramento genético do feijoeiro e o nível de produtividade das atuais cultivares comerciais, como as que estão sendo avaliadas no presente trabalho, o desempenho do feijoeiro inoculado torna-se um pouco comprometido, e adubações nitrogenadas complementares na cultura podem ser necessárias, para se atingir os mais altos potenciais produtivos. Ao trabalhar com a cultivar Pérola, PELEGRIN et al. (2009) constatou a necessidade da adubação com 20 kg ha^{-1} de N no plantio, junto da inoculação com rizóbio, para possibilitar a obtenção de rendimento de grãos e receita líquida equivalente à aplicação de 160 kg ha^{-1} de N. PACHECO et al. (2012) observaram na cultivar Carioca que é necessário aplicar 40 kg ha^{-1} de N em cobertura, no feijoeiro inoculado, para a cultura alcançar a produtividade equivalente a aplicação de 60 kg ha^{-1} de N mineral.

O número de vagens por planta apresentou, em 2011, valores nas plantas adubadas com N mineral, superiores aos das plantas que foram inoculadas (Tabela 21). O maior número de vagens ficou por conta das cultivares Marfim e Grafite, com 12,1 e 10,7 vagens por planta respectivamente, enquanto que Jalo Precoce apresentou apenas 7,2 vagens por planta (Tabela 21). As plantas adubadas com N mineral em 2012 apresentaram maior número de vagens por planta do que as plantas que foram inoculadas (Tabela 21). As cultivares que mais se destacaram foram Estilo e Ouro Negro com 18,9, e 16,8 vagens por planta, enquanto que Radiante apresentou somente 8,7 vagens por planta (Tabela 21).

Entre as cultivares, os dados do número de vagens por planta não concordam entre um ano e outro de experimento, ou seja, houve grande variação entre as cultivares, e o bom desempenho de uma cultivar em um ano, não se repetiu no ano seguinte. A adubação nitrogenada tem grande influência neste componente de produção: MOREIRA et al. (2013) observaram que com o aumento das doses de N aplicados em semeadura foi observada uma relação linear positiva com o número de vagens por planta, proporcionando um incremento de 0,03 vagens para cada kg ha^{-1} de N aplicado. No experimento em 2011, as plantas inoculadas produziram um número de grãos por vagem inferior ao das plantas adubadas com N mineral (Tabela 21). Porém, em 2012, a análise estatística não identificou diferença no número de grãos por vagem, entre plantas inoculadas e adubadas com N mineral (Tabela 21).

Tabela 21. Número de vagens por planta, número de grãos por vagem em massa de cem grãos de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, nos anos de 2011 e 2012.

Cultivar	Número de vagens por planta					
	2011			2012		
	Inoculado	N mineral	Média	Inoculado	N mineral	Média
Radiante	5,6	9,1	7,3 c	7,0	10,4	8,7 d
Jalo Precoce	6,3	8,1	7,2 c	8,2	9,9	9,1 d
Estilo	5,8	9,2	7,5 c	17,9	19,9	18,9 a
Grafite	8,5	12,9	10,7 ab	12,8	15,6	14,2 c
Marfim	8,8	15,3	12,1 a	13,6	16,9	15,3 bc
Ouro Negro	7,6	10,9	9,3 bc	15,5	18,0	16,8 ab
Pontal	6,1	9,5	7,8 c	13,6	13,6	13,6 c
Vereda	5,4	10,5	8,0 c	13,0	16,8	14,9 bc
Média	6,8 B	10,7 A		12,7 B	15,1 A	
CV (%)		19,7			15,4	
Número de grãos por vagem						
Radiante	3,1	3,3	3,2 c	3,7	3,9	3,8 e
Jalo Precoce	3,4	3,6	3,5 bc	4,3	4,3	4,3 d
Estilo	3,9	4,3	4,1 b	5,1	4,8	5,0 bc
Grafite	3,8	4,5	4,1 b	5,3	5,4	5,3 ab
Marfim	2,9	3,6	3,3 c	4,8	5,2	5,0 bc
Ouro Negro	4,1	4,2	4,1 b	4,9	5,0	4,9 c
Pontal	4,7	5,3	5,0 a	5,5	5,3	5,4 a
Vereda	4,7	5,3	5,0 a	5,2	5,4	5,3 abc
Média	3,8 B	4,3 A		4,8 A	4,9 A	
CV (%)		11,0			7,1	
Massa de 100 grãos (g)						
Radiante	38,5	46,9	42,7 a	49,2	52,1	50,7 a
Jalo Precoce	38,7	48,7	43,7 a	51,3	50,6	51,0 a
Estilo	29,3	31,5	30,4 cd	35,3	35,6	35,4bc
Grafite	30,0	31,0	30,5 cd	35,1	35,4	35,3bc
Marfim	29,3	32,8	31,0 bc	34,9	32,6	33,7 c
Ouro Negro	31,7	33,6	32,6 b	37,1	35,4	36,2 b
Pontal	28,0	29,3	28,6 de	35,0	32,7	33,8 c
Vereda	25,5	27,8	26,7 e	31,9	30,4	31,2 d
Média	31,4 B	35,2 A		38,7 A	38,1 A	
CV (%)		5,0			5,1	

Letras minúsculas comparam colunas e letras maiúsculas comparam linhas pelo teste Duncan a 5%.

De acordo com MEDEIROS et al. (2000), o número de grãos por vagem não sofre influência da adição de N, mas de outros fatores como a densidade de semeadura e a radiação solar.

Entre as cultivares, no ano de 2011, o maior número de grãos por vagem foi observado em Pontal e Vereda e os menores nas cultivares Radiante e Marfim (Tabela 21). Em 2012, novamente a cultivar Pontal apresentou o maior número de grãos por vagem e a cultivar Radiante o menor (Tabela 21). A massa de cem grãos nas plantas inoculadas foi menor do que nas plantas adubadas com N mineral em 2011, mas em 2012 a massa de cem grãos das plantas inoculadas não diferiu das plantas com N mineral (Tabela 21). O tamanho da semente é uma característica típica de cada cultivar, e o presente trabalho contempla cultivares muito distintas quanto a esta característica. As cultivares de ciclo precoce, Radiante e Jalo Precoce, foram as que apresentaram as maiores massa de 100 grãos, e Vereda apresentou as menores massas de 100 grãos, nos dois anos de experimento (Tabela 21). A massa de 100 grãos não foi influenciada pela inoculação da semente, adubação de N na semeadura, e em cobertura (FERREIRA et al., 2000; ROMANINI-JÚNIOR et al., 2007).

O índice de colheita, no ano de 2011, foi maior nas plantas adubadas com N mineral. No ano de 2012, este resultado se inverteu (Tabela 22).

Tabela 22. Índice de colheita de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, nos anos de 2011 e 2012.

Cultivar	Índice de colheita (mg g ⁻¹)					
	2011			2012		
	Inoculado	N mineral	Média	Inoculado	N mineral	Média
Radiante	578	605	592 bc	678	668	673 bc
Jalo Precoce	554	579	566 bc	675	653	664 bc
Estilo	569	632	601 ab	679	659	669 bc
Grafite	533	616	575 bc	667	660	663 bc
Marfim	509	622	566 bc	679	681	680 b
Ouro Negro	643	659	651 a	726	718	722 a
Pontal	581	660	621 ab	714	701	707 a
Vereda	475	598	537 c	668	636	652 c
Média	555 B	622 A		686 A	672 B	
CV (%)		7,33			2,7	

Letras minúsculas comparam colunas e letras maiúsculas comparam linhas pelo teste Duncan a 5%.

A cultivar Ouro Negro foi a que apresentou o maior índice de colheita, no ano de 2011, e no ano de 2012, as cultivares Ouro Negro e Pontal foram as que apresentaram os maiores índices de colheita e a cultivar Vereda exibiu o menor índice de colheita, nos dois anos de experimento (Tabela 22).

Os resultados de componentes de produção no ano de 2012 estão mais de acordo com os encontrados na literatura, do que os de 2011, visto que os dados da literatura que comparam a inoculação com rizóbios frente à aplicação de N mineral, mostram desempenhos semelhantes entre estes tratamentos quanto aos componentes de produção (FERREIRA et al., 2000; ARAÚJO et al., 2007; SILVA et al., 2009; PACHECO et al., 2012; BARROS et al.,

2013). A inexistência de efeito das fontes de N nos componentes de produção pode ser explicada pelo fato destes componentes serem característicos de alta herdabilidade genética.

De acordo com RAMOS JÚNIOR et al. (2005), a massa de cem grãos e o número de grãos por vagem são os componentes de maior influência na produtividade de grãos de cultivares de feijão. Como observado na Tabela 21, o aumento de produtividade, de 2011 para 2012, nas plantas inoculadas, realmente pode ser atribuído a esses dois fatores, já que eles não diferiram estatisticamente entre os dois tipos de fontes de N. No entanto, quando se considera a produtividade final, em 2012, os dados discordam dos de RAMOS JÚNIOR et al. (2005), já que a menor produtividade das plantas inoculadas, no ano de 2012, pode ser atribuída ao número de vagens por planta, já que foi este o único componente de produtividade que ficou inferior às plantas adubadas com N mineral e, portanto, decisivo para determinar a menor produtividade de grãos das plantas inoculadas, em 2012, frente às plantas adubadas com N mineral, discordando de RAMALHO et al. (1993), que afirmou que o número de vagens por planta costuma apresentar-se como o componente com maior participação na produção de grãos. De acordo com ARAÚJO & TEIXEIRA (2012), o número de vagens por planta apresenta inclusive correlação fenotípica altamente significativa com a produção de grãos para os genótipos de hábito de crescimento tipo III.

O índice de colheita, razão entre a massa dos grãos e a massa total de parte aérea, foi maior nas plantas inoculadas do que adubadas com N mineral em 2012 (Tabela 22). Esse resultado, no final do ciclo da cultura, já era esperado, haja vista os aumentos de produtividade nas plantas inoculadas terem sido bem maiores do que nas plantas adubadas com N mineral, quando se compara com suas respectivas produtividades no ano anterior, em 2011. De 2011 para 2012, o aumento na produtividade das plantas inoculadas foi de 1770 kg ha⁻¹ (de 1510 para 3280 kg ha⁻¹), ao passo que o aumento de produtividade para o mesmo período nas plantas adubadas com N mineral foi de apenas 1090 kg ha⁻¹ (de 2830 para 3920 kg ha⁻¹), uma diferença de 680 kg ha⁻¹ a menos, em ganho de produtividade entre os dois anos, o que se refletiu de forma positiva no índice de colheita das plantas inoculadas.

Os índices de colheita encontrados nas cultivares avaliadas neste trabalho, contradizem, em parte, os encontrados por ARAÚJO & TEIXEIRA (2012), que relataram que os genótipos de crescimento prostrado (tipo III), tinham menor índice de colheita em comparação aos de crescimento ereto, gerando correlação negativa do índice de colheita com a massa de caule na maturação, concordando com ARAÚJO & TEIXEIRA (2003), que afirmaram que materiais de porte ereto apresentam menor índice de colheita, sem que isso signifique necessariamente menor eficiência de translocação de biomassa para os grãos. Porém no presente trabalho, as cultivares Pontal (tipo III, prostrado) e Estilo (tipo II, ereto), apresentaram, em 2011, o mesmo índice de colheita, e no ano de 2012, a cultivar Pontal apresentou o maior índice de colheita entre as duas cultivares, muito embora nos dois anos de experimento o menor índice de colheita entre todas as cultivares tenha sido observado na cultivar Vereda, de tipo III, e crescimento prostrado (Tabela 22). Todavia, aparentemente não houve influência da duração do ciclo das cultivares sobre o índice de colheita, já que as cultivares Jalo Precoce e Radiante, ambas de ciclo precoce, não diferiram no índice de colheita das cultivares Grafite e Vereda, ambas de ciclo tardio, corroborando ARAÚJO & TEIXEIRA (2012), cujos índices de colheita dos 64 genótipos estudados não se correlacionaram com os dias para maturação, o que indica que a seleção para índice de colheita pode ser efetuada de forma independente da duração do ciclo da cultura.

4.5.5. Acumulação de nitrogênio total

A análise estatística dos dados identificou interação significativa apenas para acúmulo de N nas folhas e na parte aérea da 1ª coleta em 2012, no acúmulo de N no grão em 2011 e

nos teores de N nos grãos de 2011 e 2012. Para os outros caracteres, as interações entre as fontes de N (inoculação com rizóbio ou adubação com N mineral) e os genótipos estudados não foram significativas (Tabelas 42, 43, 44, 46, 53, 54 e 58).

O acúmulo de N em cada tecido vegetal foi obtido pelo produto entre o teor de N de cada tecido e a sua respectiva massa seca. O acúmulo de N na folha foi maior nas plantas sob N mineral do que nas plantas inoculadas com rizóbio (Tabela 23).

Tabela 23. Acúmulo de N na folha de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, nos anos de 2011 e 2012.

Cultivar	Acúmulo de N na folha (g m ⁻²)					
	Floração plena			Duas semanas após floração plena		
	Inoculado	N mineral	Média	Inoculado	N mineral	Média
2011						
Radiante	1,57	2,63	2,10 d	1,02	2,43	1,73 c
Jalo Precoce	2,53	6,06	4,30 a	0,96	2,58	1,77 c
Estilo	3,08	3,37	3,23 abcd	1,38	3,47	2,43 bc
Grafite	2,62	5,53	4,08 ab	3,02	5,05	4,04 a
Marfim	2,52	4,70	3,61 abc	2,27	4,17	3,22 ab
Ouro Negro	2,50	3,47	2,99 bcd	2,37	3,33	2,85 abc
Pontal	2,05	3,57	2,81 cd	2,08	2,83	2,46 bc
Vereda	2,56	3,86	3,21 abcd	2,02	4,13	3,08 ab
Média	2,43 B	4,15 A		1,89 B	3,50 A	
CV (%)		28,7			36,8	
2012						
Radiante	1,69 b	2,57 e	2,13 e	2,04	3,72	2,88 d
Jalo Precoce	2,31 ab	3,75 de	3,03 de	3,19	4,39	3,79 cd
Estilo	4,08 a	9,10 a	6,59 a	5,32	6,78	6,05 a
Grafite	4,37 a	7,42 ab	5,90 ab	4,49	5,47	4,98 ab
Marfim	2,67 ab	5,28 cd	3,97 cd	3,32	5,70	4,51 bc
Ouro Negro	3,88 a	6,69bc	5,29 abc	3,75	5,97	4,86 bc
Pontal	3,23 ab	4,56 d	3,89 cd	5,07	5,47	5,27 ab
Vereda	4,39 a	4,85 cd	4,62 bc	5,23	4,68	4,95 ab
Média	3,33 B	5,53 A		4,05 B	5,27 A	
CV (%)		29,5			21,7	

Letras minúsculas comparam colunas e letras maiúsculas comparam linhas pelo teste Duncan a 5%.

Este comportamento se repetiu nas duas épocas de avaliação e nos dois anos de experimento (Tabela 23). No ano de 2011, na 1ª coleta, as plantas adubadas com N mineral acumularam 1,72 g m⁻² de N nas folhas a mais do que as plantas inoculadas, e na 2ª coleta as plantas adubadas acumularam 1,61 g m⁻² a mais de N nas folhas do que as plantas inoculadas. Em 2012, o acúmulo de N nas folhas foi 2,2 g m⁻² maior na 1ª coleta, e 1,22 g m⁻² a mais na 2ª

coleta, nas plantas adubadas com N mineral. No período compreendido entre a 1ª coleta (floração plena) e a 2ª coleta (duas semanas após a floração plena), ocorreu um decréscimo no acúmulo de N nas folhas, o que pode ser indicativo de translocação de N foliar. Em média, nas plantas inoculadas, a perda de N das folhas neste período foi de 22% ($0,54 \text{ g m}^{-2}$), e nas plantas adubadas foi de 16% ($0,65 \text{ g m}^{-2}$), no ano de 2011. Em 2012, ocorreu ganho de 21% ($0,72 \text{ g m}^{-2}$) no acúmulo de N nas folhas nas plantas inoculadas, ao passo que as plantas adubadas se mantiveram praticamente estáveis, com pequena perda de 4% ($0,26 \text{ g m}^{-2}$) no acúmulo de N nas folhas, entre a 1ª e a 2ª coleta (Tabela 23). Cabe ressaltar, que houve ganho médio de massa seca de folhas em ambos os tratamentos e nos dois anos de experimento (Tabela 39 e 50).

Em 2011, na 1ª coleta, Jalo Precoce teve maior acúmulo de N nas folhas do que as cultivares Pontal, Ouro Negro e Radiante, já na 2ª coleta, a cultivar Grafite acumulou mais N nas folhas do que as cultivares Pontal, Estilo, Jalo Precoce e Radiante (Tabela 23). Em 2012, na média dos dois tratamentos, a cultivar com maior acúmulo de N nas folhas foi Estilo, acompanhada por Grafite e Ouro Negro, na 1ª coleta, e por Grafite, Pontal e Vereda na 2ª coleta (Tabela 23). Ocorreu interação significativa para acúmulo de N nas folhas, entre as fontes de N e as cultivares, na 1ª coleta de 2012. Entre as plantas inoculadas, a cultivar Radiante acumulou menos N nas folhas do que as cultivares Vereda, Ouro Negro, Grafite e Estilo (Tabela 23). Entre as plantas com N mineral, a cultivar Radiante só não acumulou menos N nas folhas do que a cultivar Jalo Precoce (Tabela 23).

O conteúdo de N no caule seguiu a mesma tendência do conteúdo de N nas folhas, quanto à resposta às fontes de N, ou seja, foi maior nas plantas sob N mineral do que nas plantas inoculadas com rizóbio, nas duas épocas de avaliação e nos dois anos de experimento (Tabela 24).

Em 2011, na 1ª coleta, as plantas adubadas com N mineral acumularam $0,74 \text{ g m}^{-2}$ de N nos caules a mais do que as plantas inoculadas, e na 2ª coleta as plantas adubadas acumularam $0,42 \text{ g m}^{-2}$ a mais de N nos caules do que as plantas inoculadas. Em 2012, o acúmulo de N nos caules foi $0,63 \text{ g m}^{-2}$ maior na 1ª coleta, e $0,4 \text{ g m}^{-2}$ a mais, na 2ª coleta nas plantas com N mineral (Tabela 24). Novamente foi observado que no período compreendido entre a 1ª coleta (floração plena) e a 2ª coleta (duas semanas após a floração plena), houve decréscimo de 52% nas plantas inoculadas e de 48% nas plantas adubadas com N mineral, no acúmulo de N no caule, em 2011.

Em 2012, houve aumento na massa de caule (Tabela 51), com aumento no acúmulo de N no caule, de 23% ($0,2 \text{ g m}^{-2}$), observado nas plantas inoculadas, porém nas plantas adubadas com N mineral, o acúmulo de N no caule manteve-se estável da 1ª para a 2ª coleta (Tabela 24). Em 2011, na 1ª coleta, Grafite acumulou mais N no caule do que Pontal, Ouro Negro, Jalo Precoce e Radiante, enquanto na 2ª coleta, Vereda teve maior acúmulo do que Ouro Negro, Jalo Precoce e Radiante. Em 2012, na 1ª coleta, o maior acúmulo de N no caule estava na cultivares Vereda, Grafite e Estilo, enquanto na 2ª coleta as cultivares que mais acumularam N no caule foram Vereda, Pontal e Estilo (Tabela 24). A redução do conteúdo de N nos tecidos de caule e folha com o desenvolvimento reprodutivo do feijoeiro é um indicativo de remobilização deste nutriente para órgãos com forte demanda de N, como as vagens em formação e os grãos. No entanto, aparentemente, no ano de 2011, esta remobilização ocorreu antecipadamente, visto que tal remobilização se inicia posteriormente ao período de duas semanas após a floração, pois até este período os conteúdos de N em folhas e caules tendem a aumentar, quando em condições controladas (HUNGRIA et al., 1985) ou pelo menos manterem-se estáveis, quando em condições de campo (ARAÚJO et al., 2012).

Tabela 24. Acúmulo de N no caule de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, nos anos de 2011 e 2012.

Cultivar	Acúmulo de N no caule (g m ⁻²)					
	Floração plena			Duas semanas após floração plena		
	Inoculado	N mineral	Média	Inoculado	N mineral	Média
2011						
Radiante	0,53	1,03	0,78 d	0,25	0,77	0,51 bc
Jalo Precoce	0,84	1,36	1,10 bcd	0,23	0,69	0,46 c
Estilo	1,08	1,66	1,37 abc	0,33	1,03	0,68 abc
Grafite	1,02	2,39	1,71 a	0,53	0,91	0,72 ab
Marfim	0,89	2,03	1,46 ab	0,51	0,83	0,67 abc
Ouro Negro	1,01	1,37	1,19 bcd	0,41	0,58	0,49 c
Pontal	0,58	1,37	0,98 cd	0,46	0,75	0,61 abc
Vereda	0,92	1,63	1,28 abc	0,56	1,09	0,83 a
Média	0,86 B	1,60 A		0,41 B	0,83 A	
CV (%)		30,3			26,1	
2012						
Radiante	0,44	0,80	0,62 c	0,57	1,09	0,83 c
Jalo Precoce	0,47	0,74	0,60 c	0,63	0,89	0,76 c
Estilo	0,72	2,10	1,41 a	1,04	1,57	1,31 ab
Grafite	0,84	1,49	1,17 ab	1,02	1,09	1,05 bc
Marfim	0,47	1,22	0,84 bc	0,65	1,39	1,02 bc
Ouro Negro	0,67	1,34	1,00 b	0,61	1,08	0,84 c
Pontal	0,53	1,08	0,80 bc	1,00	1,60	1,30 ab
Vereda	1,18	1,58	1,38 a	1,35	1,43	1,39 a
Média	0,66 B	1,29 A		0,86 B	1,26 A	
CV (%)		35,3			27,8	

Letras minúsculas comparam colunas e letras maiúsculas comparam linhas pelo teste Duncan a 5%.

O período da segunda semana após a floração é considerado o de maior acúmulo de N nos tecidos do caule e da folha, quando então começam a decair em virtude da remobilização para as vagens e perdas pelas folhas senescentes (ARAÚJO et al., 2012). Neste sentido, o experimento em 2012 gerou resultados mais coerentes com os relatados na literatura (HUNGRIA et al., 1985; ARAÚJO et al., 2012).

O acúmulo de N na vagem foi medido por ocasião da 2ª coleta (duas semanas após a floração plena), e as plantas com N mineral apresentaram maior acúmulo de N na vagem do que as plantas inoculadas, nos dois anos de experimento (Tabela 25). Em 2011 as plantas adubadas com N mineral acumularam 2,5 vezes mais N nas vagens do que as plantas inoculadas, uma diferença de 4,02 g m⁻², já no ano de 2012, essa diferença entre as fontes de N foi bem menor, de apenas 0,88 g m⁻² na média (Tabela 25). As cultivares que mais

acumularam N nas vagens foram Ouro Negro e Grafite em 2011 e Vereda e Grafite em 2012 (Tabela 25).

Tabela 25. Acúmulo de N na vagem, duas semanas após a floração plena (2ª coleta), de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, nos anos de 2011 e 2012.

Cultivar	Acúmulo de N na vagem (g m ⁻²)					
	2011			2012		
	Inoculado	N mineral	Média	Inoculado	N mineral	Média
Radiante	1,87	4,07	2,97 c	1,68	2,76	2,22 c
Jalo Precoce	3,27	6,85	5,06 bc	2,18	2,64	2,41 c
Estilo	1,72	7,04	4,38 bc	1,62	2,31	1,97 c
Grafite	3,04	10,08	6,56 ab	5,49	5,76	5,63 ab
Marfim	1,93	3,66	2,80 c	3,52	5,43	4,47 b
Ouro Negro	5,13	10,47	7,80 a	2,22	2,88	2,55 c
Pontal	1,36	4,76	3,06 c	1,65	2,52	2,08 c
Vereda	1,47	5,03	3,25 c	5,92	6,97	6,44 a
Média	2,47 B	6,49 A		3,03 B	3,91 A	
CV (%)		47,2			35,4	

Letras minúsculas comparam colunas e letras maiúsculas comparam linhas pelo teste Duncan a 5%.

O acúmulo de N na parte aérea foi maior nas plantas adubadas com N mineral do que nas plantas inoculadas com rizóbio (Tabela 26). Este comportamento se repetiu nas duas épocas de avaliação e nos dois anos de experimento (Tabela 26). Em 2011, na 1ª coleta, as plantas adubadas com N mineral acumularam 2,46 g m⁻² a mais de N na parte aérea, e na 2ª coleta essa diferença foi de 6,05 g m⁻² a mais de N acumulado na parte aérea do que nas plantas inoculadas. Em 2012, na 1ª coleta, as plantas com N mineral acumularam 2,83 g m⁻² a mais de N na parte aérea, e na 2ª coleta acumularam 2,5 g m⁻² de N a mais na parte aérea, do que as plantas inoculadas (Tabela 26). Geralmente não ocorre superioridade no acúmulo de N na parte aérea de tratamentos com rizóbio sobre tratamentos com N mineral, notadamente em experimentos de campo. SOARES et al. (2006) observaram que apenas uma das cinco estirpes testadas conseguiu equiparar o acúmulo de N na parte aérea ao tratamento com N mineral, enquanto FERREIRA et al. (2009), testando as mesmas cinco bactérias, não encontraram diferença estatística em nenhum dos tratamentos, inclusive entre a testemunha sem fonte de N.

Na 1ª coleta de 2011, a cultivar Grafite acumulou mais N na parte aérea do que as cultivares Pontal e Radiante, e na 2ª coleta as cultivares que mais acumularam N na parte aérea foram Grafite e Ouro Negro (Tabela 26). As cultivares Estilo, na 1ª coleta e Vereda, na 2ª coleta, foram as que mais acumularam N na parte aérea em 2012 (Tabela 26). Os menores acúmulos de N na parte aérea nos dois experimentos foram encontrados na cultivar Radiante (Tabela 26).

Tabela 26. Acúmulo de N na parte aérea de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, nos anos de 2011 e 2012.

Cultivar	Acúmulo de N na parte aérea (g m ⁻²)					
	Floração plena			Duas semanas após floração plena		
	Inoculado	N mineral	Média	Inoculado	N mineral	Média
2011						
Radiante	2,10	3,66	2,88 c	3,14	7,27	5,20 b
Jalo Precoce	3,37	7,42	5,40 ab	4,45	10,12	7,29 b
Estilo	4,17	5,03	4,60 ab	3,43	11,54	7,48 b
Grafite	3,64	7,92	5,78 a	6,59	16,05	11,32 a
Marfim	3,41	6,72	5,07 ab	4,70	8,66	6,68 b
Ouro Negro	3,52	4,84	4,18 abc	7,91	14,38	11,15 a
Pontal	2,63	4,94	3,78 bc	3,90	8,34	6,12 b
Vereda	3,48	5,49	4,49 ab	4,06	10,24	7,15 b
Média	3,29 B	5,75 A		4,77 B	10,82 A	
CV (%)		27,9			37,5	
2012						
Radiante	2,13 c	3,36 e	2,74 e	4,29	7,57	5,93 e
Jalo Precoce	2,77bc	4,48 de	3,63 de	5,99	7,92	6,95 de
Estilo	4,80 ab	11,20 a	8,00 a	7,99	10,65	9,32 c
Grafite	5,21 ab	8,92 ab	7,06 ab	10,99	12,32	11,66 ab
Marfim	3,14 abc	6,49 cd	4,81 cd	7,48	12,51	10,0 bc
Ouro Negro	4,55 abc	8,03 bc	6,29 bc	6,57	9,92	8,25 cd
Pontal	3,75 abc	5,63 cde	4,69 cd	7,72	9,59	8,65 cd
Vereda	5,57 a	6,44 cd	6,00bc	12,50	13,07	12,78 a
Média	3,99 B	6,82 A		7,94 B	10,44 A	
CV (%)		29,5			21,8	

Letras minúsculas comparam colunas e letras maiúsculas comparam linhas pelo teste Duncan a 5%.

Vários trabalhos mostram que o acúmulo de N nos tecidos acompanha as suas respectivas produções de biomassa (HUNGRIA et al., 1985; KUMARASINGHE et al., 1992; SANETRA et al., 1998; ARAÚJO et al., 2012), portanto os menores conteúdos de N na parte aérea, encontrados na cultivar Radiante, podem estar associados ao fato desta cultivar também ter produzido a menor massa de parte aérea entre todas as cultivares avaliadas, ao passo que, cultivares com grandes acúmulos de N na parte aérea como Estilo e Vereda, encontram-se também entre as que mais acumularam biomassa de parte aérea (Tabela 18). Além do mais, diferenças entre cultivares quanto ao acúmulo de N na parte aérea são comuns, mostrando que esta característica é fortemente influenciada, tanto pelo genótipo quanto pelo tratamento. DUQUE et al. (1985) encontraram que, na média das quatro cultivares avaliadas, o tratamento com 100 kg ha⁻¹ de N mineral proporcionou maior acúmulo de N na parte aérea aos 61 DAE do que o tratamento inoculado, no entanto, duas destas cultivares, mais responsivas à

inoculação mostraram acúmulos de N superiores aos seu respectivos tratamentos com N mineral.

A remobilização de nutrientes dos tecidos vegetativos para os órgãos reprodutivos desempenha um papel importante nas leguminosas. A contribuição da remobilização de N dos órgãos vegetativos para a semente foi de 70% para a ervilha, 80-90% na soja, 43-94% na lentilha, 80% no feijão de fava e de 84% no feijão (SCHILTZ et al., 2005), sendo as vagens e sementes do feijoeiro os principais drenos de N quando ele é aplicado nas fases vegetativa e reprodutiva, respectivamente (WESTERMANN et al., 1985).

Mesmo ocorrendo decréscimo no conteúdo de N da folha (Tabela 23) e do caule (Tabela 24) da 1ª para a 2ª coleta, em 2011, ocorreu aumento no acúmulo de N na parte aérea na 2ª coleta, o que foi atribuído ao ganho de N pelas vagens (Tabela 25), em ambas as fontes de N.

De posse de informações como a diferença de N nas folhas e nos caules da 1ª para a 2ª coleta, e da quantidade de N acumulado na parte aérea inteira e somente nas vagens na 2ª coleta, podem ser feitas inferências sobre a remobilização de N nos tecidos da parte aérea na 1ª coleta para as vagens em formação, na 2ª coleta. Para isto, deve ser considerado que no período compreendido entre a floração e duas semanas após a floração, a massa de folhas senescentes e as consequentes perdas de N através destas folhas senescentes são relativamente baixas (ARAÚJO et al., 2012), e que neste período não existe diferença entre cultivares quanto à perda de massa e N pelas folhas senescentes (ARAÚJO et al., 2012). Sendo assim, é possível supor que praticamente toda a diferença de N encontrada entre as duas coletas, em 2011, foi alocada das folhas e caules no período da floração plena para as vagens em formação, e que não há diferença nessa realocação, até esta fase, entre as cultivares estudadas. Assumindo estas suposições, tem-se que nas plantas inoculadas o decréscimo no acúmulo de N, da 1ª para a 2ª coleta, considerando-se apenas folha + caule, foi de $0,99 \text{ g m}^{-2}$, porém, houve ganho de N na parte aérea na 2ª coleta de $1,48 \text{ g m}^{-2}$, o que é atribuído ao acúmulo de $2,47 \text{ g m}^{-2}$ nas vagens, portanto, considera-se que nas plantas inoculadas, cerca de 40% do N acumulado nas vagens, duas semanas após a floração, vieram via remobilização de folha e caule no estágio de florescimento do feijoeiro, em 2011. Seguindo este mesmo raciocínio para as plantas com N mineral, $1,42 \text{ g m}^{-2}$ de N foi perdido das folhas e caules da 1ª para a 2ª coleta, porém houve ganho de N na parte aérea na 2ª coleta de $5,07 \text{ g m}^{-2}$ de N atribuídos ao acúmulo de $6,49 \text{ g m}^{-2}$ nas vagens, indicando que aproximadamente 22% do N acumulado nas vagens vieram via remobilização de folhas e caules no período da floração plena do feijoeiro. Estes dados indicam que, possivelmente as plantas no experimento em 2011, passaram, em algum momento do seu ciclo por um estresse severo, observado principalmente nas plantas inoculadas, visto que essas plantas, mesmo tendo uma suposta maior translocação de N das folhas e caules para as vagens em formação, não foram capazes de suprir completamente os grãos com o nutriente, visto o menor teor de N observados nos grãos dessas plantas (Tabela 28). O menor índice de colheita de N observado nas plantas inoculadas (Tabela 30) indica que possivelmente depois do período de duas semanas após a floração as taxas de translocação de N das plantas adubadas com N mineral tenham aumentado, ou podem indicar também que as plantas inoculadas tiveram maiores perdas de N via folha senescente, dado que não foi quantificado no presente trabalho.

Continuando este raciocínio, no experimento em 2012, ao contrário do que ocorreu em 2011, nas plantas inoculadas houve ganho no acúmulo de N na folha (Tabela 23) e no caule (Tabela 24), de $0,92 \text{ g m}^{-2}$ da 1ª para a 2ª coleta, somados ao acúmulo de $3,03 \text{ g m}^{-2}$ de N nas vagens, com consequentes ganhos de $3,95 \text{ g m}^{-2}$ no acúmulo de N na parte aérea, indicando que neste ano, as plantas inoculadas não efetuaram uma remobilização de N de seus tecidos para a formação de vagens, até o período de duas semanas após a floração plena. Sob N mineral, as perdas no acúmulo de N ocorridas da 1ª para a 2ª coleta nos tecidos de folha e

caule foram muito pequenas quando comparadas a 2011, indicando que a contribuição do N oriundo da remobilização dos tecidos de folha e caule para a formação de vagens, da floração até duas semanas após a floração, foi mínima. As plantas sob N mineral sofreram decréscimo no acúmulo de N de 0,29 g m⁻², da 1ª para a 2ª coleta, considerando-se folha + caule, porém, houve ganho de N na parte aérea na 2ª coleta de 3,62 g m⁻², o que é atribuído ao acúmulo de 3,91 g m⁻² nas vagens, portanto, considera-se que nas plantas adubadas com N mineral, apenas 7,4% do N acumulado nas vagens vieram via remobilização de folha e caule no estágio de florescimento do feijoeiro, em 2012. Deve ficar claro que este tipo de aproximação feita aqui só é válida até o período de duas semanas após a floração plena, já que, segundo ARAÚJO et al. (2012), após este período a massa e a quantidade de N de folhas senescentes aumentam muito, e as diferenças entre cultivares começam a aparecer. De acordo com ARAÚJO et al. (2012), na média, as folhas senescentes continham 1,94 g m⁻² de N, o que correspondeu a 28% do N acumulado pela cultura do feijoeiro durante seu ciclo de crescimento em condições de campo, muito próximo dos 22% sugeridos por HUNGRIA et al. (1985), em casa-de-vegetação.

Em 2011, na 1ª coleta (floração plena), a cultivar Estilo acumulou mais N na parte aérea do que Radiante e Pontal, já na 2ª e na 3ª coletas, a Ouro Negro se destacou e apresentou os maiores acúmulos de N na parte aérea, porém, sem diferir estatisticamente de Grafite, enquanto na 4ª coleta, Ouro Negro foi superior apenas à cultivar Pontal (Tabela 27).

Tabela 27. Acúmulo de N na parte aérea de cultivares de feijoeiro inoculado com *Rhizobium*, em experimento de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.

Cultivar	Acúmulo de N na parte aérea (g m ⁻²)			
	Semanas após floração			
	0	2	3	4
Radiante	2,10 c	3,14 c	4,64 b	4,95
Jalo Precoce	3,37 ab	4,45 bc	4,78 b	5,61
Estilo	4,17 a	3,43 bc	2,88 b	5,48
Grafite	3,64 ab	6,59 ab	7,24 ab	7,08
Marfim	3,41 ab	4,70 bc	5,33 b	5,32
Ouro Negro	3,52 ab	7,91 a	11,40 a	7,79
Pontal	2,63 bc	3,90 bc	5,79 b	4,20
Vereda	3,48 ab	4,06 bc	5,00 b	4,84
Média	3,29	4,78	5,88	5,65
CV (%)	19,46	36,13	46,50	28,33

Letras minúsculas comparam colunas pelo teste Duncan a 5%.

Os resultados apresentados pela cultivar Ouro Negro no ano de 2011, especialmente na 3ª coleta, são surpreendentes. Três semanas após a floração plena, a cultivar Ouro Negro teve massa seca de parte aérea de 478 g m⁻², esta biomassa foi 177 g m⁻² maior do que a da cultivar Grafite (a segunda cultivar que mais produziu biomassa de parte aérea), e 278 g m⁻² maior do que a massa seca de parte aérea da cultivar Radiante, a que menos produziu biomassa de parte aérea (Tabela 45). Nesta mesma coleta, a massa seca de nódulos da cultivar Ouro Negro foi de 169 mg planta⁻¹, sendo que a média de todas as cultivares nesta coleta, não passou de 30 mg planta⁻¹ (Tabela 15). Isto demonstra que a cultivar Ouro Negro, como já

registrado na literatura (HENSON et al., 1993), apresenta alta capacidade de fixar N_2 , visto que sua excelente nodulação aliada a boa produção de parte aérea, se converteu em significativos acúmulos de N na parte aérea (Tabela 27) e no grão (Tabela 28) desta cultivar, e com reflexos na produção de grãos, visto que Ouro Negro foi a única cultivar a produzir mais de 2000 kg ha^{-1} , entre as cultivares inoculadas, no experimento em 2011 (Tabela 20).

Houve interação significativa entre fontes de N e cultivares para o teor de N no grão e acúmulo de N no grão em 2011, e para o teor de N no grão em 2012 (Tabela 47 e 59).

Na média, em 2011, as plantas que foram adubadas com N mineral produziram grãos com maior teor de N do que as plantas inoculadas (Tabela 28). Entre as plantas inoculadas, as cultivares tardias, Vereda e Grafite, tiveram teor de N no grão maior do que as cultivares Ouro Negro, Estilo e Radiante, enquanto que nas plantas adubadas com N mineral os grãos com maiores teores de N estavam nas cultivares Vereda, Marfim e Jalo Precoce (Tabela 28). Em 2012, não houve diferença entre plantas sob inoculação e N mineral para o teor de N nos grãos (Tabela 28), resultado similar ao encontrado por SOARES et al. (2006), FERREIRA et al. (2009) e PELEGRIN et al. (2009). Sob inoculação, a cultivar Vereda apresentou o maior teor de N nos grãos entre todas as cultivares, e sob N mineral, a cultivar Grafite apresentou maior teor de N nos grãos do que as cultivares Estilo e Radiante (Tabela 28). Algumas cultivares como a Ouro Negro em 2011, ou Estilo em 2012, apresentaram elevadas produtividades e baixos teores de N nos grãos, outras, como a Vereda, em 2012, apresentaram elevadas produtividades e altos teores de N nos grãos, ao contrário da Radiante que apresentou baixas produtividades e baixos teores de N nos grãos (Tabela 28).

De acordo com PESSOA et al. (1996), plantas com teores acima de 34 kg ha^{-1} de N nos grãos, não sofreram deficiência deste elemento durante seu ciclo. Os resultados de teor de N no grão em 2011 estão abaixo deste valor crítico, o que indica que neste ano as plantas podem ter passado por um estresse nutricional, ao passo que, em 2012 os teores de N no grão ficaram acima do relatado por PESSOA et al. (1996), demonstrando bom padrão nutricional das plantas neste ano. O acúmulo de N no grão é controlado mais pela força da demanda deste órgão em crescimento do que controlado geneticamente, porém, as condições ambientais podem afetar a aquisição do elemento pelas plantas e o início da senescência foliar de forma diferenciada entre cultivares, alterando seus padrões de translocação do nutriente para as sementes, o que pode explicar os diferentes teores relativos de N nos grãos (ARAÚJO & TEIXEIRA, 2003).

O acúmulo de N nos grãos das cultivares em 2011 foi maior nas plantas com N mineral do que nas plantas inoculadas (Tabela 28), resultado semelhante ao de FERREIRA et al. (2009). Na média, a inoculação proporcionou às plantas o acúmulo de $3,84 \text{ g m}^{-2}$ de N no grão, o que corresponde a 50% do acumulado pelas plantas adubadas com 90 kg ha^{-1} de N mineral (Tabela 28). As cultivares Vereda e Marfim acumularam mais N nos grãos do que a cultivar Radiante (Tabela 28). Em 2012 o acúmulo de N nos grãos foi maior do que em 2011, e o N mineral continuou proporcionando os maiores acúmulos de N no grão, no entanto, a diferença entre as fontes de N foi menor do que a encontrada em 2011 (Tabela 28). Dessa vez, as plantas inoculadas acumularam na média $12,6 \text{ g m}^{-2}$ de N nos grãos, apenas 13% menos do que as plantas com N mineral (Tabela 28). Entre as cultivares, na média dos dois tratamentos, as cultivares Ouro Negro e Estilo acumularam mais N no grão do que as cultivares de ciclo precoce, Radiante e Jalo Precoce (Tabela 28).

Existem resultados mostrando que a inoculação com estirpes adequadas de rizóbio não só pode substituir a adubação mineral com N do ponto de vista da produção de grãos, mas também mostram uma tendência a aumentar o teor de N nos grãos do feijoeiro (SOARES et al., 2006; ARAÚJO et al., 2007; MULAS et al., 2011).

Tabela 28. Teor de N no grão e acúmulo de N no grão de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, nos anos de 2011 e 2012.

Cultivar	Teor de N no grão (mg g ⁻¹)			Acúmulo de N no grão (g m ⁻²)		
	Inoculado	N mineral	Média	Inoculado	N mineral	Média
2011						
Radiante	26,9 b	33,0 bcd	30,0 bc	3,32 a	6,90 b	5,11 b*
Jalo Precoce	28,8 ab	36,7 ab	32,8 ab	3,62 a	8,67 ab	6,15 ab*
Estilo	27,0 b	30,6 d	28,8 c	3,44 a	8,83 ab	6,14 ab*
Grafite	32,5 a	32,9 bcd	32,7 ab	4,18 a	7,83 ab	6,01 ab*
Marfim	29,9 ab	35,3 abc	32,6 ab	3,42 a	9,92 a	6,67 a*
Ouro Negro	27,1 b	31,1 cd	29,1 c	4,93 a	7,80 ab	6,37 ab*
Pontal	30,0 ab	29,2 d	29,6 c	4,52 a	6,93 b	5,73 ab*
Vereda	32,4 a	38,8 a	35,6 a	3,24 a	9,59 a	6,42 a*
Média	29,3 B	33,4 A		3,84 B	8,31 A	
CV (%)		7,8			19,7	
2012						
Radiante	32,0 d	34,9 b	33,4 d	6,73	11,22	8,98 c
Jalo Precoce	36,8 b	37,5 ab	37,1 abc	11,03	12,06	11,54 bc
Estilo	33,0 cd	34,2 b	33,6 d	14,93	15,84	15,38 a
Grafite	38,2 b	39,0 a	38,6 ab	13,53	15,18	14,35 ab
Marfim	35,8 bc	35,2 ab	35,5 cd	12,32	16,12	14,22 ab
Ouro Negro	35,5 bcd	37,2 ab	36,4 bc	13,99	15,87	14,93 a
Pontal	37,7 b	37,2 ab	37,4 abc	14,14	14,53	14,33 ab
Vereda	42,4 a	36,8 ab	39,6 a	14,18	14,91	14,54 ab
Média	36,4 A	36,5 A		12,60 B	14,46 A	
CV (%)		6,3			18,5	

Letras minúsculas comparam colunas e letras maiúsculas comparam linhas pelo teste Duncan a 5%.

*teste Duncan a 10%.

Entre cultivares, as diferenças na capacidade de acumular N nos grãos não são tão evidentes (ARAÚJO & TEIXEIRA, 2008). Os resultados de acúmulo de N nos grãos do presente estudo, não parecem estar correlacionados com o rendimento de grãos, embora cultivares menos produtivas, como a Radiante, também tenha acumulado menos N no grão. Por outro lado, a cultivar Marfim, que também teve produtividades baixas, figurou entre as cultivares com maiores acúmulos de N nos grãos. No entanto, na média, de 2011 para 2012, o incremento na produção de grãos foi de 132 kg ha⁻¹ acompanhado por um aumento no acúmulo de N de 7,4 g m⁻², o que pode denotar que a quantidade de N nos grãos em feijoeiro, de forma geral, está relacionada com o seu potencial de produção, assim como relatado por ARAÚJO & TEIXEIRA (2003).

O acúmulo de N na palhada do caule e da vagem, gerados após a colheita dos grãos em 2011, foi maior nas plantas com N mineral do que nas inoculadas (Tabela 29).

Tabela 29. Acúmulo de N na palha do caule e na palha da vagem de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, nos anos de 2011 e 2012.

Cultivar	Acúmulo de N palha do caule (g m ⁻²)			Acúmulo de N palha da vagem (g m ⁻²)		
	Inoculado	N mineral	Média	Inoculado	N mineral	Média
2011						
Radiante	0,34 b	0,63 bc	0,49 c	0,24 ab	0,50 b	0,37 abc
Jalo Precoce	0,48 ab	1,36 a	0,92 a	0,25 ab	0,62 a	0,43 a
Estilo	0,49 ab	0,49 c	0,49 c	0,20 b	0,56 ab	0,38 ab
Grafite	0,83 a	0,76 bc	0,79 ab	0,22 ab	0,36 c	0,29 c
Marfim	0,61 ab	0,94 b	0,77 ab	0,23 ab	0,49 b	0,36 abc
Ouro Negro	0,33 b	0,64 bc	0,48 c	0,22 ab	0,34 c	0,28 c
Pontal	0,54 ab	0,55 bc	0,54 bc	0,33 a	0,33 c	0,33 bc
Vereda	0,71 ab	0,85 bc	0,78 ab	0,16 b	0,49 b	0,33 bc
Média	0,54 B*	0,78 A*		0,23 B	0,46 A	
CV (%)		32,3			19,0	
2012						
Radiante	0,45	0,57	0,51 c	0,29	0,57	0,43 b
Jalo Precoce	0,58	0,70	0,64 bc	0,45	0,56	0,51 ab
Estilo	0,66	0,76	0,71 abc	0,53	0,71	0,62 a
Grafite	0,82	0,94	0,88 ab	0,48	0,54	0,51 b
Marfim	0,65	0,77	0,70 abc	0,39	0,57	0,48 b
Ouro Negro	0,59	0,60	0,60 bc	0,40	0,51	0,46 b
Pontal	0,60	0,74	0,67 bc	0,48	0,53	0,50 ab
Vereda	0,77	1,20	0,99 a	0,41	0,60	0,51 ab
Média	0,64 A	0,78 A		0,43 B	0,57 A	
CV (%)		31,9			18,3	

Letras minúsculas comparam colunas e letras maiúsculas comparam linhas pelo teste Duncan a 5%.

*teste Duncan a 10%.

Em média o acúmulo de N na palha das vagens das plantas inoculadas, foi metade do acumulado pelas plantas com N mineral. Houve interação significativa entre as cultivares e as fontes de N para os acúmulos de N nas palhas do caule e da vagem. Sob inoculação, a cultivar Grafite acumulou mais N no caule do que as cultivares Ouro Negro e Radiante, enquanto que sob N mineral o maior acúmulo de N no caule foi encontrado na cultivar Jalo Precoce (Tabela 29). O acúmulo de N na palha das vagens, nas plantas inoculadas, foi maior na cultivar Pontal do que nas cultivares Vereda e Estilo, e nas plantas com N mineral, o maior acúmulo de N na palha das vagens foi encontrado nas cultivares Jalo Precoce e Estilo (Tabela 29). No ano de 2012, o acúmulo de N na palha do caule não diferiu entre as duas fontes de N, e a cultivar Vereda acumulou mais N na palha do caule do que as cultivares Pontal, Ouro Negro, Jalo Precoce e Radiante (Tabela 29). O acúmulo de N nas vagens foi maior nas plantas com N

mineral do que nas inoculadas, e entre as cultivares, Estilo acumulou mais N na palha das vagens do que Ouro Negro, Marfim, Grafite e Radiante (Tabela 29).

Dependendo do tipo e da qualidade do material, e da cultura em questão, os resíduos gerados após o cultivo de leguminosas de grãos, podem conter até 80 kg ha⁻¹ de N (SHAH et al., 2003), sendo que, em feijoeiro, os resíduos resultantes da trilhagem de grãos de diversas cultivares apresentaram massa seca entre 600 e 1500 kg ha⁻¹ e continham entre 5 e 12 kg ha⁻¹ de N, correspondendo em média a 15% do total de N acumulado pela cultura no final do ciclo (ARAÚJO & TEIXEIRA, 2003).

O índice de colheita de N foi obtido através da razão entre o conteúdo de N nos grãos e o conteúdo de N na parte aérea. O índice de colheita de N, no ano de 2011, foi maior nas plantas com N mineral do que nas inoculadas, já no ano de 2012 este resultado se inverteu e o maior índice de colheita de N foi obtido nas plantas inoculadas (Tabela 30). Em 2011 não houve diferença estatística entre as cultivares para o índice de colheita de N, enquanto em 2012, a cultivar Ouro Negro, apresentou maior índice de colheita de N que as cultivares Vereda, Grafite, Jalo Precoce e Radiante (Tabela 30).

Tabela 30. Índice de colheita de N de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, nos anos de 2011 e 2012.

Cultivar	Índice de colheita de N (mg g ⁻¹)					
	2011			2012		
	Inoculado	N mineral	Média	Inoculado	N mineral	Média
Radiante	852	858	855	895	908	902 d
Jalo Precoce	833	809	821	914	905	910 bcd
Estilo	826	893	860	926	916	921 abc
Grafite	799	875	837	914	911	913 bcd
Marfim	786	875	831	926	923	925 ab
Ouro Negro	896	883	890	933	934	933 a
Pontal	831	890	861	930	919	924 ab
Vereda	779	877	828	922	893	907 cd
Média	825 B	870 A		920 A	914 B	
CV (%)		4,6			1,4	

Letras minúsculas comparam colunas e letras maiúsculas comparam linhas pelo teste Duncan a 5%.

Os índices de colheita de N foram superiores ao índice de colheita de biomassa, denotando que a remobilização de N para formação dos grãos é mais intensa que a própria translocação de fotoassimilados (ARAÚJO & TEIXEIRA, 2003). Conforme ARAÚJO & TEIXEIRA (2012), a produção de grãos tem correlações fenotípicas, ambientais e genéticas altamente significativas com o índice de colheita de N, indicando que o maior rendimento está estreitamente associado à maior alocação de N nos grãos, fato que foi comprovado, no presente trabalho, pela cultivar Ouro Negro. Entretanto, LYNCH & WHITE (1992) propuseram que um ideótipo de feijoeiro para eficiência de N deve incluir intensa aquisição deste nutriente, translocação tardia deste para as sementes, alto índice de colheita de N e baixo teor deste nos grãos, características não inteiramente contempladas pela cultivar Ouro Negro.

Em 2012, as plantas inoculadas foram mais eficientes em alocar N para o grão, dado o maior índice de colheita de N, porém, esta alocação deve ter ocorrido depois do período de duas semanas após a floração, visto que até este período, as plantas ainda estavam aumentando o acúmulo de N na folha e no caule, enquanto nas plantas com N mineral, possivelmente já estava ocorrendo alguma remobilização, porém a taxas muito pequenas.

4.5.6. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio

Espécies capazes de realizar FBN apresentam valores de $\delta^{15}\text{N}$ menores do que aquelas não fixadoras crescendo no mesmo solo, sendo tanto maior a proporção da FBN quanto maior a diferença em $\delta^{15}\text{N}$ entre as espécies fixadoras e não-fixadoras (UNKOVICH et al., 2008).

Para o cálculo da contribuição da FBN (%Ndfa) em leguminosas, deve-se utilizar um índice definido como “valor B”, ou seja, o valor da abundância natural de plantas leguminosas quando completamente dependente da FBN para o seu crescimento (PEOPLES et al., 1989). São poucos os trabalhos publicados que estabeleceram o valor B em feijoeiro, e mesmo assim, estes têm mais de 20 anos. MARIOTTI et al. (1980) determinaram o valor B em duas cultivares de feijoeiro variando de $-1,97$ a $-1,83\%$, e YONEYAMA et al. (1986) encontraram valor B variando de $-3,20$ a $-1,80\%$ em três cultivares de feijoeiro. No presente trabalho, para fins de cálculo da contribuição da FBN, foram utilizados dois valores de valor B: $-2,00\%$ definido por (PEOPLES, *apud* UNKOVICH et al., 2008); e outro $-1,2\%$, valor definido a partir da avaliação de três cultivares (Radiante, Ouro Negro e Grafite), em trabalho apresentado no Capítulo II desta Tese. O valor B de $-2,0$ é mais conservador, e mostra taxas de FBN menores, no entanto, para fins de maior simplicidade de descrição de resultados e eventuais comparações entre cultivares foi utilizado o valor B de $-1,2$, pelo fato deste ter sido definido para as mesmas cultivares e inoculante em estudo neste trabalho.

Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ medidos nas cultivares de feijoeiro e na parte aérea das plantas controle foram mais elevados em 2011 do que em 2012, porém a diferença de deltas entre leguminosas e plantas controle foi maior no ano de 2012, indicando por consequência, maiores contribuições da FBN neste ano.

A parte aérea das plantas controle que cresceram no mesmo solo que o feijoeiro, em 2011, apresentou valores positivos de $\delta^{15}\text{N}$, que variaram entre $5,058$ e $5,857\%$ (Tabela 31), mostrando diferenças de menos de 1% na abundância de ^{15}N entre as três plantas controle, indicando que estas espécies absorveram quantidades de N do solo oriundas de compartimentos similares, e que houve apenas uma pequena variação temporal ou espacial na abundância de ^{15}N do solo.

No experimento de 2011, na 1ª coleta, os valores de $\delta^{15}\text{N}$ encontrados nas folhas das três cultivares avaliadas, foram bem elevados, acima de 6% , e portanto, maiores do que os deltas encontrados nas três espécies controle, e por consequência a FBN neste tecido não pôde ser estimada.

Os tecidos do caule tiveram deltas variando de $3,580\%$ a $4,084\%$, diferindo em mais de 1% das plantas controle, e portanto oferecendo boas condições de se detectar contribuições da FBN. A menor quantidade de N oriundo da FBN no caule, foi encontrado na cultivar Radiante, com $0,12\text{ g N m}^{-2}$, cerca de 21% do N-total da folha, os deltas das cultivares Grafite e Ouro Negro, na 1ª coleta, foram muito próximos, assim como as contribuições da FBN e quantidade de N no caule, sendo $0,28\text{ g N m}^{-2}$ na cultivar Grafite e $0,30\text{ g N m}^{-2}$ na cultivar Ouro Negro, equivalentes a $27,4\%$ e $29,3\%$, do N-total do caules destas cultivares respectivamente (Tabela 31).

Tabela 31. Contribuição do nitrogênio derivado da fixação atmosférica (%Ndfa) e quantidade de N fixado através da FBN, na folha, no caule, e na vagem de cultivares de feijoeiro inoculado com *Rhizobium*, em experimento de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.

Genótipo	Tecido	$\delta^{15}\text{N}/14\text{N}$	%Ndfa	FBN (g N m ⁻²)	%Ndfa	FBN (g N m ⁻²)
			Valor B = -2,0		Valor B = -1,2	
Floração plena						
Radiante	Folha	6,432	< 0	n.d.	< 0	n.d.
	Caule	4,084	19,56	0,10	21,9	0,12
Grafite	Folha	6,197	< 0	n.d.	< 0	n.d.
	Caule	3,710	24,50	0,25	27,4	0,28
Ouro Negro	Folha	6,238	< 0	n.d.	< 0	n.d.
	Caule	3,580	26,22	0,27	29,3	0,30
Plantas Controle						
NORH-54	parte aérea	5,207	---	---	---	---
Milho	parte aérea	5,799	---	---	---	---
Braquiária	parte aérea	5,686	---	---	---	---
Dois semanas após floração						
Radiante	Folha	6,993	< 0	n.d.	< 0	n.d.
	Caule	3,917	21,77	0,05	24,3	0,06
	Vagem	5,678	< 0	n.d.	< 0	n.d.
Grafite	Folha	5,845	< 0	n.d.	< 0	n.d.
	Caule	2,234	44,02	0,23	49,2	0,26
	Vagem	4,652	12,05	0,37	13,5	0,41
Ouro Negro	Folha	5,434	1,71	0,04	1,92	0,05
	Caule	1,694	51,16	0,21	57,2	0,23
	Vagem	3,665	25,10	1,29	28,1	1,44
Plantas Controle						
NORH-54	parte aérea	5,058	---	---	---	---
Milho	parte aérea	5,857	---	---	---	---
Braquiária	parte aérea	5,110	---	---	---	---

n.d.: não determinado.

Na 2ª coleta, os $\delta^{15}\text{N}$ das folhas das cultivares Radiante e Grafite continuaram elevados, > 5,8‰ e a contribuição da FBN nesse tecido novamente não pode ser calculada para estas cultivares, enquanto que na cultivar Ouro Negro pôde-se detectar uma contribuição muito pequena da FBN de apenas 1,92%, equivalente a 0,05 g m⁻² de N da FBN (Tabela 31). Nos caules, as contribuições da FBN aumentaram da 1ª para a 2ª coleta em todas as cultivares, passando de 29% para 57% na cultivar Ouro Negro (Tabela 31). No entanto, a quantidade de N oriunda da FBN reduziu de uma coleta para outra em todas as cultivares (Tabela 31),

seguindo a mesma tendência do observado para o N-total, reforçando a hipótese de que ocorreu translocação deste tecido provavelmente para o enchimento de vagens. As vagens da cultivar Radiante apresentaram $\delta^{15}\text{N}$ acima da média observada nas plantas controle, e portanto a contribuição da FBN nas vagens desta cultivar não pode ser detectada (Tabela 31). A quantidade de N e a contribuição da FBN nas vagens da cultivar Ouro Negro foram de $1,44 \text{ g N m}^{-2}$, equivalente a 28% do N da vagem, o dobro da participação da FBN no N da vagem da cultivar Grafite, que foi de 13,5% correspondendo a $0,41 \text{ g N m}^{-2}$ (Tabela 31).

No experimento em 2012, a parte aérea das plantas controle, na 1ª coleta apresentou valores menos positivos de $\delta^{15}\text{N}$ do que do experimento em 2011, e que variaram entre 3,449 e 4,723 ‰ (Tabela 32).

Apenas a cultivar Radiante não pôde ter detectado contribuições da FBN para o N das folhas, haja vista o $\delta^{15}\text{N}$ desta cultivar ter sido de 4,9‰, e portanto acima do $\delta^{15}\text{N}$ encontrado nas plantas controle de 4,7‰ (Tabela 32). A cultivar Grafite apresentou a maior contribuição (21,3%) e a maior quantidade de FBN (0,93) nas folhas, na 1ª coleta (Tabela 32). Os caules foram os tecidos com as maiores contribuições da FBN, na 1ª coleta variando de 30,9% a 46,3%, o que equivale às quantidades de $0,14$ a $0,39 \text{ g m}^{-2}$, nas cultivares Radiante e Grafite respectivamente (Tabela 32).

Na 2ª coleta, a parte aérea das plantas controle que cresceram no mesmo solo que o feijoeiro, apresentou valores positivos de $\delta^{15}\text{N}$, que variaram entre 4,496 e 5,173‰ (Tabela 32), mostrando diferenças de menos de 1‰ na abundância de ^{15}N entre as três plantas controle, indicando que estas espécies absorveram quantidades de N do solo oriundas de compartimentos similares, e que houve apenas uma pequena variação temporal ou espacial na abundância de ^{15}N do solo, porém o $\delta^{15}\text{N}$ da folha da cultivar Radiante foi de 5,3‰ e por isso, para ela não foi encontrada contribuição da FBN nesse tecido (Tabela 32). As quantidades de N derivadas da FBN e as respectivas contribuições da FBN, de modo geral, aumentaram, da 1ª para a 2ª coleta, nos tecidos da folha e do caule (Tabela 32), acompanhando a mesma tendência dos acúmulos de N, observados em 2012 (Tabelas 23 e 24). A contribuição da FBN na folha da cultivar Ouro Negro passou de 13% para 24,9% da 1ª para a 2ª coleta (Tabela 32). Para o N do caule, a contribuição da FBN, na cultivar Ouro Negro, foi de 35%, para 46% da 1ª para a 2ª coleta (Tabela 32). No entanto, mesmo com os aumentos de contribuição da FBN e de quantidade de N na folha e no caule da cultivar Ouro Negro, não foi detectado quantidades significativas de N derivado da FBN nas vagens dessa cultivar, já que o $\delta^{15}\text{N}$ desse tecido foi de 5,099, ficando acima da média dos $\delta^{15}\text{N}$ das plantas controle (Tabela 32), o que pode ser um indicativo de que a cultivar Ouro Negro até duas semanas após a sua floração plena, ainda não havia começado a remobilização de N da FBN de outros tecidos para as vagens, e que a sua eficiência em remobilizar esse N, nas fases depois de duas semanas após a floração é bastante alta, visto que foi esta cultivar que apresentou a maior quantidade e a maior contribuição de N da FBN, em 2012 (Tabela 32). As contribuições da FBN nas vagens, até duas semanas após a floração, foram de 3,6%, na cultivar Radiante, e de 10,7% na cultivar Grafite (Tabela 32).

As quantidades de N derivado da FBN, até duas semanas após a floração, no presente trabalho, foram muito pequenas, em todos os tecidos e em todas as cultivares. Essa condição pode ser justificada, pelo fato de que as contribuições da FBN em feijoeiro, começam a se intensificar posteriormente ao período médio de enchimento de vagens (HUNGRIA et al., 1985; KUMARASINGHE et al., 1992), o que pode explicar o fato de nessa fase as quantidades de N da FBN serem ínfimas, porém quando são avaliados os grãos, consegue-se detectar com maior facilidade as contribuições da FBN, que chegaram a alcançar 49% do N do grão (Tabela 36).

Tabela 32. Contribuição do nitrogênio derivado da fixação atmosférica (%Ndfa) e quantidade de N fixado através da FBN, na folha, no caule, e na vagem de cultivares de feijoeiro inoculado com *Rhizobium*, em experimento de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.

Genótipo	Tecido	$\delta^{15}\text{N}/14\text{N}$	%Ndfa	FBN (g N m ⁻²)	%Ndfa	FBN (g N m ⁻²)
			Valor B = -2,0		Valor B = -1,2	
Floração plena						
Radiante	folha	4,966	< 0	n.d.	< 0	n.d.
	caule	2,594	26,96	0,12	30,9	0,14
Grafite	folha	3,121	18,58	0,81	21,3	0,93
	caule	1,730	40,70	0,34	46,3	0,39
Ouro Negro	folha	3,578	11,33	0,44	13,0	0,50
	caule	2,367	30,57	0,20	35,0	0,23
Plantas Controle						
NORH-54	parte aérea	4,700	---	---	---	---
Arroz	parte aérea	3,449	---	---	---	---
Trapoeraba	parte aérea	4,723	---	---	---	---
Dois semanas após floração						
Radiante	folha	5,328	< 0	n.d.	< 0	n.d.
	caule	2,479	26,96	0,12	39,0	0,22
	vagem	4,612	3,62	0,06	3,6	0,06
Grafite	folha	3,548	18,58	0,81	21,3	0,95
	caule	2,201	40,70	0,34	43,6	0,44
	vagem	4,184	10,73	0,59	10,7	0,59
Ouro Negro	folha	3,327	11,33	0,44	24,9	0,93
	caule	2,059	30,57	0,20	46,0	0,28
	vagem	5,099	< 0	n.d.	< 0	n.d.
Plantas Controle						
NORH-54	parte aérea	4,823	---	---	---	---
Arroz	parte aérea	4,496	---	---	---	---
Trapoeraba	parte aérea	5,173	---	---	---	---

n.d.: não determinado.

Para a apresentação dos resultados de contribuição e quantidade de N oriunda da FBN na parte aérea das cultivares de feijão, foi feita a média ponderada dos tecidos de caule e folha, na 1ª coleta e de caule, folha e vagens, na 2ª coleta, para que se guardasse as devidas proporções da participação de cada tecido na constituição final do N da FBN na parte aérea.

No experimento de 2011, tanto na 1ª quanto na 2ª coleta, os maiores valores de $\delta^{15}\text{N}$ na parte aérea, foram encontrados na cultivar Radiante, que foram inclusive maiores do que os

deltas encontrados nas três espécies controle, e por consequência a FBN desta cultivar, até o período de duas semanas após a floração plena, não pôde ser estimada. Os deltas das cultivares Grafite e Ouro Negro, na 1ª coleta, foram muito semelhantes, assim como as respectivas contribuições da FBN e acúmulo de N na parte aérea (Tabela 33).

Tabela 33. Contribuição do nitrogênio derivado da fixação atmosférica (%Ndfa) e quantidade de N fixado através da FBN, na parte aérea de cultivares de feijoeiro inoculado com *Rhizobium*, em experimento de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.

Cultivar	Tecido	$\delta^{15}\text{N}/14\text{N}$	%Ndfa		FBN (g N m ⁻²)	
			Valor B = -2,0	Valor B = -1,2	Floração plena	
Radiante	Parte aérea	5,838	< 0	n.d.	< 0	n.d.
Grafite	Parte aérea	5,467	1,3	0,05	1,4	0,05
Ouro Negro	Parte aérea	5,452	1,5	0,05	1,6	0,06
Plantas Controle						
NORH-54	parte aérea	5,207	---	---	---	---
Milho	parte aérea	5,799	---	---	---	---
Braquiária	parte aérea	5,686	---	---	---	---
Duas semanas após floração						
Radiante	Parte aérea	5,957	< 0	n.d.	< 0	n.d.
Grafite	Parte aérea	5,005	7,4	0,49	8,3	0,54
Ouro Negro	Parte aérea	4,107	19,3	1,52	21,5	1,70
Plantas Controle						
NORH-54	Parte aérea	5,058	---	---	---	---
Milho	Parte aérea	5,857	---	---	---	---
Braquiária	Parte aérea	5,110	---	---	---	---

n.d.: não determinado.

As cultivares fixaram de 0,05 a 0,06 g m⁻² de N, com %Ndfa que variou de 1,4 a 1,6% na 1ª coleta, respectivamente, para Grafite e Ouro Negro (Tabela 33). Na 2ª coleta, a contribuição da FBN aumentou, assim como as diferenças entre as cultivares Grafite e Ouro Negro (Tabela 33). O acúmulo de N na 2ª coleta na cultivar Grafite foi de 0,54 g N m⁻² e na cultivar Ouro Negro foi de 1,70 g N m⁻², com %Ndfa de 8,3% e de 21,5%, respectivamente (Tabela 33). A diferença na contribuição da FBN, na 2ª coleta, entre Ouro Negro e Grafite, foi superior a 10% (Tabela 33).

As quantidades de N fixado e as contribuições da FBN na parte aérea aumentaram em 2012 em relação a 2011. Mesmo assim, o $\delta^{15}\text{N}$ da cultivar Radiante, na 1ª coleta, foi superior ao $\delta^{15}\text{N}$ médio das plantas controle, e novamente a FBN para esta cultivar não pôde ser estimada durante a floração plena (Tabela 34). A diferença entre deltas das cultivares Grafite e Ouro Negro, na 1ª coleta foram bem mais aparentes, com superioridade da cultivar Grafite, que acumulou 1,32 g m⁻² de N oriundo da FBN na parte aérea, enquanto a cultivar Ouro Negro apenas 0,74 g m⁻², o que correspondeu a %Ndfa de 25,4 e 16,2%,

respectivamente (Tabela 34). Na 2ª coleta, a cultivar Grafite acumulou 2,12 g m⁻² de N oriundo da FBN, com %Ndfa de 19,3%, a cultivar Ouro Negro acumulou 1,08 g N m⁻², com %Ndfa de 16,4% (Tabela 34). A cultivar Radiante começou a apresentar participação da FBN na 2ª coleta, embora bastante modesta, com 0,08 g m⁻² de N na parte aérea oriundo da FBN e %Ndfa de 2,0% (Tabela 34).

Tabela 34. Contribuição do nitrogênio derivado da fixação atmosférica (%Ndfa) e quantidade de N fixado através da FBN, na parte aérea de cultivares de feijoeiro inoculado com *Rhizobium*, em experimento de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.

Cultivar	Tecido	δ 15N/14N	%Ndfa	FBN (g N m ⁻²)	%Ndfa	FBN (g N m ⁻²)
			Valor B = -2,0		Valor B = -1,2	
Floração plena						
Radiante	Parte aérea	4,490	< 0	n.d.	< 0	n.d.
Grafite	Parte aérea	2,896	22,2	1,16	25,4	1,32
Ouro Negro	Parte aérea	3,400	14,2	0,64	16,2	0,74
Plantas controle						
NORH-54	Parte aérea	4,700	---	---	---	---
Arroz	Parte aérea	3,449	---	---	---	---
Trapoeraba.	Parte aérea	4,723	---	---	---	---
Duas semanas após floração plena						
Radiante	Parte aérea	4,713	1,7	0,07	2,0	0,08
Grafite	Parte aérea	3,668	17,0	1,87	19,3	2,12
Ouro Negro	Parte aérea	3,841	14,5	0,95	16,4	1,08
Plantas controle						
NORH-54	Parte aérea	4,823	---	---	---	---
Arroz	Parte aérea	4,496	---	---	---	---
Trapoeraba	Parte aérea	5,173	---	---	---	---

n.d.: não determinado.

Em 2011, a quantidade de N oriundo da FBN na palha dos caules variou de 0,16 a 0,35 g m⁻² nas cultivares Radiante e Vereda, respectivamente (Tabela 35). O acúmulo de N oriundo da FBN na palha das vagens variou de 0,08 a 0,15 g m⁻² nas cultivares Grafite e Pontal, respectivamente (Tabela 35). As contribuições da FBN para estes tecidos variaram de 54 a 35%, na palha do caule, nas cultivares Estilo e Grafite, respectivamente, e a variação na palha da vagem foi de 36% na cultivar Grafite, a 60%, nas cultivares Estilo e Vereda (Tabela 35). A quantidade de N na parte aérea oriundo da FBN, na maturação das cultivares de feijoeiro (palhada de caule e vagem + grão), variou de 0,93g m⁻² na cultivar Marfim, a 1,93 g m⁻² na cultivar Ouro Negro (Tabela 35).

Em 2011, o acúmulo de N derivado da FBN nos grãos das oito cultivares variou de 0,58 g m⁻² a 1,64 g m⁻² e as contribuições da FBN variaram de 17% a 33%. As cultivares com hábito tipo III e de porte prostrado ou semi-prostrado (Vereda, Pontal e Ouro Negro) foram as que acumularam mais N oriundo da FBN nos grãos, sendo as únicas a acumularem mais de 10

kg ha⁻¹ (1,0 g m⁻²) de N nos grãos (Tabela 35). Ouro Negro e Vereda também foram as cultivares com as maiores contribuições da FBN para o N dos grãos, com 33,3% e 32,9%, respectivamente. A cultivar com o menor acúmulo de N no grão e a menor %Ndfa, foi a cultivar Marfim (Tabela 35), que possui hábito de crescimento do tipo intermediário II / III, porte de planta semi-ereto e ciclo semi-precoce (Tabela 1). A cultivar Radiante, que em 2011 apresentou resultados pouco satisfatórios em parâmetros como número de nódulos (Tabela 14) e massa seca de nódulo (Tabela 15), acúmulo de N na parte aérea (Tabela 26) e no grão (Tabela 28), e quantidade de N oriundo da FBN e %Ndfa na parte aérea (Tabela 33), ficou em uma posição intermediária entre as cultivares, quanto ao acúmulo de N e a %Ndfa nos grãos. Esta cultivar acumulou 0,82 g m⁻² de N nos grãos, o que correspondeu a uma %Ndfa de 24,8% (Tabela 35). Já a cultivar Grafite, que em 2011, apresentou bons resultados nos mesmos parâmetros citados acima para Radiante, não teve um bom desempenho e foi uma das cultivares com o menor acúmulo de N no grão oriundo da FBN e %Ndfa, com apenas 0,77 g m⁻² de N em seus grãos, correspondendo a uma %Ndfa de 18,4% (Tabela 35).

Ao se determinar a razão entre o conteúdo de N nos grãos pelo conteúdo de N na parte aérea, oriundos da FBN, pode-se estimar um índice de colheita de N para a FBN (N_{fix}) e assim temos uma indicação da eficiência de translocação do N oriundo da FBN, em cada cultivar.

Tabela 35. Contribuição do nitrogênio derivado da fixação atmosférica (%Ndfa) e quantidade de N fixado através da FBN, na palhada do caule, na palhada da vagem, e nos grãos de cultivares de feijoeiro inoculado com *Rhizobium*, em experimento de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.

Cultivar	Tecido	δ 15N/14N	%Ndfa	FBN (g N m ⁻²)	%Ndfa	FBN (g N m ⁻²)
			Valor B = -2,0		Valor B = -1,2	
Radiante	Grãos	3,719	22,11	0,73	24,8	0,82
	Caule	2,324	41,11	0,14	46,1	0,16
	Vagem	2,014	45,33	0,11	50,9	0,12
	Parte aérea	---	---	0,98	---	1,11
Jalo Precoce	Grãos	4,049	17,61	0,64	19,8	0,72
	Caule	2,595	37,41	0,18	42,0	0,20
	Vagem	2,625	37,00	0,09	41,5	0,10
	Parte aérea	---	---	0,91	---	1,02
Estilo	Grãos	3,555	24,34	0,84	27,3	0,94
	Caule	1,804	48,18	0,23	54,1	0,26
	Vagem	1,379	53,97	0,11	60,6	0,12
	Parte aérea	---	---	1,18	---	1,32
Grafite	Grãos	4,138	16,39	0,69	18,4	0,77
	Caule	3,033	31,44	0,26	35,3	0,29
	Vagem	2,971	32,29	0,07	36,2	0,08
	Parte aérea	---	---	1,02	---	1,14

Continua...

Continuação da Tabela 35.

Cultivar	Tecido	δ 15N/14N	%Ndfa	FBN (g N m ⁻²)	%Ndfa	FBN (g N m ⁻²)
			Valor B = -2,0		Valor B = -1,2	
Marfim	Grãos	4,236	15,06	0,51	16,9	0,58
	Caule	2,648	36,69	0,22	41,2	0,25
	Vagem	2,456	39,31	0,09	44,1	0,10
	Parte aérea	---	---	0,83	---	0,93
Ouro Negro	Grãos	3,165	29,64	1,46	33,3	1,64
	Caule	2,001	45,50	0,15	51,1	0,17
	Vagem	1,641	50,40	0,11	56,6	0,13
	Parte aérea	---	---	1,72	---	1,93
Pontal	Grãos	3,648	22,68	1,03	25,5	1,15
	Caule	2,676	36,31	0,20	40,8	0,22
	Vagem	2,489	38,86	0,13	43,6	0,15
	Parte aérea	---	---	1,35	---	1,52
Vereda	Grãos	3,190	29,31	0,95	32,9	1,07
	Caule	2,141	43,59	0,31	48,9	0,35
	Vagem	1,419	53,44	0,09	60,0	0,10
	Parte aérea	---	---	1,35	---	1,51
Plantas Controle						
NORH-54	Parte aérea	5,058	---	---	---	---
Milho	Parte aérea	5,857	---	---	---	---
Braquiária	Parte aérea	5,110	---	---	---	---

Obs.: dados de caule e vagem correspondem à palhada após trilhagem dos grãos.

Dentre todas as cultivares, a única cujo índice de colheita de N_{fix} esteve acima de 800 mg g^{-1} , foi a cultivar Ouro Negro (850 mg g^{-1}), ao passo que as únicas cultivares com índices de colheita de N_{fix} abaixo de 600 mg g^{-1} foram justamente as cultivares Marfim (624 mg g^{-1}) e Grafite (675 mg g^{-1}), indicando que a capacidade de translocação de N derivado da FBN da cultivar Ouro Negro foi superior às demais cultivares. PEÑA-CABRIALES et al. (1993) encontraram, para duas cultivares de feijoeiro, um índice de colheita de N para FBN de 935 mg g^{-1} na cultivar mais eficiente, e 604 mg g^{-1} na cultivar menos eficiente em translocar o N da FBN para os grãos, medida através da diluição isotópica de ^{15}N .

Em 2012, o maior acúmulo de N oriundo da FBN na palha dos caules estava na cultivar Grafite com $0,42 \text{ g m}^{-2}$, superior que Ouro Negro e Radiante, porém a variação na %Ndfa foi pequena, de 51,9% em Radiante a 48,4% em Ouro Negro (Tabela 36). A %Ndfa para a palha da vagem foi bastante elevada em 2012, ficando acima dos 80% em todas as cultivares, e a maior quantidade de N oriundo da FBN estava na cultivar Ouro Negro com $0,41 \text{ g m}^{-2}$, e a menor, na cultivar Radiante com $0,25 \text{ g m}^{-2}$ (Tabela 36). O acúmulo de N na parte aérea na maturação das cultivares de feijoeiro (palhada de caule e vagem + grão), em

2012, foi de 7,53 g m⁻² na cultivar Ouro Negro, 4,67 g m⁻² na cultivar Grafite, e 2,63 g m⁻² na cultivar Radiante (Tabela 36).

Em 2012, a quantidade de N fixado nos grãos foi muito maior do que em 2011. A maior proporção da FBN foi encontrada nos grãos da cultivar Ouro Negro, que apresentou o menor $\delta^{15}\text{N}$ (1,884‰), inferior ao $\delta^{15}\text{N}$ das plantas controle e das cultivares Grafite e Radiante (Tabela 36). A cultivar Ouro Negro acumulou nos grãos 6,84 g m⁻² oriundos da FBN, correspondendo a 48,9% do N do grão (Tabela 36). A cultivar Grafite acumulou 3,87 g m⁻² de N oriundo da FBN, que correspondeu a 28,6% do N do grão, enquanto a cultivar Radiante acumulou 2,16 g m⁻² de N da FBN, que correspondeu a 32,1% do N do grão (Tabela 36).

Tabela 36. Contribuição do nitrogênio derivado da fixação atmosférica (%Ndfa) e quantidade de N fixado através da FBN, na palhada do caule, na palhada da vagem, e nos grãos de cultivares de feijoeiro inoculado com *Rhizobium*, em experimento de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.

Cultivar	Tecido	$\delta^{15}\text{N}/14\text{N}$	%Ndfa	FBN (g N m ⁻²)	%Ndfa	FBN (g N m ⁻²)
			Valor B = -2,0	Valor B = -1,2	Valor B = -2,0	Valor B = -1,2
Radiante	Grãos	2,898	28,29	1,90	32,1	2,16
	Caule	1,700	25,25	0,20	51,9	0,23
	Vagem	-0,330	43,14	0,22	85,6	0,25
	Parte aérea	---	---	2,33	---	2,63
Grafite	Grãos	3,106	25,25	3,42	28,6	3,87
	Caule	1,755	45,02	0,37	51,0	0,42
	Vagem	1,911	71,73	0,25	81,2	0,39
	Parte aérea	---	---	4,13	---	4,67
Ouro Negro	Grãos	1,884	43,14	6,04	48,9	6,84
	Caule	1,911	42,75	0,25	48,4	0,29
	Vagem	-1,275	89,38	0,36	100	0,41
	Parte aérea	---	---	6,65	---	7,53
Plantas Controle						
NORH-54	Parte aérea	4,823	---	---	---	---
Arroz	Parte aérea	4,496	---	---	---	---
Trapoeira	Parte aérea	5,173	---	---	---	---

Obs.: dados de caule e vagem correspondem à palhada após trilhagem dos grãos.

São variáveis os valores de contribuição e acúmulos de N oriundos da FBN, em cultivares de feijoeiro. Os dados do presente trabalho corroboram algumas estimativas anteriores, efetuadas em feijoeiro em condições de campo, através da técnica da diluição isotópica de ¹⁵N, que mostram quantidades de N oriundas da FBN variando de 9 a 43 kg ha⁻¹ nos grãos, em 17 cultivares (PEREIRA et al., 1989). No entanto, DUQUE et al. (1985), ao avaliarem quatro cultivares de feijoeiro (três de tipo II e uma de tipo III) no período de enchimento de vagens, encontraram quantidades de N oriundo da FBN da ordem de 18,4 a

31,7 kg ha⁻¹, porém em apenas duas cultivares (Carioca, tipo III e Negro Argel, tipo II), enquanto as outras duas cultivares apresentaram acúmulos insignificantes de N da FBN. Em condições de casa de vegetação o cenário é diferente e as contribuições da FBN aumentam muito. Em trabalhos mais recentes, utilizando a diluição isotópica, RONDON et al. (2007) estudaram os reflexos da aplicação de bio-char sobre a FBN em feijoeiro variedade BAT 477 na maturidade fisiológica, e encontraram contribuição da FBN que passou de 50% para 72% de N oriundo da FBN, quando da aplicação de 90 kg ha⁻¹ de bio-char. Este resultado é bastante semelhante ao de BRITO et al. (2011), que encontraram contribuições na cultivar Carioca de 55% a 71%, muito próximo dos 75% encontrados por FRANZINI et al. (2013) na média da 25 genótipos avaliados, entre eles, cinco dos mesmos genótipos avaliados no presente estudo (Pontal, Vereda, Ouro Negro, Jalo Precoce e Grafite).

São escassos e contraditórios os trabalhos que quantificaram a FBN em feijoeiro através da técnica da abundância natural de ¹⁵N, em condições de campo. RENNIE & KEMP (1983a) encontraram contribuições da FBN variando de 32 a 50%, correspondendo a 37 e 70 kg N ha⁻¹, nos grãos em duas cultivares, determinadas por diluição isotópica a níveis da abundância natural de ¹⁵N, enquanto TSAI et al. (1993), avaliando 31 genótipos consorciados com milho, e tendo o trigo como planta controle, observaram contribuições da FBN na maturidade fisiológica variando de 50% a 60%. No entanto, estes trabalhos, com mais de 20 anos, foram pioneiros com a técnica da abundância de ¹⁵N em feijoeiro, e na época não atentavam para a necessidade de se levar em consideração o valor do fracionamento isotópico que ocorre no interior das plantas, e, portanto esses autores não utilizaram nenhum valor B para os cálculos da contribuição da FBN, o que pode diminuir a confiabilidade destes trabalhos à luz dos conhecimentos atuais. Um trabalho mais recente foi realizado por KIMURA et al. (2004) em experimento de campo com feijoeiro no Japão, utilizando o trigo como planta controle e valor B de -0,482‰, com uma contribuição da FBN na maturidade fisiológica bem modesta, da ordem de 4 kg ha⁻¹ de N oriundo da FBN. No entanto, deve-se considerar que estes autores utilizaram apenas uma cultivar de feijão, com hábito de crescimento determinado, além de não terem feito a inoculação das sementes com alguma estirpe selecionada de rizóbio, deixando que a infecção ocorresse naturalmente através das estirpes nativas do solo da área. Portanto, identifica-se uma necessidade da utilização da técnica da abundância natural de ¹⁵N em *P. vulgaris*, de modo a fornecer informações sobre as peculiaridades da técnica, em especial em culturas cuja contribuição da FBN não é das maiores.

Considera-se que quando a FBN quando está abaixo de 50%, o valor B tem pouca influência sobre o cálculo da %Ndfa (UNKOVICH et al., 2008). O que se observou no presente trabalho, foi uma pequena influência do valor B quando as avaliações foram feitas até duas semanas após a floração, onde as contribuições da FBN eram muito baixas a diferença entre valores de B não se expressaram, no entanto, quando as avaliações foram realizadas nos grãos, onde as contribuições da FBN para a cultura foram as maiores, a influência do valor B foi mais notada chegando a haver uma diferença de 7% na estimativa da contribuição nos grãos da cultivar Ouro Negro, quando se usou o valor B de -2,0‰, em comparação ao valor B de -1,2‰ (Tabela 36). Portanto, a técnica da abundância natural de ¹⁵N tem grande aplicabilidade em estudos para identificar potenciais de FBN em cultivares de feijoeiro, desde que se atente para épocas de amostragem mais adequadas, preferencialmente na maturidade fisiológica das plantas.

4.6. CONCLUSÕES

Nos experimentos de campo nos anos de 2011 e 2012, a aplicação de 90 kg ha⁻¹ de N mineral, na cultura do feijoeiro, promoveu maior produção de biomassa de parte aérea e de raiz, maior produção de grãos e maior acúmulo de N na biomassa e no grão, do que o tratamento com inoculação com estirpes comerciais de rizóbio.

No ano de 2011, a cultivar Ouro Negro, com hábito de crescimento tipo III, arquitetura semi-prostrada e ciclo normal, apresentou o maior número e massa de nódulos, com aumento da nodulação e do acúmulo de N na parte aérea, até a terceira semana após a floração. A cultivar Ouro Negro obteve o maior rendimento de grãos sob inoculação, alcançando 73% do rendimento obtido com a aplicação de 90 kg ha⁻¹ de N mineral. O acúmulo de N derivado da FBN nos grãos das oito cultivares variou entre 0,58 g m⁻² e 1,64 g m⁻², que correspondeu a 17% e 33% de contribuição da FBN nas cultivares Marfim e Ouro Negro respectivamente.

No ano de 2012, as cultivares Vereda e Estilo tiveram a maior nodulação, e a cultivar Vereda acumulou mais N na parte aérea e no grão dentre todas as cultivares avaliadas. A inoculação com rizóbio proporcionou rendimento de grãos equivalente a 84% do rendimento obtido com a aplicação de 90 kg ha⁻¹ de N mineral. O acúmulo de N nos grãos derivado da FBN foi de 3,87 g m⁻² na cultivar Grafite, 2,16 g m⁻² na cultivar Radiante, e 6,84 g m⁻² na cultivar Ouro Negro, que correspondeu a 29, 32 e 49% de contribuição da FBN, respectivamente.

5. CONCLUSÕES GERAIS

A aplicação de 90 kg ha⁻¹ de N mineral, na cultura do feijoeiro, promoveu maior produção de biomassa de parte aérea e de raiz, maior produção de grãos e maior acúmulo de N na biomassa e no grão, do que o tratamento com inoculação com estirpes comerciais de rizóbio.

A inoculação com rizóbio proporcionou rendimento de grãos que alcançou 84% do rendimento obtido com a aplicação de 90 kg ha⁻¹ de N mineral.

O acúmulo de N derivado da FBN nos grãos das oito cultivares variou de 17% a 49% de contribuição da FBN nas cultivares Marfim e Ouro Negro respectivamente.

A técnica da abundância natural de ¹⁵N possibilita a identificação do potencial de FBN para o fornecimento de N em diferentes genótipos de feijoeiro, e mostra-se como uma opção de ferramenta capaz de fornecer subsídios para orientar os programas de melhoramento da espécie, visando aumentar a eficiência da FBN.

A técnica mostrou-se fortemente influenciada pela época de amostragem, de modo que se recomenda que as avaliações sejam feitas em estádios mais tardios do ciclo da cultura, preferencialmente a partir do período correspondente à metade do enchimento de vagem até a maturação dos grãos, nesta fase os deltas são mais ampliados, a contribuição da FBN é maior, e é onde se encontra a maior quantidade de N derivado da FBN, aumentando assim a sensibilidade e a precisão do método.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inclusão da FBN nos programas de melhoramento do feijoeiro é dificultada pela ausência de marcadores, sejam estes fenotípicos ou genotípicos, para seleção de plantas com maior potencial para FBN. Tradicionalmente, a identificação de plantas com uma simbiose eficiente é realizada pela escavação do solo e pela pesagem dos nódulos, contudo, essa é uma atividade laboriosa e pouco produtiva, pois poucas plantas podem ser coletadas de forma eficiente e muitos nódulos são perdidos nesse processo, inviabilizando a utilização dessa prática em programas de seleção de cultivares, que é um processo dinâmico onde centenas de linhagens são avaliadas em um curto espaço de tempo. Deste modo, os métodos de avaliação da FBN utilizados devem estar voltados para o exame da parte aérea, e principalmente no grão, órgão de fácil acesso na planta e onde são maiores os acúmulos de N derivados da FBN.

A utilização da abundância natural de ^{15}N na quantificação da FBN em condições de campo, em diferentes cultivares de feijoeiro, é uma abordagem inédita para a cultura. A possibilidade de identificação do potencial de FBN para o fornecimento de N em diferentes genótipos de feijoeiro, estimada pela análise da abundância natural de ^{15}N nos grãos, mostra-se uma ferramenta promissora em fornecer subsídios para orientar os programas de melhoramento da espécie, visando aumentar a eficiência da FBN. A estimativa do potencial da FBN através da avaliação da abundância natural de ^{15}N nos grãos possibilita a inserção desta metodologia em avaliações de populações segregantes e em progênies em programas de melhoramento, além de propiciar a avaliação de um grande número de materiais em diferentes condições ambientais.

Neste sentido, recomenda-se a utilização da técnica da abundância natural de ^{15}N , na quantificação da FBN de genótipos de feijoeiro com diferentes hábitos de crescimento, arquitetura de planta e duração de ciclo, o que permitiria uma avaliação mais precisa da possibilidade da inserção da FBN nos programas de melhoramento do feijoeiro, obtendo-se uma indicação se o potencial para FBN nessa cultura está extrinsecamente associado a materiais de ciclo mais longo e de hábito de crescimento indeterminado, ou se é possível progressos na contribuição da FBN em materiais precoces e de crescimento determinado, características estas buscadas nos atuais programas de melhoramento do feijoeiro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRECHT, J.C.; CARVALHO, W.P. BRS Pontal: cultivar de feijão comum com tipo de grão carioca com alto potencial produtivo no Distrito Federal e em Goiás. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2006. 2p. (Embrapa Cerrados. Comunicado Técnico, 125).

ALBRECHT, J.C.; CARVALHO, W.P. BRS Vereda: nova cultivar de feijoeiro comum do grupo comercial rosinha para o Distrito Federal. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003. 3p. (Embrapa Cerrados. Comunicado Técnico, 95).

AMARGER, N.; MARIOTTI, A.; MARIOTTI, F.; DURR, J.C.; BOURGUIGNON, C.; LAGACHERIE, B. Estimate of symbiotic fixed nitrogen in field grown soybean using variations in ¹⁵N natural abundance. *Plant and Soil*, v.52, p.269-280, 1979.

ARAÚJO, A.P.; DEL PIN, B.; TEIXEIRA, M.G. Nitrogen and phosphorus in senescent leaves of field-grown common bean cultivars and their contribution to crop nutrient budget. *Field Crops Research*, v.127, p.35-43, 2012.

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, A.P.; TEIXEIRA, M.G. Nitrogen and phosphorus harvest indices of common bean cultivars: implications for yield quantity and quality. *Plant and Soil*, v.257, n.2., p.425-433, 2003.

ARAÚJO, A.P.; TEIXEIRA, M.G. Relationships between grain yield and accumulation of biomass, nitrogen and phosphorus in common bean cultivars. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.32, p.1977-1986, 2008.

ARAÚJO, A.P.; TEIXEIRA, M.G. Variabilidade dos índices de colheita de nutrientes em genótipos de feijoeiro e sua relação com a produção de grãos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.36, p.137-146, 2012.

ARAÚJO, A.P.; TEIXEIRA, M.G.; ALMEIDA, D.L. Growth and yield of common bean cultivars at two soil phosphorus levels under biological nitrogen fixation. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.35, n.4, p.809-817, 2000.

ARAÚJO, A.P.; TEIXEIRA, M.G.; ALMEIDA, D.L. Variability of traits associated with phosphorus efficiency in wild and cultivated genotypes of common bean. *Plant and Soil*, v.203, n.2, p.173-182, 1998.

ARAÚJO, F.F.; CARMONA, F.G.; TIRITAN, 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.535-540, 2007.

ARNOLD, S.L.; SCHEPERS, J.S. A simple roller-mill grinding procedure for plant and soil samples. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v.35, p.537-545, 2004.

BARRADAS, C.A.; BODDEY, L.H.; HUNGRIA, M. Seleção de cultivares de feijão e estirpes de *Rhizobium* para nodulação precoce e senescência tardia dos nódulos. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v.13, p.169-179, 1989.

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

BAUER, W.D. Infection of legumes by rhizobia. Annual Review of Plant Physiology, v.32, p.407-449, 1981.

BELANE, A.K.; DAKORA, F.D. Symbiotic N₂ fixation in 30 field-grown cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) genotypes in the Upper West Region of Ghana measured using ¹⁵N natural abundance. Biology and Fertility of Soils, v.46, p.191-198, 2010.

BERGERSEN, F.J.; BROCKWELL, J.; GAULT, R.R.; MORTHORPE, L.; PEOPLES, M.B.; TURNER, G.L. Effects of available soil nitrogen and rates of inoculation on nitrogen fixation by irrigated soybeans and evaluation of ¹⁵N methods for measurement. Australian Journal of Agricultural Research, v.40, p.763-780, 1989.

BERGERSEN, F.J.; TURNER, G.L.; AMARGER, N.; MARIOTTI, F.; MARIOTTI, A. Strain of *Rhizobium lupini* determines natural abundance of ¹⁵N in root nodules of *Lupinus spp.* Soil Biology and Biochemistry, v.18, p.97-101, 1986.

BERGERSEN, F.T.; PEOPLES, M.B.; TURNER, G.L.; Isotopic discrimination during the accumulation of nitrogen by soybeans. Australian Journal of Plant Physiology, v.15, p.407-420, 1988.

BLISS, F.A. Breeding common bean for improved biological nitrogen fixation. Plant and Soil, v.152, p.71-79, 1993a.

BLISS, F.A. Utilizing the potential for increased nitrogen fixation in common bean. Plant and Soil, v.152, p.157-160, 1993b.

BOCKMAN, O.C.; OLFS, H.W. Fertilizers, agronomy and N₂O. Nutrient Cycling in Agroecosystems, v.52, p.165-170, 1998.

BODDEY, R.M. Methods for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. CRC Critical Reviews in Plant Science, v.6, p.209-266, 1987.

BODDEY, R.M.; MÜLLER, S.H.; ALVES, B.J.R. Estimation of the contribution of biological N₂ fixation to two *Phaseolus vulgaris* genotypes using simulation of plant nitrogen uptake from ¹⁵N-labelled soil. Fertilizer Research, v.45, p.169-185, 1996.

BODDEY, R.M.; OLIVEIRA, O.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. Field application of the ¹⁵N isotope dilution technique for the reliable quantification of plant-associated biological nitrogen fixation. Fertilizer Research, v.42, p.77-87, 1995.

- BODDEY, R.M.; PEOPLES, M.B.; PALMER, B.; DART, P.J. Use of the ^{15}N natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, v.57, p.235-270, 2000.
- BOLGER, T.P.; PATE, J.S.; UNKOVICH, M.J.; TURNER, N.C. Estimates of seasonal nitrogen fixation of annual subterranean clover-based pastures using the ^{15}N natural abundance technique. *Plant and Soil*, v.175, p.57-66, 1995.
- BRANDÃO JUNIOR, O.; HUNGRIA, M. Efeito de doses de inoculante turfoso na fixação biológica do nitrogênio pela cultura da soja. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.24, p.527-535, 2000.
- BRITO, M.M.P.; MURAOKA, T.; SILVA, E.C. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio, fertilizante nitrogenado e nitrogênio do solo no desenvolvimento de feijão e caupi. *Bragantia*, v.70, n.1, p.206-215, 2011.
- CABALLERO, S.U.; LIBARDI, P.L.; REICHARDT, K.; MATSUI, E.; VICTORIA, R.L. Utilização de fertilizante nitrogenado aplicado a uma cultura de feijão. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.20, p.1031-1040, 1985.
- CADISCH, G.; HAIRIAH, K.; GILLER, K.E. Applicability of the natural ^{15}N abundance technique to measure N_2 fixation in *Arachis hypogaea* grown on an Ultisol. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, v.48, p.31-45, 2000.
- CARLSSON, G.; HUSS-DANELL, K. Does nitrogen transfer between plants confound ^{15}N -based quantifications of N_2 fixation? *Plant and Soil*, v.374, p.345-358, 2014.
- CARVALHO, W.P.; ALBRECHT, J.C. BRS Radiante: nova cultivar precoce de feijoeiro comum com tipo de grão rajado para o Distrito Federal e Noroeste Mineiro. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003. 3p. (Embrapa Cerrados. Comunicado Técnico, 94).
- CHALK, P.M. Estimation of N_2 fixation by isotope dilution: an appraisal of techniques involving ^{15}N enrichment and their application. *Soil Biology and Biochemistry*, v.17, p.389-410, 1985.
- CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2012/2013 – Décimo Segundo Levantamento – Setembro/2013. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> acesso em 13 de fevereiro de 2014.
- DANSO, S.K.A. Assessment of biological nitrogen fixation. *Fertiliser Research*, v.42, p.33-41, 1995.
- DANSO, S.K.A.; HARDARSON, G.; ZAPATA, Z. Misconceptions and practical problems in the use of ^{15}N soil enrichment techniques for estimating N_2 fixation. *Plant and Soil*, v.152, p.25-52, 1993.
- DANSO, S.K.A.; KUMARISHINGE, K.S. Assessment of potential sources of error in nitrogen fixation measurements by the nitrogen-15 isotope dilution technique. *Plant and Soil*, v.125, p.87-93, 1990.

DAWSON, T.E.; MAMBELLI, S.; PLAMBOECK, A.H.; TEMPLER, P.H.; TU, K.P. Stable isotopes in plant ecology. *Annual Review Ecology Systems*, v.33, p.507-559, 2002.

DEL PELOSO, M.J.; MELO, L.C.; FARIA, L.C.; COSTA, J.G.C.; RAVA, C.A.; CARNEIRO, G.E.S.; SOARES, D.M.; DÍAZ, J.L.C.; ABREU, A.F.B.; FARIA, J.C.; SARTORATO, A.; SILVA, H.T.; BASSINELLO, P.Z.; ZIMMERMANN, F.J.P. BRS Pontal: nova cultivar de feijoeiro comum de tipo de grão carioca com alto potencial produtivo. Santo Antonio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2003. 2p. (Comunicado Técnico, 64).

DEL PELOSO, M.J.; FARIA, L.C.; COSTA, J.G.C.; RAVA, C.A.; CARNEIRO, G.E.S.; SOARES, D.M.; DÍAZ, J.L.C.; SARTORATO, A.; FARIA, J.C. BRS Marfim: nova cultivar de feijoeiro comum com tipo de grão mulatinho. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2002. 2 p. (Embrapa Arroz e Feijão. Comunicado Técnico, 48).

DEL PELOSO, M.J.; MELO, L.C.; FARIA, L.C.; COSTA, J.G.C.; RAVA, C.A.; CARNEIRO, G.E.S.; SOARES, D.M.; DÍAZ, J.L.C.; ABREU, A.F.B.; FARIA, J.C.; SARTORATO, A.; SILVA, H.T.; BASSINELLO, P.Z.; ZIMMERMANN, F.J.P. BRS Pontal: new common bean cultivar with Carioca grain. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.4, p.369-371, 2004.

DÖBEREINER, J. Avanços recentes na pesquisa em fixação biológica de nitrogênio no Brasil. *Estudos Avançados*, v.4, n.8, p.144-152, 1989.

DÖBEREINER, J.; ARRUDA, N.B.; PENTEADO, A.F. Avaliação da fixação do nitrogênio, em leguminosas, pela regressão do nitrogênio total das plantas sobre o peso dos nódulos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.1, p.233-237, 1966.

DOUGHTON, J.A.; VALLIS, I.; SAFFIGNA, P.G. An indirect method for estimating ¹⁵N isotope fractionation during nitrogen fixation by a legume under field conditions. *Plant and Soil*, v.144, p.23-29, 1992.

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

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia [Home Page], 2013. Disponível em <www.cnpab.embrapa.br>, Acesso em: 5 de novembro de 2013.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa em Arroz e feijão. Catálogo de cultivares de feijão da Embrapa. Goiânia, 2012. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/transferecia/tecnologiasprodutos/cultivares/cultivaresFeijao.pdf>>. Acesso em: 19 de março de 2012.

EPAMIG. Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. Ouro Negro: cultivar recomendada para Minas Gerais e Rio de Janeiro. Belo Horizonte, 2012. Disponível em: <http://www.epamig.br/index.php?option=com_content&task=view&id=200&Itemid=135>. Acesso em: 01 de agosto de 2012.

FARIA, L.C.; DEL PELOSO, M.J.; COSTA, J.G.C.; RAVA, C.A.; CARNEIRO, G.E.S.; SOARES, D.M.; CABRERA DÍAZ, J.L. BRS Radiante: nova cultivar precoce de feijoeiro comum com tipo de grão rajado. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2002a. 2p. (Comunicado Técnico, 45).

FARIA, L.C.; DEL PELOSO, M.J.; COSTA, J.G.C.; RAVA, C.A.; CARNEIRO, G.E.S.; SOARES, D.M.; DÍAZ, J.L.C.; SARTORATO, A.; FARIA, J.C. BRS Vereda: nova cultivar de feijoeiro comum do grupo comercial rosinha. Santo Antonio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2002b. 2p. (Comunicado Técnico, 50).

FARIA, L.C.; MELO, P.G.S.; PEREIRA, H.S.; DEL PELOSO, M.J.; BRÁS, A.J.B.P.; MOREIRA, J.A.A.; CARVALHO, H.W.L.; MELO, L.C. Genetic progress during 22 years of improvement of carioca-type common bean in Brazil. *Field Crops Research*, v.142, p.68-74, 2013.

FERNÁNDEZ-LUQUEÑO, F.; DENDOOVEN, L.; MUNIVE, A.; COLRLAY-CHEE, L.; SERRANO-COVARRUBIAS, L.M.; ESPINISA VICTORIA, D. Micromorfology of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodules undergoing senescence. *Acta Physiologiae Plantarum*, v.30, p.545-552, 2008.

FERREIRA, A.C.B.; ANDRADE, M.J.B.; ARAÚJO, G.A.A. Nutrição e adubação do feijoeiro. *Informe Agropecuário, Belo Horizonte*, v.25, n.223, p.61-72, 2004.

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

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

FRANZINI, V.I.; MENDES, F.L.; MURAOKA, T.; TREVISAM, A.R.; ADU-YAMFI, J.J. Biological nitrogen fixation efficiency in Brazilian common bean genotypes as measured by ¹⁵N methodology. Optimizing productivity of food crop genotypes in low nutrient soils. Vienna: International Atomic Energy Agency, 2013. 30p.

FUJIHARA, S. Biogenic amines in rhizobia and legume root nodules. *Microbes and Environments*, v.24, p.1-13, 2009.

GATHUMBI, S.M.; CADISCH, G.; GILLER, K.E. ¹⁵N natural abundance as a tool for assessing N₂-fixation of herbaceous, shrub and tree legumes in improved fallows. *Soil Biology and Biochemistry*, v.34, p.1059-1071, 2002.

GOMES, A.A.; ARAÚJO, A.P.; ROSSIELLO, R.O.P.; PIMENTEL, C. Acumulação de biomassa, características fisiológicas e rendimento de grãos em cultivares de feijoeiro irrigado e sob sequeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.35, n.10, p.1927-1937, 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.; DRAEGER, K.; FERREY, M.L.; CONROY, M.J.; HAMMER, B.E.; MARTINEZ-ROMERO, E.; NAARONS, S.R.; QUINTO, C. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Canadian Journal Microbiology*, v.40, p.198-207, 1994.
- GRAHAM, P.H.; ROSAS, J.C. Growth and development of indeterminate, bush and climbing cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. inoculated with *Rhizobium*. *Journal Agricultural Science*, v.88, p.503-508, 1977.
- GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, v.36, p.1389-1398, 2004.
- GRANLI, T.; BOCKMAN, O.C. Nitrous oxide emissions from soils in warm climates. *Fertilizer Research*, v.42, p.159-163, 1995.
- GROSS, Y.; KIGEL, J. Differential sensitivity to high temperature of stages in the reproductive development of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Research*, v.36, p.201-212, 1994.
- GUIMARÃES, A.; DE MORAIS, R.F.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M.; ALVES, B.J.R. *Bradyrhizobium* strain influences the ¹⁵N natural abundance quantification of biological N₂ fixation in soybean. *Scientia Agricola*, v.65, p.516-524, 2008.
- HARDARSON, G.; BLISS, F.A.; CIGALES-RIVERO, M.R.; HENSON, R.A.; KIPE-NOLT, J.A.; LONGERI, L.; MANRIQUE, A.; PEÑA-CABIALES, J.J.; PEREIRA, P.A.A.; SANABRIA, C.A.; TSAI, S.M. Genotypic variation in biological nitrogen fixation by common bean. *Plant and Soil*, v.152, p.59-70, 1993.
- HAUGGAARD-NIELSEN, H.; HOLDENSEN, L.; WULFSOHN, D.; JENSEN, E. S. Spatial variation of N₂-fixation in field pea (*Pisum sativum* L.) at the field scale determined by the ¹⁵N natural abundance method. *Plant and Soil*, v.327, p.167-184, 2010.
- HENSON, R.A. Measurements of N₂ fixation by common bean in Central Brazil as affected by different reference crops. *Plant and Soil*, v.152, p.53-58, 1993.
- HENSON, R.A.; PEREIRA, P.A.A.; CARNEIRO, J.E.S.; BLISS, F.A. Registration of “Ouro Negro”, a high dinitrogen-fixing, high-yielding common bean. *Crop Science*, v.33, p.644, 1993.
- HERRIDGE, D.F.; PEOPLES, M.B. The ureide assay for measuring nitrogen fixation by nodulated soybean calibrated by ¹⁵N methods. *Plant Physiology*, v.93, p.495-503, 1990.
- HERRIDGE, D.F.; PEOPLES, M.B.; BODDEY, R.M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil*, v.311, p.1-18, 2008.
- HOFFMANN JÚNIOR, L.; RIBEIRO, N.D.; ROSA, S.S.; JOST, E.; POERSCH, N.L.; MEDEIROS, S.L.P. Resposta de cultivares de feijão à alta temperatura do ar no período reprodutivo. *Ciência Rural*, v.37, n.6, p.1543-1548, 2007.

HÖGBERG, P.; NÄSHOLM, T.; HÖGBOM, L.; STAHL, L. Use of ^{15}N labelling and ^{15}N natural abundance to quantify the role of mycorrhizas in N uptake by plants: importance of seed N and of changes in the ^{15}N labelling of the available N. *New Phytologist*, n.127, p.515-519, 1994.

HÖGBERG, P. ^{15}N natural abundance in soil-plant systems. *New Phytologist*, n.137, p.179-203, 1997.

HOUNGNANDAN, P.; YEMADJE, R.G.H.; OIKEH, S.O.; DJIDOHOKPIN, C.F.; BOECKX, P.; VAN CLEEMPUT, O. Improved estimation of biological nitrogen fixation of soybean cultivars (*Glycine max* L. Merrill) using ^{15}N natural abundance technique. *Biology and Fertility of Soils*, v.45, p.175-183, 2008.

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

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

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. Fixação biológica de nitrogênio na cultura da soja. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 48p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 35; Embrapa Cerrados. Circular Técnica, 13).

HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P.; VICTORIA, R.L. Assimilação do nitrogênio pelo feijoeiro; II. Absorção e translocação do N mineral e do N_2 fixado. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.9, p.202-209, 1985.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Environmental factors affecting N_2 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. Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2009. 777p.

ISOI, T.; YOSHIDA, S. Low nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Soil Science and Plant Nutrition*, v.37, p.559-563, 1991.

JENSEN, E.S.; HAUGGAARD-NIELSEN, H. How can increased use of biological N_2 fixation in agriculture benefit the environment? *Plant and Soil*, v.252, p.177-186, 2003.

JUNK, G.; SVEC, H.J. The absolute abundance of the nitrogen isotopes in the atmosphere and compressed gas from various sources. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v.14, p.234-243, 1958.

KAHINDI, J.H.P.; WOOPER, P.; GEORGE, T.; MOREIRA, F.M.S.; KARANJA, N.K.; GILLER, K.E. Agricultural intensification, soil biodiversity and ecosystem function in the tropics: the role of nitrogen fixing bacteria. *Applied Soil Ecology*, v.6, p.55-76, 1997.

KAPPES, C.; WRUCK, F.J.; CARVALHO, M.A.C.; YAMASHITA, O.M. Feijão comum: características morfo-agronômicas de cultivares. Documentos, IAC, Campinas, v.85, p.506-509, 2008.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; CAMPO, R.J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. *Applied Soil Ecology*, v.32, p.210-220, 2006.

KILIAN, S.; BERSWORDT-WALLRABE, P.V.; STEELE, H.; WERNER, D. Cultivar-specific dinitrogen fixation in *Vicia faba* studied with the nitrogen-15 natural abundance method. *Biology and Fertility of Soils*, v.33, p.358-364, 2001.

KIMURA, S.D.; SCHMIDTKE, K.; TAJIMA, R.; YOSHIDA, K.; NAKASHIMA, H.; RAUBER, R. Seasonal N uptake and N₂ fixation by common and adzuki bean at various spacings. *Plant and Soil*, v.258, p.91-101, 2004.

KIPE-NOLT, J.A.; GILLER, K.E. A field evaluation using the ¹⁵N isotope dilution method of lines of *Phaseolus vulgaris* L. bred for increased nitrogen fixation. *Plant and Soil*, v.152, p.107-114, 1993.

KIPE-NOLT, J.A.; VARGAS, H.; GILLER, K.E. Nitrogen fixation in breeding lines of *Phaseolus vulgaris* L.. *Plant and Soil*, v.152, p.103-106, 1993.

KOHL, D.; REYNOLDS, P.H.S.; SHEARER, G. Distribution of ¹⁵N within pea, lupin and soybean nodules. *Plant Physiology*, v.90, p.420-426, 1989.

KOHL, D.H.; SHEARER, G.; HARPER, J.E. Estimates of N₂ fixed based on differences in natural abundance of ¹⁵N in nodulating and non-nodulating isolines of soybean. *Plant Physiology*, v.66, p.61-65, 1980.

KUMARASINGHE, K.S.; DANSO, S.K.A.; ZAPATA, F. Field evaluation of N₂ fixation and N partitioning in climbing bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using ¹⁵N. *Biology and Fertility of Soils*, v.13, p.142-146, 1992.

KYEI-BOAHEN, S.; SLANKARD, A.; WALLEY, F. Isotopic fractionation during N₂ fixation by chickpea. *Soil Biology and Biochemistry*, v.34, p.417-420, 2002.

LEDGARD, S.F. Nutrition, moisture and rhizobial strain influence isotopic fractionation during N₂ fixation in pasture legumes. *Soil Biology and Biochemistry*, v.21, p.65-68, 1989.

LIMA, E.R.; SANTIAGO, A.S.; ARAÚJO, A.P.; TEIXEIRA, M.G. Effects of the size of sown seed on growth and yield of common bean cultivars of different seed sizes. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v.17, p.273-281, 2005.

LÓPEZ-BELLIDO, F.J.; LÓPEZ-BELLIDO, R.J.; REDONDO, R.; LÓPEZ-BELLIDO, L. B value and isotopic fractionation in N₂ fixation by chickpea (*Cicer arietinum* L.) and faba bean (*Vicia faba* L.). *Plant and Soil*, v.337, p.425-434, 2010.

- BRITO, L.F. Iniciação da nodulação em cultivares de feijoeiro. Seropédica: UFRRJ, 2013. 56p. (Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo).
- LYNCH, J.; WHITE, J.W. Shoot nitrogen dynamics in tropical common bean. *Crop Science*, v.32, p.392-397, 1992.
- MARIOTTI, A. Atmospheric nitrogen is a reliable standard for ^{15}N natural abundance measurements. *Nature*, v.303, p.685-687, 1983.
- MARIOTTI, A.; GERMONT, J. C.; LECLERC, A. Nitrogen isotope fractionation associated with the $\text{NO}_2 - \text{N}_2\text{O}$ step of denitrification in soils. *Canadian Journal Soil Science*, v. 62, p. 227-241, 1982.
- MARIOTTI, A.; MARIOTTI, F.; AMARGER, N.; PIZELLE, G.; NGAMBI, J.M.; CHAMPIGNY, M.L.; MOYSE, A. Fractionnements isotopiques de l'azote lors des processus d'absorption des nitrates et de fixation de l'azote atmosphérique par les plantes. *Physiologie Vegetale*, v.18, p.163-181, 1980.
- MARTÍNEZ-ROMERO. E. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. *Plant and Soil*, v.252, p.11-23, 2003.
- MEDEIROS, G.A.; ARRUDA, F.B.; SAKAI, E.; FUJIWARA, M.; BONI, N.R. Crescimento vegetativo e coeficiente de cultura do feijoeiro relacionados a graus-dia acumulados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.35, p.1733-1742, 2000.
- MELO, L.C.; DEL PELOSO, M.J.; PEREIRA, H.S.; FARIA, L.C.; COSTA, J.G.C.; DÍAZ, J.L.C.; RAVA, C.A.; WENDLAND, A.; ABREU, A.F.B. BRS Estilo - common bean cultivar with Carioca grain, upright growth and high yield potential. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.10, p.377-379, 2010.
- MENDES, I.C.; REIS JÚNIOR, F.B.; HUNGRIA, M.; SOUSA, D.M.G.; CAMPO.R.J. Adubação nitrogenada suplementar tardia em soja cultivada em latossolos do Cerrado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.43, n.8, p.1053-1060, 2008.
- 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*, v.18, p.421-425, 1994.
- MICHIELS, J.; DOMBRECHT, B.; VERMEIREN, N.; XI, C.; LUYTEN, E.; VANDERLEYDEN, J. *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. *FEMS Microbiology Ecology*, v.26, p.193-205, 1998.
- MNASRI, B.; AOUANI, M.E.; MHAMDI, R. Nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris*) under water deficiency. *Soil Biology and Biochemistry*, v.39, p.1744-1750, 2007.
- MOREIRA, G.B.L.; PEGORARO, R.F.; VIEIRA, N.M.B.; BORGES, I.; KONDO, M.K. Desempenho agrônômico do feijoeiro com doses de nitrogênio em semeadura e cobertura. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.17, n.8, p.818-823, 2013.

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

MSTAT-C. A microcomputer program for the design, management, and analysis of agronomic research experiments. Michigan: MSTAT Distribution Package, 1991.

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

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.

NASCENTE, A.S.; FARIA, L.C.; DEL PELOSO, M.J.; MELO, L.C.; COSTA, J.G.C.; RAVA, C.A. Cultivares de feijoeiro comum da Embrapa indicadas para o Estado do Paraná. Santo Antonio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006. 4p. (Comunicado Técnico, 128).

NEBIYU, A.; HUYGENS, D.; UPADHAYAY, H.R.; DIELS, J.; BOECKX, P. Importance of correct B value determination to quantify biological N₂ fixation and N balances of faba beans (*Vicia faba* L.) via ¹⁵N natural abundance. *Biology and Fertility of Soils*, v.50, p.517-525, 2014.

NGULUU, S.; PROBERT, M.; MCCOWN, R.; MYERS, R.; WARING, S. Isotopic discrimination associated with symbiotic nitrogen fixation in stylo (*Stylosanthes hamata* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* L.). *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, v.62, p.11-14, 2001.

NOTIFICAÇÃO AO UNFCCC SOBRE AS AÇÕES BRASILEIRAS DE REDUÇÃO DE EMISSÕES. Disponível em: http://www.mre.gov.br/portugues/imprensa/nota_detalhe3.asp?ID_RELEASE=7811 Acesso em: 13 de abril de 2010.

OKITO, A.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Isotopic fractionation during N₂ fixation by four tropical legumes. *Soil Biology and Biochemistry*, v.36, p.1179-1190, 2004.

OLIVEIRA, W.S.; MEINHARDT, L.W.; SESSITSCH, A.; TSAI, S.M. Analysis of *Phaseolus*-*Rhizobium* interactions in a subsistence farming system. *Plant and Soil*, v.204, p.107-115, 1998.

OSINAME, O.; GIJN VAN, H.; VLEK, 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.

PACHECO, R.S. Crescimento e produção de feijoeiro originado de sementes com diferentes teores de fósforo e molibdênio sob diferentes fontes de nitrogênio. Seropédica: UFRRJ, 2010. 44p. (Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo).

PACHECO, R.S.; BRITO, L.F.; STRALIOTTO, R.; PÉREZ, D.V.; ARAÚJO, A.P. Seeds enriched with phosphorus and molybdenum as a strategy for improving grain yield of common bean crop. *Field Crops Research*, v.136, p.97-106, 2012.

PATE, J.S.; UNKOVICH, M.J.; ARMSTRONG, E.L.; SANFORD, P. Selection of reference plants for ^{15}N natural abundance assessment of N_2 fixation by crop and pasture legumes in south-west Australia. *Australian Journal Agricultural Research*, n.45, p.133-147, 1994.

PAUFERRO, N.; GUIMARÃES, A.P.; JANTALIA, C.P.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M. ^{15}N natural abundance of biologically fixed N_2 in soybean is controlled more by the *Bradyrhizobium* strain than by the variety of the host plant. *Soil Biology and Biochemistry*, v.42, p.1694-1700, 2010.

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 N_2 fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant and Soil*, v.152, p.115-121, 1993.

PEOPLES, M.B.; BELL, M.; BUSHBY, V. Effect of rotation and inoculation with *Bradyrhizobium* on nitrogen fixation and yield of peanut (*Arachis hypogaea* L. cv Virginia Bunch). *Australian Journal of Agricultural Research*, v.43, p.595-607, 1992.

PEOPLES, M.B.; FAIZAH, A.W.; RERKASEM, B.; HERRIDGE, D.F. Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, ACIAR Monograph, n.11, 76p, 1989.

PEOPLES, M. B.; HERRIDGE, D. F.; LADHA, J. K. Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? *Plant and Soil*, v.174, p.3-28, 1995.

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

PERES, J.R.R.; SUHET, A.R.; MENDES, I.C.; VARGAS, M.A.T. Efeito da inoculação com rizóbio e da adubação nitrogenada em sete cultivares de feijão em solo de cerrado. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.18, p.415-420, 1994.

PESSOA, A.C.S.; KELLING, C.R.S.; POZZEBON, E.J.; KÖNIG, O. Concentração e acumulação de nitrogênio, fósforo e potássio pelo feijoeiro cultivado sob diferentes níveis de irrigação. *Ciência Rural*, v.26, n.1, p.69-74, 1996.

PIHA, M.I.; MUNNS, D.N. Nitrogen fixation capacity of field grown bean compared to other grain legumes. *Agronomy Journal*, v.79, p.690-696, 1987a.

PIHA, M.I.; MUNNS, D.N. Nitrogen fixation potential of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) compared with other grain legumes under controlled conditions. *Plant and Soil*, v.98, p.169-182, 1987b.

PIHA, M.I.; MUNNS, D.N. Sensitivity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) symbioses to high soil temperature. *Plant and Soil*, v.98, p.183-194, 1987c.

PORTES, T.A. Ecofisiologia. In: ARAUJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J.O. (cords.). *Cultura do feijoeiro comum no Brasil*. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa de Potassa e do Fosfato, p.101-137, 1996.

PRELL, J.; POOLE, P. Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends in Microbiology*, v.14, p.161-168, 2006.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; ZIMMERMANN, M.J.O. *Genética quantitativa em plantas autógamas: aplicações ao melhoramento do feijoeiro*. Goiânia, Universidade Federal de Goiás, 1993. 271p.

RAMOS JUNIOR, E.U.; LEMOS, L.B.; SILVA, T.R.B. Componentes da produção, produtividade de grãos e características tecnológicas de cultivares de feijão. *Bragantia*, v.64, n.1, p.75-82, 2005.

RAPOSEIRAS, R.; MARRIEL, I.E.; MUZZI, M.R.S.; PAIVA, E.; PEREIRA FILHO, I.A.; CARVALHAIS, L.C.; PASSOS, R.V.M.; PINTO, P.P.; SÁ, N.M.H. *Rhizobium* strains competitiveness on bean nodulation in Cerrado soils. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.41, p.439-447, 2006.

RAVA, C.A.; COSTA, J.G.C.; FARIA, L.C.; DEL PELOSO, M.J.; CARNEIRO, G.E.S.; SOARES, D.M.; DÍAZ, J.L.C.; MELO, L.C.; ABREU, A.F.B.; FARIA, J.C.; SILVA, H.T.; SARTORATO, A.; BASSINELLO, P.Z.; ZIMMERMANN, F.J.P. *BRS Grafite: cultivar de feijoeiro comum de grão preto, indicada para as regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil*. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2003. 4p. (Embrapa Arroz e Feijão. Comunicado Técnico, 63).

RELARE. (2004). *Ata da XIII Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE)*. <http://www.relare.org.br/rtfatas/>.

RENNIE, R.J.; KEMP, G.A. N₂ fixation in field beans quantified by ¹⁵N isotope dilution. I. Effect of strains of *Rhizobium phaseoli*. *Agronomy Journal*, v.75, p.640-644, 1983a.

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

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

RONDON, M.A.; LEHMANN, J.; RAMIREZ, J.; HURTADO, M. Biological nitrogen fixation by common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) increases with bio-char additions. *Biology and Fertility of Soils*, v.43, p.699-708, 2007.

ROSAS, J.C.; BLISS, F.A. Host-plant traits associated with estimates of nodulation and nitrogen fixation in common bean. *HortScience*, v.21, p.287-289, 1986.

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

SAITO, S.M.T. Avaliação em campo da capacidade de fixação simbiótica de estirpes de *Rhizobium phaesoli*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.17, n.7, p.999-1006, 1982.

SANETRA, C.M.; ITO, O.; VIRMANI, S.M.; VLEK, P.L.G. Remobilization of nitrogen from senescing leaves of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.): genotypic differences across maturity groups? *Journal of Experimental Botany*, v.49, n.322, p.853-862, 1998.

SANTOS, G.G.; SILVEIRA, P.M.; MARCHÃO, R.L.; BECQUER, T.; RIOS, A.J.W.; RODRIGUES, C. Descrição morfológica de perfis de solos da Fazenda Capivara da Embrapa Arroz e Feijão. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2010. 51p. (Documentos 258).

SCHILTZ, S.; MUNIER-JOLAIN, N.; JEUDY, C.; BURSTIN, J.; SALON, C. Dynamics of exogenous nitrogen partitioning and nitrogen remobilization from vegetative organs in pea revealed by ¹⁵N in vivo labeling throughout seed filling. *Plant Physiology*, v.137, p.1463-1473, 2005.

SCHWENKE, G.; PEOPLES, G.; TURNER, G.; HERRIDGE, D. Does nitrogen fixation of commercial dryland chickpea and faba bean crops in north-west New South Wales maintain or enhance soil nitrogen? *Australian Journal of Experimental Agriculture*, v.38, p.61-70, 1998.

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

SHAH, Z.; SHAH, S.H.; PEOPLES, M.B.; SCHWENKE, G.D.; HERRIDGE, D.F. Crop residue and fertiliser N effects on nitrogen fixation and yields of legume-cereal rotations and soil organic fertility. *Field Crops Research*, v.83, p.1-11, 2003.

SHEARER, G.; BRYAN, B.A.; KOHL, D.H. Increase of natural ¹⁵N enrichment of soybean nodules with mean nodule mass. *Plant Physiology*, v.76, p.743-746, 1984.

SHEARER, G.; FELDMAN, L.; BRYAN, B.A.; SKEETERS, J.L.; KOHL, D.H.; AMARGER, N.; MARIOTTI, F.; MARIOTTI, A. ¹⁵N abundance of nodules as an indicator of N metabolism in N₂-fixing plants. *Plant Physiology*, v.70, p.465-468, 1982.

SHEARER, G.; KOHL, D.H. N₂ fixation in field settings: estimations based on natural ¹⁵N abundance. *Australian Journal of Plant Physiology*, v.13, p.699-756, 1986.

SHEARER, G.; KOHL, D.; HARPER, J.E. Distribution of ¹⁵N among plant parts of nodulating and non-nodulating isolines of soybeans. *Plant Physiology*, v.66, p.57-60, 1980.

SHONNARD, G.C.; GEPTS, P. Genetic of heat tolerance during reproductive development in common bean. *Crop Science*, v.34, p.1168-1175, 1994.

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.

SILVA, M.F.; SILVA SANTOS, C.E.R.; SOUSA, C.A.; ARAÚJO, R.S.L.; STAMFORD, N.P.; FIGUEIREDO, M.V.B. Nodulação e eficiência da fixação do N₂ em feijão caupi por efeito da taxa do inóculo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.36, p.1418-1425, 2012.

SILVA, S.C.; HEINEMANN, A.B.; PAZ, R.L.F.; AMORIM, A.O. Informações meteorológicas para pesquisa e planejamento agrícola, referentes ao ano de 2009, do Município de Santo Antônio de Goiás, GO. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2010. 32p. (Documentos 256).

SINGLETON, P.W.; TAVARES, J.W. Inoculation response of legumes in relation to the number and effectiveness of indigenous rhizobium populations. *Applied and Environmental Microbiology*, v.51, n5, p.1013-1018, 1986.

SOARES, A.L.L.; PEREIRA, J.P.A.R.; FERREIRA P.A.A.; VALE, H.M.M.; LIMA, A.S.; ANDRADE, M.J.B.; MOREIRA, F.M.S. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). II – feijoeiro. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.30, p.803-811, 2006.

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

STEELE, K.W.; BONISH, P.M.; DANIEL, R.M.; O' HARA, G.W. Effect of rhizobial strain and host plant on nitrogen isotopic fractionation in legumes. *Plant Physiology*, v.72, p.1001-1004, 1983.

STOUT, W.L.; FALES, S.L.; MULLER, L.D.; SCHNABEL, R.R.; WEAVER, S.R. Water quality implications of nitrate leaching from intensively grazed pasture swards in the northeast US. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v.77, p.203-210, 2000.

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N.G. Biodiversidade do rizóbio que nodula o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e os principais fatores que afetam a simbiose. *Seropédica: Embrapa Agrobiologia*, 1999. 51p. (Embrapa- CNPAB.Documentos, 94).

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

THIES, J.E.; SINGLETON, P.W.; BOHOOL, B.B. Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. *Applied and Environmental Microbiology*, v.57, n.1, p.19-28, 1991.

TSAI, S.M.; SILVA, P.M.; CABEZAS, W.L.; BONETTI, R. Variability in nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) intercropped with maize. *Plant and Soil*, v.152, p.93-101, 1993.

TURNER, G.L.; BERGERSEN, F.J. Natural abundance of ^{15}N in root nodules of soybean, lupin, subterranean clover and lucerne. *Soil Biology and Biochemistry*, v.15, p.525-530, 1983.

UNKOVICH, M. Isotope discrimination provides new insight into biological nitrogen fixation. *New Phytologist*, v.198, p.643-646, 2013.

UNKOVICH, M.; HERRIDGE, D.; PEOPLES, M.; CADISCH, G.; BODDEY, R.M.; GILLER, K.E.; ALVES, B.J.R.; CHALK, P. Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems. ACIAR (Australian Council for International Agricultural Research), Monograph N^o.136, 258 pp., 2008.

UNKOVICH, M.J.; PATE, J.S. An appraisal of recent field measurements of symbiotic N_2 fixation by annual legumes. *Field Crops Research*, v.65, p.211-228, 2000.

VARGAS, A.A.T.; SILVEIRA, J.S.M.; ATHAYDE, J.T.; ATHAYDE, A.; PACOVA, B.E.V. Comparação entre genótipos de feijão quanto à capacidade nodulante e à produtividade com inoculação com rizóbios e/ou adubação de N mineral. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.15, p.267-272, 1991.

VARGAS, M.A.T.; MENDES, I.C.; HUNGRIA, M. Response of field-grown bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Rhizobium* inoculation and nitrogen fertilization in two Cerrados soils. *Biology and Fertility of Soils*, v.32, p.228-233, 2000.

VIEIRA, C.O. Feijoeiro-comum: cultura, doenças e melhoramento. Viçosa: UFV, 1967. 220p.

VINCENT, J.M. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBM Handbook, n^o 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh, 1970.

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

VOISIN, A.S.; SALON, C.; MUNIER-JOLAIN, N.G.; NEY, B. Effect of mineral nitrogen on nitrogen nutrition and biomass partitioning between the shoot and roots of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant and Soil*, v.242, p.251-262, 2002.

WEAVER, R.W.; FREDERICK, L.R. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* L. Merrill. I - Greenhouse studies. *Agronomy Journal*, v.66, p.229-232, 1974.

WESTERMANN, D.T.; KLEINKOPF, G.E.; PORTER, L.K. & LEGGETT, G.E. Nitrogen sources for bean seed production. *Agronomy Journal*, v.73, p.660-664, 1981.

WESTERMANN, D.T.; PORTER, L.K.; O'DEEN, W.A. Nitrogen partitioning and mobilization patterns in bean plants. *Crop Science*, v.25, p.225-229, 1985.

WITTY, J.F. Estimating N₂-fixation in the field using ¹⁵N-labelled fertilizer: some problems and solutions. *Soil Biology and Biochemistry*, v.15, p.631-639, 1983.

YAN, X.; LYNCH, J.P.; BEEBE, S.E. Genetic variation for phosphorus efficiency of common bean in contrasting soil types - I: vegetative response. *Crop Science*, v.35, p.1086-1093, 1995.

YONEYAMA, T.; FUJIHARA, S.; YAGI, K. Natural abundance of ¹⁵N in amino acids and polyamines from leguminous nodules: unique ¹⁵N enrichment in homospermidine. *Journal of Experimental Botany*, v.49, p.521-526, 1998.

YONEYAMA, T.; FUJITA, K.; YOSHIDA, T.; MATSUMOTO, T.; KAMBAYASHI, I.; YAZAKI, J. Variation in natural abundance of ¹⁵N among plant parts and in ¹⁵N/¹⁴N fractionation during N₂ fixation in the legume-rhizobia symbiotic system. *Plant and Cell Physiology*, v.27, p.791-799, 1986.

YONEYAMA, T.; UCHIYAMA, T.; YAZAKI, J. Ontogenetic change of nitrogen accumulation and natural ¹⁵N abundance in pea and faba bean with special reference to estimate of N₂ fixation and ¹⁵N enrichment of nodules. *Mass Spectroscopy*, v.39, p.267-276, 1991.

ZAHRAN, H.H. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.63, n.4, p.968-989, 1999.

8. ANEXOS

Tabela 37. Análise de variância dos caracteres de nodulação e de acumulação de biomassa, na 1ª coleta de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.

Fonte de Variação	GL	Número de Nódulos por Planta	Massa de Nódulos por Planta	Massa de Raiz	Massa de Folha	Massa de caule	Massa de Parte Aérea
N	1	583314,063*	9288,141**	3052,563	913219,141**	1179396,000**	4168743,063**
Erro A	6	56873,813	557,703	1881,896	55937,578	50010,865	183123,396
Cultivar	7	98577,098	3693,123***	16964,955***	263025,873***	288581,491***	885087,777***
N x cul	7	62295,598	712,141	1583,741	32467,533	35930,786	94931,991
Erro B	42	56458,527	504,616	1423,646	51592,233	35065,555	154621,408
CV (%)		139,80	100,55	21,50	25,55	27,28	25,61

Tabela 38. Análise de variância dos caracteres de nodulação e de acumulação de biomassa, na 2ª coleta de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.

Fonte de Variação	GL	Número de Nódulos por Planta	Massa de Nódulos por Planta	Massa de Raiz	Massa de Folha	Massa de caule	Massa de Parte Aérea
N	1	14610,766**	18,063	860488,141	591361,000*	10938729,391*	25037514,063*
Erro A	6	825,224	4698,448	204304,057	76992,875	1122020,224	3049095,948
Cultivar	7	3589,801***	11936,464***	537549,926***	167384,786***	1693545,962***	4122371,071**
N x cul	7	3617,301***	978,027	34801,391	24976,464	495107,069	713929,063
Erro B	42	580,510	1870,876	110294,712	22418,970	246596,843	999459,975
CV (%)		145,06	24,05	30,40	25,72	42,56	31,53

Tabela 39. Massa seca de caule e massa seca de folha, na 1ª e na 2ª coleta de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.

cultivar	Massa seca de folha (g m ⁻²)					
	Floração plena			Duas semanas após floração plena		
	Inoculado	N mineral	Média	Inoculado	N mineral	Média
Radiante	40,4	59,0	49,7 b	51,9	92,4	72,1 d
Jalo Precoce	88,5	126,3	107,4 a	60,1	92,9	76,5 cd
Estilo	89,2	94,5	91,9 a	93,9	126,6	110,2 bc
Grafite	85,9	117,6	101,8 a	143,5	160,3	151,9 a
Marfim	71,6	111,4	91,5 a	116,1	128,0	122,1 ab
Ouro Negro	95,0	109,4	102,2 a	109,0	116,0	112,5 bc
Pontal	69,4	100,0	84,7 a	99,5	109,2	104,3 bcd
Vereda	75,6	88,6	82,1 a	107,5	141,6	124,5 ab
Média	76,9 B	100,8 A		97,7 B	120,9 A	
Massa seca de caule (g m ⁻²)						
Radiante	26,0	42,5	34,3 e	29,0	54,5	41,8 cd
Jalo Precoce	48,2	57,3	52,7 de	30,2	43,4	36,8 d
Estilo	78,8	100,0	89,4 ab	49,9	81,6	65,7 ab
Grafite	70,4	114,7	92,5 a	65,9	83,0	74,5 a
Marfim	48,6	92,3	70,4 bcd	48,6	57,6	53,1 bcd
Ouro Negro	64,1	80,5	72,3 abcd	52,6	58,2	55,4 bc
Pontal	44,3	81,2	62,7 cd	53,8	68,2	61,0 ab
Vereda	60,2	89,2	74,7 abc	58,9	96,2	77,6 a
Média	55,1 B	82,2 A		48,6 B	67,8 A	

Letras minúsculas comparam colunas e letras maiúsculas comparam linhas pelo teste Duncan a 5%.

Tabela 40. Análise de variância conjunta, da 1ª e da 2ª coletas, dos caracteres de nodulação e de acumulação de biomassa, de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.

Fonte de Variação	GL	Massa de Nódulos por Planta	Massa de Raiz	Massa de Folha	Massa de caule	Massa de Parte Aérea
Repetição	3	1062,438	3012,802	78416,615	4198,927	901163,427
Coleta	1	979,031	603,781	1327635,125***	347152,781**	51305917,531***
N	1	23598,781***	1300,500	1773315,281***	1720512,500***	24819535,125***
Col x N	1	300,125	1770,125	392,000	50244,500	4386722,000**
Cultivar	7	4915,982***	27464,603***	559533,746***	403000,531***	4029943,174***
Col x cul	7	2366,942***	1436,817	241042,054*	52965,746	977515,674
N x cul	7	3131,656***	495,500	21546,281	27390,786	372308,339
Col x N x cul	7	1197,786*	2066,268	45722,643	33516,464	436552,714
Erro	93	540,948	1815,200	87370,448	34019,094	611781,766
CV (%)		120,04	23,98	29,83	29,08	35,42

Tabela 41. Número de plantas e biomassa seca de nódulos, de raiz, de folha, de caule e de parte aérea, analisadas conjuntamente na 1ª e na 2ª coletas de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.

Cultivar	Número de plantas (por m ²)			Massa de nódulos por planta (mg)		
	Inoculado	N mineral	Média	Inoculado	N mineral	Média
Coleta 1	21,6	19,8	20,7	34	10	22 a
Coleta 2	20,3	19,4	19,8	32	2	17 a
Média	20,9 A	19,6 B		33 A	6 B	
Cultivar	Massa de raiz (g m ⁻²)			Massa de folha (g m ⁻²)		
	Inoculado	N mineral	Média	Inoculado	N mineral	Média
Coleta 1	16,9	18,2	17,6 a	76,9	100,8	88,9 b
Coleta 2	18,0	17,9	18,0 a	97,7	120,9	109,3 a
Média	17,5 A	18,1 A		87,3 B	110,8 A	
Cultivar	Massa de caule (g m ⁻²)			Massa de parte aérea (g m ⁻²)		
	Inoculado	N mineral	Média	Inoculado	N mineral	Média
Coleta 1	55,1	82,2	68,6 a	132,0	183,1	157,5 b
Coleta 2	48,6	67,8	58,2 b	221,6	346,7	284,2 a
Média	51,8 B	75,0 A		176,8 B	264,9 A	

Letras minúsculas comparam colunas e letras maiúsculas comparam linhas pelo teste Duncan a 5%.

Tabela 42. Análise de variância dos caracteres teor de N no caule, na folha e conteúdo de N no caule, na folha, e na parte aérea, na 1ª coleta de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.

Fonte de Variação	GL	Teor de N na Folha	Teor de N no Caule	Conteúdo de N na Folha	Conteúdo de N no Caule	Conteúdo de N na Parte Aérea
N	1	82088,021**	19561,688*	354492,188**	66454,083***	727915,021**
Erro A	4	2010,292	965,479	9217,792	957,833	14876,979
Cultivar	7	4475,711*	2436,211***	29868,640**	4998,988**	51513,021*
N x cul	7	1388,211	307,640	17542,045	1806,321	24522,830
Erro B	28	1803,220	461,479	8923,244	1396,048	15932,622
CV (%)		11,96	12,45	28,71	30,33	27,91

Tabela 43. Análise de variância dos caracteres teor de N na folha, no caule, e na vagem e conteúdo de N na folha, no caule, na vagem e na parte aérea, na 2ª coleta de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.

Fonte de Variação	GL	Teor de N na Folha	Teor de N no Caule	Teor de N na Vagem	Conteúdo de N na Folha	Conteúdo de N no Caule	Conteúdo de N na Vagem	Conteúdo de N na Parte Aérea
N	1	93633,333***	18330,083**	72930,021**	311052,000**	21168,000*	1941258,521**	4395325,521***
Erro A	4	408,833	487,771	1203,521	1973,667	370,479	11028,646	19813,708
Cultivar	7	1129,667	1064,571***	12978,640***	35745,274**	963,845**	208976,830***	301421,402**
N x cul	7	1187,048+	688,274**	5722,497*	4141,381	407,286	46979,807	57675,045
Erro B	28	543,571	203,414	2022,997	9866,024	262,574	45208,122	85879,446
CV (%)		10,45	14,50	13,75	36,86	26,12	47,42	37,58

Tabela 44. Análise de variância do parâmetro massa seca de nódulos e conteúdo de N na parte aérea nas quatro coletas de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium*, em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.

Fonte de variação	GL	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta
		Massa seca de nódulos			
Repetição	3	869,792	1641,865	969,708	643,208
Cultivar	7	3617,912**	7181,531***	12936,268***	1109,268*
Erro	21	836,387	1156,484	425,565	363,970
CV (%)		84,59	107,21	71,29	174,43
Conteúdo de N na parte aérea					
Repetição	2	16761,167*	13212,125	135132,875	206877,167**
Cultivar	7	12221,470*	81240,357*	193784,518+	42880,262
Erro	14	4101,167	29729,982	74848,446	25695,690
CV (%)		19,46	36,13	46,50	28,33
Massa seca de parte aérea					
Repetição	3	218766*	1262945	6657078**	4911908**
Cultivar	7	425035***	1691600*	3454359*	516749
Erro	21	63539	507854	1154276	404604
CV (%)		19,10	32,16	40,02	24,76

Tabela 45. Massa seca de parte aérea e massa seca de raiz, nas quatro coletas de cultivares de feijoeiro, inoculado com Rhizobium, em experimento de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.

Cultivar	Massa de raiz (g m ⁻²)				
	1 ^a coleta	2 ^a coleta	3 ^a coleta	4 ^a coleta	Média
Radiante	10,1	12,3	13,1	11,5	11,8
Jalo Precoce	17,4	15,0	14,2	12,4	14,4
Estilo	25,5	20,2	16,1	18,4	20,1
Grafite	21,4	26,7	21,4	17,1	22,4
Marfim	15,2	18,0	16,1	12,7	15,0
Ouro Negro	13,6	15,4	13,4	12,5	14,1
Pontal	14,8	16,0	14,6	11,6	15,0
Vereda	17,0	20,9	16,7	15,6	17,3
Média	16,9	18,0	15,7	13,9	
Cultivar	Massa de parte aérea (g m ⁻²)				
	1 ^a coleta	2 ^a coleta	3 ^a coleta	4 ^a coleta	Média
Radiante	66	130	200	233	145
Jalo Precoce	137	188	230	277	193
Estilo	168	200	185	249	190
Grafite	156	314	301	298	251
Marfim	120	210	271	243	195
Ouro Negro	159	323	478	311	298
Pontal	114	201	261	202	192
Vereda	136	208	223	243	191
Média	132	222	268	257	

Tabela 46. Análise de variância dos caracteres número de plantas, produção de grão (g m^{-2}), número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de 1 grão, índice de colheita e produção de grãos (3 m^{-2}), de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha^{-1}), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.

Fonte de Variação	GL	Número de Plantas	Produção de Grãos	Número de Vagens por Planta	Número de Grãos por Vagem	Massa de 1 Grão	Índice de Colheita	Produção de Grãos 3 m^2
N	1	0.333	20990720,083**	18369,188**	238,521	17442,188**	52801,333*	21166992,187*
Erro A	4	13.854	911056,083	618,854	136,292	795,625	6756,458	1164738,292
Cultivar	7	45.619**	239387,893	1925,949***	294,902***	24400,973***	7672,810**	225195,807
N x cul	7	19.000	254994,369	301,283	8,997	1753,378***	2478,619	218100,568
Erro B	28	12.640	221322,202	296,259	20,101	281,935	1858,768	257785,625
CV (%)		15.80	21,64	19,73	11,09	5,05	7,33	22,29

Tabela 47. Análise de variância dos caracteres teor e conteúdo de N no grão, e na palhada do caule e da vagem e índice de colheita de N de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha^{-1}), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.

Fonte de Variação	GL	Teor de N no Grão	Teor de N no Caule	Teor de N na Vagem	Conteúdo de N no Grão	Conteúdo de N no Caule	Conteúdo de N na Vagem	Índice de Colheita de N
N	1	20254,083+	402,521	1140,750+	240334350,750***	677350,083	632731,688**	23763,000
Erro A	4	3877,229	1523,958	121,542	2621283,125	116145,542	8763,417	4025,604
Cultivar	7	3402,560***	1260,735*	82,476	1383495,857	187889,667**	14806,640**	3095,190
N x cul	7	1369,036+	1119,997+	245,464*	3671907,131*	136569,179*	26814,830***	3457,619+
Erro B	28	600,467	504,625	79,685	1341189,815	45450,708	4363,940	1567,842
CV (%)		7,81	26,63	18,37	19,07	32,35	19,01	4,67

Tabela 48. Análise de variância dos caracteres conteúdo de N, contribuição da FBN e quantidade de N fixado no grão, e na palhada do caule e da vagem, de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium*, em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2011.

Fonte de Variação	GL	Conteúdo de N no Grão	Conteúdo de N no Caule	Conteúdo de N na Vagem	% FBN Grão	% FBN Grão Caule	% FBN Vagem
Repetição	2	4062913,625*	20063,292	15736,292	20591,167	14653,792	25958,792
Cultivar	7	1193097,423	88477,708*	7117,714	11715,423	11665,238	25155,994
Erro	14	644074,387	25935,101	5314,196	13567,405	5560,649	16872,458
CV (%)		20,93	29,81	31,33	46,87	16,60	26,41
		Quantidade de N fixado no grão	Quantidade de N fixado no caule	Quantidade de N fixado na vagem	Quantidade de N fixado na parte aérea		
Repetição	2	10034,375*	61,792	105,167	10880,042*		
Cultivar	7	3860,476	122,857**	20,929	3880,476		
Erro	14	2069,994	27,982	35,500	2466,137		
CV (%)	7	47,39	22,67	51,44	37,96		

Tabela 49. Análise de variância dos caracteres de nodulação e de acumulação de biomassa, na 1ª coleta de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.

Fonte de Variação	GL	Número de Nódulos por Planta	Massa de Nódulos por Planta	Massa de Raiz	Massa de Folha	Massa de Caule	Massa de Parte Aérea
N	1	7216610,641**	185545,563**	19355,766**	2386638,766*	762129,000**	5844306,250**
Erro A	6	487956,599	8326,490	1356,328	201508,224	49103,083	444936,573
Cultivar	7	869606,462**	13588,393***	33663,926***	1592255,480***	442862,250***	3532466,063***
N x cul	7	742775,033**	12015,205**	1538,123	221605,837	50221,143	465158,536
Erro B	42	205365,337	2650,668	1206,161	110020,141	32478,774	252434,180
N	1	7216610,641**	185545,563**	19355,766**	2386638,766*	762129,000**	5844306,250**
CV (%)		92,85	81,00	21,99	25,80	33,55	27,57

Tabela 50. Análise de variância dos caracteres de nodulação e de acumulação de biomassa, na 2ª coleta de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.

Fonte de Variação	GL	Número de Nódulos por Planta	Massa de Raiz	Massa de Folha	Massa de Caule	Massa de Vagem	Massa de Parte Aérea
N	1	194481,000***	1406,250	1037851,563**	688070,250**	24688,266	4023534,516*
Erro A	6	3830,458	1578,542	63509,896	36984,490	182128,578	659970,870
Cultivar	7	8141,643*	25666,464***	911552,098***	520662,491***	1220285,712***	5183477,105***
N x cul	7	7475,964*	1435,893	86951,170	60952,821	90658,087	618694,337
Erro B	42	2574,875	1672,565	85579,182	45692,894	139875,995	609599,917
CV (%)		80,31	22,36	19,44	25,63	38,02	23,50

Tabela 51. Massa seca de caule e massa seca de folha, na 1ª e na 2ª coleta de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.

Cultivar	Massa seca de folha (g m ⁻²)					
	Floração plena			Duas semanas após floração plena		
	Inoculado	N mineral	Média	Inoculado	N mineral	Média
Radiante	48,1	57,4	52,7 f	69,7	102,1	85,9 d
Jalo Precoce	75,7	96,8	86,2 e	111,1	126,3	118,7 c
Estilo	135,0	236,9	185,9 a	165,6	208,0	186,8 a
Grafite	144,9	199,8	172,3 ab	174,3	182,4	178,3 a
Marfim	93,8	139,1	116,4 de	131,6	184,0	157,8 ab
Ouro Negro	122,3	181,9	152,1 abc	119,2	164,7	141,9 bc
Pontal	111,0	121,1	116,0 cde	159,4	174,7	167,0 ab
Vereda	143,3	149,9	146,6 bcd	171,4	164,0	167,7 ab
Média	109,2 B	147,9 A		137,8 B	163,2 A	
Massa seca de caule (g m ⁻²)						
Radiante	22,5	28,5	25,5 c	40,1	61,2	50,6 d
Jalo Precoce	24,1	28,5	26,3 c	46,6	50,6	48,6 d
Estilo	47,9	101,6	74,7 a	87,9	118,4	103,1 ab
Grafite	63,6	95,4	79,5 a	102,7	102,6	102,6 ab
Marfim	31,9	53,1	42,5 bc	58,3	110,2	84,2 bc
Ouro Negro	43,8	69,6	56,7 b	54,9	81,9	68,4 cd
Pontal	33,3	48,0	40,6 bc	77,7	104,9	91,3 b
Vereda	75,5	92,4	83,9 a	116,2	120,5	118,4 a
Média	42,8 B	64,6 A		73,0 B	93,8 A	

Letras minúsculas comparam colunas e letras maiúsculas comparam linhas pelo teste Duncan a 5%.

Tabela 52. Análise de variância conjunta, da 1ª e da 2ª coletas, dos caracteres de nodulação e de acumulação de biomassa, de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.

Fonte de Variação	GL	Número de Plantas	Massa de Nódulos por Planta	Massa de Raiz	Massa de Folha	Massa de Caule	Massa de Parte Aérea
Repetição	3	9,000	12804,604**	1384,154	256830,841+	111931,594*	1308529,549*
Coleta	1	60,500*	4,500	19975,008***	1544622,820***	2819718,781***	72019501,320***
N	1	98,000**	379974,031***	15598,195**	3286086,570***	1449253,125***	9783123,195***
Col x N	1	12,500	52,531	5163,820+	138403,758	946,125	84717,570
Cultivar	7	9,429	18178,804****	56426,169***	2321845,847***	903498,888***	7756381,704***
Col x cul	7	15,357	3551,232	2904,222+	181961,731	60025,853	959561,463*
N x cul	7	6,571	16398,406***	1396,552	231553,767*	67838,804	693978,910
Col x N x cul	7	4,500	3092,763	1577,463	77003,240	43335,161	389873,963
Erro	93	10,290	2731,190	1444,767	97148,255	37246,674	418379,442
CV (%)		16,77	82,46	22,30	22,34	28,15	25,14

Tabela 53. Número de plantas e biomassa seca de nódulos, de raiz, de folha, de caule e de parte aérea, analisadas conjuntamente na 1ª e na 2ª coleta de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.

Cultivar	Número de plantas (por m ²)			Massa de nódulos por planta (mg)		
	Inoculado	N mineral	Média	Inoculado	N mineral	Média
1ª coleta	21	19	20 a	117	10	64 a
2ª coleta	19	18	18 b	118	8	63 a
Média	20 A	18 B		118 A	9 B	
Cultivar	Massa de raiz (g m ⁻²)			Massa de folha (g m ⁻²)		
	Inoculado	N mineral	Média	Inoculado	N mineral	Média
1ª coleta	14,1 bB	17,5aA	15,8 b	109,2	147,9	128,5 b
2ª coleta	17,8aA	18,8 aA	18,3 a	137,8	163,2	150,5 a
Média	15,9 B	18,1 A		123,5 B	155,5 A	
Cultivar	Massa de caule (g m ⁻²)			Massa de parte aérea (g m ⁻²)		
	Inoculado	N mineral	Média	Inoculado	N mineral	Média
1ª coleta	42,8	64,6	53,7 b	152,0	212,5	229,6 b
2ª coleta	73,0	93,8	83,4 a	307,2	357,4	284,9 a
Média	57,9 B	79,2 A		182,3 B	332,3 A	

Letras minúsculas comparam colunas e letras maiúsculas comparam linhas pelo teste Duncan a 5%.

Tabela 54. Análise de variância dos caracteres teor no caule e na folha, e conteúdo no caule, na folha e na parte aérea, na 1ª coleta de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.

Fonte de Variação	GL	Teor de N na Folha	Teor de N na Caule	Conteúdo de N na Folha	Conteúdo de N no Caule	Conteúdo de N na Parte Aérea
N	1	80089,000**	46117,563**	774400,000**	63315,141**	1280575,141**
Erro A	6	4962,500	1294,990	42748,542	1154,495	57256,724
Cultivar	7	5126,714*	8102,429***	175615,107***	8102,016***	248358,462***
N x cul	7	1426,000	1849,455*	43643,500*	2392,355	64876,212*
Erro B	42	1390,286	657,501	17080,577	1192,304	25464,474
CV (%)		10,84	13,59	29,53	35,32	29,53

Tabela 55. Análise de variância dos caracteres teor de N no caule, na folha e na vagem e conteúdo de N no caule, na folha, na vagem e na parte aérea, na 2ª coleta de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.

Fonte de Variação	GL	Teor de N no Grão	Teor de N no Caule	Teor de N na Vagem	Conteúdo de N na Folha	Conteúdo de N no Caule	Conteúdo de N na Vagem	Conteúdo de N na Parte Aérea
N	1	17922,516	7744,000*	79242,250**	238510,141**	26609,766**	122587,516*	1003252,641**
Erro A	6	4449,141	675,448	3303,323	14021,224	1277,203	20844,370	66072,974
Cultivar	7	3924,623*	3708,991***	17363,741***	74172,212***	4783,033***	254077,141***	417120,141***
N x cul	7	2082,837	432,429	1684857	18622,355	1205,766	5011,658	38639,462
Erro B	42	1349,903	499,662	1147,013	10260,653	870,906	15117,608	40228,272
CV (%)		11,84	17,11	9,87	21,73	27,82	35,43	21,82

Tabela 56. Análise de variância conjunta, da 1ª e da 2ª coletas, dos caracteres teor de conteúdo no caule, na folha e na parte aérea, de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.

Fonte de Variação	GL	Teor de N na Folha	Teor de N na Caule	Conteúdo de N na Folha	Conteúdo de N no Caule
Repetição	3	1664,404	1713,469*	29001,549	2139,927
Coleta	1	36214,133***	107764,031***	17648,508	2211,125
N	1	86892,383***	45828,781***	936225,070***	86008,781***
Col x N	1	11119,133*	8032,781***	76685,070*	3916,125*
Cultivar	7	6791,222**	11142,531***	225045,186***	10916,799***
Col x cul	7	2260,115	668,888	24742,133	1968,250
N x cul	7	2888,901	1720,281**	44669,052**	2394,692*
Col x N x cul	7	619,936	561,603	17596,802	1203,429
Erro	93	1791,017	594,442	15074,684	1019,626
CV (%)		12,94	15,27	27,03	31,33

Tabela 57. Teor e conteúdo de N na folha e no caule, analisadas conjuntamente nas duas coletas de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.

Cultivar	Teor de N na folha (mg g ⁻¹)			Teor de N no caule (mg g ⁻¹)		
	Inoculado	N mineral	Média	Inoculado	N mineral	Média
1ª coleta	30,9 Ba	37,9 Aa	34,4 a	16,2 Ba	21,6 Aa	18,9 a
2ª coleta	29,4 Ba	32,7 Ab	31,0 b	12,0 Bb	14,2 Ab	13,1 b
Média	30,1 B	35,3 A		14,1 B	17,9 A	
Cultivar	Conteúdo de N na folha (g m ⁻²)			Conteúdo de N no caule (g m ⁻²)		
	Inoculado	N mineral	Média	Inoculado	N mineral	Média
1ª coleta	3,33 Bb	5,53 Aa	4,43 a	0,66 Bb	1,29 Aa	0,98 a
2ª coleta	4,05 Ba	5,27 Aa	4,66 a	0,86 Ba	1,26 Aa	1,06 a
Média	3,69 B	5,40 A		0,76 B	1,28 A	

Letras minúsculas comparam colunas e letras maiúsculas comparam linhas pelo teste Duncan a 5%.

Tabela 58. Análise de variância dos caracteres número de plantas, produção de grão (g m^{-2}), número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de 1 grão, índice de colheita e produção de grãos (3 m^{-2}), de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha^{-1}), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.

Fonte de variação	GL	Número de Plantas	Produção de Grãos m^2	Número de Vagens por Planta	Número de Grãos por Vagem	Massa de 1 grão	Índice de Colheita	Produção de Grãos 3 m^2
N	1	8,266	5438807,016	9555,063+	9,000	618,766	3108,063	6446521,000*
Erro A	6	10057	19003697,891	1741,281	30,448	467,557	887,979	928331,292
Cultivar	7	15,730***	3514574,908***	9914,643***	255,170***	48727,480***	4553,563***	3249456,429***
N x cul	7	5,766	479402,837	288,455	10,250	593,230	228,777	301122,929
Erro B	42	2,903	449242,081	460,698	11,996	390,998	355,717	212756,923
CV (%)		8,53	16,01	15,42	7,13	5,15	2,78	12,81

Tabela 59. Análise de variância dos caracteres teor e conteúdo de N no grão, e na palhada do caule e da vagem e índice de colheita de N de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha^{-1}), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.

Fonte de Variação	GL	Teor de N no Grão	Teor de N no Caule	Teor de N na Vagem	Conteúdo de N no grão	Conteúdo de N no Caule	Conteúdo de N na Vagem	Índice de Colheita de N
N	1	9,000	435,766	425,391+	553908,063	332352,250	348985,563*	618,766+
Erro A	6	1156,833	372,057	73,599	273151,073	118031,167	29274,229	140,703
Cultivar	7	3938,429***	1669,051***	84,819	376014,607***	188066,393**	24568,848*	890,819***
N x cul	7	1300,250*	395,408	19,069	45000,491	30364,250	12098,848	289,123
Erro B	42	532,310	288,593	49,206	62808,466	51648,619	8482,670	176,465
CV (%)		6,33	20,01	15,60	18,52	31,92	18,39	1,45

Tabela 60. Correlação entre fontes de N, produção de grãos e componentes de produção de cultivares de feijoeiro, inoculado com *Rhizobium* ou adubado com N mineral (90 kg ha⁻¹), em experimentos de campo em Santo Antônio de Goiás, no ano de 2012.

Correlação	Todas as parcelas		Inoculado		N mineral	
	R	Prob.	R	Prob.	R	Prob.
Produção x número de plantas	-0,304	0,015	-0,489	0,004	-0,014	0,940
Produção x número de vagens por planta	0,859	0,000	0,905	0,000	0,761	0,000
Produção x número de grãos por vagem	0,573	0,000	0,584	0,000	0,594	0,000
Produção x massa de 1 grão	-0,417	0,001	-0,377	0,033	-0,500	0,004
Produção x índice de colheita	0,284	0,023	0,436	0,013	0,333	0,062
Número de vagens por planta x número de grãos por vagem	0,501	0,000	0,528	0,002	0,484	0,005
Número de grãos por vagem x massa de 1 grão	-0,753	0,000	-0,740	0,000	-0,766	0,000

Tabela 61. Análise de variância dos parâmetros massa seca de folha, caule, parte aérea, raiz, nódulos, cotilédones e tegumento, no período de pré-floração de três cultivares de feijoeiro inoculado com *Rhizobium*, crescido em cultivo hidropônico com solução nutritiva isenta de N, no ano de 2012.

Fonte de variação	GL	Massa de Folha	Massa de Caule	Massa de Parte Aérea	Massa de Raiz	Massa de Nódulos	Massa de Cotilédone	Massa de Tegumento
Repetição	4	31926,944	7956,111	67061,944	1418,889	1886,111	735,967	2,444
Cultivar	2	171607,222**	8962,222	115957,222	12708,889	7304,156**	4700,156***	397,489***
N	2	1135135,556***	75940,556***	1798257,222***	60243,889***	58133,956***	1093,089+	2,022
Cul x N	4	202372,222***	11723,889*	310933,056***	38932,222***	2784,722	270,889	3,989*
Erro	32	28401,319	3400,486	48253,819	4768,889	1186,799	375,867	1,469
CV (%)		33,04	32,68	31,90	20,50	43,92	46,06	5,10

Tabela 62. Massa seca de folha, caule, no período de pré-floração de três cultivares de feijoeiro inoculado com *Rhizobium*, crescido em cultivo hidropônico com solução nutritiva isenta de N, no ano de 2012.

Fonte de N	Massa de Folha (mg/Planta)				Massa de Caule (mg/planta)			
	Ouro Negro	Radiante	Grafite	Média	Ouro Negro	Radiante	Grafite	Média
CIAT 899	767	434	938	713 a	239	213	239	230 a
Comercial	598	450	813	620 a	188	222	213	208 a
Controle	131	344	116	197 b	67	185	40	97 b
Média	499 AB	409 B	622 A		165 A	207 A	164 A	

Letras minúsculas comparam colunas e letras maiúsculas comparam linhas pelo teste Duncan a 5%.

Tabela 63. Análise de variância dos parâmetros massa seca de parte aérea, de raiz, de nódulos, de cotilédones e número e tamanho de nódulos, aos 13 DAT de duas cultivares de feijoeiro inoculado com *Rhizobium*, crescido em cultivo hidropônico com solução nutritiva isenta de N, no ano de 2013.

Fonte de Variação	GL	Massa de Parte Aérea	Massa de Raiz	Massa de Nódulos	Massa de Cotilédone	Número de Nódulos	Diâmetro de Nódulos
Repetição	3	535,563	57,063	27,417	30,729	62,917	247,167
Cultivar	1	159001,563***	50963,063***	240,250*	1425,063***	900,000*	1980,250**
N	1	2889,063	60,063	506,250**	1,563	2550,250**	79524,000***
Cul x N	1	2475,063	45,563	240,250*	14,063	900,000*	1980,250**
Erro	9	3051,340	599,063	25,639	8,507	135,861	184,000
CV (%)		15,93	11,92	90,02	5,75	92,32	19,24

Tabela 64. Análise de variância dos parâmetros massa seca de folha, de caule, de flor, de parte aérea, de raiz, de cotilédones, na floração plena de duas cultivares de feijoeiro inoculado com *Rhizobium*, crescido em cultivo hidropônico com solução nutritiva isenta de N, no ano de 2013.

Fonte de variação	GL	Massa de folha	Massa de caule	Massa de flor	Massa de parte aérea	Massa de raiz	Massa de cotilédone
Repetição	3	80927,500	5686,250	101,729	130370,063	6562,063	4,917
Cultivar	1	2316484,000***	56406,250**	473,063	3019775,063***	2835,563	2352,250***
N	1	8023056,250***	314160,250***	22725,563***	12554620,563***	266514,063***	2,250
Cul x N	1	3155952,250***	278256,250***	473,063	5210947,563***	422825,063***	12,250
Erro	9	53459,556	3298,250	426,063	81501,618	10498,674	5,139
CV (%)		24,02	18,39	54,77	21,75	17,92	4,48

Tabela 65. Análise de variância dos parâmetros massa seca de nódulos, e número e tamanho de nódulos, na floração plena de duas cultivares de feijoeiro inoculado com *Rhizobium*, crescido em cultivo hidropônico com solução nutritiva isenta de N, no ano de 2013.

Fonte de variação	GL	Massa de nódulos	Número de nódulos	Diâmetro de nódulos
Repetição	3	4775,229	4225,083	873,500
Cultivar	1	41514,063**	6162,250	552,250
N	1	248751,563***	124962,250***	211600,000***
Cul x N	1	41514,063**	6162,250	552,250
Erro	9		1500,861	990,111
CV (%)			43,84	27,36

Tabela 66. Massa seca de folha, de caule, e de flor na floração plena de duas cultivares de feijoeiro inoculado com *Rhizobium*, crescido em cultivo hidropônico com solução nutritiva isenta de N, no ano de 2013.

Fonte de N	Massa de folha (mg/planta)			Massa de caule (mg/planta)			Massa de flor (mg/planta)		
	Radiante	Grafite	Média	Radiante	Grafite	Média	Radiante	Grafite	Média
Inoculado	846	2496	1671 a	261	644	453 a	86	65	75 a
Controle	318	191	255 b	245	100	172 b	0	0	0 b
Média	582 B	1343 A		253 B	372 A		43 A	32 A	

Tabela 67. Análise de variância dos parâmetros massa seca de folha, de caule, de vagem de parte aérea, de raiz, e de cotilédones, duas semanas após floração plena de duas cultivares de feijoeiro inoculado com *Rhizobium*, crescido em cultivo hidropônico com solução nutritiva isenta de N, no ano de 2013.

Fonte de variação	GL	Massa de folha	Massa de caule	Massa de vagem	Massa de parte aérea	Massa de raiz	Massa de cotilédone
Repetição	3	35405,229	28622,729	362511,396	842890,563	4290,063	1,063
Cultivar	1	1372998,063**	91355,063+	6246250,563**	1050112,563	10050,063	2093,063***
N	1	19331410,563***	3375487,563***	25007500,563***	126230842,563***	1261690,563***	3,063
Cul x N	1	1703677,563**	170362,563*	6246250,563**	610351,563	261888,063**	7,563
Erro	9	93493,785	20816,451	541770,951	1057340,285	23227,674	6,285
CV (%)		21,80	23,78	58,88	31,55	19,91	5,05

Tabela 68. Análise de variância dos parâmetros massa seca de nódulos, e número e tamanho de nódulos, duas semanas após floração plena de duas cultivares de feijoeiro inoculado com *Rhizobium*, crescido em cultivo hidropônico com solução nutritiva isenta de N, no ano de 2013.

Fonte de variação	GL	Número de nódulos	Massa de nódulos	Diâmetro de nódulos
Repetição	3	852,167	6417,729	1329,563
Cultivar	1	41616,000*	26978,063	5,063
N	1	537289,000***	705180,063***	268065,063***
Cul x N	1	41616,000*	26978,063	5,063
Erro	9	5063,278	7087,729	958,896
CV (%)		38,83	40,10	23,92

Tabela 69. Massa seca de folha, e de caule, duas semanas após floração plena de duas cultivares de feijoeiro inoculado com *Rhizobium*, crescido em cultivo hidropônico com solução nutritiva isenta de N, no ano de 2013.

Fonte de N	Massa de folha (mg/planta)			Massa de caule (mg/planta)		
	Radiante	Grafite	Média	Radiante	Grafite	Média
Inoculado	1883	3121	2502 a	887	1245	1066 a
Controle	337	270	303 b	175	120	147 b
Média	1110 B	1696 A		531 B	682 A	

Letras minúsculas comparam colunas e letras maiúsculas comparam linhas pelo teste Duncan a 5%.