

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO - UNIFENAS

MARIANA CAROLINE SPINELI

**ADUBAÇÃO NITROGENADA ASSOCIADA À INOCULAÇÃO COM *Rhizobium*
tropici NA CULTURA DO FEIJOEIRO**

ALFENAS - MG

2015

MARIANA CAROLINE SPINELI

**ADUBAÇÃO NITROGENADA ASSOCIADA À INOCULAÇÃO COM *Rhizobium*
tropici NA CULTURA DO FEIJOEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade
José do Rosário Vellano - UNIFENAS,
como parte das exigências para obtenção
do Título do Mestre em Sistema de
Produção na Agropecuária.

Orientadora: Dra. Ligiane Aparecida Florentino
Coorientador: Dr. Adriano Bortolotti da Silva

**ALFENAS – MG
2015**

Spinesi, Mariana Caroline
Adubaçãõ nitrogenada associada à inoculaçãõ com Rhizobium
tropici na cultura do feijoeiro.—Mariana Caroline Spinesi.-- 2015.
47 f.

Orientadora: ProfªDrª Ligiane Aparecida Florentino

Dissertaçãõ (Mestrado)- Programa de Pós-graduaçãõ
em Sistemas de Produçãõ na Agropecuária -Universidade
José do Rosário Vellano, Alfenas, 2015.

1. Bactérias nodulíferas 2. Leguminosa 3. Fertilizantes
nitrogenados I. Universidade José do Rosário Vellano II. Título
CDU: 635.652(043)

Certificado de Aprovação

TÍTULO: "ADUBAÇÃO NITROGENADA ASSOCIADA À INOCULAÇÃO COM *RHIZOBIUM TROPICI* NA CULTURA DO FEIJOEIRO"

AUTOR: Mariana Caroline Spineli

ORIENTADOR: Profa. Dra. Ligiane Aparecida Florentino

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de **Mestre Profissional em Sistemas de Produção na Agropecuária** pela Comissão Examinadora.



Profa. Dra. Ligiane Aparecida Florentino
Orientadora



Prof. Dr. Adriano Bortolotti da Silva



Profa. Dra. Giselle Prado Brigate

Alfenas, 08 de maio de 2015.



Prof. Dr. Mário Sérgio Oliveira Swerts
Diretor de Pesquisa e Pós-graduação
UNIFENAS

A Deus, por sempre me abençoar e iluminar meu caminho, aos meus pais Varlei e Wanderleia, irmãs Marília e Maristela por serem a razão da minha vida. À minha querida ex-professora Dra. Giselle Prado Brigante, por me incentivar a não desistir em momentos que deparei em grandes dificuldades, a quem tenho total admiração pela competência e postura, sendo um exemplo de profissional a seguir.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade José Rosário Vellano - UNIFENAS, ao Programa de Pós-Graduação em Sistema de Produção na Agropecuária.

À Professora Dra. Ligiane Aparecida Florentino pela forma humana como conduziu minha orientação, pela oportunidade e ensinamentos que foram de fundamental importância ao contínuo aprendizado e amadurecimento pessoal e profissional. Ao meu coorientador Professor Dr. Adriano Bortolotti da Silva pelas contribuições.

Ao Professor Dr. José Messias Miranda (*in memoriam*) pela oportunidade concedida.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Giselle Prado Brigante, Dra. Ligiane Aparecida Florentino e Dr. Adriano Bortolotti da Silva, pelas significativas contribuições e disponibilidade. A vocês minha gratidão, meu carinho e respeito.

Ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Ao colega Thiago por sua contribuição para realização deste trabalho que foi de grande valor.

Ao Laboratório de Microbiologia do Solo pelas instalações, e aos colegas em especial ao Márcio de Souza Dias e Flávia Romam pela amizade.

Aos colegas do curso de pós-graduação, Márcio de Souza Dias, Antônio Carlos Estanislau, Carlos Emanuel, Dominício Júnior, Fabiula Ferrarez, Geraldo Gomes Junior, Carlos Alberto de Carvalho, Gentil Luiz Miguel Filho, Fernando Spadon, Kaio.

A todos os meus professores do curso de pós-graduação, Dra. Ligiane Aparecida Florentino, Dra. Roberta Bessa, Dr. Paulo Roberto Correa Landgraf, Dr. José Claudio de Souza Reis, Dr. Osmar Vicente Chévez Pozo, pelo apoio e ensinamentos.

Aos colegas de graduação, Aline Mesquita, Ana Paula Pereira, Antônio Carlos Oliveira Junior, Gustavo Queiroga, Gustavo Matheus Barbosa, André Stefanuto, Dalvana Pereira, Eunice de Oliveira, Tati Braga, Fábio, Anderson, Eunice de Oliveira, Ana Caroline Bifaroni, pela ótima convivência e auxílio durante as atividades desenvolvidas ao longo do curso.

A todos meus amigos, em especial ao Paulo Henrique e Matheus Rabello, pela paz transmitida nos momentos em que me encontrei incapaz de prosseguir, pela amizade, apoio e incentivo a seguir sempre em frente.

Aos meus pais Varlei Silva Spineli e Wanderleia Xavier pelos exemplos de vida e trabalho, pelo carinho, compreensão e dedicação, por estarem sempre ao meu lado, ajudando-me em tudo que preciso. Às minhas irmãs Marília e Maristela pelo apoio e amor incondicional. Às minhas avós queridas Maria Olinda e Antonia Augusta pela ajuda e carinho. Aos meus sobrinhos lindos João Vitor e Alice obrigada por existirem. Amo vocês. Aos meus familiares e amigos por acreditarem na minha vitória.

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito da associação entre inoculação e aplicação de fertilizantes nitrogenados em plantio e cobertura no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). O experimento foi conduzido em campo no setor experimental de Olericultura da Faculdade de Agronomia da Universidade José do Rosário Vellano - Unifenas, Alfenas - MG. O delineamento experimental foi realizado em blocos casualizados, com oito tratamentos e três repetições, sendo um tratamento controle sem adição do inoculante e adubação, os demais tratamentos constituídos de N no plantio, N em cobertura, N no plantio e em cobertura, inoculação e N no plantio, inoculação e N em cobertura, inoculação e N no plantio e cobertura, e apenas um tratamento utilizando somente inoculação. Utilizou-se o inoculante da espécie *Rhizobium tropici*, estirpe CIAT 899^T, que foi cultivada em meio 79, contendo azul de bromotimol e pH 6,8, até o aparecimento de colônias isoladas. Estas foram transferidas para o meio 79 líquido por três dias, sob agitação, a 28°C até a fase log de crescimento, contendo aproximadamente 10⁸ células mL⁻¹. Sessenta mililitros desta suspensão bacteriana foram inoculados em 1400 sementes utilizando cv. Pérola. Todos os tratamentos receberam adubação de 110 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 50 kg ha⁻¹ de K₂O no sulco de plantio. Aos 38 dias após o plantio, todos os tratamentos também receberam adubação com molibdênio aplicado via foliar. A adubação nitrogenada correspondeu de 40 kg ha⁻¹ aplicados no sulco de plantio e 60 kg ha⁻¹ aplicados em cobertura aos 28 dias via foliar. Foram avaliados os parâmetros: peso seco da parte aérea (PSPA), teor de nitrogênio da parte aérea (TNPA), número de nódulos (NN) e peso seco dos nódulos (PSN), atividade nitrato redutase (ANR) no período do florescimento, e número de vagem por planta (NVP), número de sementes por planta (NSP), produtividade de grãos em (kg ha⁻¹) e produtividade de grãos em saca de 60 kg ha⁻¹. Os resultados obtidos foram que a inoculação é uma prática viável, sendo recomendado seu uso em áreas em que não se empregam adubações nitrogenadas. O emprego do inoculante em associação com adubação nitrogenada promoveu o aumento do crescimento das plantas, bem como da produção do feijoeiro.

Palavras-chave: Bactérias nodulíferas, leguminosa, fertilizantes nitrogenados.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the association between inoculation and application of nitrogen fertilizers in planting and cover the bean (*Phaseolus vulgaris* L.). The experiment was conducted in the field in Vegetable Crops experimental sector of the Faculty of Agronomy of the University José do Rosário Vellano - Unifenas, Alfenas - MG. The experimental design was randomized blocks, with eight treatments and three repetitions, being a control treatment without addition of inoculant and fertilizer, the other treatments were made up of N at planting, nitrogen in N at planting and coverage, inoculation and N in planting, inoculation and nitrogen in inoculation and N at planting and coverage, and only one treatment using only inoculation. We used the species *Rhizobium* inoculant *tropicici* strain CIAT 899^T, which was cultured in 79, containing bromothymol blue and pH 6.8, until the appearance of isolated colonies. These were transferred to liquid medium 79 for three days under stirring at 28 ° C until log phase growth containing approximately 108 cells ml⁻¹. Sixty milliliters of this bacterial suspension was inoculated in 1400 using seeds cv. Pearl. All treatments received fertilization of 110 kg ha⁻¹ of P₂O₅ and 50 kg ha⁻¹ K₂O at planting, after planting to 38 days all treatments also received fertilization applied via leaf molybdenum. Nitrogen fertilization corresponded to 40 kg ha⁻¹ applied at planting and 60 kg ha⁻¹ applied in coverage at 28 days foliar. We evaluated the dry weight parameters of shoot (PSPA), shoot nitrogen content (TNPA), number of nodes (NN) and dry weight of nodules (PSN), nitrate reductase activity (NRA) in the flowering period, and number of pods per plant (NVP), number of seeds per plant (NSP), grain productivity (kg ha⁻¹) and grain yield in bag of 60 kg ha⁻¹. The results were that the inoculation is a practical feasible, and should be used in areas where there is used nitrogen fertilizer. The use of inoculant in association with nitrogen fertilization promoted higher plant growth and production of dry beans.

Keywords: Nodulating bacteria, legumes, nitrogen fertilizers.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1. Resultado da análise química do solo utilizado no experimento em campo.31

Tabela 2. Peso seco da parte aérea (PSPA), teor de nitrogênio na parte aérea (TNPA), número de nódulos (NN), peso seco dos nódulos (PSN) e atividade nitrato redutase (ANR), de planta de feijão, no período da floração, cultivadas sob diferentes tratamentos.34

Tabela 3. Número de vagem por plantas (NVP), número de sementes por planta (NSP), produtividade de grãos kg ha^{-1} (Kg ha^{-1}) e produtividade de sacas 60 kg ha^{-1} (sacas ha^{-1}), do feijoeiro cultivado sob os diferentes tratamentos.....37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANR	Atividade Nitrato Redutase
DAE	Dias após Emergência
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
NN	Número de Nódulo
NVP	Número de Vagem por Planta
NSP	Número de Semente por Planta
PNS	Peso Seco Nódulo
PSPA	Peso Seco Parte Aérea
TNPA	Teor de Nitrogênio Parte Aérea

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Cultura do feijoeiro	15
2.2 Adubação nitrogenada e Fixação Biológica Nitrogênio.....	16
2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio na cultura do feijão.....	18
2.4 Molibdênio no feijoeiro.....	20
2.5 Enzima nitrato redutase	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
CAPÍTULO 2	29
ARTIGO 1 :Adubação nitrogenada associada à inoculação com <i>Rhizobium tropici</i> na cultura do feijoeiro	30
INTRODUÇÃO	31
MATERIAL E MÉTODOS	32
RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
CONCLUSÕES	42
AGRADECIMENTOS	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), alimento que está presente diariamente na mesa de sua população. Para o cultivo do feijoeiro, o nitrogênio é um dos nutrientes que mais limita a produtividade da cultura (BARBOSA et al., 2010). No entanto, atualmente, o manejo adequado da adubação nitrogenada é considerado uma das principais dificuldades encontradas para essa cultura, pois, mesmo que outros fatores de produção sejam otimizados, a aplicação de baixas doses de N pode limitar o potencial produtivo da cultura e doses excessivas de N, além de contribuir com o alto custo econômico da produção, podem promover riscos ao meio ambiente quando carregadas para o lençol freático provocando a contaminação dos aquíferos subterrâneos, rios e lagos (SANTOS et al., 2003). Assim, é despertada a necessidade do desenvolvimento de técnicas de manejo que possam maximizar o uso eficiente desse nutriente pelo feijoeiro.

O feijoeiro pode obter parte do nitrogênio necessário para seu desenvolvimento através da associação com bactérias que apresentam capacidade de realizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN), processo que consiste na transformação biológica do N₂ atmosférico em amônia (NH₃), sendo realizada principalmente por bactérias diazotróficas, de vida livre ou em associação com plantas, em especial, as leguminosas. A FBN é uma alternativa tecnológica para aumentar a produtividade agropecuária, de maneira a minimizar os efeitos causados pelos adubos nitrogenados— que granjeiam alto custo ambiental e econômico na produção, através da simbiose com plantas que são capazes de fornecer nitrogênio para o desenvolvimento da cultura (FEREIRA et al., 2009; RUFINI et al., 2011).

Apesar de o feijoeiro possuir capacidade de estabelecer simbiose com bactérias, alguns fatores limitam o desempenho das estirpes inoculadas e reduzem essa relação (MOURA et al., 2009). Um desses fatores é o teor de N presente no solo pode afetar essa simbiose. Assim, o grande desafio que se apresenta na cultura é conseguir um manejo adequado desse processo, visando aumentar a eficiência da FBN, de modo a suprir os requerimentos das plantas (STRALIOTTO et al., 2003). Outro fator que contribui com a limitação da produtividade no feijoeiro está relacionado à deficiência de molibdênio, pois o metabolismo do nitrogênio na planta pode ser afetado por esse micronutriente que faz parte da composição da enzima nitrato redutase, responsável pela

assimilação de N no solo, e da nitrogenase, responsável pela fixação biológica de N₂ pelo rizóbio (NUNES et al., 2003; TAIZ; ZEIGER, 2004). Portanto, o suprimento adequado de molibdênio pode influenciar positivamente na eficiência do *Rhizobium* no processo de fixação simbiótica do nitrogênio (ARAÚJO et al., 1987).

O estudo sobre a associação entre adubação nitrogenada e inoculação no feijoeiro com doses de nitrogênio, através de recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais pela 5ª aproximação de acordo com (CHAGAS et al., 1999), poderá contribuir para o aumento da eficiência do uso de nutrientes e da produtividade na cultura. Diante deste contexto, objetivou-se examinar o efeito da associação entre inoculação e aplicação de fertilizantes nitrogenados em plantio e cobertura no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), visando avaliar os fatores de crescimento e produção da cultura.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cultura do feijoeiro

No Brasil, a produção de feijão-comum apresenta grande importância social e econômica. De acordo com a Sociedade Nacional de Agricultura (SNA, 2013), seu cultivo é realizado por diversos tipos de produtores, em diversas regiões brasileiras, utilizando diferentes níveis tecnológicos, nas diferentes épocas e safras. Estas podem ser divididas em três etapas: a primeira, conhecida como safra das águas, colhida de dezembro a março, principalmente nos estados do PR, MG, SP, GO e SC; a segunda safra, determinada no período de seca, colhida de abril a julho, concentrando-se no PR, BA, MT e MG; e a terceira, a safra de inverno, colhida de agosto a outubro em MG, GO, SP e MT. O feijão-comum é consumido em todo território brasileiro e mundial, por todas as classes sociais, sendo, para muitos indivíduos, a principal fonte de proteínas, minerais, vitaminas e fibras (DELPINO; LAJOLO, 2003; MESQUITA et al., 2007).

O Brasil apresenta um consumo per capita estimado em 17 kg habitante⁻¹ ano⁻¹ (CONAB, 2013). O país produz e consome diversos tipos de feijão, destacando-se os do Grupo I, que inclui o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), com 64% da produção, o

Preto, com 2%, e o Cores, com 42%, e o do Grupo II, o Feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), com 36% da produção. Segundo a Secretária de Estado da Agricultura e do Abastecimento (SEAB, 2013), as espécies de feijão do grupo *Phaseolus vulgaris* L. são cultivadas em todo o território brasileiro, enquanto *Vigna unguiculata* tem seu plantio predominado na região Amazônica e Nordeste.

Segundo SNA (2013), os principais estados brasileiros produtores de feijão foram PR, MG, GO, MT e BA, que unidos correspondem a 70,69% da produção nacional do país. De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2013), o Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão-comum, com produção anual superior a 3 milhões de toneladas, colhida atualmente em cerca de 4 milhões de hectares e designada inteiramente ao mercado interno.

De acordo com FIESP e ÍCONE (2012), na safra entre 2001/2002 e 2010/2011, a produção total de feijão no Brasil aumentou em 778 mil toneladas, e, segundo projeções de mesma fonte para a produção total de feijão no ano de 2021/2022, haverá um aumento de 25% em relação a 2010/2011. Mesmo assim, o país continuará importando feijão, adquirindo do exterior um volume de 114 mil toneladas.

2.2 Adubação nitrogenada e Fixação Biológica Nitrogênio

Dentre os nutrientes, o nitrogênio (N) constitui um dos mais limitantes ao crescimento do feijoeiro. As formas preferenciais de absorção de N inorgânico pelas plantas são a amônia (NH_4^+) e o nitrato (NO_3^-), no entanto, a disponibilidade desse nutriente, principalmente em solos tropicais, é baixa, sendo utilizadas adubações nitrogenadas para suprir essa deficiência para o desenvolvimento das culturas. Em Minas Gerais, as recomendações oficiais de adubação do feijão-comum variam de 20 a 40 kg ha⁻¹ de nitrogênio plantio e de 20 a 60 kg ha⁻¹ de nitrogênio em cobertura, dependendo do nível tecnológico do produtor e da expectativa de produtividade (CHAGAS et al., 1999). Contudo, a adubação nitrogenada deve ser efetuada de maneira a fornecer uma adequada nutrição à planta, em época que ainda favoreça o aumento do número de vagens por planta, ou seja, até o início do florescimento, já que a nutrição mineral afeta diretamente a fixação de flores e vagens (PORTES, 1996).

Segundo Moraes (1988), não se pode desprezar a adubação nitrogenada no feijoeiro, a razão pela qual o N é recomendado nas fórmulas de adubação. No entanto, o

feijoeiro, sendo uma leguminosa, apresenta condições de beneficiar-se da associação simbiótica com *Rhizobium*, o que contribui especificamente para a economia de nitrogênio. Porém, a fixação biológica de nitrogênio não é capaz de suprir toda a necessidade de N dessa cultura.

Para a cultura do feijoeiro, a maioria das recomendações nitrogenadas é direcionada ao sistema de preparo convencional. Carvalho et al. (1992) o recomendam 90 kg ha⁻¹ de N para alcançar a produtividade máxima. Já Silveira e Damasceno (1993) recomendam apenas 72 kg ha⁻¹ de N para maximizar a produtividade do feijoeiro. Silva et al. (2000), em sistema de preparo convencional, obtiveram resposta quadrática do feijoeiro ao N e a produtividade máxima foi alcançada com 74 kg ha⁻¹ de nitrogênio. Por outro lado, no mesmo tipo de solo, sob sistema de plantio direto, Soratto et al. (2001) e Silva (2002) verificaram resposta linear da produtividade até a dose máxima testada, ou seja, 100 e 150 kg ha⁻¹, respectivamente.

É importante considerar, quando se faz a introdução de rizóbios selecionados via inoculante, a possibilidade das populações naturalizadas presentes no solo promoverem nodulação, excetuando-se quando a inoculação ocorrer em condições de solo esterilizado. Portanto, as estirpes de rizóbio do inoculante devem ser, além de eficientes na FBN, suficientemente competitivas para que sejam capazes de superar as nativas, assegurando maior nodulação (MATOSO; KUSDRA, 2014).

Os autores Stralotto, Teixeira e Mercante (2003) ressaltam que, apesar de o feijoeiro ser uma planta com elevada capacidade de absorção do nitrogênio disponível no solo, se faz necessário o conhecimento do metabolismo do N na planta, uma vez que o manejo adequado da adubação nitrogenada é fator decisivo para o sucesso da produção, na qual a presença ou ausência de N pode afetar negativamente a simbiose de várias formas (PEREIRA, 1982). A aplicação elevada de doses de nitrogênio afeta inicialmente o número e peso de nódulos. Mas, segundo Ruschel e Ruchel (1975) e Ruschel e Saito (1977), esse tipo de aplicação parece não exibir o desenvolvimento do nódulo. De modo geral, entretanto, a adição de elevadas doses de nitrogênio no solo, principalmente no plantio, tem efeito negativo sobre a nodulação e a fixação biológica de nitrogênio (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; SOUZA; SORATTO; PAGANI, 2011).

Por outro lado, níveis muito baixos de nitrato no solo podem ser limitantes a atividade simbiótica (ROSOLEM, 1987). Trabalhos têm evidenciado que pequenas doses de N aplicadas no plantio como adubação de arranque favorece o desenvolvimento do sistema radicular do feijoeiro, de forma a aumentar os sítios de

infecção radicular, conseqüentemente beneficiando a fixação biológica de nitrogênio. Fato evidenciado por Brito, Muraoka e Silva (2011) que mencionaram a associação simbiótica em feijão comum necessitar de uma dose de arranque (40 kg ha^{-1} de N) para a obtenção de produtividade economicamente aceitável, mostrando que a aplicação de pequenas doses de N mineral no início do desenvolvimento do feijoeiro foi favorável à planta hospedeira.

Grande parte dos problemas relacionados com a FBN no feijoeiro está no processo de domesticação e seleção de cultivares, dirigindo as características desejáveis apenas para o lado comercial e descuidando dos caracteres de nodulação, o que pode ter modificado o equilíbrio simbiótico entre o rizóbio e a planta, condição demonstrada pela ocorrência de feijoeiros silvestres frequentemente apresentarem maior capacidade de nodulação do que os domesticados (FRANCO et al., 2002).

2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio na cultura do feijão

O nitrogênio frequentemente limita as produções agrícolas brasileiras. Esse nutriente pode ser fornecido em grande escala, basicamente, por duas formas: através dos fertilizantes nitrogenados ou pelo processo de fixação biológica do nitrogênio.

No procedimento industrial, a obtenção de fertilizantes nitrogenados conhecidos como Haber-Bosch ocorre pela reação entre os gases de nitrogênio e o hidrogênio, utilizando altas pressões e temperaturas, o que gera um enorme gasto de energia advinda de fontes não renováveis, como o petróleo (MARIN et al., 2012). Já a fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo natural mediado por gêneros de bactérias conhecidos como diazotróficos, que podem estar presentes no solo livremente ou em associação com plantas, em especial, leguminosas. Esta simbiose entre plantas leguminosas e bactéria caracteriza-se pela formação de uma estrutura especializada, denominada nódulos.

O nitrogênio é o gás mais abundante na atmosfera, representando 78% de todos os gases. Porém, esse gás não pode ser absorvido e assimilado diretamente pelas plantas na forma em que se encontra (N_2). A fixação biológica de nitrogênio é mediada por alguns gêneros de bactérias que possuem uma enzima denominada nitrogenase, que faz o processo de redução do nitrogênio para a amônia em temperaturas ambiente, sob

condições normais de pressão e utilizando apenas energia fornecida ao sistema enzimático na forma de adenosina trifosfato (ATP) (FANCELLI; TSUMANUMA, 2007).

O feijão é uma leguminosa que possui a capacidade de estabelecer simbiose com determinadas espécies de bactérias do gênero *Rhizobium* e demais gêneros (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A inoculação de bactérias capazes de fixar o nitrogênio atmosférico e fornecê-lo a cultura do feijoeiro é uma alternativa que pode substituir, ainda que parcialmente, a adubação nitrogenada, resultando em benefícios econômicos e ambientais (STRALITIOTTO; TEIXEIRA; MERCANTE, 2003).

No entanto, o sucesso desse processo é influenciado por diversos fatores – como climáticos, edáficos e a existência de populações de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas presentes no solo, que apresentam diferenças no potencial de fixação e competem por sítios nodulares – que são limitantes aos benefícios que a fixação biológica de nitrogênio pode oferecer (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Além disso, na cultura do feijoeiro, a ocorrência de altas temperaturas, de acidez do solo, de toxidez de alumínio e a fisiologia da planta hospedeira em simbiose também afetam a eficiência do processo de fixação biológica de nitrogênio (RAPOSEIRAS et al., 2002; DEKAL et al., 2006; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; RUFINI et al., 2011; FONSECA et al., 2013).

A ocorrência de deficiência nutricional das plantas é outro fator que pode afetar a eficiência do processo de FBN. Entre os micronutrientes que as plantas necessitam para seu desenvolvimento podemos destacar o cobalto, elemento integrante da molécula chamada cobalamida (Vitamina B12) e que atua nos processos metabólicos para a formação da leghemoglobina, substância que controla o oxigênio dentro dos nódulos, proporcionando o funcionamento da enzima nitrogenase. A ausência ou baixa quantidade de cobalto prejudica gravemente a fixação do nitrogênio (MENGEL; KIRKBY, 2001).

Apesar de todas as limitações, vários resultados indicam que o feijão pode beneficiar-se significativamente da inoculação, principalmente porque os inoculantes aprovados para serem comercializados introduzem estirpes mais eficientes que as nativas (VARGAS et al., 2004).

No solo, estão presentes várias espécies de rizóbio capazes de nodular o feijoeiro, incluindo o *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli*, *R. tropici*, *R. gallicum*, *R. giardinii* e *R. etli* (AMARGER; MACHERET; LAGUERRE, 1997; CHUEIRE, 2000).

A espécie isolada nos solos brasileiros para produção de inoculantes utilizados na cultura do feijoeiro é denominada *Rhizobium tropici*. Esta estirpe é adaptada aos solos tropicais e possui melhores condições de suportar estresse, como altas temperaturas e acidez do solo, além de ser altamente competitiva (STRALITOTTO; TEIXEIRA; MERCANTE, 2003). No entanto, atualmente, os inoculantes disponíveis no mercado aprovados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011) e recomendados para a cultura do feijoeiro são SEMIA 4077 (=CIAT 899^T), SEMIA 4080 (=PRF 81) e SEMIA 4088 (=H 12) (BARBOSA; GONZAGA, 2012).

2.4 Molibdênio no feijoeiro

Segundo Malavolta (1980), o molibdênio (Mo) é o micronutriente que se encontra em menor abundância no solo e na planta, embora possua importância para o metabolismo vegetal. A função mais importante do Mo no feijoeiro está associada com o metabolismo do N, favorecendo a assimilação do nitrogênio atmosférico (VIEIRA et al., 1998). Sua deficiência pode levar ao acúmulo de nitrato na folha, devido a não ativação dessa enzima, prejudicar o metabolismo do N, e apresentar-se como uma das possíveis causas da baixa produtividade da cultura do feijão (PESSOA et al., 2000).

Do ponto de vista agrícola, as enzimas nitrogenase e redutase do nitrato são as mais importantes, pois o Mo participa como componente da enzima nitrogenase, que é responsável pela quebra da tripla ligação do N₂, formando amônia (NH₃) no processo de FBN (TAIZ; ZEIGER, 2004). Participa, também, do complexo enzimático da nitrato redutase, que faz a redução do nitrato a nitrito no processo de assimilação do N do solo (NUNES; ANGELA; ANTONIO, 2003).

A enzima ou complexo enzimático é composto por duas unidades protéicas, a Ferro-proteína e a Molibdênio-Ferro-proteína, que se combinam para reduzir o nitrogênio atmosférico à amônia (TAIZ; ZEIGER, 2004; REIS; TEIXEIRA, 2006). No processo de reação de redução do nitrogênio atmosférico, a nitrogenase é auxiliada pela ferredoxina, que exerce o papel de reduzir a Fe-proteína, que, reduzida, funciona como doadora de elétrons para a Molibdênio-Ferro-proteína. Todo este processo é dependente da hidrólise Mg ATP, de maneira que os elétrons são passados para o N, transformando-o em amônia (BURRIS, 1999; TAIZ; ZEIGER, 2004). Em condições de baixa disponibilidade, o Mo concentra-se mais nos nódulos do que nas demais partes da

planta, de forma a manter concentrações adequadas para a fixação de N_2 (JACOBNETO; FRANCO, 1989; BRODRICK; GILLER, 1991).

De acordo com Marschner (1993), este micronutriente tem total importância para a fixação biológica do nitrogênio na cultura do feijoeiro, pois exerce função fundamental na assimilação do nitrato NO_3^- absorvido do solo por essa cultura. O suprimento adequado de Mo pode influir positivamente na eficiência do rizóbio no processo de fixação simbiótica do nitrogênio (ARAÚJO et al., 1987).

Segundo Calonego et al. (2010), a ausência de suplementação de molibdênio via adubação foliar originou o acúmulo de NO_3^- nas folhas à medida que elevou a dose de nitrogênio fornecida, mostrando a baixa eficiência da assimilação de N na falta do molibdênio. Para Andrade et al. (1998), a aplicação foliar de Mo no feijoeiro proporcionou aumento nos teores de nitrogênio nas folhas, tornando sua coloração verde bem mais acentuada, e, frequentemente, aumentando o tamanho dos grãos, do número de vagens por planta e, conseqüentemente, do rendimento de grãos.

Com aplicação de Mo em plantas de feijão, há um melhor desempenho delas, um maior número de vagens, um maior teor de nitrogênio nas folhas e uma maior produção de grãos (OLIVEIRA; ARAÚJO, DUTRA, 1996). A aplicação de 75g/ha de Mo via foliar originou maior acúmulo de matéria seca nas hastes, ramos, folhas, vagens e grãos do feijoeiro, o que resultou em aumento no rendimento de grãos, número de vagens por planta, número de grãos por vagem e peso médio de 100 grãos (LIMA, 1997).

Vieira et al. (1996) verificaram que a interação inoculante, Mo e N afetou positivamente o rendimento da variedade IAPAR 31. O número de vagens foi o único componente do rendimento que evidenciou influência positiva da presença do nitrogênio. Berger, Vieira e Araújo (1993), estudando o efeito de doses de Mo, aplicadas via foliar, 25 dias após a emergência das plantas de feijão em dois locais diferentes – Viçosa e Coimbra – verificaram aumento de 54% na produção com a dose 90g/ha em Viçosa, e 164% na produção obtida em Coimbra com a dose 78g/ha.

Lima (1997), estudando a resposta do feijoeiro à aplicação foliar de Mo (40g/ha) em relação a diferentes formas de aplicação de N (sem N, N semeadura + N cobertura, inoculação com *Rhizobium*, inoculação + N cobertura), constatou que a interação N com Mo foi significativa para peso de 100 sementes, índice de colheita e matéria seca de flores mais vagens, resultando em acréscimo de 91% na produtividade.

Contudo, fica claro que o manejo correto do molibdênio no feijoeiro pode contribuir com a eficiência do *Rhizobium* no processo da FBN (ARAÚJO et al., 1987).

2.5 Enzima nitrato redutase

O nitrogênio é um macronutriente que se encontra em baixa disponibilidade no solo e é exigido pelas plantas em altas quantidades por estar relacionado aos mais importantes processos fisiológicos, além de ser caracterizado por fazer parte de estrutura de várias enzimas (TAIZ; ZIEZER, 2004). Porém, nem todo o N absorvido é assimilável, sendo necessária a utilização de enzimas para mediar este processo. Uma das enzimas envolvidas na participação da redução do N a formas assimiláveis é a nitrato redutase. A quantidade deste elemento assimilado pelas plantas durante o seu ciclo depende da atividade das enzimas envolvidas no ciclo do nitrogênio (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000).

As plantas absorvem nitrogênio na forma de nitrato (NO_3^-), amônio (NH_4^+) ou através da fixação biológica do N_2 (FAGAN et al., 2007). A absorção de NH_4^+ acontece de forma passiva por difusão, quando as concentrações externas destes íons são elevadas (WILLIAMS; MILLER, 2001), e, por ser o amônio um elemento tóxico, precisa ser rapidamente assimilado, evitando seu acúmulo nos tecidos. Já o NO_3^- absorvido pelas raízes deve ser reduzido a NH_4^+ antes de ser incorporado em compostos orgânicos, seja no sistema radicular, seja na parte aérea (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000).

No conjunto de processos que envolvem a assimilação do N pelas plantas, são envolvidas duas enzimas para realização da redução do nitrato a amônio: as enzimas nitrato redutase e redutase do nitrito. A enzima nitrato redutase exerce a primeira etapa do processo, que é realização da redução do N para a forma de nitrito NO_2^- , logo em seguida é transformado em amônio NH_4^+ , através da enzima redutase do nitrito, na forma pela qual será utilizada pelas plantas (CRAWFORD, 1995; TAIZ; ZIEZER, 2004).

Por razão dessa função de reguladora, a produtividade das culturas pode estar envolvida indiretamente com a atividade da enzima nitrato redutase. Isso, junto à hipótese de que plantas com elevada atividade desta enzima teriam maior capacidade de assimilar o nitrato disponível, tendo, assim, como resultado maior capacidade de responder a adubação nitrogenada (BEEVES; HAGEMAN, 1969).

REFERÊNCIAS

- AMARGER, N.; MACHERETE, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules **International Journal of Systematic Bacteriology**, França, v. 47, n. 4, p. 996-1006, out. 1997.
- ANDRADE, M. J. B. et al. Influência do nitrogênio, rizóbio e molibdênio sobre o crescimento, nodulação radicular e teores de nutrientes no feijoeiro. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 45, n. 257, p. 65-79, ago. 1998.
- ARAÚJO, G. A. A. et al. Influência do molibdênio e do nitrogênio sobre duas variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Ceres**, Viçosa, v.34, n.2, p.333-339, 1987.
- BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A. C. O. (ed.) **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2012. 247 p. (Documentos / Embrapa Arroz e Feijão).
- BARBOSA, G. et al. Nitrogênio em cobertura e molibdênio foliar no feijoeiro de inverno. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 1, p. 117-123, jan./mar. 2010.
- BEEVERS, L., HAGEMAN, R. H. Nitrate reduction in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 20, p. 495-522, 1969.
- BERGER, P. G.; VIEIRA, C.; ARAÚJO, G. A. A. Adubação molíbdica por via foliar na cultura do feijão: efeito de doses. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 4, Londrina, 1993. **Anais**. Londrina: IAPAR, 1993. p.159.
- BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, SC, v.30, n.2, p. 365-372, mar/abr.2000.
- BURRIS, R. H. Advances in biological nitrogen fixation. **Journal of Industrial of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 381-393, abr. 1999.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instituição Normativa nº 13**, de 24 de março de 2011.
- BRITO, M. de M. P.; MURAOKA, T. S.; SILVA, E. C da. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio, fertilizante nitrogenado e nitrogênio do solo no desenvolvimento de feijão e caupi. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n.1, p. 206-215, ago. 2011.
- BRODRICK, S.J.; GILLER, K.E. Root nodules of *Phaseolus*: efficient scavengers of molybdenum for N₂-fixation. **Journal of Experimental Botany**, v. 42, n. 5, p. 679-686, maio 1991.

CHAGAS, J. M. et al. Feijão. In: COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação**. Viçosa, MG. 1999. p. 306-307.

CALONEGO, J. C. et al. Adubação nitrogenada em cobertura no feijoeiro com suplementação de molibdênio via foliar. **Revista Ciência Agronômica**, CE, v. 41, n. 3, p. 334-340, jun./set. 2010.

CARVALHO, A. M. de et al. Influência da fertirrigação no rendimento de grãos e componentes de produção do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Carioca. **Ciência e Prática**, Lavras, v.16, n. 4, p. 503-511, mar. 1992.

CHUEIRE, L. M. O. **Classificação taxonômica, baseada na caracterização molecular das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas de soja e do feijoeiro**. Londrina: Embrapa - CNPS, 2000. 32p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABSTECIMENTO – CONAB. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos: décimo levantamento**. Brasília, jul. 2013.

CRAWFORD, N. M. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. **The Plant Cell**, Rockville, n.7, p.859-868, jul. 1995.

DEKAL, A. K.; AZAD, P.; PAIRA, S. C. Survival of *Rhizobium* in soil at different pH, temperature and moisture levels. **Ecology: environment and conservation paper**, v.12, p.751-754, 2006.

DELPINO, V. M. H.; LAJOLO, M. F. Efectoin hibitorio de los taninos del frijol carioca (*Phaseolus vulgaris* L.) sobre la digestibilidad de la faseolina por dos sistemas multienzimáticos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 1 p. 49-53, jan./abr. 2003.

FAGAN, E. B. et al. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja: revisão. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 14, n. 1, p. 89-106, jul. 2007.

FANCELLI, A. L.; TSUMANUMA, G. M. Nitrogênio e enxofre nas culturas de milho e feijão. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S. R. S. e; VITTI, G. C. (Ed.). **Nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira**. Piracicaba: International Plant Nutrition Institute - Brasil, 2007. 722 p.

FERREIRA, P. A. A. et al. Inoculação com cepas de rizóbio na cultura do feijoeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n.7, p. 2210-2212. out. 2009.

FIESP E ICONE, 2012. Disponível em: <http://www.iconebrasil.com.br/datafiles/publicacoes/estudos/2012/outlook_brasil_2022_projecoes_para_o_agronegocio_portugues.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2015.

FONSECA, G. G. et al. Resposta de cultivares de feijoeiro-comum à inoculação das sementes com duas estirpes de rizóbio. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 6 , p. 1778-1787, nov./dec. 2013.

- FRANCO, M. C. et al. Nodulação em cultivares de feijão dos conjuntos gênicos andino e meso-americano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 8, p. 1145-1150, ago. 2002.
- HUNGRIA, M. et al. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 32, n. 11, p. 1515-1528, out. 2000.
- JACOB-NETO, J.; FRANCO, A. A. Determinação do nível crítico de Mo nos nódulos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L). **Turrialba**, Costa Rica, v. 39, n. 2, p. 215-223, 1989.
- LIMA, S. F. **Comportamento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) submetido à aplicação foliar de doses de boro, molibdênio e zinco**. 1997. 76 f. Dissertação (Mestrado)-ESAL, Lavras, 1997.
- MALAVOLTA, E. **Elementos de Nutrição Mineral de plantas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1980. 231p.
- MALAVOLTA, E. O. Futuro da Nutrição de Plantas Tendo em Vista Aspectos Agronômicos, Econômicos e Ambientais. **INPI Informações Agronômicas**, n. 121, mar. 2008.
- MARIN, V. A. et al. **Fixação biológica de nitrogênio**: bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical. 1999. 32p. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/598661/1/doc091.pdf>>. Acesso em: 29 mar. 2015.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2. ed. Londres: Academic Press, 1993. 889p.
- MATOSO, S. C. G.; KUSDRA, J. F. Nodulação e crescimento do feijoeiro em resposta à aplicação de molibdênio e inoculante rizobiano. **Revista brasileira Engenharia Agrícola Ambiental**, Campina Grande, v. 18, n. 6, p. 567-573. jun. 2014.
- MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. **Principles of plant nutrition**. 5. ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. 849 p.
- MESQUITA, F. R. et al. Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade protéica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1114-1121. jul./ago. 2007.
- MORAES, J. F. V. Calagem e adubação. In: ZIMMERMANN, M. J. O.; ROCHA, M. ; YAMADA, T. (eds.). **Cultura do feijoeiro**: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: Potafós, 1988. p. 261-302.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002. 626p.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2006. 729p.

MOURA, J. B. et al. Produtividade do feijoeiro submetido à adubação nitrogenada e inoculação com *Rhizobium Tropici*. **Global Science Technology**, Rio Verde, v. 02, n. 03, p.66-71, set/dez. 2009.

NUNES, F. S.; ANGELA, C. R.; ANTONIO, C. N. Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. **Química Nova**, Curitiba, v. 26, n.6, p. 872-879, mar. 2003.

OLIVEIRA, I.P.; ARAÚJO, R.S.; DUTRA, L.G. Nutrição mineral e fixação biológica do nitrogênio. In: ARAÚJO, R.S.et al. **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: Potafós, 1996. p.169-216.

PEREIRA, P. A. A. Fixação biológica de nitrogênio do feijoeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.8, n.90, p.41-46, jun.1982.

PESSOA, A. C. S. et al. Concentração foliar de molibdênio e exportação de nutrientes pelo feijoeiro “Ouro Negro” em resposta à adubação foliar com molibdênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.24, n.1 p.75-84, jan. 2000.

PORTES, T. A. Ecofisiologia. In: ARAÚJO, R. S. et al. **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba : Potafós, 1996. p. 101-137.

RAPOSEIRA, R. et al. Variabilidade de colônias isoladas de estirpes de *Rhizobium* efetivas na nodulação do feijoeiro, antes de após exposição temperatura elevada. **Brazilian Journal Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 149-154, abr./ jun. 2002.

REIS, V. M.; TEXEIRA, K. R. S. **Fixação Biológica de Nitrogênio**: estado da arte. [S.l.; s.n], 2006. 180p.

ROSOLEM, C. A. **Nutrição e adubação do feijoeiro**. Piracicaba: Potafós, 1987. 91p. (Boletim Técnico, 8).

RUFINI, M. et al. Simbiose de bactérias fixadoras de nitrogênio com feijoeiro-comum em diferentes valores de pH. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 1, p. 81-88, jan. 2011.

RUSCHEL, A.P.; RUSCHEL, R. Avaliação da fixação simbiótica de nitrogênio em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.10, n.1, p.11-17, jan. 1975.

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

SANTOS, A. B. et al. Resposta do feijoeiro ao manejo de nitrogênio em várzeas tropicais. **Pesquisa. Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 38, n. 11, p. 1265-1271, nov. 2003.

SEAB. SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/feijao_2013_14.pdf>. Acesso em: 22 mar. 2015.

SILVA, T. R. B. da. **Adubação nitrogenada e resíduos vegetais no desenvolvimento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em sistema de plantio direto**. 2002. 56f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira - SP, 2002.

SILVA, T. R. B. da et al. Doses e épocas de aplicação de nitrogênio em cobertura na cultura do feijoeiro de inverno. **Cultura Agronômica**, Ilha Solteira - SP, v.9, n.1, p.1-17. 2000.

SILVEIRA, P. M. da; DAMASCENO, M. A. Doses e parcelamento de K e de N na cultura do feijoeiro irrigado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 11, p.1269-1276, nov. 1993.

SNA. SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA. 2013. Safra feijão é insuficiente para atender o consumo. Rio de Janeiro. 2014. Disponível em: <<http://sna.agr.br/safra-de-feijao-e-insuficiente-para-atender-ao-consumo/>>. Acesso em 22 mar. 2015.

SORATTO, R. P. et al. Níveis e épocas de aplicação de nitrogênio em cobertura no feijoeiro irrigado em plantio direto. **Cultura Agronômica**, Ilha Solteira - SP, v.10, n. 1, p.89-99, 2001.

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

STRALIOTTO, R.; TEIXEIRA, M. G.; MERCANTE, F. M. Cultivo do feijoeiro Comum; Fixação biológica de Nitrogênio. Embrapa Arroz e Feijão, 2003. **Sistema de Produção 2**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/fbnitrogenio.htm>>. Acesso em 28 mar. 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

VARGAS, M. A. T. et al. Inoculação de leguminosas e manejo de adubos verdes. In: SOUSA, D. M. G. de; LOBATO, E. **Cerrado: correção do solo e adubação**. 2. ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2004. p. 97-127.

VIEIRA, R. F.; et al. Foliar application of molybdenum in common beans. I. Nitrogenase and reductase activities in a soil of high fertility. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 21, n. 1. p. 169-180, nov. 1998.

WILLIAMS, L. E.; MILLER, A. J. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, n. 1, p. 659-688, jun. 2001.

CAPÍTULO 2

ARTIGO

(Artigo formatado de acordo com as normas da Revista Ciência Rural - ISS 0103-8478-B1- a ser submetido)

Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Rhizobium tropici* na cultura do feijoeiro**Nitrogen fertilization associated with inoculation with *Rhizobium tropici* the bean crop**

Mariana Caroline Spineli¹; Ligiane Aparecida Florentino²; Thiago Virgínio Pereira³; Adriano Bortolotti da Silva⁴

Resumo - Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da associação entre inoculação e aplicação de fertilizantes nitrogenados em plantio e cobertura no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). O experimento foi conduzido em campo com a cv. Pérola utilizando inoculante da espécie *Rhizobium tropici* estirpe (CIAT 899^T), e o delineamento experimental foi em DBC com oito tratamentos e três repetições. Os tratamentos constaram de adubação nitrogenada somente em plantio ou cobertura, associados ou não à inoculação. Foram aplicadas doses de N que corresponderam a 40 kg ha⁻¹ no plantio e 60 kg ha⁻¹ em cobertura aos 28 dias após o plantio. A inoculação é uma prática viável, sendo recomendado seu uso em áreas em que não se empregam adubações nitrogenadas. O emprego do inoculante em associação com adubação nitrogenada promoveu aumento do crescimento das plantas, bem como da produção do feijoeiro.

Palavras-chave: Nitrogênio, *Phaseolus vulgaris*, *Rhizobium tropici*.

¹Universidade José do Rosário Velano - UNIFENAS. ²*Faculdade de Agronomia - UNIFENAS. Email: ligianeflorentino@gmail.com (Autor para correspondência). ³Faculdade de Agronomia - UNIFENAS, Alfenas - MG. ⁴Faculdade de Agronomia - UNIFENAS, Alfenas - MG.

Abstract -This study aimed to evaluate the effect of association between inoculation and application of nitrogen fertilizers in planting and cover the bean (*Phaseolus vulgaris* L.). The experiment was conducted in the field with the cv. Pearl using the species *Rhizobium* inoculant *tropicum* strain (CIAT 899^T), and the experimental design was DBC with eight treatments and three replications. The nitrogen fertilizer treatments consisted only in planting or cover, with or without inoculation. N rates were applied corresponding to 40 kg ha⁻¹ at sowing and 60 kg ha⁻¹ in coverage at 28 days after planting. The inoculation is viable, its use is recommended in areas that do not employ nitrogen fertilization. The use of inoculant in association with nitrogen fertilization promoted increase in plant growth and production of dry beans.

Key words: Nitrogen, *Phaseolus vulgaris*, *Rhizobium tropicum*.

INTRODUÇÃO

O cultivo de feijão no Brasil caracteriza-se por apresentar alta relevância na dieta alimentar da população, e pelo país ser um dos maiores produtores e consumidores desse grão no mundo (BARBOSA et al., 2010). Essa cultura é considerada exigente em nutrientes, dentre os quais, o nitrogênio destaca-se por estar relacionado diretamente a produtividade da cultura (PESSOA et al., 2000). Contudo, esse nutriente é um elemento que promove elevados custos econômicos e ambientais, por apresentar alta mobilidade quando aplicado ao solo (STRALIOTTO et al., 2002).

Dessa forma, o manejo adequado do N representa uma das principais dificuldades, pois teores baixos aplicados podem reduzir o potencial produtivo da cultura, e doses excessivas elevam o custo econômico da produção, podendo promover impactos ambientais (SANTOS et al., 2003).

A utilização da associação da cultura do feijoeiro com espécies de bactérias, especialmente do grupo *Rhizobiumtropicici*, é uma tecnologia capaz de fornecer N através da FBN, contribuindo para economia do custo de produção do cultivo (GRANGE et al., 2007). Porém, a associação entre bactéria e planta está relacionada a vários fatores. Um deles é a presença ou ausência de N no solo (VIEIRA et al., 2005).

A adição de elevados teores de N fornecidos pelas adubações pode reduzir a eficiência simbiótica, porém, em pequenas quantidades aplicadas no plantio, possibilita um aumento no crescimento dos nódulos e, conseqüentemente, maior FBN. Por outro lado, teores muito baixos aplicados no solo podem ser limitantes à atividade simbiótica (HUNGRIA et al., 2003).

O presente trabalho teve como objetivo examinar o efeito da associação entre inoculação e aplicação de fertilizantes químicos nitrogenados em plantio e cobertura, visando avaliar os fatores de crescimento e produção da cultura do feijoeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em campo no setor experimental de olericultura da Faculdade de Agronomia da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), em Alfenas (MG), com altitude de 860 metros (latitude 21° 27', longitude 45° 56'). O período de condução ocorreu de maio a agosto de 2014, e os dados meteorológicos registrados nesse período foram de temperatura média de 17,3 a 21,8° C, e precipitação pluviométrica de 9,6 mm. As características químicas do solo utilizado no experimento foram obtidas conforme métodos compilados em EMBRAPA (2011), e descritas na tabela 1.

Tabela 1. Resultado da análise química do solo utilizado no experimento em campo.

pH (H ₂ O)	P	K	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H + Al	SB	T	T	V	m	MO
	mg dm ⁻³			cmolc dm ⁻³						%		dag Kg ⁻¹
6,0	2	44	1,4	0,9	0,1	3,2	2,4	2,6	6	40	8	25

Antes da instalação do experimento, em função de cultivos anteriores de feijão na área experimental, não houve registro de nenhum tipo de inoculante. O preparo do solo foi realizado no sistema convencional – com uma aração e duas gradagens –, seguido pela abertura manual dos sulcos. Não foi necessário realizar calagem devido ao pH do solo, conforme mostra os resultados representados na análise química do solo da Tabela 1.

As adubações de N, P, K foram baseadas na recomendação para o quarto nível tecnológico de cultivo (CHAGAS, et al., 1999). Realizou-se uma adubação de 110 kg ha⁻¹ de P²O⁵ (surpefosfato simples) e 50 kg ha⁻¹ de K²O (cloreto de potássio), sendo, em todos os tratamentos, ambos aplicados no plantio. Para os tratamentos que receberam adubação nitrogenada fonte (uréia) utilizaram-se 40 kg ha⁻¹ de N no plantio e 60 kg ha⁻¹ de N em cobertura aplicados aos 28 dias via foliar. Também foi aplicado molibdênio via foliar em todos os tratamentos, utilizando o produto Nutrifolha Molibdênio 6,1 SAMARITA aos 38 após plantio.

Durante o período do experimento, a umidade do solo foi mantida próxima à capacidade de campo. Os tratamentos fitossanitários realizados consistiram no uso de inseticida Pirate Basf (Clorfenapir) para controle de insetos, como vaquinha masca branca, e fungicida Cerconil (Tiofanato-Metílico e Chlorothalonil) para controle de antracnose, ferrugem e óídio.

Quanto ao plantio, foram utilizadas sementes de feijão cv. Pérola inoculadas com a estirpe CIAT 899^T da espécie *Rhizobium tropici*, aprovada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011) para a cultura do feijoeiro. Essa estirpe foi cultivada em meio 79 (FRED; WAKSMAN, 1928), também denominado YMA (VINCENT, 1970), contendo azul de bromotimol e pH 6,8, até o aparecimento de colônias isoladas. Estas foram transferidas para o meio 79 líquido por três dias, sob agitação, a 28°C até conterem aproximadamente 10^8 células mL⁻¹ viáveis. Sessenta mililitros desta suspensão bacteriana foram inoculados nas sementes, imediatamente encaminhadas para o plantio, com a semeadura realizada manualmente.

O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados, com 8 tratamentos e 3 blocos. Cada parcela experimental constituiu-se de 7 linhas de plantio com comprimento de 2,5m totalizando área de 268,75m². Os tratamentos correspondem de um controle absoluto sem adição do inoculante e adubação, os demais tratamentos foram constituídos de N no plantio, N em cobertura, N no plantio e em cobertura, inoculação mais N no plantio, inoculação mais N em cobertura, inoculação mais N no plantio e cobertura, e apenas um tratamento utilizando somente inoculação.

Quanto ao desenvolvimento da planta, na época em que atingiram o estágio fenológico R6 (floração)-que ocorreu por volta dos 50 dias após o plantio-, foi realizada a colheita de 15 plantas por tratamento em cada bloco, nas quais foram avaliados os seguintes parâmetros: peso seco da parte aérea, teor de nitrogênio na parte aérea, número de nódulos, peso seco dos nódulos e atividade nitrato redutase. Para a realização da determinação do nitrogênio da parte aérea foi utilizada a metodologia proposta por KJELDAHL (1883). O método é baseado na decomposição da matéria orgânica por meio da digestão da amostra a 400° C com ácido sulfúrico concentrado, em presença de sulfato de cobre como catalisador que acelera a oxidação da matéria orgânica. O

nitrogênio presente na solução ácida resultante é determinado por destilação por arraste de vapor, seguida de titulação com ácido diluído (NOGUEIRA; SOUZA. 2005).

Já a ANR foi avaliada pela a metodologia proposta por HAGEMAN & REED (1980), em que as folhas foram coletadas, acondicionadas em sacos plásticos, colocadas em caixa de isopor com gelo e levadas imediatamente para o laboratório, pois a atividade enzimática é determinada *in vivo*. No laboratório, as folhas foram perfuradas com um furador manual de 0,3 cm de diâmetro, obtendo-se discos foliares com peso total entre 0,2 e 0,5 g. Após a pesagem e obtenção do peso da matéria fresca, os discos foram colocados em um erlenmeyer de 25 mL, que previamente recebeu 10 mL do meio de incubação (5 mL de tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ a pH 7,5 + 2,5 mL de propanol 8% + 1 mL de água destilada + 1,5 mL de KNO₃ 0,75 mol.L⁻¹ + 2 gotas de TRITON-X100). Em seguida, o erlenmeyer foi submetido a um ambiente com vácuo por 60 segundos, por duas vezes, objetivando maior contato do meio de incubação com as células do mesófilo foliar. Rapidamente, em ambiente escuro, o erlenmeyer foi colocado em banho-maria a 30 °C. Retiraram-se alíquotas de 1 mL do meio de incubação aos 10 e 30 minutos, colocando-as em solução contendo 1 mL de sulfanilamida 1% e 1 mL de água destilada, com o objetivo de paralisar a atividade da enzima por desnaturação. Em seguida, foi acrescentado 1 mL de n-naftil 0,02%, agitando-se em vórtex por 20 segundos. Após uma hora e ocorrida a estabilização do n-naftil com o nitrito formado a partir da redução do nitrato, fez-se a leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 540 nm. Com a curva-padrão, em que se tinham concentrações conhecidas de nitrito, fez-se a conversão dos dados para ANR. Os componentes da produção foram avaliados aos 120 dias, feita a colheita de 15 plantas por tratamento em cada bloco para avaliar os seguintes parâmetros: número de vagens por planta e número de sementes por

planta. Para a produtividade de grãos em (kg ha^{-1}) e produtividade de grãos em sacas de 60 kg ha^{-1} , foi realizada a colheita do feijão de toda a área experimental.

Os dados foram submetidos à análise estatística e as médias das três repetições foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, ($p < 0,5$), utilizando-se o programa Sisvar (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeitos significativos da associação entre inoculação e adubação nitrogenada na cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) foram observados nos seguintes parâmetros avaliados: peso seco da parte aérea, teor de nitrogênio da parte aérea, número de nódulos, peso seco dos nódulos e atividade nitrato redutase, no período do florescimento, conforme dados apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Peso seco da parte aérea (PSPA), teor de nitrogênio na parte aérea (TNPA), número de nódulos (NN) e peso seco dos nódulos (PSN) de plantas de feijão, atividade nitrato redutase (ANR), no período da floração, cultivadas sob os diferentes tratamentos.

TRATAMENTOS	PSPA	TNPA	NN	PSN	ANR
	(g)	(mg de N/g de cada planta)	(unidade)	(g)	($\mu\text{g N-NO}_2\text{g}^{-1}\text{FV h}^{-1}$)
C	8,46f	185,33g	30d	0,080e	6,95b
NPL	14,06d	371,66d	63a	0,180a	6,25c
NPL+N COB	18,66b	512,66b	53b	0,130c	6,28c
COB	12,84d	327,33e	54b	0,150b	7,43b
INOC	10,76e	262,66f	37d	0,070e	6,10c
INOC+N PL	13,99d	399,66d	44c	0,106d	8,19a

INOC+N PL+N COB	20,78a	637,00a	24e	0,013f	9,63a
INOC+N COB	16,66c	442,33c	46c	0,109d	10,0a
CV%	4,73	5,50	7,23	11,78	18,0

Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste Scott-Knott, 0,5% de probabilidade. Controle (C); Nitrogênio (N); Plantio (PL); Cobertura (COB); Inoculante (INOC).

Em relação ao parâmetro PSPA, os resultados experimentais permitem-nos concluir que houve efeito significativo do tratamento que recebeu inoculação e adubação com N plantio mais N cobertura, comparado ao valor obtido pelo tratamento sem inoculação e com N no plantio mais N em cobertura. O tratamento com inoculação mais N em cobertura também obteve efeito significativo quando comparado ao tratamento com apenas N em cobertura, indicando a contribuição da fixação biológica de nitrogênio. Já o tratamento com inoculação mais N no plantio apresentou PSPA semelhante ao do tratamento sem inoculação com N no plantio. Contudo, no presente trabalho, a utilização em conjunto das duas aplicações N no plantio e N cobertura associada à inoculação com rizóbios mostrou-se eficiente. Resultados similares foram encontrados por BARROS et al. (2013), utilizando inoculação associada adubação nitrogenada de plantio e cobertura, em que se obteve maiores incrementos, demonstrando a capacidade da inoculação fornecer N através da FBN.

Houve efeito significativo no TNPA com a associação da inoculação com adubação nitrogenada, e o tratamento com inoculação mais adubação de N no plantio e em N cobertura alcançou o maior valor desse parâmetro avaliado comparado aos demais tratamentos. Já o menor valor obtido foi para o tratamento controle sem inoculação sem N mineral. De acordo com CARVALHO et al. (2001), o efeito da aplicação de

fertilizantes nitrogenados proporcionam teores foliares superiores aos verificados nas plantas testemunhas, sem adubação nitrogenada.

Em relação aos valores de NN adquiridos, no entanto, possibilitam-nos verificar que o maior número obtido foi para o tratamento com adubação N de plantio. O menor NN obtido foi para o tratamento com inoculação e adubação com N plantio e N cobertura. Os tratamentos com N plantio mais N cobertura mais o tratamento com N cobertura foram estatisticamente iguais. Observa-se que o acréscimo da adubação nitrogenada resultou em diminuição no NN, e, segundo MOREIRA & SIQUERIRA (2006), altos teores de N-mineral no solo reduzem a formação nódulos. Esse fato ocorre devido preferência das plantas em absorver o N disponível no solo, em vez de gastar energia para estabelecer simbiose com os rizóbios.

Quanto ao PSN, não houve efeito significativo dos tratamentos com o uso da inoculação associada à adubação nitrogenada, no entanto, observou-se que o menor valor obtido foi ao tratamento com inoculação mais adubação com N de plantio e N cobertura, podendo ser verificado que, entre os tratamentos com acréscimo da adubação nitrogenada juntamente com a inoculação, resultou-se em uma diminuição no PSN. Isto evidencia que a inoculação mais aplicação de total de N inibiu o processo de nodulação da população de rizóbios inoculados. SOARES (2012) também observou que altas doses de N apresentaram menores médias neste parâmetro, caracterizando o efeito inibitório com elevados teores nitrogênio no solo.

O parâmetro “atividade nitrato redutase (ANR)” avaliado permite-nos verificar que o maior valor foi para o tratamento com inoculação mais N em cobertura, porém não se diferenciou estatisticamente dos tratamentos com inoculação mais N no plantio e N cobertura e com o tratamento inoculado mais N no plantio. O menor valor foi para o tratamento com apenas inoculação, contudo, não se diferenciou estatisticamente dos

tratamentos com N plantio mais N em cobertura e ao tratamento com N no plantio. Valores similares foram obtidos por SOARES (2013), ao constatar haver incremento da ANR com a aplicação de micronutrientes, resultados que realçam o papel dos micronutrientes em contribuir com a capacidade de leguminosas em se beneficiarem do N através da assimilação do nitrato no solo quanto da fixação de N_2 .

Na tabela 3, estão apresentados os parâmetros de produção avaliados do feijoeiro cultivado sob os diferentes tratamentos em que foram observados resultados significativos.

Tabela 3. Número de vagem por planta (NVP), número de sementes por planta (NSP), produtividade de grãos em ($Kg\ ha^{-1}$) e produtividade de grãos em saca de 60 $kg\ ha^{-1}$ (sacas ha^{-1}), do feijoeiro cultivado sob os diferentes tratamentos.

TRATAMENTOS	NVP	NSP	$Kg\ ha^{-1}$	SACAS ha^{-1}
	(unidade)	(unidade)	(kg)	(sacas de 60 kg)
C	8g	31 f	1.520 d	25 d
NPL	14d	58 d	2.500 c	42 c
NPL+N COB	22b	87 b	3.380 b	56 b
COB	12e	53 d	2.440 c	41 c
INOC	10f	43 e	2.120 c	35 c
INOC+N PL	15 d	62 d	2.640 c	44 c
INOC+N PL+N COB	25 a	109 a	3.720 a	62 a
INOC+N COB	19 c	78 c	2.700 c	45 c
CV%	7,21	6,60	8,01	8,01

Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste Scott-knott, 0,5% de probabilidade. Controle (C); Nitrogênio (N); Plantio (PL); Cobertura (COB); Inoculante (INOC).

Quanto ao NVP, os resultados permitem-nos observar que houve efeito significativo onde o tratamento com realização da inoculação associada à adubação com N no plantio mais N em cobertura foi superior ao tratamento com apenas N plantio e N cobertura. O tratamento com inoculação e adubação nitrogenada de cobertura foi superior ao tratamento com apenas aplicação de N em cobertura, destacando-se a contribuição da FBN no que se refere ao número de vagens por planta. Nos demais tratamentos, não se observou diferença estatística. Portanto, os resultados permitem-nos concluir que o uso conjunto do N no plantio e N cobertura no feijoeiro é muito eficiente, podendo promover acréscimo no NVP. Entretanto, com o uso conjunto da inoculante obteve-se aumento significativo. Porém, somente o uso da inoculação sem adição de N-mineral é ineficiente para suprir toda a demanda de N pela planta, até mesmo quando acompanhado de apenas adubação nitrogenada de plantio ou cobertura. Esses resultados são similares aos encontrados por ALBUQUERQUE et al. (2012), ao observarem que a adubação nitrogenada atua com efeito positivo sobre o número de vagens por planta.

Em relação aos seguintes resultados sobre o componente de produção NSP, observa-se que houve efeito significativo com o tratamento que recebeu inoculação associada ao N no plantio e N cobertura comparado ao tratamento sem inoculação mais N plantio e N cobertura. Já o tratamento com inoculação associada ao N em cobertura também foi superior ao tratamento com apenas N em cobertura, evidenciando a contribuição da FBN. Os tratamentos com inoculação mais N plantio não obtiveram efeito significativo ao tratamento com apenas N no plantio. No entanto, os resultados permitem-nos concluir que a adubação nitrogenada de plantio e cobertura aplicada no feijoeiro foram eficientes, promovendo aumento significativo no NSP com uso da inoculação. Entretanto, a inoculação de bactérias mostrou ser ineficiente sozinha ou acompanhada de apenas adubação nitrogenada de plantio ou cobertura. Resultados

contrários foram encontrados por BASSAN et al. (2001), que, utilizando diferentes níveis de N aplicados em cobertura associada a inoculação com *Rhizobiumtropicum*, verificaram que a inoculação não foi eficaz em promover o aumento do NSP comparado ao tratamento sem inoculação, demonstrando a grande capacidade de competição e efetividade na fixação simbiótica do N₂ por parte da estirpe nativa.

A produtividade de grãos kg ha⁻¹ variou entre 1.520 kg ha⁻¹ a 3.720 kg ha⁻¹, em que a menor produtividade foi para o tratamento controle sem adição de inoculante e N-mineral. Já a produtividade mais elevada (3.720 kg ha⁻¹) corresponde ao tratamento com aplicação da inoculação mais N plantio e cobertura, evidenciando a contribuição da FBN em suplementar a produção de feijão. Aos demais tratamentos não houve diferença, exceto para o tratamento com N plantio e N cobertura, que obteve valores próximos ao tratamento com inoculação mais N plantio e N cobertura. Todavia, constatou-se que o feijoeiro é eficiente na absorção de N no plantio e cobertura, podendo promover aumento significativo com a inoculação de bactérias. Esses resultados são similares aos encontrados por SORATTO et al. (2006), que constataram que quanto maior a dose de nitrogênio aplicado via solo e foliar nas plantas do feijoeiro, maior será a produtividade em quilogramas por hectare.

Os resultados experimentais alcançados em relação à produtividade de grãos em sacas de 60 kg ha⁻¹ permitem-nos observar que o tratamento inoculado com adubação de N plantio e N cobertura obteve maior número de sacas de 60 kg ha⁻¹ entre os demais tratamentos. Nos demais tratamentos, não houve diferença estatística, exceto para o tratamento N no plantio mais N cobertura que obteve valor próximo ao tratamento com inoculação e N no plantio e N cobertura, mostrando a necessidade da adubação nitrogenada completa que a cultura do feijoeiro precisa para se obter alta produtividade. Esses resultados permitem-nos concluir que a adição da inoculação somente é

significativa quando aplicada em conjunto com N no plantio e N em cobertura, evidenciando sua importância para obtenção de maior rentabilidade na cultura do feijoeiro. Esses resultados são similares aos encontrados por SORATTO et al. (2006), que concluíram que a maior produtividade do feijoeiro está relacionada com aplicação de nitrogênio mineral.

CONCLUSÕES

A inoculação é uma prática viável, sendo recomendado seu uso em áreas em que não se empregam adubações nitrogenadas.

O emprego do inoculante em associação com adubação nitrogenada promoveu aumento do crescimento das plantas, bem como da produção do feijoeiro.

AGRADECIMENTOS

A FAPEMIG, por ter me concedido a bolsa de mestrado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, H.C. et al. Capacidade nodulatória e características agronômicas de feijoeiros comuns submetidos à adubação mólbdica parcelada e nitrogenada. **Revista Ciências Agronômicas**, Fortaleza, CE, v. 43, n. 2, p. 2014-2221, abr./jun. 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rca/v43n2/a02v43n2.pdf>>. Acesso em: 02 abr. 2015. doi:10.1590/S1806-66902012000200002

BARROS, R.L.N, et al. Interação entre inoculação com rizóbio e adubação nitrogenada de plantio na produtividade do feijoeiro nas épocas da seca e das águas. **Semina: ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 4, p. 1443-1450, jul./ago. 2013 Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/10436>>. Acesso em: 01 abr. 2015. doi: 10.5433/1679-0359.2013v34n4p1443

BASSAN, D.A.Z et al. Inoculação de sementes e aplicação de nitrogênio e molibdênio na cultura do feijão de inverno: produção e qualidade fisiológica de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.23, n.1, p.76-83, 2001. Disponível em: <<http://www.abrates.org.br/revista/artigos/2001/v23n1/artigo11.pdf>>. Acesso em: 22 maio 2015.

BARBOSA, G.F. et al. Nitrogênio em cobertura e molibdênio foliar no feijoeiro de inverno. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 1, p. 117-123, jan./mar. 2010. Disponível em: <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAgron/article/viewFile/1605/1605>>. Acesso em: 13 mar. 2015. doi: 10.4025/actasciagron.v32i1.1605.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instituição Normativa nº 13**, de 24 de março de 2011.

CARVALHO, M.A.C. et al. Produtividade e qualidade de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) sob influência de parcelamentos e fontes de nitrogênio. **Revista Ciências do Solo**, v. 25 p. 617-624, 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbcs/v25n3/10.pdf>>. Acesso em 21 abr. 2013.

CHAGAS, J.M. et al. Feijão. In: COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação**. Viçosa, MG. 1999. p. 306-307.

EMBRAPA, EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Manual de métodos de análise de solos**. 2. ed. rev. Rio de Janeiro : Embrapa Solos, 2011. 230p.

FERREIRA, D.F. SISVAR: a computerstatisticalanalysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141370542011000600001&lng=sci_arttext&pid=S1413-70542011000600001&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 01 abr. 2013. doi: 10.590/S1413-70542011000600001.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of genereal microbiology**: whit special reference to the microorganisms of the soil. New York: McGraw-Hill Book Company, 1928. 145p.

GRANGE, L. et al. New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. **SoilBiology&Biochemistry**, Brisbaine, v. 39, n. 4, p. 867-876. 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071706004615>>. Acesso em: 05 abr. 2015. doi:10.1016/j.soilbio.2006.10.008

HAGEMAN, R.H.; REED, A.J. Nitrate reductase from higher plants. **Methods Enzymology**, San Diego, v.69, p.270-280, 1980.

HUNGRIA, M. et al. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Soils**, Berlim, v. 39, n. 2, p. 88-93, 2003. Disponível em:

<<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00374-003-0682-6#page-1>>. Acesso em: 22 abr. 2015. doi:10.1007/s00374-003-0682-6.

KJELDAHL, J. Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern, **Z. Anal. Chem.**, v.22, p. 366-382, 1883.

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

NOGUEIRA, A.R.A.; SOUZA, G.B. **Manual de Laboratórios: Solo, Água, Nutrição Vegetal, Nutrição Animal e Alimentos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005. 313p.

PESSOA, A.C.S et al. Concentração foliar de molibdênio e exportação de nutrientes pelo feijoeiro “Ouro Negro” em resposta à adubação foliar com molibdênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.24, n.1, p.75-84, jan./mar. 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbcs/v24n1/10.pdf>>. Acesso: 14 maio 2015. doi: 10.1590/S0100-06832000000100010.

SANTOS, A.B. et al. Resposta do feijoeiro ao manejo de nitrogênio em várzeas tropicais. **Pesquisa. Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 38, n. 11, p. 1265-1271, nov. 2003. Disponível em:

<<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/v38n11a03ID-Q4ERSBzXg3.pdf>>.

Acesso em: 10 mar. 2015.

SOARES, B.L. **Avaliação técnica e econômica do feijoeiro-comum inoculado com rizóbio em diferentes ambientes**. 2012. 150f. Tese (Doutorado em Microbiologia e Bioquímica do solo) – Pós-graduação em Ciências do solo, Universidade Federal de Lavras.

SOARES, L.H. **Manejo fisiológico com base em tratamento de sementes e aplicação de organominerais via foliar para sistemas de alto potencial produtivo de soja**. 2013. 129f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba.

SORATTO, R.P. et al. Fertilidade do solo e nutrição de plantas. **Revista Brasileira Ciências do Solo**, Viçosa, v. 30. n. 2. p. 259-265, mar./abr. 2006. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010006832006000200007&script=sci_arttext>. Acesso 28 mar. 2015. doi.org/10.1590/S0100-06832006000200007

STRALIOTTO, R. et al. Fixação simbiótica de nitrogênio. In: AIDAR, H.; KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L. F. **Produção de feijoeiro-comum em várzeas tropicais**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz, Feijão, 2002. p. 122-153.

VIEIRA, R.F. et al. Nodulação e fixação simbiótica de nitrogênio em feijoeiro com estirpes nativas de rizóbio, em solo tratado com lodo de esgoto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 1047-1050, out. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-04X2005001000015&script=sci_arttext>. Acesso em: 04 fev. 2015.

VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. (International Biological Programme Handbook, 15).