

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

**DISSERTAÇÃO**

**Co-inoculação de Rizóbio e Bactérias Promotoras de  
Crescimento Vegetal em Feijoeiro Comum**

**Rennan do Amaral Bastos**

**2016**



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

**CO-INOCULAÇÃO DE RIZÓBIO E BACTÉRIAS PROMOTORAS DE  
CRESCIMENTO VEGETAL EM FEIJOEIRO COMUM**

**RENNAN DO AMARAL BASTOS**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Adelson Paulo de Araújo**

*e Co-orientação do Pesquisador*  
**Ederson da Conceição Jesus**

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

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2016

641.3565

B327c

T

Bastos, Rennan do Amaral, 1988-

Co-inoculação de rizóbio e bactérias promotoras de crescimento vegetal em feijoeiro comum / Rennan do Amaral Bastos – 2016.

101 f. : il.

Orientador: Adelson Paulo de Araújo.

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

Bibliografia: f. 84-99.

1. Feijão – Teses. 2. Feijão-comum – Crescimento – Teses. 3. Rizóbio – Teses. 4. Biomassa vegetal – Teses. 5. Nitrogênio – Fixação – 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**

**RENNAN DO AMARAL BASTOS**

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 04/02/2016.

---

Adelson Paulo de Araújo. Dr. UFRRJ  
(Orientador)

---

Rosângela Straliozzo. Dra. Embrapa Agrobiologia

---

Vera Lucia Divan Baldani. Dra. Embrapa Agrobiologia

## DEDICATÓRIA

À Nardele Campos Felício Bastos, minha esposa, dedico esta obra e meu amor.

[...] Sim, me leva pra sempre, *Beatriz*  
Me ensina a não andar com os pés no chão  
Para sempre é sempre por um triz  
Aí, diz quantos desastres tem na minha mão  
Diz se é perigoso a gente ser feliz

Olha  
Será que é uma estrela  
Será que é mentira  
Será que é comédia  
Será que é divina  
A vida da atriz  
Se ela um dia despencar do céu  
E se os pagantes exigirem bis  
E se o arcanjo passar o chapéu  
E se eu pudesse entrar na sua vida.

Beatriz. Francisco Buarque de Hollanda.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus, Pai de infinita bondade e misericórdia, pela sublimidade da vida, proteção e amparo.

Ao Mestre Jesus, que sempre ao meu lado não desiste deste seu tutelado, especialmente nos momentos mais complexos.

A espiritualidade amiga, por toda a paciência, entendimento de minhas limitações e essencial suporte que me concederam durante o curso.

A Universidade Rural, minha casa, para onde sempre retornam aqueles que a amam.

A Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia, pela estrutura física e demais auxílios que proporcionaram a condução dos experimentos.

Ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo, agradeço pela compreensão de minhas especificidades docentes, apoio e acolhida.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Acre - *Campus* Cruzeiro do Sul pela liberação para qualificação profissional.

Ao meu orientador Prof. Adelson Paulo de Araújo, os mais sinceros agradecimentos pelo grandioso auxílio na elaboração desta obra, por acreditar em minha proposta de pesquisa, apoiar-me durante o curso e entender as particularidades de meu trabalho externo.

Ao meu co-orientador Ederson da Conceição Jesus, pelo exemplo de dedicação ao trabalho de pesquisador, amizade integral e apoio irrestrito na condução dos trabalhos. Muito obrigado meu amigo!

À Profa. Vera Lúcia Divan Baldani, pelas contribuições fundamentais que dispensou a esta obra, pela grata convivência e aprendizado em Microbiologia do Solo.

Aos meus pais Paulo e Saionara, que alicerçaram minha vida e, especialmente durante a condução deste trabalho, me dedicaram todo o seu amor.

À minha esposa Nardele, por seu amor, incentivo, apoio fundamental e carinho ininterrupto. Esta Dissertação é sua!

A Áurea Maria de Sousa, pelo grande e dedicado auxílio na condução dos experimentos e amizade. MUITÍSSIMO OBRIGADO!

Ao meu amigo e indispensável orientador Wilson Cabral da Fonseca, agradeço pela ajuda durante os ensaios e análises, pela amizade e momentos de descontração.

Aos colegas da equipe técnica da Embrapa Agrobiologia que me auxiliaram nas práticas realizadas: Andréia, Lúcio, Marcelo, Roberto Carlos, Sr. Edilson, Nivaldo e Ernani.

## **BIOGRAFIA**

Rennan do Amaral Bastos, filho de Paulo Augusto Xavier Bastos e Saionara do Amaral Bastos, nasceu em Niterói, Estado do Rio de Janeiro, em 15 de março de 1988. cursou o Ensino Médio no Colégio Manilhense em Itaboraí - RJ. Em 2006 ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, e colou grau como Engenheiro Agrônomo em 2010. Durante a graduação na UFRRJ, foi bolsista de Iniciação Científica do PIBIC/CNPq no Instituto de Agronomia – Departamento de Solos, presidente do Centro de Estudos Agronômicos (CEA) e integrante do Núcleo de Estudos Agronômicos (NEAGRO). Em 2011 foi aprovado para o cargo de Professor Substituto de Ensino Básico, Técnico e Tecnológico no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais - Campus São João Evangelista. Em 2013 tomou posse como professor efetivo no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Acre - *Campus* Cruzeiro do Sul, onde permanece. Iniciou em 2014, ao nível de Mestrado, o curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo.

## RESUMO GERAL

BASTOS, Rennan do Amaral. **Co-inoculação de rizóbio e bactérias promotoras de crescimento vegetal em feijoeiro comum**. 2016. 101f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2016.

O objetivo do trabalho foi avaliar a produção de biomassa e de grãos em feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) sob co-inoculação de rizóbio e bactérias promotoras de crescimento vegetal. O trabalho foi dividido em três capítulos. O primeiro teve como objetivo avaliar a compatibilidade entre rizóbio e bactérias promotoras de crescimento e seus efeitos no crescimento das plantas. Em ensaio em placas de Petri, *Azospirillum amazonense* e *A. brasilense* foram co-inoculados com *Rhizobium tropici* em três doses de aplicação, verificando-se ausência de antagonismo. O experimento em vasos de Leonard teve esquema fatorial 5x3+3 com oito repetições, composto por cinco bactérias (*Bradyrhizobium diazoefficiens*, *B. elkanii*, *Azospirillum amazonense*, *A. brasilense* e *Escherichia coli*) e três doses de aplicação ( $10^4$ ,  $10^6$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>), todas co-inoculadas com *R. tropici*, e três tratamentos adicionais (testemunhas absoluta, nitrogenada, e inoculada com *R. tropici*). A co-inoculação aumentou a nodulação, teor e conteúdo de N na parte aérea. O experimento em vasos com solo teve esquema fatorial 3x2x2+4 com quatro repetições, composto por três promotores de crescimento (*B. diazoefficiens*, *B. elkanii* e *A. brasilense*), duas doses ( $10^4$  e  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>), duas fontes de N (*R. tropici* e N mineral), e quatro tratamentos adicionais (testemunhas absoluta, nitrogenada, inoculada com rizóbio e co-inoculada com AZOTOTAL<sup>®</sup>). A inoculação com *A. brasilense* associada à adubação nitrogenada aumentou a produção de folhas e de parte aérea. O segundo capítulo teve como objetivo avaliar o crescimento e produção do feijoeiro sob co-inoculação. Foi realizado um experimento em vasos com solo em esquema fatorial 2x3+4 com oito repetições, combinando a inoculação de *R. tropici* com *A. brasilense* ou *B. diazoefficiens* e três doses de aplicação ( $10^4$ ,  $10^6$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>), acrescidos das testemunhas absoluta, nitrogenada, inoculada com rizóbio e co-inoculada com AZOTOTAL<sup>®</sup>. As plantas foram coletadas aos 45 dias após plantio e na maturação dos grãos. As plantas co-inoculadas apresentaram massa de parte aérea, número de vagens, conteúdo de N na parte aérea, massa de grãos, número de grãos e de vagens por planta, superiores à testemunha inoculada com rizóbio. O índice de clorofila Falker foi similar nos tratamentos co-inoculados e sob adubação nitrogenada, mas inferior ao da inoculação com *R. tropici*. No terceiro capítulo avaliou-se o crescimento e produção do feijoeiro sob diferentes estratégias de adubação nitrogenada associada à co-inoculação. O experimento consistiu de sete tratamentos com oito repetições: testemunha absoluta; inoculação com *R. tropici* sem aplicação de N; testemunha com N mineral; co-inoculação com *R. tropici* e *A. brasilense* sem N ou com 20 kg ha<sup>-1</sup> de N em semeadura; inoculação com *R. tropici* e 20 kg ha<sup>-1</sup> de N em semeadura; inoculação com *A. brasilense* e 20 kg ha<sup>-1</sup> de N em semeadura. As plantas foram coletadas aos 45 dias e na maturação. A co-inoculação combinada com a adubação nitrogenada resultou em maiores valores de massa de folhas, caule, parte aérea, massa seca de grãos, número de grãos por planta e acúmulo de N nas vagens e grãos.

**Palavras-chave:** *Phaseolus vulgaris*. Co-inoculação. Crescimento.



## GENERAL ABSTRACT

BASTOS, Rennan do Amaral. **Co-inoculation of rhizobia and plant growth promoting bacteria in common bean.** 2016. 101p. Dissertation (Master Degree in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

The objective of this work was to evaluate the production of biomass and grains in common bean (*Phaseolus vulgaris*) in co-inoculation with rhizobia and plant growth promoting bacteria. The work was divided into three chapters. The first evaluated the compatibility between rhizobia and plant growth promoting bacteria and their effects on plant growth. In Petri dishes assay, *Azospirillum amazonense* and *A. brasilense* were co-inoculated with *Rhizobium tropici* at three application levels, and no antagonism was detected. The experiment in Leonard jars had a 5x3+3 factorial with eight replications, consisting of five bacteria (*Bradyrhizobium diazoefficiens*, *B. elkanii*, *A. amazonense*, *Azospirillum brasilense* and *Escherichia coli*) and three application levels ( $10^4$ ,  $10^6$  and  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>), all co-inoculated with *R. tropici* plus three additional treatments (control, nitrogen, and inoculated with *R. tropici*). Co-inoculation increased nodulation, N concentration and content in the shoot. The experiment in pots with soil had 3x2x2+4 factorial with four replications, consisting of three growth promoters (*B. diazoefficiens*, *B. elkanii* and *A. brasilense*), two application levels ( $10^4$  and  $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup>), two N sources (*R. tropici* and mineral N), and four additional control treatments (absolute control, nitrogen, inoculated with rhizobia and co-inoculated with AZOTOTAL<sup>®</sup>). Inoculation with *A. brasilense* associated with N fertilization increased the production of leaves and shoots. The second chapter aimed to evaluate the growth and production of common bean under co-inoculation. An experiment in pots with soil in a factorial 2x3+4 with 8 repetitions were performed by combining the inoculation of *R. tropici* with *A. brasilense* or *B. diazoefficiens* in three application levels ( $10^4$ ,  $10^6$  and  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>) plus the control treatments (absolute, nitrogen, inoculated with rhizobia and co-inoculated with AZOTOTAL<sup>®</sup>). Four replications were harvested at 45 days after sowing, and four at grain maturity. Co-inoculated plants showed shoot mass, number of pods, shoot N content, grain yield, number of seeds and pods per plant higher than the control inoculated with rhizobia. The leaf chlorophyll Falker index was similar in co-inoculated treatments and under mineral N fertilization, but lower than the exclusive inoculation *R. tropici*. In the third chapter it was evaluated the growth and production of common bean under different strategies of mineral N fertilization associated with co-inoculation with *R. tropici* and *A. brasilense*. The experiment had seven treatments with four replications: control; inoculation with *R. tropici* without N application; control with mineral N; co-inoculation with *R. tropici* and *A. brasilense* without N fertilization or application of 20 kg ha<sup>-1</sup> of N at sowing; inoculation with *R. tropici* and 20 kg ha<sup>-1</sup> of N at sowing; inoculation with *A. brasilense* and 20 kg ha<sup>-1</sup> of N at sowing. Plants were harvested at 45 days after sowing and at grain maturity. Co-inoculation combined with the N fertilization resulted in higher mass values of leaves, stem, shoot, dry mass of grains, number of grains per plant and accumulation of N in pods and grains.

**Key words:** *Phaseolus vulgaris*. Co-inoculation. Growth.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Visão geral do experimento em vasos de Leonard. ....	16
<b>Figura 2.</b> Visão geral do experimento em vasos com solo. ....	18
<b>Figura 3.</b> Microscopia ótica de seções longitudinais de quatro semanas de idade de nódulos de feijoeiro sob co-inoculação de <i>R. tropici</i> com <i>A. brasilense</i> , <i>B. diazoefficiens</i> , <i>B. elkanii</i> e <i>E. coli</i> . (A) Feixe vascular de nódulo da testemunha inoculada com <i>R. tropici</i> . (B) Células infectadas em nódulo de testemunha inoculada com <i>R. tropici</i> . (C) e (D) Células de nódulo co-inoculado com <i>R. tropici</i> e <i>B. diazoefficiens</i> (ci, células infectadas; cni, células não infectadas). (E) Células de nódulo co-inoculado com <i>R. tropici</i> e <i>B. elkanii</i> . (F) Feixe vascular de nódulo co-inoculado com <i>R. tropici</i> e <i>B. elkanii</i> . (G) Células de nódulo co-inoculados com <i>R. tropici</i> e <i>A. brasilense</i> . (H) Feixe vascular de nódulo co-inoculado com <i>R. tropici</i> e <i>E. coli</i> . (I) Células de nódulo co-inoculado com <i>R. tropici</i> e <i>E. coli</i> . ....	27
<b>Figura 4.</b> Visão geral do experimento aos 46 dias após o plantio. ....	45
<b>Figura 5.</b> Visão geral do experimento aos 64 dias após o plantio. ....	46
<b>Figura 6.</b> Variação média do Índice de Clorofila Falker para os teores de clorofila a, b e ab em folhas de feijoeiro co-inoculadas com rizóbio e bactérias promotoras de crescimento vegetal. ....	55
<b>Figura 7.</b> Visão geral do experimento aos 45 dias após o plantio. ....	69
<b>Figura 8.</b> Visão geral do experimento aos 74 dias após o plantio. ....	69
<b>Figura 9.</b> Variação das leituras do clorofilômetro (ICF) para o teor de clorofila a e b em folhas de feijoeiro co-inoculado com <i>R. tropici</i> e <i>A. brasilense</i> associado à adubação nitrogenada. ....	77

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Demonstrativo do procedimento para obtenção do quadro de análise de variância em esquema fatorial com tratamentos extras, para os dados de conteúdo de N na parte aérea no experimento de vasos de Leonard.....	19
<b>Tabela 2.</b> Teste de antagonismo de <i>Azospirillum amazonense</i> e <i>Azospirillum brasilense</i> à <i>Rhizobium tropici</i> em meios de cultura DYGS e NFB, em que (-) = ausência de inibição e (+) = presença de inibição. ....	20
<b>Tabela 3.</b> Massa seca de parte aérea, massa seca de raiz, número de nódulos, massa seca de nódulos e massa seca de 1 nódulo de feijoeiro co-inoculado com rizóbio ( <i>Rhizobium tropici</i> ) e bactérias promotoras de crescimento vegetal ( <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> , <i>B. elkanii</i> , <i>Azospirillum amazonense</i> e <i>A. brasilense</i> ), sob diferentes doses de inoculante ( $10^4$ , $10^6$ e $10^8$ UFC mL <sup>-1</sup> ), 35 dias após o plantio, em vasos de Leonard.....	21
<b>Tabela 4.</b> Valores médios referentes à massa de parte aérea e raiz de feijoeiro co-inoculado com rizóbio ( <i>Rhizobium tropici</i> ) e bactérias promotoras de crescimento vegetal ( <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> , <i>B. elkanii</i> , <i>Azospirillum amazonense</i> e <i>A. brasilense</i> ), sob diferentes doses de inoculante ( $10^4$ , $10^6$ e $10^8$ UFC mL <sup>-1</sup> ), 35 dias após o plantio, em vasos de Leonard. ....	21
<b>Tabela 5.</b> Médias de massa, número e massa unitária de nódulos de feijoeiro co-inoculado com rizóbio ( <i>Rhizobium tropici</i> ) e bactérias promotoras do crescimento vegetal ( <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> , <i>B. elkanii</i> , <i>Azospirillum amazonense</i> e <i>A. brasilense</i> ), sob diferentes doses de inoculante ( $10^4$ , $10^6$ e $10^8$ UFC mL <sup>-1</sup> ), 35 dias após o plantio, em vasos de Leonard. ....	24
<b>Tabela 6.</b> Teor e conteúdo de N na parte aérea de feijoeiro co-inoculado com rizóbio ( <i>Rhizobium tropici</i> ) e bactérias promotoras do crescimento vegetal ( <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> , <i>B. elkanii</i> , <i>Azospirillum amazonense</i> e <i>A. brasilense</i> ), sob diferentes doses de inoculante ( $10^4$ , $10^6$ e $10^8$ UFC mL <sup>-1</sup> ), 35 dias após o plantio, em vasos de Leonard..	25
<b>Tabela 7.</b> Médias de conteúdo de nitrogênio na parte aérea de feijoeiro co-inoculado com rizóbio ( <i>Rhizobium tropici</i> ) e bactérias promotoras do crescimento vegetal ( <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> , <i>B. elkanii</i> , <i>Azospirillum amazonense</i> e <i>A. brasilense</i> ), sob diferentes doses de inoculante ( $10^4$ , $10^6$ e $10^8$ UFC mL <sup>-1</sup> ), 35 dias após o plantio, em vasos de Leonard. ....	26
<b>Tabela 8.</b> Massa de folhas, massa de caule, massa de parte aérea e massa de raiz de feijoeiro co-inoculado com rizóbio ( <i>Rhizobium tropici</i> ) e bactérias promotoras de crescimento vegetal ( <i>Bradyrhizobium elkanii</i> , <i>B. diazoefficiens</i> e <i>Azospirillum brasilense</i> ) nas sementes, sob diferentes doses de inoculante ( $10^4$ , $10^6$ e $10^8$ UFC mL <sup>-1</sup> ), 45 dias após o plantio, em vasos com solo não esterelizado.....	28
<b>Tabela 9.</b> Número de nódulos, massa de nódulos e massa de 1 nódulo de feijoeiro co-inoculado com rizóbio ( <i>Rhizobium tropici</i> ) e bactérias promotoras de crescimento vegetal ( <i>Bradyrhizobium elkanii</i> , <i>B. diazoefficiens</i> e <i>Azospirillum brasilense</i> ) nas sementes, sob diferentes doses de inoculante ( $10^4$ , $10^6$ e $10^8$ UFC mL <sup>-1</sup> ), 45 dias após o plantio, em vasos com solo não esterelizado.....	29

<b>Tabela 10.</b> Médias da massa de nódulos de feijoeiro co-inoculado com rizóbio ( <i>Rhizobium tropici</i> ) e bactérias promotoras do crescimento vegetal ( <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> , <i>B. elkanii</i> , <i>Azospirillum brasilense</i> ), sob diferentes doses de inoculante ( $10^4$ e $10^6$ UFC mL <sup>-1</sup> ), 45 dias após o plantio, em vasos com solo não esterelizado. ....	29
<b>Tabela 11.</b> Atividade de nitrogenase no sistema radicular e atividade específica da nitrogenase de plantas de feijoeiro co-inoculado com rizóbio ( <i>Rhizobium tropici</i> ) e bactérias promotoras de crescimento vegetal ( <i>Bradyrhizobium elkanii</i> , <i>B. diazoefficiens</i> e <i>Azospirillum brasilense</i> ) nas sementes, sob diferentes doses de inoculante ( $10^4$ , $10^6$ e $10^8$ UFC mL <sup>-1</sup> ), 45 dias após o plantio, em vasos com solo não esterelizado. ....	30
<b>Tabela 12.</b> Teor de N na parte aérea e conteúdo de N na parte aérea de feijoeiro co-inoculado com rizóbio ( <i>Rhizobium tropici</i> ) e bactérias promotoras de crescimento vegetal ( <i>Bradyrhizobium elkanii</i> , <i>B. diazoefficiens</i> e <i>Azospirillum brasilense</i> ) nas sementes, sob diferentes doses de inoculante ( $10^4$ , $10^6$ e $10^8$ UFC mL <sup>-1</sup> ), 45 dias após o plantio, em vasos com solo não esterelizado. ....	31
<b>Tabela 13.</b> Médias de conteúdo de nitrogênio na folha e conteúdo de nitrogênio na parte aérea de feijoeiro co-inoculado com rizóbio ( <i>Rhizobium tropici</i> ) e bactérias promotoras do crescimento vegetal ( <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> , <i>B. elkanii</i> , <i>Azospirillum brasilense</i> ), sob diferentes doses de inoculante ( $10^4$ e $10^6$ UFC mL <sup>-1</sup> ), 45 dias após o plantio, em vasos com solo não esterelizado. ....	32
<b>Tabela 14.</b> Massa seca de folhas, massa seca de caule, massa seca de vagens, massa seca de parte aérea, massa seca de raiz e número de vagens de feijoeiro co-inoculado com rizóbio ( <i>R. tropici</i> = Rhizo) e bactérias promotoras de crescimento vegetal ( <i>A. brasilense</i> = Azo e <i>B. diazoefficiens</i> = Brady) sob três doses de aplicação ( $10^4$ , $10^6$ e $10^8$ UFC mL <sup>-1</sup> ) aos 45 dias após o plantio. ....	49
<b>Tabela 15.</b> Número de nódulos, massa de nódulos e massa de 1 nódulo de feijoeiro co-inoculado com rizóbio ( <i>R. tropici</i> = Rhizo) e bactérias promotoras de crescimento vegetal ( <i>A. brasilense</i> = Azo e <i>B. diazoefficiens</i> = Brady) sob três doses de aplicação ( $10^4$ , $10^6$ e $10^8$ UFC mL <sup>-1</sup> ) aos 45 dias após o plantio. ....	50
<b>Tabela 16.</b> Teor e conteúdo de N na folha, caule, parte aérea e vagem de feijoeiro co-inoculado com rizóbio ( <i>R. tropici</i> = Rhizo) e bactérias promotoras de crescimento vegetal ( <i>A. brasilense</i> = Azo e <i>B. diazoefficiens</i> = Brady) sob três doses de aplicação ( $10^4$ , $10^6$ e $10^8$ UFC mL <sup>-1</sup> ) aos 45 dias após o plantio. ....	51
<b>Tabela 17.</b> Produção de grãos, componentes de produção e índice de colheita de feijoeiro co-inoculado com rizóbio ( <i>R. tropici</i> = Rhizo) e bactérias promotoras de crescimento vegetal ( <i>A. brasilense</i> = Azo e <i>B. diazoefficiens</i> = Brady) sob três doses de aplicação ( $10^4$ , $10^6$ e $10^8$ UFC mL <sup>-1</sup> ). ....	53
<b>Tabela 18.</b> Teor e conteúdo de N nos grãos de feijoeiro co-inoculado com rizóbio ( <i>R. tropici</i> = Rhizo) e bactérias promotoras de crescimento vegetal ( <i>A. brasilense</i> = Azo e <i>B. diazoefficiens</i> = Brady) sob três doses de aplicação ( $10^4$ , $10^6$ e $10^8$ UFC mL <sup>-1</sup> ). ....	54
<b>Tabela 19.</b> Variação temporal do Índice de Clorofila Falker para os teores de clorofila a em folhas de feijoeiro co-inoculado com rizóbio ( <i>R. tropici</i> = Rhizo) e bactérias promotoras de crescimento vegetal ( <i>A. brasilense</i> = Azo e <i>B. diazoefficiens</i> = Brady) sob três doses de aplicação ( $10^4$ , $10^6$ e $10^8$ UFC mL <sup>-1</sup> ). ....	56

<b>Tabela 20.</b> Variação temporal do Índice de Clorofila Falker para os teores de clorofila b em folhas de feijoeiro co-inoculado com rizóbio ( <i>R. tropici</i> = Rhizo) e bactérias promotoras de crescimento vegetal ( <i>A. brasilense</i> = Azo e <i>B. diazoefficiens</i> = Brady) sob três doses de aplicação ( $10^4$ , $10^6$ e $10^8$ UFC mL <sup>-1</sup> ). .....	57
<b>Tabela 21.</b> Variação temporal do Índice de Clorofila Falker para os teores de clorofila total em folhas de feijoeiro co-inoculado com rizóbio ( <i>R. tropici</i> = Rhizo) e bactérias promotoras de crescimento vegetal ( <i>A. brasilense</i> = Azo e <i>B. diazoefficiens</i> = Brady) sob três doses de aplicação ( $10^4$ , $10^6$ e $10^8$ UFC mL <sup>-1</sup> ). .....	58
<b>Tabela 22.</b> Massa seca de folha, caule, vagens, parte aérea, raiz e total de feijoeiro co-inoculado com <i>R. tropici</i> e <i>A. brasilense</i> associado à adubação nitrogenada, aos 45 dias após a semeadura. ....	72
<b>Tabela 23.</b> Número de nódulos, massa seca de nódulos e massa seca de 1 nódulo de feijoeiro co-inoculado com <i>R. tropici</i> e <i>A. brasilense</i> associado à adubação nitrogenada, aos 45 dias após o plantio. ....	72
<b>Tabela 24.</b> Teor e conteúdo de N na folha, caule e vagem de feijoeiro co-inoculado com <i>R. tropici</i> e <i>A. brasilense</i> associado à adubação nitrogenada, aos 45 dias após o plantio. ....	73
<b>Tabela 25.</b> Massa seca de grãos e componentes de produção de feijoeiro co-inoculado com <i>R. tropici</i> e <i>A. brasilense</i> associado à adubação nitrogenada. ....	75
<b>Tabela 26.</b> Teor e conteúdo de N nos grãos de feijoeiro co-inoculado com <i>R. tropici</i> e <i>A. brasilense</i> associado à adubação nitrogenada. ....	76
<b>Tabela 27.</b> Variação temporal do Índice de Clorofila Falker para os teores de clorofila a em folhas de feijoeiro co-inoculado com <i>R. tropici</i> e <i>A. brasilense</i> associado à adubação nitrogenada. ....	78
<b>Tabela 28.</b> Variação temporal do Índice de Clorofila Falker para os teores de clorofila b em folhas de feijoeiro co-inoculado com <i>R. tropici</i> e <i>A. brasilense</i> associado à adubação nitrogenada. ....	79
<b>Tabela 29.</b> Variação temporal do Índice de Clorofila Falker para os teores de clorofila a e b em folhas de feijoeiro co-inoculado com <i>R. tropici</i> e <i>A. brasilense</i> associado à adubação nitrogenada. ....	79
<b>Tabela 30.</b> Análise de variância dos caracteres de acúmulo de biomassa e conteúdo de N na parte aérea no experimento em vasos de Leonard. ....	100
<b>Tabela 31.</b> Análise de variância dos caracteres de massa de nódulos, número de nódulos e massa unitárias de nódulos no experimento em vasos de Leonard. ....	100
<b>Tabela 32.</b> Análise de variância dos caracteres de biomassa e conteúdo de N no experimento em vasos de solo. ....	101
<b>Tabela 33.</b> Análise de variância dos caracteres de nodulação no experimento em vasos de solo. ....	101

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA GERAL .....</b>	<b>3</b>
2.1	Rizóbio: Interação Planta-Bactéria e Fixação Biológica de Nitrogênio	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.2	Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.3	Co-inoculação de Rizóbio e Bactérias Promotoras de Crescimento	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.4	Adubação Nitrogenada e Inoculação de Leguminosas.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO I - CO-INOCULAÇÃO DE RIZÓBIO E BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL EM SEMENTES DE FEIJOEIRO COMUM.....</b>	<b>9</b>
3.1	RESUMO .....	10
3.2	ABSTACT.....	12
3.3	INTRODUÇÃO.....	12
3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.4.1	Ensaio em placas .....	14
3.4.2	Experimento em vasos de Leonard.....	14
3.4.3	Experimento em vasos com solo .....	16
3.4.4	Análise estatística .....	18
3.5	RESULTADOS .....	20
3.5.1	Ensaio em placas .....	20
3.5.2.	Experimento em vasos de Leonard.....	20
3.6	DISCUSSÃO.....	33
3.6.1	Ensaio em placas .....	33
3.6.2	Ensaio em vasos de Leonard .....	33
3.6.3	Ensaio em vasos com solo.....	35
3.7	CONCLUSÕES .....	38
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO II - ACÚMULO DE BIOMASSA, TEORES DE CLOROFILA E COMPONENTES DE PRODUÇÃO DE FEIJOEIRO SOB CO-INOCULAÇÃO DE RIZÓBIO E BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL .....</b>	<b>39</b>
4.1	RESUMO .....	40
4.2	ABSTRACT .....	41
4.3	INTRODUÇÃO.....	42
4.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.4.1	Condições experimentais.....	44
4.4.2	Coletas e determinações .....	46
4.4.3	Análises estatísticas .....	47
4.5	RESULTADOS .....	48
4.6	DISCUSSÃO.....	59
4.7	CONCLUSÕES .....	62

<b>5</b>	<b>CAPÍTULO III - CO-INOCULAÇÃO DE <i>Rhizobium tropici</i> E <i>Azospirillum brasilense</i> EM FEJÓEIRO SUBMETIDO À ADUBAÇÃO NITROGENADA MINERAL.....</b>	<b>63</b>
5.1	RESUMO .....	64
5.2	ABSTRACT .....	66
5.3	INTRODUÇÃO.....	66
5.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	68
5.4.1	Condições experimentais.....	68
5.4.2	Coletas e determinações .....	70
5.4.3	Análises estatísticas .....	70
5.5	RESULTADOS .....	71
5.6	DISCUSSÃO.....	80
5.7	CONCLUSÕES .....	82
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>83</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>100</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A simbiose leguminosa-*Rhizobium* é conhecida por ser o sistema mais eficiente para fixação biológica de N<sub>2</sub> (BURDMAN et al., 1997), ocorrendo por meio de nodulação nas raízes (MOLLA et al., 2001) onde a bactéria, na forma de bacteróides, converte nitrogênio atmosférico em amônia, através da nitrogenase (NEVES, 1981; NEVES & RUMIJANEK, 1998), tornando-o disponível para as reações de aminação (processo pelo qual íons amônio são transferidos para compostos contendo carbono a fim de produzir aminoácidos e outras substâncias orgânicas contendo nitrogênio) (RAVEN et al., 1996).

O sistema simbiótico desempenha destacada função na agricultura: inoculantes rizobianos, veículos que contém estirpes de comprovada especificidade com a planta hospedeira, têm sido amplamente utilizados em áreas de produção de leguminosas com o objetivo de atender – parcial ou integralmente – a demanda de N das culturas através da fixação biológica de nitrogênio (FBN). Giller & Cadisch (1995) se referem ao sucesso em termos de modificação das práticas agrícolas decorrentes de pesquisas sobre FBN como resultante do desenvolvimento e aplicação de tais produtos, destacando que sua utilização permitiu a introdução de leguminosas em locais onde rizóbios compatíveis eram ausentes no solo. Estima-se que, no mundo, a FBN em áreas cultivadas contribua com 32 Tg ano<sup>-1</sup> de N, que corresponde a 30% do N produzido na forma de fertilizantes (CANTARELLA, 2007).

Outro grupo de microrganismos benéficos do solo é representado por bactérias associativas capazes de promover o crescimento das plantas por meio de vários processos biológicos (CHAPARRO et al., 2012), conhecidas como bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPB - *plant growth promoting bacteria*). Dentre os mecanismos intrínsecos à sua fisiologia e que destacadamente podem interferir no desenvolvimento das culturas, podem-se citar: produção de substâncias reguladoras do crescimento de plantas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006), aumento da captação de nutrientes através da solubilização de fosfatos inorgânicos e de ferro pela produção de sideróforos (GLICK et al., 1999; PODILE & KISHORE, 2006; GALVÃO et al., 2010), fixação biológica de nitrogênio (REIS et al., 2005) e controle biológico contra patógenos de plantas (SALAMONE et al., 2001).

Apesar de inoculantes de *Rhizobium* estarem disponíveis para comercialização por um século, só recentemente é que a primeiras preparações comerciais de PGPBs têm aparecido no mercado (FAGES, 1992; TANG, 1994; TANG & YANG, 1997; BASHAN, 1998). Os efeitos da inoculação dos promotores de crescimento sobre o desenvolvimento das plantas estão diretamente ligados a uma série de fatores: concentração de inóculo (GERMAN et al., 2000), tipo de solo (BASHAN, 1998), época de inoculação e condições ambientais (OKON & KAPULNIK, 1986), podendo então expressar distintas respostas à cultura, em conformidade a sua tecnologia de aplicação ou de agroecossistema. Dentre as técnicas de utilização de promotores do crescimento, duas têm se destacado: sua associação com a adubação nitrogenada mineral e a co-inoculação com bactérias do gênero *Rhizobium*.

Experimentos recentes, que objetivaram avaliar a efetividade da inoculação de PGPBs em feijoeiro adubado com nitrogênio mineral, demonstram o potencial promissor de utilização desta técnica para a promoção de ganhos em termos de produtividade. Gitti et al. (2012) observaram que a inoculação de *Azospirillum brasilense* proporcionou incremento de grãos equivalente a 101 kg ha<sup>-1</sup> em comparação ao não inoculado, demonstrando que a disponibilização de nitrogênio prontamente solúvel (advindo dos fertilizantes) associado ao efeito sinérgico das PGPBs é potencialmente favorável ao feijoeiro.

Inoculantes mistos (combinações de microrganismos) que interagem sinérgicamente estão atualmente sendo elaborados (BASHAN, 1998), ensejando um quadro otimista para a



indústria, pela possibilidade de incorporação das PGPBs aos inoculantes rizobianos já comercializados e amplamente utilizados em plantios de leguminosas. A técnica alternativa de co-inoculação, também denominada de inoculação mista, consiste na utilização de combinações de diferentes microorganismos, aos quais produzem um efeito sinérgico, em que se superam os resultados produtivos obtidos com os mesmos, quando utilizados na forma isolada (FERLINI, 2006; BÁRBARO et al., 2008, 2009), com frequência, aumentando o crescimento e produção, em comparação à inoculação isolada, condicionando plantas com nutrição mais equilibrada (BASHAN & HOLGUIN, 1997; BASHAN, 1998).

A co-inoculação de PGPBs com rizóbios está se tornando um método prático para o desenvolvimento da agricultura sustentável, em função dos aumentos de rendimento observados em comparação com inoculação com rizóbio sozinho (BAI et al., 2002). Segundo Hungria et al. (2013), considerando-se as principais limitações para a fixação biológica de N<sub>2</sub> com feijão inoculado com rizóbios e os benefícios para o crescimento da cultura atribuído às PGPBs, a co-inoculação com ambos os microrganismos pode melhorar o desempenho da planta em questão, sendo esta abordagem coerente com as exigências modernas de sustentabilidade agrícola, econômica, social e ambiental (CHAPARRO et al., 2012).

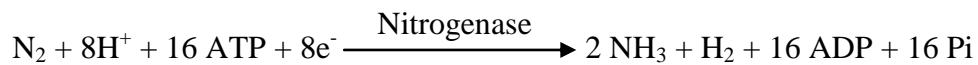
Na atual conjuntura do agronegócio, busca-se elevar a produtividade das lavouras considerando-se de antemão os aspectos econômico e ambiental. Desta forma, justificam-se o desenvolvimento de tecnologias que contribuam para a redução do uso de insumos industriais e proporcionem menores impactos aos recursos naturais. Diante deste cenário, a hipótese é de que a co-inoculação de rizóbio e bactérias promotoras de crescimento vegetal, associados ou não à adubação nitrogenada mineral, podem favorecer o crescimento das plantas.

Para testar esta suposição, foram conduzidos experimentos em casa de vegetação, onde plantas de feijoeiro foram submetidas à co-inoculação de rizóbio com bactérias promotoras de crescimento vegetal, de forma isolada ou associada à adubação nitrogenada mineral, tendo como objetivo avaliar as respostas em termos de produção de biomassa e componentes de produção.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Rizóbio: Interação Planta-Bactéria e Fixação Biológica de Nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo em que a molécula de N<sub>2</sub> na forma gasosa é incorporada, na forma de amônio, ao metabolismo primário de fixação de nitrogênio, participando da produção de proteínas nas plantas (REIS et al., 2010). Apenas uma parcela relativamente pequena das espécies de procariotos possui a enzima nitrogenase que é capaz de reduzir o N<sub>2</sub> para a forma inorgânica combinada NH<sub>3</sub> que pode então, tornar-se disponível para plantas e outros organismos, os quais são chamados de fixadores de N<sub>2</sub> ou diazotróficos, e o processo que mediam – a fixação biológica de N<sub>2</sub> (FBN) é representado pela seguinte equação (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006):



A enzima nitrogenase é composta por duas unidades básicas: uma ferro-proteína que coleta a força redutora e energia e outra ferro-molibdênio, proteína que coleta e reduz o substrato (Moreira & Siqueira, 2006). Atualmente, são conhecidos três tipos de nitrogenase: um que possui molibdênio (Mo, nitrogenase-1) e ferro (Fe); outro em que o vanádio (V) substitui o molibdênio (nitrogenase-2); e um terceiro, que só tem ferro (nitrogenase-3) (REIS et al., 2005). A fisiologia dos microrganismos diazotróficos é marcada pelas propriedades inerentes desta enzima. São elas: alta sensibilidade ao oxigênio, necessidade dos metais Fe, Mo ou V, seus componentes estruturais; suprimento adequado de poder redutor; MgATP para a sua atividade; ambiente onde o nitrogênio combinado não esteja disponível (REIS et al., 2005).

O estudo de bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> ou diazotróficas associadas às plantas tem mostrado a ocorrência de uma grande variedade de microrganismos isolados a partir das mais diversas famílias do reino vegetal, além do solo e dos sistemas aquáticos (REIS & TEIXEIRA, 2005). A capacidade diazotrófica está restrita a Bactéria e Archaea, incluindo cianobactérias e bactérias Gram positivas e Gram negativas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Na associação com leguminosas, a bactéria é denominada comumente de rizóbio (CASSINI & FRANCO, 2013); as plantas formam então estruturas especializadas, denominadas “nódulos”, localizados nas raízes, onde ficam os bacteróides – rizóbios transformados – contendo as enzimas necessárias à fixação do N (LOPES, 2007). Embora seja um processo de redução, os rizóbios demandam oxigênio para outros processos metabólicos. O suprimento de oxigênio é feito de forma controlada, com a participação da proteína leg-hemoglobina, que confere aos nódulos efetivos uma tonalidade avermelhada (LOPES, 2007).

“Rizóbio” é um termo genérico atribuído a bactérias diazotróficas originalmente pertencentes à família *Rhizobiaceae* (RUMJANEK et al., 2005), que inicialmente incluía todas as espécies de bactérias que nodulam leguminosas (JORDAN, 1984; MOREIRA, 2008). O nome rizóbio originou-se da primeira espécie descrita – *Rhizobium leguminosarum* de onde também se derivou o nome da primeira família compreendendo, na época, todas as bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas conhecidas – *Rhizobiaceae* (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Hoje, com a descoberta de bactérias que nodulam leguminosas em outras famílias de diversos ramos filogenéticos de Prokaryota, esse nome se tornou inapropriado, porém é amplamente empregado como termo coletivo e consagrado pelo uso (MOREIRA, 2008). Segundo Cassini & Franco (2013), os rizóbios caracterizam-se pela capacidade de interação com o sistema radicular da planta hospedeira por meio do desenvolvimento de estruturas altamente especializadas – o nódulo radicular – onde se

processa a FBN. Essa interação representa uma simbiose, ou, mais especificamente, uma interação mutualística, pois a bactéria se beneficia do suprimento de fotoassimilados ou carbono orgânico fornecidos pela planta hospedeira, enquanto a planta recebe o nitrogênio fixado pelo rizóbio microssimbionte na forma amoniacal, assimilando-o em compostos nitrogenados que podem ser translocados para as suas diferentes partes.

O mérito do primeiro isolamento de bactérias fixadoras de nitrogênio do interior dos nódulos é creditado a Beijerinck em 1888 que as denominou *Bacillus radicolica* (MOREIRA, 2008). A origem do epíteto *Rhizobium leguminosarum*, que *Bacillus radicolica* substituiu e, retido até hoje como a primeira espécie de bactéria que nodula leguminosas, é incerta (YOUNG, 1999; MOREIRA, 2008). Por muito tempo foi creditado a Frank (1890), mas revisões recentes corrigiram para Frank (1879), que descreveu a espécie, mas não demonstrou sua capacidade de fixar nitrogênio (MOREIRA, 2008).

O agrupamento dos rizóbios foi, inicialmente, baseado em características fenotípicas, principalmente na habilidade de nodular determinadas leguminosas, dando origem ao conceito de “grupos de inoculação cruzada” (FRED et al., 1932; HUNGRIA et al., 1997), baseado no princípio da existência de uma especificidade para que ocorra a infecção da planta pelas estirpes bacterianas.

A nomenclatura do grupo rizóbio baseada na faixa de hospedeiro mostrou-se cada vez mais inadequada, exigindo uma profunda revisão (RUMJANEK et al., 2005). Atualmente, são reconhecidos treze gêneros: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* (anteriormente conhecido como *Sinorhizobium*), *Burkholderia*, *Phyllobacterium*, *Microvirga*, *Azorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Methylobacterium*, *Cupriavidus*, *Devosia* e *Shinella* (WEIR, 2012). A perspectiva diante da alta diversidade identificada nesse grupo de bactéria é que ainda deverão ocorrer alterações na taxonomia, principalmente nos rizóbios que nodulam as leguminosas tropicais (YOUNG & HAUKKA, 1996; RUMJANEK, 2005).

As bactérias que nodulam o feijoeiro foram classificadas, inicialmente, como *Rhizobium phaseoli*, levando em consideração, principalmente, o grupo de inoculação cruzada (HUNGRIA et al., 1997). Com a melhor caracterização fisiológica, bioquímica e genética, essas bactérias foram reclassificadas, após 50 anos, na espécie *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (JORDAN, 1984; HUNGRIA et al., 1997). Durante muitos anos, o feijoeiro foi considerado como uma leguminosa de nodulação específica, sendo nodulado apenas por *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (JORDAN, 1984; MERCANTE et al., 1999). Mais recentemente, com o avanço nas técnicas de biologia molecular e avaliação de um grupo maior de isolados que nodulam o feijoeiro, proveniente de diferentes regiões, foram constatadas características bastante heterogêneas entre estes, permitindo que fossem divididos em dois grupos diferentes, correspondentes às estirpes Tipo I e Tipo II (MARTÍNEZ et al., 1985, 1987, 1988; BROM et al., 1988; MERCANTE et al., 1999).

As estirpes do Tipo I incluíam os isolados com uma estreita faixa de hospedeiros, múltiplas cópias do gene *nifH* (QUINTO et al., 1982; MARTÍNEZ et al., 1985) e hibridização com o gene *psi* (BORTHAKUR et al., 1985), enquanto as estirpes do Tipo II apresentavam uma faixa de hospedeiros mais ampla (incluindo *Leucaena leucocephala* e *Macroptilium atropurpureum*) apresentando uma única cópia do gene *nifH* e não hibridizavam com o gene *psi* (MARTÍNEZ et al., 1985, 1988; MERCANTE et al., 1999). Posteriormente, com base em diversas diferenças fisiológicas e genéticas, as estirpes do Tipo II foram reclassificadas numa nova espécie, *Rhizobium tropici*, sendo divididas em dois grupos IIA e IIB (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991; MERCANTE et al., 1999). Classificam-se como pertencentes ao grupo I as bactérias *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* e *Rhizobium etli*, e como pertencente ao grupo II *Rhizobium tropici*.

A inoculação das sementes do feijoeiro com bactérias do gênero *Rhizobium* apresenta-se como uma tecnologia de baixo custo para o fornecimento de nitrogênio às plantas

(HUNGRIA et al., 1997). Ainda segundo Hungria et al. (1997), estimativas das taxas de FBN em feijoeiro, obtidas em experimentos de campo conduzidos na América do Sul, América Central e África, variam de 4 a 124 kg ha<sup>-1</sup> de N e, desta forma, o fornecimento de N via fixação poderia aumentar a produtividade média nacional sem o uso de adubos nitrogenados.

Por muitos anos, as estirpes de rizóbio usadas comercialmente para a inoculação do feijoeiro no Brasil pertenciam ao grupo de estirpes Tipo I (*R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *R. etli*), que, conforme sabemos hoje, apresenta um elevado grau de instabilidade genética. Isto poderia explicar, pelo menos em parte, a variabilidade nas respostas à inoculação do feijoeiro, com perdas frequentes da eficiência simbiótica e, até mesmo, perda de sua viabilidade em culturas estocadas (SOBERÓN-CHAVEZ et al., 1986; FLORES et al., 1988; MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991; MERCANTE et al., 1999).

De acordo com as sugestões apresentadas na “VI RELARE – Reunião da Rede de Laboratórios para a Recomendação de Estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*”, realizada em 1994, apenas as estirpes de *R. tropici* devem ser recomendadas para inoculação de feijoeiro no Brasil (HUNGRIA & ARAUJO, 1995; MERCANTE et al., 1999). De fato, as pesquisas têm demonstrado que a inoculação do feijoeiro com estirpes de *R. tropici* representa um grande potencial para a fixação de N<sub>2</sub> nesta cultura (MERCANTE et al., 1999).

As bactérias definidas como *Rhizobium tropici* podem ser descritas como aeróbicas, Gram-negativas, com bastonetes flagelados, sem a formação de esporos e tamanho de 0,5 a 0,7 µm por 1,5 a 2 µm (HUNGRIA et al., 1997), que produzem hipertrofias corticais em plantas, denominadas nódulos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). As colônias são circulares, convexas, semitranslúcidas e, usualmente, apresentam diâmetro de 2 a 4 mm em 2 a 4 dias em meio TY (HUNGRIA et al., 1997). O pH ótimo para crescimento varia de 5 a 7 e o crescimento pode ocorrer em temperaturas de até 40°C (HUNGRIA et al., 1997).

A estirpe IIB CIAT 899 (= ATCC, 49672, = UMR 1899, = SEMIA 4077) foi designada como estirpe-padrão (“type strain”) e a estirpe representativa do grupo IIA é a CFN 299 (HUNGRIA et al., 1997). A estirpe CIAT 899, assim como as outras do tipo IIB, também é resistente a metais pesados e aos antibióticos cloranfenicol, espectinomomicina, carbenicilina e estreptomicina (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991) e apresenta maior tolerância à acidez (GRAHAM et al., 1994) e a temperaturas elevadas (MERCANTE, 1993; HUNGRIA et al., 1997). A estirpe CIAT 899 encontra-se registrada, na coleção da Embrapa Agrobiologia, como BR 322 e, tem como código oficial SEMIA 4077.

A maioria dos estudos sobre rizóbio do feijoeiro foi desenvolvida em laboratórios europeus, definindo para as bactérias apenas as características de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, dentre as quais a capacidade de nodular exclusivamente o feijoeiro (HUNGRIA et al., 1997). Esta capacidade, porém, vinha sendo questionada, pois há relatos de nodulação do feijoeiro com estirpes de *R. meliloti* (BROMFIELD & BARRAN, 1990), *R. fredii* (SADOWSKY et al., 1988) e por rizóbio isolado de diversas leguminosas florestais (HUNGRIA et al., 1997). Pode-se citar, entre as espécies de leguminosas florestais, relatos de estirpes capazes de nodular o feijoeiro e *Albizia lebbek*, *Clintus formosus*, *Clitoria ternatea*, *Dalea leporina*, *Indigofera tinctoria*, *Gliricidia maculata*, *Leucaena leucocephala*, *Lonchocarpus* spp., *Prosopis chilensis* e *Sesbania exaltata*, entre outras (HUNGRIA et al., 1997). Algumas estirpes também são capazes de nodular forrageiras, como *Lotus corniculatus*, adubos verdes, como *Canavalia ensiformis* e espécies de *Vigna* (HERNANDEZ-LUCAS et al., 1995; HUNGRIA et al., 1997). De acordo com Hungria (1997), é provável que a natureza promíscua das estirpes que nodulam o feijoeiro, ao contrário das de soja, possa permitir a manutenção da infectividade pela nodulação de diversos hospedeiros.

A extraordinária diversidade genética e fisiológica encontrada no rizóbio do feijoeiro, em que os limites entre as espécies das populações nativas não foram ainda definidos

(EARDLY et al., 1985), aliada a capacidade de nodulação da planta com relação a diferentes espécies de rizóbio, vem evidenciar a elevada variabilidade de resposta à nodulação nos diversos cultivares de feijão e pode explicar, em alguns pontos, a razão do insucesso da utilização de inoculantes rizobianos nessa cultura em campo (CASSINI & FRANCO, 2013). Assim, as estirpes superiores de rizóbios, isto é, estirpes com elevada capacidade de nodulação e fixação de nitrogênio, quando utilizadas em plantios de determinadas cultivares de feijão, em certas regiões, podem não sobreviver em campo ou, se sobreviverem, não conseguem competir com os rizóbios nativos, naturalmente mais adaptados às condições locais, havendo, assim, insucesso no seu emprego (CASSINI & FRANCO, 2013). Esse insucesso pode ser expresso como baixa eficiência de fixação de nitrogênio, apesar de a planta apresentar nódulos (CASSINI & FRANCO, 2013).

A julgar pelos dados de comercialização de inoculantes, esse produto vem sendo empregado em apenas 2-3% da área cultivada com feijoeiro (LOPES, 2007). Resultados obtidos em experimentos com feijoeiro indicam que é grande a possibilidade de substituir completamente a adubação nitrogenada pela inoculação (HUNGRIA et al., 2000; LOPES, 2007). Entretanto, a assimilação da tecnologia de inoculação do feijoeiro pode, ainda, demandar tempo. Dentre os motivos mais importantes está a descrença da efetividade da inoculação, devido aos resultados de pesquisas anteriores, nas quais foram utilizados inoculantes produzidos com estirpes de baixa estabilidade genética (LOPES, 2007). Até 1990, as estirpes recomendadas apresentavam alta instabilidade genética e baixa tolerância à acidez, à temperatura elevada e baixa capacidade de nodular em presença de N (LOPES, 2007). Com a descoberta de *Rhizobium tropici* (MARTINEZ-ROMERO et al., 1991) e com a seleção de estirpes mais eficientes, atualmente recomendadas, vem-se acumulando resultados experimentais positivos com a inoculação (LOPES, 2007).

## **2.2 Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal**

Outro grupo de microrganismos benéficos é representado por bactérias associativas capazes de promover o crescimento das plantas por meio de vários processos, incluindo a produção de hormônios de crescimento (como auxinas, giberelinas, citocininas e etileno), a indução de resistência sistêmica a doenças e estresses ambientais, a capacidade de solubilizar fosfato e, também, de realizar FBN (HUNGRIA et al., 2013).

Esses organismos são também chamados de bactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPB – plant growth promoting bacteria) (GALVÃO et al., 2010). As PGPBs são consideradas biofertilizantes, quando promovem o crescimento vegetal especificamente através do aumento da disponibilidade de nutrientes ou do acesso a eles pela planta, pelo do incremento da área superficial da raiz (SOMERS et al., 2004; GALVÃO et al., 2010).

Incluem-se nesse grupo várias bactérias de diversos gêneros e espécies que vivem na rizosfera de gramíneas sem formar nódulos, proporcionando benefícios para a planta através da fixação do N, produção de fitohormônios que estimulam o enraizamento, aumento da colonização micorrízica e aumento na eficiência de absorção de nutrientes e, conseqüentemente, na produtividade. Espécies desse grupo ocorrem na rizosfera, filosfera e mesmo no interior dos tecidos das plantas (endofíticas) (LOPES, 2007). Dentre essas bactérias, destacam-se as pertencentes ao gênero *Azospirillum*, utilizadas mundialmente como inoculantes (HUNGRIA et al., 2013).

O gênero *Azospirillum* inclui atualmente seis espécies descritas, mas apenas 5 são fixadoras de nitrogênio (REIS et al., 2005). As duas espécies primeiramente classificadas na década de 70 são as mais estudadas, sendo *A. brasilense* a que acumula o maior número de publicações durante essas últimas 3 décadas e pode ser considerada como o modelo de estudo nessa área de pesquisa (REIS et al., 2005). Bactérias desse gênero têm sido encontradas em associação com plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas, sendo por isso consideradas

ubíquas (REIS et al., 2005). As espécies *A. lipoferum* e *A. brasilense* são as mais frequentemente encontradas colonizando a maioria das plantas de regiões tropicais e temperadas, sendo a maioria dos isolados obtidos de plantas de maior interesse agrônomo como milho, arroz, sorgo e trigo (REIS et al., 2005).

O gênero *Azospirillum* compreende seis espécies, *A. brasilense* e *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens*, *A. irakense* e *A. largimobile*, caracterizadas com base na análise fenotípica e genotípica (homologia DNA:DNA e sequência da rRNA 16S) (REIS et al., 2005). O sequenciamento da rRNA 16S mostrou a formação de dois grupos distintos: o primeiro subgrupo é formado pelas espécies *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. halopraeferens*, *A. largimobile*, e as duas primeiras espécies apresentam um alto grau de similaridade genética; o outro subgrupo é formado pelas espécies *A. amazonense* e *A. irakense* (REIS et al., 2005). Entretanto, por não apresentarem características genéticas divergentes que justifiquem a criação de novo gênero, os mesmos continuam a fazer parte do gênero *Azospirillum* (DEKHIL et al., 1997; REIS et al., 2005).

### 2.3 Co-inoculação de Rizóbio e Bactérias Promotoras de Crescimento

Considerando-se os efeitos promovidos pelas bactérias em questão e vislumbrando-se as perspectivas que sua aplicação poderia agregar em termos de crescimento das plantas, iniciaram-se o desenvolvimento de trabalhos com o objetivo de combinar diferentes microrganismos, mais especificamente as bactérias promotoras de crescimento vegetal e rizóbios, de forma a avaliar as respostas das plantas em termos de desenvolvimento vegetativo, resistência a condições de estresse e produção.

A técnica alternativa de co-inoculação ou também denominada de inoculação mista consiste na utilização de combinações de diferentes microrganismos, aos quais produzem um efeito sinérgico, em que se superam os resultados produtivos obtidos com os mesmos, quando utilizados na forma isolada (BÁRBARO et al., 2008).

Li & Alexander (1988) conseguiram incrementar a colonização e a nodulação de soja, por meio de co-inoculação de *Bradyrhizobium diazoefficiens* com bactérias do gênero *Bacillus*, produtoras de antibióticos (FIGUEIREDO et al., 2010). Outros relatos demonstram efeitos positivos na nodulação pela co-inoculação de rizóbio com outras espécies de bactérias (FIGUEIREDO et al., 2007; SILVA et al., 2007; FIGUEIREDO et al., 2010). Essa contribuição foi relacionada com a produção de fitohormônios, pectinase ou sinais moleculares em *Bacillus cereus* e outras espécies de microrganismos (FIGUEIREDO et al., 2010).

Molla et al. (2001), estudando a promoção de crescimento das raízes e nodulação da soja sob co-inoculação de *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* em condições de laboratório, observaram aumento significativo nos seguintes fatores: crescimento do sistema radicular, desenvolvimento dos pelos radiculares e elevação do número e peso de nódulos.

Em trabalho conduzido pela co-inoculação de *Bradyrhizobium diazoefficiens* e *Rhizobium tropici* com *Azospirillum brasilense*, Hungria et al. (2013) obtiveram resultados satisfatórios em termos de aumento da produção para as culturas da soja e feijão. Considerando as principais limitações atuais e potenciais da FBN com a soja e os benefícios atribuídos a diversas culturas pela inoculação com *Azospirillum*, deduz-se que a co-inoculação com ambos organismos pode melhorar o desempenho das culturas, em uma abordagem que respeita as demandas atuais de sustentabilidade agrícola, econômica, social e ambiental (HUNGRIA et al., 2013).

## 2.4 Adubação Nitrogenada e Inoculação de Leguminosas

A aplicação de N mineral nos solos tropicais pode resultar às vezes, em baixa frequência de resposta pela cultura do feijão (ALMEIDA et al., 2000). O aproveitamento do nitrogênio usado no adubo é normalmente inferior a 50%, podendo em solos arenosos, atingir entre 5 a 10 %, devido a grandes perdas por lixiviação ou desnitrificação (ALMEIDA et al., 2000).

Nesse contexto, o manejo adequado da adubação nitrogenada representa uma das principais dificuldades da cultura do feijoeiro, visto que a aplicação de doses excessivas de N, além de aumentar o custo econômico, pode promover sérios riscos ao ambiente, e a sua utilização em quantidade insuficiente pode limitar o seu potencial produtivo, mesmo que outros fatores de produção sejam otimizados (SANTOS et al., 2003; PELEGRIN et al., 2009). No entanto, o feijoeiro, sendo uma leguminosa, apresenta condições de se beneficiar da associação simbiótica com *Rhizobium*, o que contribui significativamente para a economia de nitrogênio (BASSAN et al., 2001), sendo possível que essa cultura se beneficie, em condições de campo, do processo de fixação biológica de N<sub>2</sub>, podendo alcançar produtividade acima de 2.500 kg ha<sup>-1</sup> (HUNGRIA et al., 2000).

O nitrogênio é um nutriente cuja presença ou ausência afeta a simbiose de várias formas (PEREIRA, 1982; FERREIRA et al., 2000). Pequenas quantidades de nitrogênio aplicadas ao solo permitem um aumento no crescimento dos nódulos e maior fixação do nitrogênio, sendo que níveis muito baixos de nitrato no solo podem ser limitantes à atividade simbiótica (ROSOLEM, 1987; BASSAN et al., 2001). A adição de elevados teores de nitrogênio afeta inicialmente o número e peso de nódulos, mas não inibe o seu desenvolvimento e a fixação simbiótica de nitrogênio (RUSCHEL & RUSCHEL, 1975; RUSCHEL & SAITO, 1977; BASSAN et al., 2001).

Diversos trabalhos foram conduzidos com o objetivo de avaliar-se a efetividade da associação entre a inoculação do feijoeiro com rizóbio e a adubação nitrogenada mineral. No princípio das pesquisas do tema em questão, Franco e Döbereiner (1967), em experimento conduzido sob condições de casa de vegetação com a finalidade de estudar a especificidade hospedeira na simbiose de estirpes de *Rhizobium phaseoli* com variedades de *Phaseolus vulgaris* sob a influência de vários nutrientes, já indicavam com seus resultados que algumas variedades nodulavam mesmo sob adubação nitrogenada e que as mesmas poderiam fixar nitrogênio, aumento a acumulação de N total nas plantas.

Em trabalho conduzido por Pelegrin et al. (2009), onde avaliou-se a resposta do feijoeiro à inoculação com rizóbio associada à aplicação de N mineral, a adubação com 20 kg ha<sup>-1</sup> de N acrescida de inoculante com a estirpe de *R. tropici* CIAT 899 possibilitou a obtenção de rendimento de grãos na cultura de feijoeiro equivalente à aplicação de até 160 kg ha<sup>-1</sup> de N. No tocante ao aspecto econômico, os resultados obtidos no ensaio em questão indicaram que a inoculação de rizóbio, acrescida da adubação com 20 kg ha<sup>-1</sup> de N no plantio, propiciou acréscimo de receita líquida semelhante à aplicação de 160 kg ha<sup>-1</sup> de N e superior ao tratamento com a adubação de 20 kg ha<sup>-1</sup> de N, sem o uso do inoculante, evidenciando a sua importância para obtenção de maior rentabilidade na cultura do feijoeiro.

Segundo Bassan et al. (2001), para níveis de produtividade superiores deve-se utilizar adubação com N mineral em cobertura, que deve ser feita no início do florescimento, para dar o tempo para estabelecimento da simbiose.

### **3      CAPÍTULO I**

## **CO-INOCULAÇÃO DE RIZÓBIO E BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL EM SEMENTES DE FEJJOEIRO COMUM**



### 3.1 RESUMO

O trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito da co-inoculação de *Rhizobium* e estirpes de bactérias promotoras de crescimento vegetal sobre o crescimento e nodulação do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), assim como a compatibilidade entre as bactérias. Conduziram-se um ensaio em ambiente laboratorial e dois experimentos em casa de vegetação, na Embrapa Agrobiologia, em Seropédica, RJ. O ensaio laboratorial, em placas de Petri, teve delineamento fatorial 2x3x2 com quatro repetições, composto por duas bactérias promotoras de crescimento (*Azospirillum amazonense* e *A. brasilense*), co-inoculadas com *Rhizobium tropici*, três doses de aplicação ( $10^4$ ,  $10^6$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) e dois meios de cultura (DYGS e NFB). Foi avaliada a presença de halo de inibição a partir da colônia antagonista. *A. amazonense* e *A. brasilense* não apresentaram ação antagonista a *R. tropici*, podendo ser inoculados de forma conjunta. O experimento em vasos de Leonard teve delineamento completamente casualizado com oito repetições, em fatorial 5x3 composto por cinco bactérias (*Bradyrhizobium diazoefficiens*, *B. elkanii*, *Azospirillum amazonense*, *A. brasilense* e *Escherichia coli*), em três doses de aplicação ( $10^4$ ,  $10^6$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>), todas co-inoculadas com *Rhizobium tropici*, acrescidos de três tratamentos adicionais (testemunha absoluta, testemunha nitrogenada, e inoculação apenas com *R. tropici*). As plantas foram coletadas aos 35 dias após a semeadura, sendo determinado o teor de N na parte aérea. A co-inoculação de *R. tropici* com *B. diazoefficiens* ( $10^8$  e  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>), *B. elkanii* ( $10^8$ ,  $10^6$  e  $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>), *A. amazonense* ( $10^8$ ,  $10^6$  e  $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>), *A. brasilense* ( $10^8$ ,  $10^6$  e  $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>) e *E. coli* ( $10^8$  e  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>), aumentou o número de nódulos; por sua vez, *A. amazonense* ( $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>) aumentou a massa de nódulos, indicando o potencial da co-inoculação para a elevação da nodulação. O teor e conteúdo de N na parte aérea foram aumentados pela dupla inoculação. As estirpes co-inoculadas *B. diazoefficiens* ( $10^8$ ,  $10^6$  e  $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>), *B. elkanii* ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>), *A. amazonense* ( $10^8$  e  $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>), *A. brasilense* ( $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>) e *E. coli* ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) elevaram o conteúdo de N na parte aérea em relação à testemunha inoculada com *R. tropici*. O experimento em vasos com solo teve delineamento em blocos ao acaso com quatro repetições, em fatorial 3x2 composto por três bactérias (*B. diazoefficiens*, *B. elkanii* e *A. brasilense*), co-inoculadas com *R. tropici*, e duas doses de aplicação ( $10^4$  e  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>), acrescidos de quatro tratamentos adicionais (testemunha nitrogenada, testemunha absoluta, inoculação com *R. tropici* e inoculação com o produto comercial AZOTOTAL<sup>®</sup>). A inoculação de *A. brasilense* aumentou a produção de folhas e de parte aérea na dose  $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup> e de caule na dose  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>. Concluiu-se que a co-inoculação, em condição estéril, aumentou a nodulação, teor e conteúdo de N parte aérea, enquanto em vasos com solo, a inoculação com *A. brasilense* associada à adubação nitrogenada aumentou a massa de parte aérea.

**Palavras-chave:** *Phaseolus vulgaris*. Co-inoculação. Biomassa.

### 3.2 ABSTRACT

This work aimed to assess the effect of co-inoculation of *Rhizobium* strains and plant growth promoting bacteria on the nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), as well as the compatibility between these bacteria. An assay in laboratory environment and two greenhouse experiments were conducted at Embrapa Agrobiologia - Seropédica, RJ. The laboratory assay in Petri dishes had a 2x3x2 factorial with four replications, consisting of two growth promoting bacteria (*Azospirillum amazonense* and *A. brasilense*), co-inoculated with *Rhizobium tropici*, three application rates ( $10^4$ ,  $10^6$  and  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>), and two culture media (DYGS and NFB). The presence of inhibition zone from the antagonistic colony was evaluated. *A. amazonense* and *A. brasilense* showed no antagonistic action with *Rhizobium tropici* and may be inoculated together. The experiment in Leonard jars had completely randomized design with eight replications in 5x3 factorial, consisting of five bacteria (*Bradyrhizobium diazoefficiens*, *B. elkanii*, *Azospirillum amazonense*, *A. brasilense* and *Escherichia coli*) in three application rates ( $10^4$ ,  $10^6$  and  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>), all co-inoculated with *Rhizobium tropici*, plus three additional control treatments (absolute, nitrogen and inoculation only with *R. tropici*). The plants were collected at 35 days after sowing, and N content determined in the shoot. Co-inoculation with *Rhizobium tropici*, *Bradyrhizobium diazoefficiens* ( $10^8$  and  $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup>), *B. elkanii* ( $10^8$ ,  $10^6$  and  $10^4$  CFU mL<sup>-1</sup>), *Azospirillum amazonense* ( $10^8$ ,  $10^6$  and  $10^4$  CFU mL<sup>-1</sup>), *A. brasilense* ( $10^8$ ,  $10^6$  and  $10^4$  CFU mL<sup>-1</sup>) and *Escherichia coli* ( $10^8$  and  $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup>) increased the number of nodules, while *Azospirillum amazonense* ( $10^4$  CFU mL<sup>-1</sup>) increased the mass of nodules, indicating the potential of co-inoculation to increase nodulation. Inoculation with *B. diazoefficiens* ( $10^8$ ,  $10^6$  and  $10^4$  CFU mL<sup>-1</sup>), *B. elkanii* ( $10^8$ ,  $10^6$  and  $10^4$  CFU mL<sup>-1</sup>), *A. amazonense* and *B. diazoefficiens* ( $10^8$  and  $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup>) and *E. coli* ( $10^8$  and  $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup>) increased the N content in the shoot, and *B. diazoefficiens* ( $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup>) provided superior values to the N control. The experiment in pots with soil had randomized block design with four replications in 3x2 factorial consisting of three bacteria (*Bradyrhizobium diazoefficiens*, *B. elkanii* and *Azospirillum brasilense*), co-inoculated with *Rhizobium tropici*, and two application levels ( $10^4$  and  $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup>), plus four additional control treatments (absolute control, nitrogen, inoculation with *Rhizobium tropici* and inoculation with the commercial product AZOTOTAL®). Inoculation of *A. brasilense* increased the production of leaves and shoots at level  $10^4$  CFU mL<sup>-1</sup> and stem at level  $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup>. It is concluded that the co-inoculation in sterile condition increased nodulation, and N content of shoot, whereas in pots with soil, co-inoculation with *A. brasilense* associated with N fertilization increased the mass of shoot.

**Keywords:** *Phaseolus vulgaris*. Co-inoculation. Biomass.

### 3.3 INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) é capaz de associar-se simbioticamente a bactérias conhecidas como rizóbios, que utilizam como fonte de nitrogênio o N<sub>2</sub> atmosférico, convertendo-o em amônia através da enzima nitrogenase e disponibilizando-o às plantas. Esse processo biológico ocorre em estruturas típicas e altamente específicas, os nódulos, que são formados após o estabelecimento da simbiose entre o microssimbionte e a planta hospedeira (BRANDÃO JÚNIOR et al., 2000). Ainda nos nódulos, a amônia sintetizada são rapidamente incorporados íons hidrogênio (H<sup>+</sup>), ocorrendo a transformação em íons amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) que são distribuídos para a planta hospedeira e incorporados em diversas formas de N orgânico, como os ureídios, aminoácidos e amidas (HUNGRIA et al., 2001), sendo esse processo denominado fixação biológica de nitrogênio (FBN).

O emprego de estirpes bacterianas eficientes para FBN, quando em simbiose com o feijoeiro, tem sido considerado como uma tecnologia favorável ao desenvolvimento vegetativo das plantas e ao incremento na produção de grãos. Uma das atuais referências para inoculação da cultura no Brasil, a estirpe CIAT 899 de *Rhizobium tropici*, foi descrita pela primeira vez por Martinez-Romero et al. (1991) e, desde então, vem sendo testada, em diferentes condições edafoclimáticas e de manejo, quanto à sua capacidade de fornecer N e atender a demanda deste nutriente pela cultura do feijoeiro. Esta estirpe é relatada como sendo geneticamente mais estável que outras estirpes de rizóbio, além de mais tolerante a estresses como temperaturas elevadas e acidez do meio, sendo mais adaptada às condições de solos tropicais (GRAHAM, 1992; SOARES et al., 2006).

Assim como as pertencentes ao gênero *Rhizobium*, novas bactérias têm sido testadas não apenas quanto à sua capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, mas também em relação à promoção de crescimento das culturas. As chamadas bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPBs, ou plant growth promoting bacteria), quando inoculadas, podem contribuir para o crescimento das plantas de diversas maneiras: induzindo a resistência das plantas a doenças e estresses (WANG et al., 2009); promovendo melhorias na nutrição vegetal, fornecendo nutrientes específicos para as plantas, principalmente fósforo e ferro, através da solubilização de fosfatos inorgânicos e da produção de sideróforos (GLICK et al., 1999; PODILE & KISHERE, 2006; GALVÃO et al., 2010); produzindo hormônios vegetais ou reguladores do crescimento vegetal como o ácido indol-acético, giberelinas e citocininas (CATTELAN, 1999; SILVA et al., 2006) e melhorando a nodulação e a fixação de nitrogênio, por afetar interações entre plantas e rizóbios (STAJKOVIĆ et al., 2011).

Os resultados adicionais próprios da inoculação de PGPBs, quando associados à aplicação de inoculantes rizobianos, possibilitam otimizar o desenvolvimento da cultura pela somatória de seus efeitos à fixação biológica de nitrogênio, sendo esta técnica denominada de co-inoculação. Resultados de estudos recentes têm demonstrando que a co-inoculação de *Rhizobium* e PGPBs em diversas leguminosas de interesse agrícola resulta em maior crescimento e produção. Na cultura do feijoeiro pode proporcionar, comparativamente às plantas inoculadas apenas com *Rhizobium*: aumento na nodulação (HUNGRIA et al., 2013); elevação do crescimento e conteúdo de N e P (STAJKOVIĆ et al., 2011), aumento na quantidade de N fixado e no rendimento de grãos (REMANS et al., 2008).

Resultados positivos decorrentes da utilização de bactérias do gênero *Azospirillum* como promotores de crescimento têm sido amplamente documentados na literatura. A co-inoculação de *Azospirillum* com *Bradyrhizobium* em soja melhorou a iniciação nodular e o desenvolvimento da planta (MOLLA et al., 2001), assim como em feijoeiro com *Rhizobium*, aumentando a nodulação, a fixação de nitrogênio (BURDMAN et al., 1997) e o rendimento da

cultura (REMANS et al., 2008). Não obstante a possibilidade de associação entre os diferentes grupos de bactérias, os estudos efetuados têm-se geralmente limitado à *Azospirillum brasilense*. Também inexistentes são as informações inerentes ao emprego de espécies do gênero *Bradyrhizobium* como promotoras de crescimento, sendo seu uso no Brasil restrito, até este momento, como inoculante rizobiano.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a compatibilidade entre *Rhizobium tropici* e bactérias promotoras de crescimento vegetal, e a eficácia de sua co-inoculação para a nodulação, o acúmulo de biomassa e de N do feijoeiro comum.

### 3.4 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.4.1 Ensaio em placas

O teste de antagonismo de *Rhizobium tropici* à *Azospirillum amazonense* e *Azospirillum brasilense* foi realizado pelo método da camada dupla de ágar com 3 pontos equidistantes. As estirpes utilizadas foram CIAT 899 (BR322) de *Rhizobium tropici*, BR 11.833 de *Azospirillum amazonense* e Sp 245 (BR 11.005) de *Azospirillum brasilense*, pertencentes à Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia.

O ensaio seguiu o delineamento completamente casualizado, com quatro repetições, em esquema fatorial 2x2x3, totalizando 48 placas de Petri, combinando-se dois meios de cultura (DYGS e NFB), duas bactérias promotoras de crescimento vegetal (*A. amazonense* e *A. brasilense*) e três doses de aplicação das mesmas ( $10^4$ ,  $10^6$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>).

Os tratamentos oriundos da combinação dos níveis desses fatores foram: T1 - *R. tropici* e *A. amazonense* ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>); T2 - *R. tropici* e *A. amazonense* ( $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>); T3 - *R. tropici* e *A. amazonense* ( $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>); T4 - *R. tropici* e *A. brasilense* ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>); T5 - *R. tropici* e *A. brasilense* ( $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>) e T6 - *R. tropici* e *A. brasilense* ( $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>).

As PGPBs foram crescidas em meio DYGS líquido (Döbereiner et al., 1999) com pH 6,8, para *A. brasilense*, e pH 6,0 para *A. amazonense*, sob agitação e, após 72 horas, semeadas individualmente nas placas de Petri, vertidas com 10 mL de meio de cultura DYGS ou NFB, em três pontos de 0,5 mm de diâmetro equidistantes. Em seguida foram incubadas por 48 horas em estufa a 27 °C.

Abertas e invertidas, as tampas das placas de Petri receberam 5 mL de clorofórmio, sendo posteriormente fechadas, permitindo a inativação bacteriana pela exposição das colônias aos vapores de clorofórmio por um período de 1 hora.

Em seguida, verteu-se uma sobrecamada de 15 mL de meio de cultura TY sólido (DÖBEREINER et al., 1999) em estado fundente (50 °C) contendo uma suspensão de *Rhizobium tropici* (CIAT 899) na concentração de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Posteriormente, as placas foram reincubadas por 48 horas em estufa a 27 °C.

A presença ou ausência de halo de inibição a partir da colônia antagônica foi avaliada no segundo dia após a reincubação.

#### 3.4.2 Experimento em vasos de Leonard

Um experimento em vasos de Leonard foi montado no delineamento experimental de blocos ao acaso, em esquema fatorial 5x3+3, totalizando 18 tratamentos, com oito repetições cada. Os fatores avaliados foram a estirpe de bactéria e dose de aplicação. Além disso, o experimento foi acrescido de três tratamentos adicionais que consistiram na testemunha nitrogenada, testemunha inoculada com *R. tropici* (CIAT 899) e testemunha absoluta. O fator estirpe foi dividido em 5 níveis, a saber as estirpes USDA 110, BR 29, BR 11.833, Sp 245 e K12 de *Bradyrhizobium diazoefficiens*, *B. elkanii*, *A. amazonense*, *A. brasilense* e *E. coli*, respectivamente, todas co-inoculadas com a CIAT 899. O fator dose de aplicação foi dividido em três níveis, a saber, as doses de  $10^4$ ,  $10^6$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>.

Os tratamentos consistiram em: T1 - co-inoculação de *R. tropici* e *B. diazoefficiens* ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>); T2 - co-inoculação de *R. tropici* e *B. diazoefficiens* ( $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>); T3 - co-inoculação de *R. tropici* e *B. diazoefficiens* ( $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>); T4 - co-inoculação de *R. tropici* e *Bradyrhizobium elkanii* ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>); T5 - co-inoculação de *R. tropici* e *B. elkanii* ( $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>); T6 - co-inoculação de *R. tropici* e *B. elkanii* ( $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>); T7 - co-inoculação de *R. tropici* e *Azospirillum amazonense* ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>); T8 - co-inoculação de *R. tropici* e *A. amazonense* ( $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>); T9 - co-inoculação de *R. tropici* e *A. amazonense* ( $10^4$  UFC

mL<sup>-1</sup>); T10 - co-inoculação de *R. tropici* e *Azospirillum brasilense* (10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>); T11 - co-inoculação de *R. tropici* e *A. brasilense* (10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup>); T12 - co-inoculação de *R. tropici* e *A. brasilense* (10<sup>4</sup> UFC mL<sup>-1</sup>); T13 - co-inoculação de *R. tropici* e *Escherichia coli* (10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>); T14 - co-inoculação de *R. tropici* e *E. coli* (10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup>); T15 - co-inoculação de *R. tropici* e *E. coli* (10<sup>4</sup> UFC mL<sup>-1</sup>); T16 - testemunha nitrogenada; T17 - testemunha inoculada com *R. tropici* e T18 - testemunha absoluta.

O experimento em vasos de Leonard foi conduzido em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia, entre novembro e dezembro de 2014, em conformidade às exigências do Protocolo Oficial para Avaliação da Viabilidade e Eficiência Agronômica de Cepas, Inoculantes e Tecnologias Relacionados ao Processo de Fixação Biológica do Nitrogênio em Leguminosas (BRASIL, 2011).

A estirpe de rizóbio utilizada foi CIAT 899 (BR 322) de *Rhizobium tropici* pertencente à Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia. A estirpe foi crescida em meio TY líquido (Döbereiner et al., 1999) por três dias sob agitação. Após o crescimento, as células foram centrifugadas a 4.000 g, por 10 min., e lavadas duas vezes em solução de 0,55% NaCl. A densidade ótica (DO) dos inóculos foi ajustada para 1.0 em espectrofotômetro, a 600 nm, de modo a adequar a concentração de células para 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> conforme determinado em ensaios prévios de contagem em placas.

As estirpes de bactérias promotoras de crescimento utilizadas foram: USDA 110 (SEMIA 5080, BR 116) de *Bradyrhizobium diazoefficiens*, BR 29 (SEMIA 5019), de *Bradyrhizobium elkanii*, BR 11.833, de *Azospirillum amazonense*, Sp 245 (BR 11.005), de *Azospirillum brasilense* e K 12, de *Escherichia coli*, pertencentes à Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia. As estirpes de *Bradyrhizobium* foram crescidas em meio TY (Döbereiner et al., 1999) por três dias sob agitação; *Azospirillum* BR 11.833 e Sp 245 em meio DYGS (Döbereiner et al., 1999), respectivamente, com pH 6,0 e 6,8, por 4 dias sob agitação; e a *Escherichia coli* em meio LB (Döbereiner et al., 1999) por 2 dias sob agitação. O procedimento de lavagem e ajuste da densidade ótica foi o mesmo aplicado para a estirpe CIAT 899. As concentrações correspondentes a 10<sup>6</sup> e 10<sup>4</sup> UFC mL<sup>-1</sup> foram obtidas através de diluição do meio em concentração equivalente a 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> em solução salina (0,55% NaCl).

A cultivar de feijoeiro utilizada foi a Pérola. As sementes foram desinfetadas por 30 segundos em álcool 96° e 2 minutos em peróxido de hidrogênio (30%), seguidos por dez lavagens em água destilada autoclavada.

Para cada vaso de Leonard, foram utilizados 1,5 kg de substrato, com areia lavada e vermiculita (2:1 v:v). Os vasos foram esterilizados em autoclave por 2 horas à temperatura de 121 °C, por dois dias consecutivos. Os vasos foram dispostos em bancadas na casa de vegetação sob condições estéreis. Semearam-se quatro sementes por vaso, desbastando-se posteriormente para duas plantas aos 5 dias após a germinação. Cada semente recebeu 1 mL de inóculo da(s) bactéria(s) no momento do plantio, cobrindo-se então com uma camada de 1 cm de areia esterilizada.

Os vasos receberam, semanalmente, 400 mL de solução nutritiva de Norris (NORRIS & T'MANNETJE, 1964) isenta de nitrogênio, com exceção da testemunha nitrogenada, que recebeu dosagens crescentes equivalentes a 10, 15, e 20 mg de N planta<sup>-1</sup>, na forma de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, na primeira, segunda e subseqüentes semanas após o plantio.

As plantas foram coletadas 35 dias após a semeadura. O sistema radicular foi lavado e recuperado juntamente aos nódulos desprendidos com auxílio de peneira de malha de 2 mm; ambos foram posteriormente acondicionados em frascos de vidro hermeticamente fechados e reservados em geladeira, sendo destacados e contados.

A parte aérea e as raízes foram acondicionadas separadamente em sacos de papel, postas a secar em estufa de circulação forçada a 65 °C até atingirem massa constante e

pesadas para determinação do peso de matéria seca. As amostras da parte aérea foram posteriormente moídas e submetidas à digestão sulfúrica para a determinação dos teores de N pelo método semimicro Kjeldahl, segundo Malavolta et al. (1997); o conteúdo de N foi obtido pelo produto entre a biomassa e o teor de N. Os nódulos foram secos em estufa de circulação forçada a 65 °C até atingirem peso constante para a determinação da massa seca.

Alguns nódulos foram coletados para estudo através de microscopia de luz. Três amostras de nódulos de cada tratamento foram retiradas das plantas 34 dias após a semeadura, e fixadas com solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 50 mM, pH 7,0, por 24 horas a 4 °C em geladeira. As amostras foram lavadas por quatro vezes em tampão fosfato e desidratadas em série alcoólica, sendo passadas por 15 minutos em soluções crescentes de álcool etílico e água destilada (15%, 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100%). Em seguida, foram colocadas em cápsula de gelatina e imersas em resina acrílica LR White por 24 horas em ambiente hermético com vácuo, seguido de polimerização a 60°C por 18 horas. O material foi seccionado em micrótomo e corado com azul de toluidina em lâminas histológicas, sendo visualizado e fotografado em microscópio ótico.



**Figura 1.** Visão geral do experimento em vasos de Leonard. Fonte: Rennan Bastos (2014).

### 3.4.3 Experimento em vasos com solo

Um experimento em vasos com solo não estéril foi montado no delineamento de blocos casualizados, no esquema fatorial 3x2x2+4, totalizando 16 tratamentos com quatro repetições cada. Os fatores foram a estirpe de bactéria (USDA 110, BR 29 e Sp 245), a dose aplicada ( $10^4$  e  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>) e a fonte de N (*R. tropici* CIAT 899 e N mineral). Além disso, foram incluídos 4 tratamentos adicionais, a saber: testemunha absoluta, testemunha nitrogenada, testemunha inoculada com *R. tropici* e testemunha de co-inoculação de *R. tropici* com o produto comercial AZOTOTAL<sup>®</sup>.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia, no período compreendido entre os meses de julho a agosto de 2014, em conformidade às

exigências do Protocolo Oficial para Avaliação da Viabilidade e Eficiência Agronômica de Cepas, Inoculantes e Tecnologias Relacionados ao Processo de Fixação Biológica do Nitrogênio em Leguminosas (BRASIL, 2011).

O ensaio foi conduzido em vasos com solo, o substrato proveio do horizonte A de um Argissolo Vermelho Amarelo oriundo da área experimental da Embrapa Agrobiologia, peneirado em malha de 4 mm. A análise química de fertilidade do solo foi realizada segundo a metodologia descrita pela Embrapa (1997) no Laboratório de Química Agrícola da Embrapa Agrobiologia, obtendo-se os seguintes resultados: pH de 5,6; P (Mehlich<sup>-1</sup>) de 1,92 mg L<sup>-1</sup>; Al<sup>3+</sup> de 0,08 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Ca<sup>2+</sup> de 1,98 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Mg<sup>2+</sup> de 0,87 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> e K de 26,00 mg L<sup>-1</sup>.

Em cada vaso de 4 kg foi realizada a calagem com a aplicação e posterior homogeneização de 7 g de CaCO<sub>3</sub> para a neutralização do Al<sup>3+</sup> tóxico e fornecimento de Ca<sup>2+</sup>. Quinze dias após a calagem, os vasos foram adubados com soluções de nutrientes, nas seguintes doses: 10 mg kg<sup>-1</sup> de Mg, como MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 2 mg kg<sup>-1</sup> de Cu, como CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O; 1 mg kg<sup>-1</sup> de Zn, como ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,1 mg kg<sup>-1</sup> de B, como H<sub>2</sub>BO<sub>3</sub>; 0,2 mg kg<sup>-1</sup> de Mo, como Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 1 mg kg<sup>-1</sup> de Fe, como Fe-EDTA e 80 mg kg<sup>-1</sup> de P, na forma de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Por sua vez, os vasos sob adubação nitrogenada receberam 60 mg kg<sup>-1</sup> de N, como (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Posteriormente, o solo de cada vaso foi homogeneizado. Os tratamentos co-inoculados não foram submetidos à adubação nitrogenada mineral.

O plantio foi realizado em julho de 2014; a cultivar utilizada foi a Pérola, sendo semeadas quatro sementes por vaso com posterior desbaste para duas plantas aos 7 dias após a emergência das plântulas.

Como estirpe de rizóbio, foi utilizada a CIAT 899 de *Rhizobium tropici*, registrada e recomendada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a produção de inoculantes de feijoeiro comum. As estirpes de promotores de crescimento testadas foram a SEMIA 5019 (BR 29) de *Bradyrhizobium elkanii*, SEMIA 5080 (BR 116) de *Bradyrhizobium diazoefficiens* e Sp 245 de *Azospirillum brasilense*. O preparo do inóculo foi o mesmo utilizado para o experimento em vasos de Leonard.

As sementes foram desinfestadas por imersão durante 30 segundos em álcool 96° GL e dois minutos em peróxido de hidrogênio P.A., sendo posteriormente lavadas por dez vezes em água destilada esterilizada. Foram semeadas quatro sementes desinfestadas por vaso com posterior desbaste para duas plantas aos 7 dias após a emergência das plântulas. A semeadura foi realizada em julho de 2014.

No momento do plantio, cada semente foi inoculada com 1 mL do inoculante de *R. tropici* e 1 mL da bactéria promotora de crescimento de planta nas concentrações correspondentes. Os tratamentos que receberam adubação nitrogenada não foram inoculados com rizóbio e receberam a aplicação de 1 mL dos inoculantes com bactérias promotoras de crescimento. Todas as sementes foram posteriormente cobertas com uma camada de aproximadamente 1 cm de terra.

As avaliações foram realizadas em plantas coletadas aos 45 dias após o plantio (florescimento pleno). A parte aérea e as raízes foram acondicionadas separadamente em sacos de papel, postas a secar em estufa de circulação forçada a 65 °C até atingirem massa constante e pesadas para determinação do peso de matéria seca. As amostras da parte aérea foram posteriormente moídas e submetidas à digestão sulfúrica para a determinação dos teores de N pelo método semimicro Kjeldahl, segundo Malavolta et al. (1997); o conteúdo de N foi obtido pelo produto entre a biomassa e o teor de N. Os nódulos foram secos em estufa de circulação forçada a 65 °C até atingirem peso constante para a determinação da massa seca.





**Figura 2.** Visão geral do experimento em vasos com solo. Fonte: Rennan Bastos (2014).

O sistema radicular foi lavado e recuperado juntamente aos nódulos desprendidos com auxílio de peneira de malha de 2 mm. Foi determinada a atividade da enzima nitrogenase através da técnica de redução de acetileno. Raízes e nódulos foram colocados em frascos de vidro de 250 mL hermeticamente fechados; inicialmente foram retirados 30 mL de ar com auxílio de seringa sendo, posteriormente, aplicados 30 mL de acetileno através de uma seringa de injeção. Após um período de incubação de 30 min, coletou-se uma amostra de 1 mL, sendo injetado 0,5 mL para leitura da concentração de etileno em cromatografia gasosa. Foi utilizado o cromatógrafo a gás do modelo Perkin-Elmer L Auto System e Integrador PE Nelson Modelo 1022 com Detector de Ionização de Chama (FID – Flame Ionization Detector) e coluna cromatográfica Poropak N. O padrão de etileno foi determinado, injetando-se no cromatógrafo 1,0 mL de etileno puro. Os valores de etileno produzido foram convertidos para  $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ planta}^{-1}$ , considerados como atividade da nitrogenase. A atividade específica da nitrogenase foi calculada através da razão entre a atividade da nitrogenase e a massa seca de nódulos de cada vaso.

As raízes e nódulos foram acondicionados em frascos de vidro hermeticamente fechados e reservados em geladeira para que se procedesse a contagem do número de nódulos. Os nódulos foram destacados e contados e secos em estufa de circulação forçada a 65 °C até o peso constante e pesados.

#### **3.4.4 Análise estatística**

Na análise estatística, adotou-se um esquema fatorial com tratamentos extras, procedimento descrito por Pimentel Gomes (1990), mas efetuado de forma diferente. Inicialmente, efetuou-se uma análise de todos os tratamentos como um único fator, que forneceu a soma dos quadrados total do experimento e das repetições. Depois se efetuou uma análise apenas dos tratamentos inseridos no fatorial, mas como um único fator; a diferença das somas dos quadrados de todos os tratamentos e destes tratamentos do fatorial forneceu a soma

dos quadrados dos tratamentos extras. Depois efetuou-se uma análise considerando o esquema fatorial, que forneceu as somas dos quadrados das fontes de variação do fatorial e de suas interações. Ao final, estas somas dos quadrados foram agrupadas em uma planilha de Excel, obtendo-se a soma dos quadrados do erro por diferença.

Para a apresentação dos resultados dos experimentos, foi considerado que foram usados diferentes delineamentos experimentais nos diferentes experimentos, que os efeitos das interações foram pouco significativos, e que os efeitos muito significativos ocorreram nos tratamentos extras. Sendo assim, as tabelas apresentam as médias de todos os tratamentos, em uma análise como um único fator. Quando da presença de algum efeito significativo na análise fatorial, foram apresentadas tabelas demonstrando apenas estes efeitos significativos. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% por meio do programa ASSISTAT. Os quadros sinóticos da análise de variância (com os quadrados médios e as significâncias) também foram apresentados nos Anexos, para guiar a interpretação dos resultados.

A Tabela 1 mostra um exemplo deste procedimento, para os dados de conteúdo de N na parte aérea no experimento de vasos de Leonard.

**Tabela 1.** Demonstrativo do procedimento para obtenção do quadro de análise de variância em esquema fatorial com tratamentos extras, para os dados de conteúdo de N na parte aérea no experimento de vasos de Leonard.

Análise com 18 tratamentos				
FV	GL	SQ	QM	F
Repetição	7	14,559	2,080	0,86
Tratamento	17	113,497	6,676	2,77**
Erro	119	286,577	2,408	
Total	143	414,633		
Análise com os 15 tratamentos do fatorial				
FV	GL	SQ	QM	F
Repetição	7	7,552	1,079	0,47
Tratamento	14	48,192	3,442	1,50
Erro	98	224,906	2,295	
Total	119	280,649		
Análise do fatorial 5x3				
FV	GL	SQ	QM	F
Repetição	7	7,552	1,079	0,47
Estirpe	4	27,672	6,918	3,01*
Dose	2	2,237	1,118	0,49
Est x dose	8	18,284	2,285	1,00
Erro	98	224,906	2,295	
Total	119	280,649		
Análise do fatorial 5x3 com 3 tratamentos extras				
FV	GL	SQ	QM	F
Repetição	7	14,559	2,080	0,86
Estirpe	4	27,672	6,918	2,87*
Dose	2	2,237	1,118	0,46
Est x dose	8	18,284	2,285	0,95
Trat extra	3	65,305	21,678	9,04**
Erro	119	286,577	2,408	
Total	143	414,633		

\*, \*\*: Significativo aos níveis de 5 e 1% pelo teste F.

### 3.5 RESULTADOS

#### 3.5.1 Ensaio em placas

No ensaio em placas, *Azospirillum amazonense* e *Azospirillum brasilense* não apresentaram ação antagonista a *Rhizobium tropici*, em nenhuma das doses ou meios de cultura testados (Tabela 2).

**Tabela 2.** Teste de antagonismo de *Azospirillum amazonense* e *Azospirillum brasilense* à *Rhizobium tropici* em meios de cultura DYGS e NFB, em que (-) = ausência de inibição e (+) = presença de inibição.

	<i>Azospirillum amazonense</i>		<i>Azospirillum brasilense</i>	
	DYGS	NFB	DYGS	NFB
10 <sup>4</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	-	-	-	-
10 <sup>6</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	-	-	-	-
10 <sup>8</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	-	-	-	-

#### 3.5.2. Experimento em vasos de Leonard

Os dados da Tabela 30 (no Anexo) apresentam os resultados da análise de variância dos dados de acúmulo de biomassa e conteúdo de nitrogênio na parte aérea. A ausência de efeito da repetição demonstra a correta distribuição dos blocos em função das variações do ambiente. Foram observados efeitos significativos para estirpe em relação à massa de raiz e conteúdo de N na parte aérea, dose para massa de raiz e dos tratamentos extras para todos os caracteres avaliados. A interação estirpe x dose foi significativa a 24% para massa de parte aérea.

As co-inoculações de *Rhizobium tropici* com *Bradyrhizobium diazoefficiens* (10<sup>8</sup> e 10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup>), *Bradyrhizobium elkanii* (10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>) e *Echerichia coli* (10<sup>4</sup> UFC mL<sup>-1</sup>), proporcionaram aumento de massa de parte aérea comparativamente à testemunha absoluta, de forma diferente do tratamento inoculado apenas com *R. tropici*, que não diferiu de maneira significativa dos co-inoculados ou da referida testemunha (Tabela 3).

Nos tratamentos de co-inoculação com *Azospirillum*, não houve alterações significativas com relação às testemunhas absoluta e inoculada com *R. tropici*, independente da dosagem aplicada.

Como pode ser observado na tabela 4, no desdobramento do efeito dos tratamentos sobre a massa de parte aérea dentro de cada dose, não houve diferença entre as médias dos tratamentos, assim como entre as três doses de aplicação.

**Tabela 3.** Massa seca de parte aérea, massa seca de raiz, número de nódulos, massa seca de nódulos e massa seca de 1 nódulo de feijoeiro co-inoculado com rizóbio (*Rhizobium tropici*) e bactérias promotoras de crescimento vegetal (*Bradyrhizobium diazoefficiens*, *B. elkanii*, *Azospirillum amazonense* e *A. brasilense*), sob diferentes doses de inoculante ( $10^4$ ,  $10^6$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>), 35 dias após o plantio, em vasos de Leonard.

Tratamento	Massa de parte aérea — mg planta <sup>-1</sup> —	Massa de raiz	Número de nódulos - planta <sup>-1</sup> -	Massa de nódulos - mg planta <sup>-1</sup> -	Massa de 1 nódulo - µg -
<i>Rhizo</i> + <i>B. diazoefficiens</i> ( $10^8$ )	678 b	341 ab	375 a	92 ab	260 cd
<i>Rhizo</i> + <i>B. diazoefficiens</i> ( $10^6$ )	650 b	293 ab	193 cd	62 ab	349 bc
<i>Rhizo</i> + <i>B. diazoefficiens</i> ( $10^4$ )	530 bc	282 bc	80 fg	35 bc	423 ab
<i>Rhizo</i> + <i>B. elkanii</i> ( $10^8$ )	695 b	291 ab	313 ab	73 ab	275 cd
<i>Rhizo</i> + <i>B. elkanii</i> ( $10^6$ )	511 bc	227 ef	140 de	59 ab	423 ab
<i>Rhizo</i> + <i>B. elkanii</i> ( $10^4$ )	471 bc	239 de	253 bc	65 ab	257 cd
<i>Rhizo</i> + <i>A. amazonense</i> ( $10^8$ )	545 bc	257 de	228 bc	93 ab	397 bc
<i>Rhizo</i> + <i>A. amazonense</i> ( $10^6$ )	507 bc	263 cd	135 de	79 ab	599 ab
<i>Rhizo</i> + <i>A. amazonense</i> ( $10^4$ )	585 bc	303 ab	286 ab	119 a	415 ab
<i>Rhizo</i> + <i>A. brasilense</i> ( $10^8$ )	520 bc	294 ab	291 ab	70 ab	238 de
<i>Rhizo</i> + <i>A. brasilense</i> ( $10^6$ )	504 bc	309 ab	327 ab	94 ab	288 cd
<i>Rhizo</i> + <i>A. brasilense</i> ( $10^4$ )	576 bc	296 ab	377 a	79 ab	197 de
<i>Rhizo</i> + <i>E. coli</i> ( $10^8$ )	561 bc	370 a	156 de	47 bc	317 cd
<i>Rhizo</i> + <i>E. coli</i> ( $10^6$ )	484 bc	256 de	233 bc	63 ab	287 cd
<i>Rhizo</i> + <i>E. coli</i> ( $10^4$ )	661 b	286 bc	112 ef	69 ab	659 a
Testemunha nitrogenada	913 a	345 ab	0 g	0 c	0,0 e
Testemunha - <i>R. tropici</i>	490 bc	296 ab	105 fg	50 bc	512 ab
Testemunha absoluta	389 c	206 f	0 g	0 c	0,0 e
C.V. (%)	34,47	23,36	36,31	57,73	48,28

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

A inoculação conjunta de *R. tropici* e *E. coli* resultou no maior acúmulo de massa de raízes, porém, não diferiu significativamente das co-inoculações com as demais estirpes de promotores de crescimento, da inoculação exclusiva com *R. tropici* e da testemunha nitrogenada. Não houve diferença significativa entre a maioria dos tratamentos co-inoculados e a testemunha inoculada com *R. tropici*, entretanto, as co-inoculações com *B. elkanii* ( $10^6$  e  $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>), *A. amazonense* ( $10^8$  e  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>) e *E. coli* ( $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>) apresentaram massa de raiz inferior à testemunha rizobiana. As únicas bactérias que, sob co-inoculação, não desfavoreceram o crescimento radicular independentemente da dose de aplicação, comparativamente às testemunhas supracitadas, foram *B. diazoefficiens* e *A. brasilense*.

Através do desdobramento do efeito dos tratamentos sobre a massa de raiz dentro de cada dose, observou-se que a co-inoculação com *B. elkanii* apresentou a menor média geral. Entre as doses, maiores valores foram obtidos a  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>.

**Tabela 4.** Massa de parte aérea e raiz de feijoeiro co-inoculado com rizóbio (*Rhizobium tropici*) e bactérias promotoras de crescimento vegetal (*Bradyrhizobium diazoefficiens*, *B. elkanii*, *Azospirillum amazonense* e *A. brasilense*), sob diferentes doses de inoculante ( $10^4$ ,  $10^6$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>), 35 dias após o plantio, em vasos de Leonard.

Tratamento	10 <sup>8</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	10 <sup>6</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	10 <sup>4</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	Média
Massa de parte aérea (mg planta <sup>-1</sup> )				
<i>Rhizo</i> + <i>B. diazoefficiens</i>	678	650	530	619
<i>Rhizo</i> + <i>B. elkanii</i>	695	512	471	559
<i>Rhizo</i> + <i>A. amazonense</i>	545	508	585	546
<i>Rhizo</i> + <i>A. brasilense</i>	521	504	577	534
<i>Rhizo</i> + <i>E. coli</i>	562	484	662	569
Média	600	532	565	
Massa de raiz (mg planta <sup>-1</sup> )				
<i>Rhizo</i> + <i>B. diazoefficiens</i>	342	294	283	306 a
<i>Rhizo</i> + <i>B. elkanii</i>	292	227	239	253 b
<i>Rhizo</i> + <i>A. amazonense</i>	257	264	303	275 ab
<i>Rhizo</i> + <i>A. brasilense</i>	295	310	296	300 a
<i>Rhizo</i> + <i>E. coli</i>	370	256	287	304 a
Média	311 A	270 B	282 AB	

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

Com relação à nodulação, a análise de variância (Tabela 31, em Anexo) demonstrou que houve efeito significativo das diferentes estirpes para o número de nódulos e massa unitária de nódulos. Com relação à dose, somente o número de nódulos apresentou efeito significativo. A interação envolvendo estirpe x dose foi significativa para número e massa unitária de nódulos. Foram observados efeitos significativos para os tratamentos extras em relação à massa de nódulos, número de nódulos e massa unitária de nódulos.

No tocante ao número de nódulos (Tabela 3), todos os tratamentos co-inoculados apresentaram ao menos uma dosagem significativamente superior à testemunha apenas inoculada com *Rhizobium tropici*. Apenas *B. diazoefficiens* e *E. coli*, ambos na dose equivalente a  $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>, não foram superiores à testemunha rizobiana. Os tratamentos sob co-inoculação com *B. diazoefficiens* e *B. elkanii* apresentaram resultados expressivamente maiores na dosagem mais elevada ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>), comparativamente às demais. A co-inoculação com as estirpes *A. amazonense* e *A. brasilense*, favoreceu a elevação do número de nódulos nas três dosagens ( $10^8$ ,  $10^6$  e  $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>). Para ambas, há tendência de progresso da nodulação sob doses mais baixas de aplicação. As médias dos resultados obtidos para cada tratamento co-inoculado (Tabela 3) demonstraram que a associação de *R. tropici* à *A. brasilense* proporcionou, comparativamente aos demais, a formação de maior número de nódulos; as médias das doses demonstraram que na mais elevada ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) houve maior formação de nódulos.

Contrastando com os dados relativos ao número de nódulos, os referentes à sua massa demonstraram não haver diferenças significativas entre os tratamentos sob co-inoculação de *B. diazoefficiens*, *B. elkanii*, *A. brasilense* e *E. coli* com relação à testemunha apenas inoculada com *R. tropici*, nas três doses de aplicação. Somente a co-inoculação com *A. amazonense* na dose equivalente a  $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup> foi significativamente superior à testemunha rizobiana. Observa-se, no entanto, clara tendência na elevação da massa de nódulos nos

tratamentos co-inoculados; fato evidenciado pela ausência de significância destes com relação à dupla inoculação com *A. amazonense* ( $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>). Comparando-se as médias dos tratamentos, não foram detectadas diferenças significativas entre as três doses de aplicação, assim como das co-inoculações entre si.

Com relação aos resultados encontrados para a massa de 1 nódulo, ou seja, para seu peso unitário, observa-se que a testemunha inoculada com *R. tropici* foi ou não diferente dos tratamentos co-inoculados. As inoculações conjuntas com *B. diazoefficiens* ( $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>), *B. elkanii* ( $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>), *A. amazonense* ( $10^6$  e  $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>) e *E. coli* ( $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>) não apresentaram diferença significativa com relação à testemunha rizobiana, tendo os demais tratamentos apresentado resultado inferior a esta. Sob co-inoculação com *B. diazoefficiens*, *B. elkanii*, *A. amazonense* e *E. coli*, nas doses que favoreceram a formação de menor número de nódulos, sua massa unitária foi correspondentemente maior.

Pelo desdobramento dos efeitos dos tratamentos sobre o número de nódulos (Tabela 5), observa-se que a média da co-inoculação com *A. brasilense* foi estatisticamente superior à dos demais tratamentos. Com relação à dose de aplicação,  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> foi a que proporcionou maior formação de nódulos, sendo significativamente superior às demais. Na massa unitária de nódulos, a dupla inoculação com *A. amazonense* apresentou o resultado mais elevado.

A análise de variância demonstrou diferenças significativas entre as estirpes para o conteúdo de N na parte aérea, da mesma forma que para os tratamentos extras (Tabela 30, em anexo). O teor de N na parte aérea foi superior nos tratamentos co-inoculados com *B. diazoefficiens* e *B. elkanii* com relação à testemunha inoculada apenas com *R. tropici*, nas três doses testadas (Tabela 6). Nos demais tratamentos, a aplicação das doses mais elevadas ( $10^8$  e  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>) em *A. amazonense* e *E. coli* também foram significativamente superiores à referida testemunha, contrariamente ao observado na co-inoculação com *A. brasilense*, que não diferiu da inoculação única com rizóbio. A dose  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> de *B. diazoefficiens* apresentou resultado significativamente superior à testemunha nitrogenada.

**Tabela 5.** Massa, número e massa unitária de nódulos de feijoeiro co-inoculado com rizóbio (*Rhizobium tropici*) e bactérias promotoras do crescimento vegetal (*Bradyrhizobium diazoefficiens*, *B. elkanii*, *Azospirillum amazonense* e *A. brasilense*), sob diferentes doses de inoculante ( $10^4$ ,  $10^6$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>), 35 dias após o plantio, em vasos de Leonard.

Tratamento	10 <sup>8</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	10 <sup>6</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	10 <sup>4</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	Média
Massa de nódulos (mg planta <sup>-1</sup> )				
<i>Rhizo</i> + <i>B.</i>	92	63	36	64
<i>Rhizo</i> + <i>B. elkanii</i>	74	60	66	66
<i>Rhizo</i> + <i>A. amazonense</i>	94	80	120	98
<i>Rhizo</i> + <i>A. brasilense</i>	71	95	80	82
<i>Rhizo</i> + <i>E. coli</i>	48	63	70	60
Média	76	72	74	
Número de nódulos (planta <sup>-1</sup> )				
<i>Rhizo</i> + <i>B.</i>	376 a	194 b	81 c	217 bc
<i>Rhizo</i> + <i>B. elkanii</i>	314 ab	141 b	254 b	236 b
<i>Rhizo</i> + <i>A. amazonense</i>	229 bc	136 b	287 ab	217 bc
<i>Rhizo</i> + <i>A. brasilense</i>	292 ab	327 a	378 a	332 a
<i>Rhizo</i> + <i>E. coli</i>	157 c	234 ab	113 c	168 c
Média	273 A	206 B	222 B	
Massa unitária de nódulo (mg)				
<i>Rhizo</i> + <i>B.</i>	261 a	349 b	423 b	344 abc
<i>Rhizo</i> + <i>B. elkanii</i>	276 a	423 ab	258 b	319 bc
<i>Rhizo</i> + <i>A. amazonense</i>	398 a	600 a	415 b	471 a
<i>Rhizo</i> + <i>A. brasilense</i>	239 a	288 b	198 b	242 c
<i>Rhizo</i> + <i>E. coli</i>	318 a	288 b	659 a	422 ab
Média	298	390	391	

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

**Tabela 6.** Teor e conteúdo de N na parte aérea de feijoeiro co-inoculado com rizóbio (*Rhizobium tropici*) e bactérias promotoras do crescimento vegetal (*Bradyrhizobium diazoefficiens*, *B. elkanii*, *Azospirillum amazonense* e *A. brasilense*), sob diferentes doses de inoculante ( $10^4$ ,  $10^6$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>), 35 dias após o plantio, em vasos de Leonard.

Tratamento	Teor de N na parte aérea	Conteúdo de N na parte aérea
	mg g <sup>-1</sup>	mg planta <sup>-1</sup>
<i>Rhizo</i> + <i>B. diazoefficiens</i> ( $10^8$ )	20,95 ab	14,39 ab
<i>Rhizo</i> + <i>B. diazoefficiens</i> ( $10^6$ )	22,77 a	15,48 ab
<i>Rhizo</i> + <i>B. diazoefficiens</i> ( $10^4$ )	21,95 ab	11,75 ab
<i>Rhizo</i> + <i>B. elkanii</i> ( $10^8$ )	19,41 bc	13,47 ab
<i>Rhizo</i> + <i>B. elkanii</i> ( $10^6$ )	18,81 bc	9,67 cd
<i>Rhizo</i> + <i>B. elkanii</i> ( $10^4$ )	19,10 bc	9,02 cd
<i>Rhizo</i> + <i>A. amazonense</i> ( $10^8$ )	19,28 bc	10,52 bc
<i>Rhizo</i> + <i>A. amazonense</i> ( $10^6$ )	19,03 bc	9,74 cd
<i>Rhizo</i> + <i>A. amazonense</i> ( $10^4$ )	17,43 cd	10,02 bc
<i>Rhizo</i> + <i>A. brasilense</i> ( $10^8$ )	18,02 cd	9,33 cd
<i>Rhizo</i> + <i>A. brasilense</i> ( $10^6$ )	17,82 cd	9,011 cd
<i>Rhizo</i> + <i>A. brasilense</i> ( $10^4$ )	17,56 cd	10,03 bc
<i>Rhizo</i> + <i>E. coli</i> ( $10^8$ )	18,56 bc	10,42 bc
<i>Rhizo</i> + <i>E. coli</i> ( $10^6$ )	20,05 ab	9,57 cd
<i>Rhizo</i> + <i>E. coli</i> ( $10^4$ )	18,17 cd	12,84 ab
Testemunha nitrogenada	18,52 bc	17,12 a
Testemunha - <i>R. tropici</i>	16,81 d	8,28 de
Testemunha absoluta	12,57 e	4,92 e
C.V. (%)	16,15	45,01

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

As plantas co-inoculadas com *B. diazoefficiens* acumularam quantidades significativamente superiores de N na parte aérea para as três doses aplicadas, quando comparada à testemunha inoculada com *R. tropici*, não diferindo, porém, da testemunha nitrogenada; *B. elkanni* também apresentou o mesmo comportamento, porém somente para a dose mais elevada. Ambas as espécies de *Azospirillum* apresentaram resultados superiores à testemunha inoculada com *R. tropici*, *A. amazonense* nas doses  $10^8$  e  $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup> e *A. brasilense* apenas sob  $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>. A co-inoculação com *E. coli*, por sua vez, também foi superior a única aplicação de *R. tropici*, nas dosagens  $10^8$  e  $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>. Em média, o maior



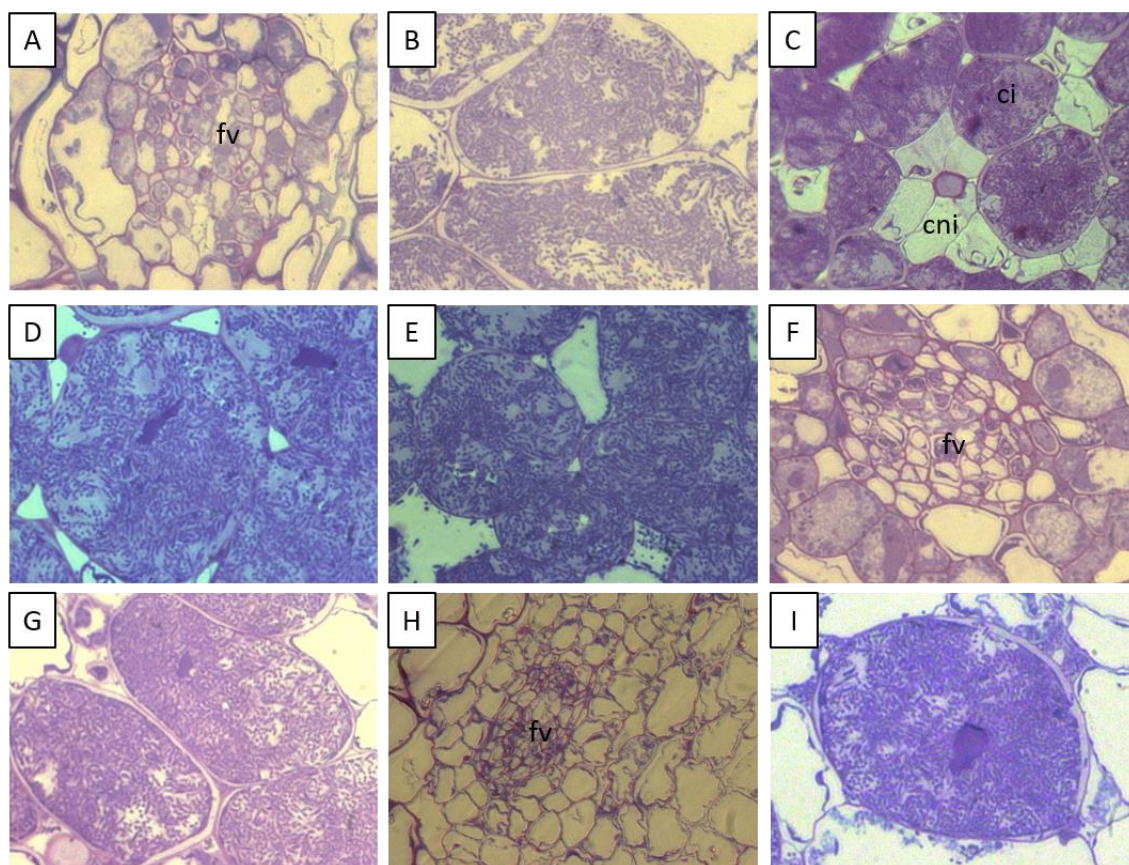
acúmulo de N na parte aérea foi alcançado pela co-inoculação com *B. diazoefficiens* (Tabela 7).

**Tabela 7.** Conteúdo de nitrogênio na parte aérea de feijoeiro co-inoculado com rizóbio (*Rhizobium tropici*) e bactérias promotoras do crescimento vegetal (*Bradyrhizobium diazoefficiens*, *B. elkanii*, *Azospirillum amazonense* e *A. brasilense*), sob diferentes doses de inoculante ( $10^4$ ,  $10^6$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>), 35 dias após o plantio, em vasos de Leonard.

Tratamento	$10^8$ UFC mL <sup>-1</sup>	$10^6$ UFC mL <sup>-1</sup>	$10^4$ UFC mL <sup>-1</sup>	Média
Conteúdo de N na parte aérea (mg planta <sup>-1</sup> )				
<i>Rhizo</i> + <i>B. diazoefficiens</i>	144	155	118	139 a
<i>Rhizo</i> + <i>B. elkanii</i>	135	97	90	107 b
<i>Rhizo</i> + <i>A. amazonense</i>	105	97	100	101 b
<i>Rhizo</i> + <i>A. brasilense</i>	93	90	100	95 b
<i>Rhizo</i> + <i>E. coli</i>	104	96	129	110 b
Média	116	107	107	

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

A microscopia ótica dos nódulos formados pela co-inoculação de *R. tropici* com *A. brasilense*, *B. diazoefficiens*, *B. elkanii* e *E. coli*, não mostrou anormalidades (Figura 3). As células infectadas pelas bactérias promotoras de crescimento vegetal não apresentaram dessemelhanças às da testemunha inoculada com *R. tropici*. Não obstante, menores quantidades de células infectadas foram observadas na co-inoculação com *E. coli*, comparativamente à testemunha inoculada com rizóbio. Também não foram observadas diferenças na estrutura dos nódulos.



**Figura 3.** Microscopia ótica de seções longitudinais de nódulos de feijoeiro com quatro semanas de idade sob co-inoculação de *R. tropici* com *A. brasilense*, *B. diazoefficiens*, *B. elkanii* e *E. coli*. (A) Feixe vascular de nódulo da testemunha inoculada com *Rhizobium tropici*. (B) Células infectadas em nódulo de testemunha inoculada com *R. tropici*. (C) e (D) Células de nódulo co-inoculado com *R. tropici* e *Bradyrhizobium diazoefficiens* (ci, células infectadas; cni, células não infectadas). (E) Células de nódulo co-inoculado com *R. tropici* e *Bradyrhizobium elkanii*. (F) Feixe vascular de nódulo co-inoculado com *R. tropici* e *B. elkanii*. (G) Células de nódulo co-inoculados com *R. tropici* e *Azospirillum brasilense*. (H) Feixe vascular de nódulo co-inoculado com *R. tropici* e *E. coli*. (I) Células de nódulo co-inoculado com *R. tropici* e *E. coli*.

### 3.5.3 Experimento em vasos com solo

Na análise de variância dos componentes de biomassa, houve interação significativa entre os fatores N mineral e dose, para conteúdo de N no caule, e entre estirpe e dose, para conteúdo de N na folha e conteúdo de N na parte aérea (Tabela 32, em Anexo). Com relação aos fatores isolados, massa de parte aérea, massa de folha, conteúdo de N na folha, conteúdo de N no caule e conteúdo de N na parte aérea foram afetados de modo significativo pelo fator N mineral e tratamentos extras, mas não apresentaram significância para os fatores estirpe e dose.

A Tabela 8 apresenta os resultados referentes à produção de biomassa de parte aérea e raiz para os tratamentos inoculados com promotores de crescimento e rizóbio ou sob associação à adubação nitrogenada mineral em condição não estéril. Em relação à massa de folhas, caule, parte aérea e raiz, não houve diferença significativa entre as co-inoculações

avaliadas em relação à testemunha inoculada apenas com rizóbio. De maneira geral, as médias dos tratamentos co-inoculados foram inferiores à da testemunha em questão.

**Tabela 8.** Massa de folhas, massa de caule, massa de parte aérea e massa de raiz de feijoeiro co-inoculado com rizóbio (*Rhizobium tropici*) e bactérias promotoras de crescimento vegetal (*Bradyrhizobium elkanii*, *B. diazoefficiens* e *Azospirillum brasilense*) nas sementes, sob diferentes doses de inoculante ( $10^4$  e  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>), 45 dias após o plantio, em vasos com solo não esterilizado.

Tratamento	Massa de	Massa de	Massa de	Massa de
	folhas	caule	parte aérea	raiz
g planta <sup>-1</sup>				
<i>Rhizo</i> + <i>B. elkanii</i> ( $10^4$ )	3,51 c	1,97 d	5,48 c	0,88 b
<i>Rhizo</i> + <i>B. diazoefficiens</i> ( $10^4$ )	4,20 c	2,25 d	6,45 c	1,29 b
<i>Rhizo</i> + <i>A. brasilense</i> ( $10^4$ )	4,06 c	2,01 d	6,07 c	1,45 b
<i>Rhizo</i> + <i>B. elkanii</i> ( $10^6$ )	4,13 c	2,02 d	6,15 c	1,17 b
<i>Rhizo</i> + <i>B. diazoefficiens</i> ( $10^6$ )	3,61 c	1,71 d	5,32 c	1,42 b
<i>Rhizo</i> + <i>A. brasilense</i> ( $10^6$ )	4,10 c	1,98 d	6,08 c	1,33 b
N + <i>B. elkanii</i> ( $10^4$ )	6,71 ab	3,25 ab	9,96 ab	4,25 a
N + <i>B. diazoefficiens</i> ( $10^4$ )	6,57 ab	3,33 ab	9,91 ab	4,35 a
N + <i>A. brasilense</i> ( $10^4$ )	7,11 a	3,81 ab	10,92 a	3,94 a
N + <i>B. elkanii</i> ( $10^6$ )	6,42 ab	3,52 ab	9,95 ab	4,26 a
N + <i>B. diazoefficiens</i> ( $10^6$ )	6,40 ab	3,03 c	9,43 ab	4,48 a
N + <i>A. brasilense</i> ( $10^6$ )	6,45 ab	3,88 a	10,33 ab	3,65 a
Testemunha nitrogenada	5,73 b	3,16 bc	8,90 b	4,11 a
Testemunha absoluta	0,30 d	0,07 e	0,37 d	0,74 b
Testemunha - <i>R. tropici</i>	4,36 c	2,08 d	6,45 c	1,57 b
Testemunha - AZOTOTAL®	4,36 c	2,38 d	6,75 c	1,40 b
C.V. (%)	12,73	17,04	12,65	29,40

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

A massa seca de folha, caule, raiz e de parte aérea foi expressivamente influenciada pela aplicação de N mineral (Tabela 8), como pode ser observado pela comparação entre os resultados expressos pelos tratamentos inoculados com PGPBs de forma associada à adubação, com relação aos co-inoculados e, especialmente, à testemunha absoluta.

A inoculação de *Azospirillum brasilense* associada à adubação nitrogenada mineral aumentou a massa de folhas na dose  $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup> e de caule na dose  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>, comparativamente à testemunha nitrogenada, apresentando incrementos em termos de massa de parte aérea equivalentes a 15,02 e 7,87%, respectivamente. No entanto, somente o tratamento inoculado na dose  $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup> apresentou resultado superior à testemunha nitrogenada para massa de folhas e massa de parte aérea.

Na análise de variância da nodulação (Tabela 33, em anexo), a interação entre os fatores estirpe e dose não foi significativa para as variáveis massa de nódulos e número de nódulos. Considerando-se os fatores de forma isolada, apenas os tratamentos extras tiveram efeito significativo para as variáveis estudadas, enquanto que os fatores estirpe e dose não resultaram efeito.

O número e massa de nódulos, importantes fatores que interferem diretamente no potencial de fixação biológica de nitrogênio, não foram alterados pela co-inoculação (Tabela 9). Em relação às plantas que receberam adubação nitrogenada mineral, observou-se que a nodulação foi insipiente.

No tocante à massa de 1 nódulo, que corresponde à relação entre seu peso e número, não se observaram diferenças significativas entre os tratamentos sob co-inoculação e as testemunhas inoculada com rizóbio e absoluta (Tabela 9).

**Tabela 9.** Número de nódulos, massa de nódulos e massa de 1 nódulo de feijoeiro co-inoculado com rizóbio (*Rhizobium tropici*) e bactérias promotoras de crescimento vegetal (*Bradyrhizobium elkanii*, *B. diazoefficiens* e *Azospirillum brasilense*) nas sementes, sob diferentes doses de inoculante ( $10^4$  e  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>), 45 dias após o plantio, em vasos com solo não esterelizado.

Tratamento	Número de nódulos - planta <sup>-1</sup> -	Massa de nódulos - mg planta <sup>-1</sup> -	Massa de 1 nódulo — µg —
<i>Rhizo</i> + <i>B. elkanii</i> ( $10^4$ )	422,00 b	300,25 b	722 ab
<i>Rhizo</i> + <i>B. diazoefficiens</i> ( $10^4$ )	528 ab	405 a	777 ab
<i>Rhizo</i> + <i>A. brasilense</i> ( $10^4$ )	484 ab	380 ab	812 ab
<i>Rhizo</i> + <i>B. elkanii</i> ( $10^6$ )	493 ab	344 ab	713 ab
<i>Rhizo</i> + <i>B. diazoefficiens</i> ( $10^6$ )	457 ab	313 b	689 ab
<i>Rhizo</i> + <i>A. brasilense</i> ( $10^6$ )	419 b	349 ab	827 ab
N + <i>B. elkanii</i> ( $10^4$ )	0,00 c	0,00 c	0,00 c
N + <i>B. diazoefficiens</i> ( $10^4$ )	0,00 c	0,00 c	0,00 c
N + <i>A. brasilense</i> ( $10^4$ )	0,00 c	0,00 c	0,00 c
N + <i>B. elkanii</i> ( $10^6$ )	0,00 c	0,00 c	0,00 c
N + <i>B. diazoefficiens</i> ( $10^6$ )	0,00 c	0,00 c	0,00 c
N + <i>A. brasilense</i> ( $10^6$ )	0,00 c	0,00 c	0,00 c
Testemunha nitrogenada	0,00 c	0,00 c	0,00 c
Testemunha absoluta	12,16 c	11,00 c	610 b
Testemunha - <i>R. tropici</i>	429 ab	375 ab	805 a
Testemunha - AZOTOTAL®	552 a	417 a	787 ab
C.V. (%)	33,02	30,76	38,16

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

Com relação às medias da massa de nódulos, detectou-se diferença significativa apenas para o tratamento co-inoculado com *B. diazoefficiens* na dose  $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup> (Tabela 10).

**Tabela 10.** Massa de nódulos de feijoeiro co-inoculado com rizóbio (*Rhizobium tropici*) e bactérias promotoras do crescimento vegetal (*Bradyrhizobium diazoefficiens*, *B. elkanii*, *Azospirillum brasilense*), sob diferentes doses de inoculante ( $10^4$  e  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>), 45 dias após o plantio, em vasos com solo não esterilizado.

Tratamento	$10^4$ UFC mL <sup>-1</sup>	$10^6$ UFC mL <sup>-1</sup>	Média
	mg planta <sup>-1</sup>		
<i>Rhizo</i> + <i>B. elkanii</i>	300 b	345 a	323
<i>Rhizo</i> + <i>B. diazoefficiens</i>	406 a	314 a	360
<i>Rhizo</i> + <i>A. brasilense</i>	381 ab	349 a	365
Média	362	336	

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

Embora tenham sido observadas respostas distintas entre os tratamentos, não houve diferença significativa da atividade de nitrogenase e nitrogenase específica (Tabela 11), devido inclusive ao elevado coeficiente de variação, que pode ser atribuído à alta heterogeneidade dos nódulos nas parcelas experimentais ou, como observaram Koch et al. (1967), Ruschel & Ruschel (1975), Ladha et al. (1986) e Pessoa et al. (2001), em função da grande variação para os resultados obtidos pela técnica de redução de acetileno.

**Tabela 11.** Atividade de nitrogenase no sistema radicular e atividade específica da nitrogenase de plantas de feijoeiro co-inoculado com rizóbio (*Rhizobium tropici*) e bactérias promotoras de crescimento vegetal (*Bradyrhizobium elkanii*, *B. diazoefficiens* e *Azospirillum brasilense*) nas sementes, sob diferentes doses de inoculante ( $10^4$  e  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>), 45 dias após o plantio, em vasos com solo não esterilizado.

Tratamento	Nitrogenase	Nitrogenase específica
	— $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ planta}^{-1}$ —	— $\mu\text{mol g n\u00f3dulo}^{-1}$ —
<i>Rhizo</i> + <i>B. elkanii</i> ( $10^4$ )	1,789	2,752
<i>Rhizo</i> + <i>B. diazoefficiens</i> ( $10^4$ )	1,800	2,190
<i>Rhizo</i> + <i>A. brasilense</i> ( $10^4$ )	2,651	2,776
<i>Rhizo</i> + <i>B. elkanii</i> ( $10^6$ )	1,041	1,696
<i>Rhizo</i> + <i>B. diazoefficiens</i> ( $10^6$ )	3,202	5,60
<i>Rhizo</i> + <i>A. brasilense</i> ( $10^6$ )	0,568	0,959
Testemunha absoluta	0,004	0,077
Testemunha – <i>R. tropici</i>	1,175	0,248
Testemunha - AZOTOTAL®	0,191	0,232
C.V. (%)	179,39	174,66

Em ambiente não estéril, o teor e conteúdo de N na folha e no caule (Tabela 12) não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos co-inoculados e a testemunha inoculada com *R. tropici*, da mesma forma que entre os tratamentos sob adubação mineral e inoculação com PGPBs em relação à testemunha nitrogenada.

No tocante ao teor de N na folha, a testemunha rizobiana e os tratamentos co-inoculados (à exceção de *A. brasilense* -  $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>), não diferiram daqueles que receberam adubação. De forma contrária, com relação ao conteúdo de N nas folhas, nenhum tratamento sob dupla inoculação com *R. tropici* e PGPBs se igualou aos que receberam N mineral.

Os resultados obtidos para o teor e conteúdo de N no caule indicaram que, de maneira geral, os tratamentos sob co-inoculação, assim como a testemunha inoculada com *R. tropici*, apresentaram médias inferiores aos que foram adubados com N mineral.

**Tabela 12.** Teor de N na parte aérea e conteúdo de N na parte aérea de feijoeiro co-inoculado com rizóbio (*Rhizobium tropici*) e bactérias promotoras de crescimento vegetal (*Bradyrhizobium elkanii*, *B. diazoefficiens* e *Azospirillum brasilense*) nas sementes, sob diferentes doses de inoculante ( $10^4$ ,  $10^6$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>), 45 dias após o plantio, em vasos com solo não estéril.

Tratamento	Teor de N	Conteúdo de N	Teor de N	Conteúdo de N
	na folha	na folha	no caule	no caule
	— mg g <sup>-1</sup> —	— mg planta <sup>-1</sup> —	— mg g <sup>-1</sup> —	— mg planta <sup>-1</sup> —
<i>Rhizo</i> + <i>B. elkanii</i> ( $10^4$ )	38,1 ab	133 bc	16,2 cd	34 c
<i>Rhizo</i> + <i>B. diazoefficiens</i> ( $10^4$ )	40,5 ab	160 bc	14,6 d	33 c
<i>Rhizo</i> + <i>A. brasilense</i> ( $10^4$ )	28,5 bc	113 c	23,1 ab	48 c
<i>Rhizo</i> + <i>B. elkanii</i> ( $10^6$ )	40,8 a	163 b	18,1 bc	353 c
<i>Rhizo</i> + <i>B. diazoefficiens</i> ( $10^6$ )	44,7 a	156 bc	17,6 bc	30 c
<i>Rhizo</i> + <i>A. brasilense</i> ( $10^6$ )	34,0 ab	138 bc	15,8 cd	32 c
N + <i>B. elkanii</i> ( $10^4$ )	38,7 ab	259 a	25,3 ab	81 b
N + <i>B. diazoefficiens</i> ( $10^4$ )	44,3 a	289 a	29,0 a	98 ab
N + <i>A. brasilense</i> ( $10^4$ )	40,3 ab	286 a	24,3 ab	93 ab
N + <i>B. elkanii</i> ( $10^6$ )	43,1 a	276 a	28,9 a	102 ab
N + <i>B. diazoefficiens</i> ( $10^6$ )	42,4 a	270 a	29,5 a	90 b
N + <i>A. brasilense</i> ( $10^6$ )	41,3 a	263 a	28,9 a	112 a
Test. nitrogenada	44,8 a	272 a	29,9 a	98 ab
Test. absoluta	24,1 c	7 d	20,0 bc	3 d
Test. - <i>R. tropici</i>	35,9 ab	153 bc	17,8 bc	39 c
Test. - AZOTOTAL®	38,4 ab	168 b	15,4 cd	37 c
C.V. (%)	18,58	15,80	21,65	22,57

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

As médias dos tratamentos demonstraram que a co-inoculação com *B. diazoefficiens* foi significativamente superior às demais para conteúdo de N na folha na dose  $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup> (Tabela 13). Na mesma dosagem, a co-inoculação com *B. elkanii* apresentou resultado inferior aos demais tratamentos para conteúdo de N na parte aérea.

**Tabela 13.** Conteúdo de nitrogênio na folha e na parte aérea de feijoeiro co-inoculado com rizóbio (*Rhizobium tropici*) e bactérias promotoras do crescimento vegetal (*Bradyrhizobium diazoefficiens*, *B. elkanii*, *Azospirillum brasilense*), sob diferentes doses de inoculante ( $10^4$  e  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>), 45 dias após o plantio, em vasos com solo não estéril.

Tratamento	$10^4$ UFC mL <sup>-1</sup>	$10^6$ UFC mL <sup>-1</sup>	Média
Conteúdo de N na folha (mg planta <sup>-1</sup> )			
<i>Rhizo</i> + <i>B. elkanii</i>	392 b	440 a	416
<i>Rhizo</i> + <i>B. diazoefficiens</i>	449 a	427 a	438
<i>Rhizo</i> + <i>A. brasilense</i>	434 ab	401 a	418
Média	425	423	
Conteúdo de N na parte aérea (mg planta <sup>-1</sup> )			
<i>Rhizo</i> + <i>B. elkanii</i>	505 b	576 a	541
<i>Rhizo</i> + <i>B. diazoefficiens</i>	580 a	547 a	564
<i>Rhizo</i> + <i>A. brasilense</i>	575 a	545 a	560
Média	553	556	

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

## 3.6 DISCUSSÃO

### 3.6.1 Ensaio em placas

Nas interações entre PGPBs e rizóbios, pode haver efeitos sinérgicos ou antagonistas (DUBEY, 1996; DEY et al., 2004). No antagonismo, um dos microrganismos diminui o crescimento do outro, geralmente pela produção de substâncias tóxicas (SOTTERO et al., 2006). Neste ensaio, observou-se que *Azospirillum amazonense* e *Azospirillum brasilense* não apresentaram ação antagonista à *Rhizobium tropici*, em nenhuma das doses avaliadas nos dois meios de cultura testados nas placas (Tabela 2). Não foram observados halos de inibição de *R. tropici* crescidos sobre as colônias dos promotores de crescimento.

Estudar efeitos antagônicos e sinérgicos, especialmente entre os chamados microrganismos benéficos, é crucial (BETHLENFALVAY et al., 1985) e ainda que os testes de antagonismo *in vitro* nem sempre apresentem o mesmo resultado *in vivo* (FREITAS & PIZZINATTO, 1991), podem ser utilizados como um indicativo da potencial interação das bactérias. A ausência de inibição apresentada neste ensaio pode indicar a possibilidade de aplicação dos gêneros bacterianos em questão simultaneamente, sem causar insucesso na co-inoculação, o que poderia facilitar o processo industrial de produção de inoculantes.

### 3.6.2 Ensaio em vasos de Leonard

Comparando os resultados de massa seca de parte aérea dentre as testemunhas inoculada com rizóbio e absoluta, não foi observada diferença significativa; diversos experimentos sob condição estéril na cultura do feijoeiro mostraram resultados semelhantes a este. Souza et al. (2011) não detectaram diferenças significativas entre a testemunha apenas inoculada com *R. tropici* (CIAT 899) e a testemunha absoluta; da mesma forma, Soares et al. (2006), testando a eficiência agrônômica de rizóbios, observaram que a estirpe CIAT 899 não fora capaz de elevar a produção de massa seca acima do encontrado no tratamento sob ausência de inoculação. O quadro em questão demonstra o potencial de aplicação da técnica de associação das estirpes de *Bradyrhizobium* a *R. tropici*, que foram capazes de incrementar a produção de massa seca de parte aérea em comparação à testemunha absoluta, especialmente na cultura do feijoeiro, onde os resultados experimentais evidenciam baixa habilidade para acréscimos em termos de biomassa quando apenas sob inoculação rizobiana.

Nos tratamentos sob co-inoculação com *Azospirillum*, não houve alterações significativas com relação às testemunhas absoluta e inoculada com *R. tropici*, tanto para estirpe quanto para doses de aplicação. Este resultado está de acordo com o encontrado por Burdman et al. (1997), que observaram inibição do crescimento do feijoeiro co-inoculado com *A. brasilense* e *R. tropici* (CIAT 899) durante a fase de pré-florescimento, em comparação com a inoculação com rizóbio sozinho. Esta inibição poderia ser causada por deformações morfológicas no desenvolvimento radicular (VOLPIN & KAPULNIK, 1994), mas também pode ser devida a uma maior atribuição de fotossintatos para o aumento do número de nódulos (BURDMAN et al., 1997). Os resultados deste experimento indicaram que, para este gênero, o potencial de elevação da massa de parte aérea é inferior ao encontrado pela co-inoculação com *Bradyrhizobium*.

Diversos trabalhos realizados com isolados de *B. diazoefficiens* sob inoculação em feijoeiro comum, como os efetuados por Ishizawa (1954) e Graham & Parker (1964), relataram que a bactéria em questão pode nodular a planta. Michiels et al. (1998) demonstraram a possibilidade de o feijoeiro comum perceber sinais de nodulação de muitos rizóbios, incluindo *Bradyrhizobium diazoefficiens*, tendo esta bactéria sido capaz de produzir em torno de 150 nódulos por planta, porém inefetivos para fixação biológica de nitrogênio.



Em trabalho realizado por Boiero (2007), foi detectado que *B. diazoefficiens*, é capaz de sintetizar fitormônios e regular o crescimento das plantas. Desta forma, pode-se sugerir que o aumento da nodulação seja capaz de favorecer os respectivos incrementos em termos de matéria seca de parte aérea, como demonstram os resultados deste experimento.

A co-inoculação com as estirpes *A. amazonense* e *A. brasilense*, favoreceu a elevação do número de nódulos nas plantas nas três dosagens ( $10^8$ ,  $10^6$  e  $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>). Para ambas, há tendência de progresso da nodulação sob doses mais baixas de aplicação. Segundo Burdman et al. (1997), citado por Dobbelaere et al. (2001), o crescimento da planta pelo efeito promotor de *Azospirillum* é dependente de sua concentração no inoculante, sendo possível determinar-se a dosagem ótima, que para este caso correspondeu a  $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>. Este resultado é concordante com o encontrado por Hungria et al. (2013), que observaram redução dos benefícios provocados por *Azospirillum* quando doses mais elevadas foram empregadas.

Diversos estudos têm demonstrado a efetividade da co-inoculação de *Rhizobium* e *Azospirillum* e seus respectivos efeitos sobre o desenvolvimento nodular em feijão, sugerindo que o promotor de crescimento pode estimular o aumento do número de raízes laterais e de pelos radiculares (OKON & KAPULNIK, 1986), nodulação antecipada e aumento da susceptibilidade da raiz à nodulação com *Rhizobium* (OKON et al., 1995), proporcionando maior número de sítios ativos e acesso à nodulação por estirpes rizobianas (DEY et al., 2004). Burdman et al. (1998) verificaram que a inoculação de feijoeiro comum com *A. brasilense*, na ausência de *Rhizobium*, resultou na produção de exsudados radiculares nas raízes de plântulas com 6 dias de idade, com maior capacidade para induzir a expressão do gene NOD, em comparação aos exsudados do controle não inoculado. Sob co-inoculação, Dardanelli et al. (2008) verificaram que a inoculação com *A. brasilense* é capaz de prolongar a sinalização das raízes para *Rhizobium tropici* (CIAT 899) pela maior produção de flavonóides, favorecendo, consequentemente, a nodulação das plantas.

Com relação aos resultados encontrados para a massa de 1 nódulo, ou seja, para seu peso unitário, observa-se que a testemunha inoculada com *R. tropici* foi ou não diferente dos tratamentos co-inoculados. Sob co-inoculação com *B. diazoefficiens*, *B. elkanii*, *A. amazonense* e *E. coli*, nas doses que favoreceram a formação de menor número de nódulos, sua massa unitária foi correspondentemente maior. Este comportamento pode estar ligado à partição de carbono na planta, indicando que a elevação da densidade de nódulos e consequente aumento na demanda por fotossintatos resultou na formação de nódulos menores.

A elevação do número de nódulos na planta provocada pela co-inoculação pode ter limitado o crescimento destas estruturas em função das alterações na relação fonte/dreno, onde a produção de fotoassimilados não foi capaz de atender a demanda gerada. Resultados de partição de carbono obtidos por Herridge & Pate (1977) registraram o significativo requerimento de fotoassimilados exigidos para a manutenção da respiração e produção de matéria de seca em nódulos em feijão caupi. Sato et al. (1999), por sua vez, estudando o efeito do fornecimento de fotoassimilados sobre características dos nódulos em soja, demonstraram que a redução do tamanho dos nódulos pode ser causada pelo efeito secundário do excesso de nodulação, possivelmente devido à competição entre os próprios nódulos.

Ensaio com o objetivo de testar a nodulação e fixação de nitrogênio em feijoeiro comum comprovaram que sua inoculação com *B. diazoefficiens* (MICHIELS et al., 1998) ou *B. elkanii* (ORMEÑO, dados não publicados; MARTÍNEZ-ROMERO et al., 2003) pode contribuir efetivamente para a formação de nódulos nas plantas, porém, ineficientes para FBN. Segundo Kan et al. (2007), durante o processo de infecção e formação dos nódulos, é provável que bactérias oportunistas penetrem juntamente com as nodulíferas no tecido vegetal. Neste contexto, considerando a significativa promoção da nodulação pelas duas estirpes de *Bradyrhizobium* testadas e a possibilidade de *R. tropici* comportar-se como uma bactéria oportunista colonizando os nódulos, é possível inferir que este quadro possa

contribuir para a elevação da taxa de FBN e, conseqüentemente, com o teor e acúmulo de nitrogênio nas plantas.

Tomados em conjunto com a observação de que as plantas não-noduladas formam mais pêlos radiculares e nas raízes laterais (PLAZINSKI & ROLFE 1985), sugere-se que, quando co-inoculado com *Rhizobium*, *Azospirillum* estimula a formação de células epidérmicas que se tornam células ciliadas nas raízes infectadas, ou cria locais de infecção adicionais que mais tarde são ocupados por rizóbios (PLAZINSKI & ROLFE 1985; TCHEBOTAR et al., 1998), o que poderia contribuir para fixação de N e conseqüente elevação do acúmulo de N nos tecidos da planta.

Diversos resultados experimentais demonstraram efeitos positivos da co-inoculação de rizóbios e PGPBs sobre o conteúdo total de N em diversas leguminosas, tais como amendoim (BADAWI et al., 2011), soja (GROPPA et al., 1998), feijão guandu (TILAK et al., 2006), feijão alado (IRUTHAYATHAS et al., 1983), grão de bico (ELKOCA et al., 2008), entre outros. Segundo Volpin & Kapulnik (1994), esta resposta na acumulação de N em plantas duplamente inoculadas pode ser atribuída à nodulação antecipada, aumento do número de nódulos, maiores taxas de fixação de N e uma melhoria geral do desenvolvimento radicular.

### 3.6.3 Ensaio em vasos com solo

Em relação à massa de folhas, caule, parte aérea e raiz, não houve diferença significativa entre as co-inoculações avaliadas em relação à testemunha inoculada apenas com rizóbio. De maneira geral, as médias dos tratamentos co-inoculados foram inferiores à da testemunha em questão, concordando com Burdman et al. (1997), que avaliando a co-inoculação com rizóbio e *Azospirillum brasilense* verificou inibição do crescimento das plantas em comparação com a inoculação com rizóbio sozinho, resultando em redução relativa de matéria seca da planta.

Del Gallo & Fabrini (1991) observaram que enquanto a inoculação única de *Azospirillum brasilense* aumentou em aproximadamente 6 vezes a massa seca de parte aérea em grão de bico, quando co-inoculado com *Rhizobium leguminosarum*, seu efeito parecia ser inibido, provavelmente devido a problemas de concorrência na superfície radicular. De maneira semelhante, Kumar Rao & Patil (1976) não detectaram diferença na produção de matéria seca em soja, entre a inoculação com rizóbio sozinho e *Rhizobium* co-inoculado com *Azotobacter* no crescimento de plantas a nível de campo.

Avaliando os resultados da co-inoculação na cultura do feijoeiro através da aplicação de *Azospirillum brasilense* em sulcos e de *Rhizobium tropici* nas sementes, Hungria et al. (2013) notaram aumento de produção de grãos em comparação com a inoculação com rizóbio exclusivamente, no entanto, quando ambas as bactérias foram co-inoculadas nas sementes obteve-se produtividade inferior à testemunha que apenas recebera rizóbio. Um dos problemas seria o fato de que os microrganismos introduzidos nem sempre são capazes de se mover do local de inoculação à semente, para se estabelecerem efetivamente na rizosfera e no rizoplano (SOTTERO et al., 2006). Os resultados nem sempre são positivos, e se questiona se o número de resultados negativos ou sem efeito não estaria subestimado, uma vez que a tendência é não publicá-los (Moreira & Siqueira, 2006), desfavorecendo a otimização das pesquisas relacionadas à interação planta-microrganismos.

Os efeitos dos promotores de crescimento sobre as plantas são constantemente relacionados ao desenvolvimento do sistema radicular, como demonstram diversos resultados obtidos sob co-inoculação de *Rhizobium* spp. com *Pseudomonas* spp. (KUMAR et al., 2001; EGAMBERDIEVA et al., 2010), *Chryseobacterium balustinum* (ESTÉVEZ et al. 2008), *Azospirillum* spp. (DARDANELLI et al., 2008), entre outros. Neste experimento não foram verificadas diferenças significativas na massa de raiz entre as plantas co-inoculadas em relação à testemunha que apenas recebeu rizóbio, reforçando a tese que a co-inoculação de

rizóbio e PGPBs de maneira simultânea nas sementes pode desfavorecer o crescimento das plantas em função de algum mecanismo ainda não totalmente elucidado. Para Molla et al. (2001), que observaram declínio no estímulo ao crescimento radicular em raízes de soja sob co-inoculação de *A. brasilense* e *B. diazoefficiens*, este comportamento poderia ser atribuído à competição para sobrevivência. A inconstância dos resultados é um assunto bastante citado por diversos autores, pois nem sempre as rizobactérias repetem sua atuação como promotoras de crescimento, mesmo em testes realizados em condições semelhantes (CHANWAY et al., 2000).

A massa seca de folhas, caule, parte aérea e raiz foi expressivamente influenciada pela aplicação de N mineral, como pode ser observado pela comparação entre os resultados expressos pelos tratamentos inoculados com PGPBs de forma associada a adubação com relação aos co-inoculados e, especialmente, a testemunha absoluta. Correspondendo ao nutriente que mais limita o crescimento das plantas, o N pode incrementar expressivamente o acúmulo de biomassa na planta. O N tem extrema importância na matéria seca, por se tratar de constituinte da molécula de clorofila e, portanto, tem influência na fotossíntese e promove o crescimento vegetativo do feijoeiro (SILVEIRA & DAMASCENO, 1993).

Os efeitos significativamente superiores apresentados na inoculação de *Azospirillum brasilense* associada à adubação nitrogenada mineral em termos de massa de folhas ( $10^4$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ), de caule ( $10^6$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) e parte aérea ( $10^4$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) comparativamente à testemunha nitrogenada podem ser derivados de diversos fatores inerentes à sua fisiologia. Resultados experimentais demonstraram que as bactérias deste gênero são capazes de produzir os fitormônios auxina (CROZIER et al., 1988), citocinina (STRZELCZYK et al., 1994), giberelina (BOTTINI et al., 1989) e ácido indolacético (SPAEPEN et al., 2008), além de aumentar o número de pelos radiculares (BURDMAN et al., 1996), elevar a quantidade de N fixado (YADEGARI et al., 2010) e solubilizar fosfato (RODRIGUEZ et al., 2004). Tal cenário demonstra a diversidade de mecanismos capazes de favorecer o crescimento das plantas, os quais, sob ação sinérgica ou de forma isolada, poderiam estar relacionados aos incrementos de biomassa observados neste experimento.

O número e massa de nódulos, importantes fatores que interferem diretamente no potencial de fixação biológica de nitrogênio, não foram alterados pela co-inoculação (Tabela 9). Isto vai ao encontro das observações de Plasinski & Rolfe (1985) de que a co-inoculação tanto pode estimular como inibir a formação e o crescimento de nódulos em um sistema simbiótico, dependendo das concentrações e tempo de inoculação. Em relação às plantas que receberam adubação nitrogenada mineral, observou-se que a nodulação foi insipiente. Tal resposta está de acordo com os resultados encontrados por Peres et al. (1994), que observaram incrementos significativos na nodulação de feijoeiro em três ensaios quando utilizada a inoculação com estirpes comerciais de rizóbios, para a cultivar Carioca, e diminuição da nodulação com a aplicação de N mineral.

Pelegri et al. (2009) verificaram tendência de diminuição da nodulação (número e matéria seca de nódulos) conforme o aumento da dose de N aplicada. Segundo Mercante et al. (1993), em condições de alta disponibilidade de N, de origem mineral ou proveniente da mineralização da matéria orgânica do solo, o feijoeiro prefere o N combinado e não nodula ou para a fixação se já está nodulado. Kanayama & Yakamoto (1991) confirmaram a existência de um efeito deletério provocado por um composto formando na presença de N, a nitrosil-leghemoglobina, que inibe a síntese e atividade da leghemoglobina.

No tocante à massa de 1 nódulo, que corresponde à relação entre seu peso e número, não se observaram diferenças significativas entre os tratamentos sob co-inoculação e as testemunhas inoculada com rizóbio e absoluta (Tabela 9), demonstrando que as PGPBs não influíram sobre este aspecto e que as bactérias nodulíferas nativas foram capazes de expressar resultados semelhantes ao rizóbio utilizado para inoculação (CIAT 899 = *R. tropici*). Este

resultado pode estar relacionado à nodulação pelas bactérias presentes no solo. O sucesso do estabelecimento e da recém introdução de rizóbios em um solo é influenciado pela população microbiana nativa, o que pode causar quer um efeito competitivo ou sinérgico ao *Rhizobium* utilizado (IRUTHAYATHAS et al., 1983).

No tocante ao teor de N na folha, a testemunha rizobiana e os tratamentos co-inoculados (à exceção de *A. brasilense* -  $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>), não diferiram daqueles que receberam adubação, indicando que a associação simbiótica combinada ou não aos efeitos das PGPBs é capaz de favorecer a nutrição nitrogenada da planta de forma equiparada à adubação mineral. No Brasil, a faixa crítica é um dos métodos utilizados para diagnose do estado nutricional das plantas (ASSIS, 2012) e, para o feijoeiro, a mais empregada para avaliar-se o teor de N foliar foi a proposta por Wilcox & Fageria (1976), que indicaram como adequados valores entre 28,0 e 60,0 g N kg<sup>-1</sup>. Neste sentido, observa-se que todos os tratamentos, à exceção da testemunha absoluta, foram capazes de se enquadrar no intervalo em questão. De forma contrária, com relação ao conteúdo de N nas folhas, nenhum tratamento sob dupla inoculação com *R. tropici* e PGPBs se igualou aos que receberam N mineral.

### 3.7 CONCLUSÕES

*Azospirillum amazonense* e *Azospirillum brasilense* não apresentaram ação antagonista à *Rhizobium tropici*.

A co-inoculação, em condição estéril, foi capaz de aumentar a nodulação em todos os tratamentos. As estirpes de *B. diazoefficiens* e *B. elkanii* na dosagem ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) proporcionaram os resultados mais elevados em termos de número de nódulos. Nas doses que favoreceram a formação de menor número de nódulos, sua massa unitária foi correspondentemente maior. Os tratamentos co-inoculados elevaram o teor de N na parte aérea, com exceção de *A. brasilense*, sendo a dose  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> de *B. diazoefficiens* superior à testemunha nitrogenada. Todas as estirpes co-inoculadas elevaram o conteúdo de N na parte aérea comparativamente à testemunha rizobiana.

A co-inoculação nas sementes de rizóbio e bactérias promotoras do crescimento vegetal, em vasos com solo não estéril, não promoveu aumento da produção de massa seca de parte aérea e raiz. A inoculação de *A. brasilense* associada à adubação nitrogenada mineral aumentou a massa de folhas ( $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>), de caule ( $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>) e de parte aérea ( $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>). A inoculação de *R. tropici* de forma combinada ou não aos efeitos das PGPBs elevou o teor de N nas folhas.

## **4      CAPÍTULO II**

### **ACÚMULO DE BIOMASSA, TEORES DE CLOROFILA E COMPONENTES DE PRODUÇÃO DE FEJJOEIRO SOB CO- INOCULAÇÃO DE RIZÓBIO E BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL**

## 4.1 RESUMO

O crescimento e produção do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) podem ser favorecidos pelo efeito sinérgico proporcionado pela co-inoculação de *Rhizobium* com bactérias promotoras de crescimento vegetal. Com o objetivo de avaliar o desenvolvimento vegetativo e produção do feijoeiro em resposta à co-inoculação de rizóbio e bactérias promotoras de crescimento vegetal, conduziu-se um experimento em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia, em Seropédica, RJ. O experimento foi realizado em esquema fatorial 2x3+4 com 8 repetições, resultante da combinação da co-inoculação de *Rhizobium tropici* com duas bactérias (*Azospirillum brasilense* ou *Bradyrhizobium diazoefficiens*) em três doses de aplicação ( $10^4$ ,  $10^6$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>), acrescidos das testemunhas absoluta, nitrogenada, inoculada com *R. tropici* e co-inoculada com AZOTOTAL<sup>®</sup>, em vasos com 12 kg de terra proveniente do horizonte A de um Planossolo Háplico. Quatro repetições foram coletadas aos 45 dias após o plantio (DAP), e as plantas foram separadas em folhas, caule, vagens, raiz e nódulos, sendo determinado o teor e conteúdo de N da parte aérea. Entre a segunda e a sétima semana de crescimento, foi determinado o índice de clorofila Falker através de clorofilômetro portátil. As demais quatro repetições foram coletadas após a senescência das plantas (76 DAP), sendo o material vegetal separado em vagens e grãos, tendo-se determinado o teor de N e os componentes de produção. As plantas co-inoculadas com *R. tropici* e *A. brasilense* apresentaram massa de parte aérea superior à testemunha inoculada com rizóbio nas doses  $10^6$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, enquanto com *B. diazoefficiens* tal resultado se repetiu para as doses  $10^4$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. O número de vagens por planta aos 45 DAP aumentou em função da co-inoculação, nas doses de  $10^6$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> para *A. brasilense* e de  $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup> para *B. diazoefficiens*. A co-inoculação elevou o conteúdo de N na parte aérea, em relação ao controle rizobiano, em 9,23% para *A. brasilense* ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>), 11,45% para *B. diazoefficiens* ( $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>) e 12% para AZOTOTAL<sup>®</sup>, não sendo detectada diferença significativa destes em relação aos controles com N mineral ou inoculado com *R. tropici*. *B. diazoefficiens* ( $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>), *A. brasilense* ( $10^6$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) e AZOTOTAL<sup>®</sup> elevaram o número de vagens acima do controle com rizóbio. A massa de grãos foi 8,3% superior à testemunha rizobiana em função da co-inoculação com *A. brasilense* ( $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>) e 6,1% com *B. diazoefficiens* ( $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>). A inoculação apenas com *R. tropici* resultou em menores número de grãos e de vagens por planta dentre os tratamentos avaliados. Houve incremento de 15 grãos por planta (10,8%) com a dupla inoculação com *A. brasilense* ( $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>) e de 4 vagens por planta (13,9%) para *B. diazoefficiens* ( $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>), comparativamente ao controle rizobiano. A co-inoculação com *A. brasilense* e *B. diazoefficiens* foi capaz de proporcionar incrementos no índice de clorofila equiparáveis aos obtidos pela adubação nitrogenada mineral, não obstante, inferiores ao da inoculação exclusiva de *R. tropici*.

**Palavras-chave:** *Phaseolus vulgaris*. Co-inoculação. Crescimento de plantas.

## 4.2 ABSTRACT

The growth and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) may be favored by the synergistic effect provided by the co-inoculation of *Rhizobium* bacteria with plant growth promoting bacteria (PGPBs). In order to evaluate the vegetative development and production of common bean in response to the co-inoculation of *Rhizobium* and PGPBs, an experiment was conducted in greenhouse at Embrapa Agrobiologia, in Seropédica, RJ. The experiment had a 2x3+4 factorial with eight replications, combining the inoculation of *Rhizobium tropici* with *Azospirillum brasilense* or *Bradyrhizobium diazoefficiens*, in three application levels ( $10^4$ ,  $10^6$  and  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>), plus four control treatments (absolute, nitrogen, inoculated with rhizobia and co-inoculated with AZOTOTAL<sup>®</sup>), in pots with 12 kg of soil from the A horizon of a Haplic Planosol. Four replications were harvested at 45 days after planting (DAP), and plants were separated into leaves, stems, pods, roots and nodules, and the shoot N content was determined. Between the second and seventh week of growth, Falker chlorophyll content was determined by through chlorophyll. The other replications were collected after plant senescence (76 DAS), and plant material were separated in pods and grains, and the N content and yield components were determined. Co-inoculated plants with *R. tropici* and *A. brasilense* showed higher shoot mass than the control inoculated with rhizobia at levels  $10^6$  and  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>, while with *B. diazoefficiens* this result occurred at levels  $10^4$  and  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. The number of pods per plant increased at 45 DAP with the co-inoculation, at levels of  $10^6$  and  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup> for *A. brasilense* and  $10^4$  CFU mL<sup>-1</sup> to *B. diazoefficiens*. Simultaneous inoculation of *Rhizobium* and PGPBs increased the N content in shoot, as compared to rizobium control, in 9.23% for *A. brasilense* ( $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>), 11.45% for *B. diazoefficiens* ( $10^4$  CFU mL<sup>-1</sup>) and 12% for AZOTOTAL<sup>®</sup>, without significant differences in relation to the controls with mineral N or inoculated with *R. tropici*. *B. diazoefficiens* ( $10^4$  CFU mL<sup>-1</sup>), *A. brasilense* ( $10^6$  and  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>) and AZOTOTAL<sup>®</sup> raised the number of pods above the control with rhizobia. The mass of grains was 8.3% higher than the rizobium control due to co-inoculation with *A. brasilense* ( $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup>) and 6.1% for *B. diazoefficiens* ( $10^4$  CFU mL<sup>-1</sup>). Inoculation with only *R. tropici* resulted in the lowest values for number of seeds and pods per plant among evaluated treatments. There was an increase of 15 grains per plant (10.8%) with the double inoculation with *A. brasilense* ( $10^4$  CFU mL<sup>-1</sup>) and 4 pods per plant (13.9%) to *B. diazoefficiens* ( $10^4$  CFU mL<sup>-1</sup>) compared to the rizobium control. The co-inoculation with *B. diazoefficiens* and *A. brasilense* was able to provide increases in chlorophyll content comparable to those obtained by the mineral N fertilization although inferior to the exclusive inoculation with *R. tropici*.

**Keywords:** *Phaseolus vulgaris*. Co-inoculation. Plant growth.



### 4.3 INTRODUÇÃO

O crescimento das plantas pode ser beneficiado por sua inoculação com um grupo de microrganismos conhecido como bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPBs, do inglês *plant growth promotiong bacteria*). Algumas dessas rizobactérias, quando inoculadas na semente ou no solo, têm a capacidade de promover o crescimento vegetal através de diferentes mecanismos, podendo apresentar efeito sinérgico com a fixação simbiótica do nitrogênio (CATTELAN, 1999) quando aplicadas na forma de co-inoculação com bactérias do grupo dos rizóbios.

As leguminosas têm a vantagem de que, em simbiose com os rizóbios do solo, podem obter N por meio da fixação biológica de nitrogênio (FBN) (PANKIEVICZ et al., 2015). Porém, a contribuição dessa simbiose pode ser incrementada por meio da co-inoculação de PGPBs, através de mecanismos diversos. Dentre estes, pode-se destacar: capacidade de produzir ou modificar a concentração de reguladores de crescimento como o ácido indolacético, giberelina, citocininas e etileno (ARSHAD & FRANKENBERGER, 1993; GLICK, 1995; AHMAD et al., 2008); solubilização de fosfato inorgânico e mineralização de fosfato orgânico, o que torna o fósforo disponível para as plantas (KRASILNIKOV, 1961; GAUR & OSTWAL, 1972; SUBBA RAO, 1982; RODRIGUÉZ & FRAGA, 1999); resistência sistêmica adquirida, por preparar a planta para a ativação potencial de várias respostas de defesa celular, que são posteriormente induzidas sob o ataque de patógenos (CONRATH et al., 2006; NIU et al., 2011); suavizar o estresse salino nas plantas, contribuindo significativamente para a resolução dos problemas de produção causados pela alta salinidade (EGAMBERDIEVA & LUGTENBERG, 2013), entre outros.

Segundo Naveed et al. (2015), a aplicação apropriada de rizóbios em conjunto com PGPBs pode aumentar expressivamente a produtividade das culturas, sendo que o uso de uma combinação compatível, eficiente e eficaz com o rizóbio não só seria capaz de suprimir ou eliminar o efeito de outras cepas da rizosfera, mas também de estimular o desenvolvimento radicular e, conseqüentemente, a nodulação, o crescimento e rendimento das leguminosas inoculadas.

Na época de formação das vagens, a planta diminui o fluxo de carboidratos para os nódulos (LAWN et al., 1974) e, desta forma, ainda há preocupações sobre a capacidade de fixação de nitrogênio biológico para aumentar o crescimento das plantas e a produtividade da cultura (HUNGRIA et al., 2013). Diante desta realidade, há uma demanda crescente por alternativas que possibilitem incrementos de crescimento do feijoeiro sob fixação biológica, como a apresentada pela integração da inoculação de rizóbio e PGPBs. Embora a quantidade de N fixado não seja tão grande como a mensurada na endosimbiose, grandes aumentos em termos de rendimento, foram relatados em condições de campo (DOBBELAERE et al., 2001; VESSEY, 2003; BHATTACHARYYA & JHA, 2012). Diversos trabalhos descreveram benefícios decorrentes da co-inoculação de *Rhizobium* e promotores de crescimento ao feijoeiro, na forma de incremento de matéria seca (YADEGARI et al., 2010), nodulação (FIGUEIREDO et al., 2007), acumulação de N e P (STAJKOVIĆ et al., 2011) e rendimento da cultura (REMANS et al., 2008) demonstrando a potencialidade de aplicação da técnica em questão.

Mishra et al. (2014) relataram que, além de proporcionar aumento em termos de biomassa e rendimento, a co-inoculação de *Pseudomonas* spp. e *Rhizobium leguminosarum* em feijoeiro foi capaz de elevar o teor de clorofila total das plantas. O N é um componente responsável por várias reações nas plantas, além de fazer parte da estrutura de clorofila, enzimas e proteínas (ZUFFO et al., 2015). A melhor oferta de N para a planta como um

resultado da co-inoculação pode aumentar a síntese de cloroplasto (BASET MIA et al., 2010), o que pode proporcionar um melhor crescimento da planta (ROJAS-TAPIAS et al., 2014) e, conseqüentemente, contribuir para a elevação da produtividade da cultura.

Dentro deste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da co-inoculação de *Rhizobium tropici* e PGPBs (*Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium diazoefficiens*) em feijoeiro comum, em relação à produção de biomassa, teores de clorofila e componentes de produção.

## 4.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.4.1 Condições experimentais

O experimento em vasos com solo foi montado em delineamento experimental de blocos casualizados, com dez tratamentos e oito repetições, totalizando 80 vasos. Os fatores avaliados foram a estirpe de bactéria (*Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110 e *Azospirillum brasilense* Sp 245) e dose de aplicação ( $10^4$ ,  $10^6$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>), acrescidos de quatro tratamentos adicionais que consistiram na testemunha nitrogenada, testemunha inoculada com *Rhizobium tropici* (CIAT 899), testemunha absoluta e testemunha co-inoculada com AZOTOTAL<sup>®</sup>.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia, entre os meses de outubro a dezembro de 2014, em conformidade às exigências do Protocolo Oficial para Avaliação da Viabilidade e Eficiência Agronômica de Cepas, Inoculantes e Tecnologias Relacionados ao Processo de Fixação Biológica do Nitrogênio em Leguminosas (BRASIL, 2011).

Os vasos foram preenchidos com 12 kg terra proveniente do horizonte A de um Planossolo Háptico oriundo da área experimental da Embrapa Agrobiologia, peneirado em malha de 4 mm. A análise química de fertilidade do solo foi realizada segundo a metodologia descrita pela Embrapa (1997), no Laboratório de Química Agrícola da Embrapa Agrobiologia e mostrou os seguintes valores: pH em água de 5,04; MO de 68,0 g kg<sup>-1</sup>; P de 4,61 g kg<sup>-1</sup>; Al<sup>3+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> de 0,18; 0,74 e 0,40 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>. Os vasos foram incubados por um período de 45 dias, através da adição de 36 g (3,0 g kg<sup>-1</sup> de solo) de palha de milho triturada, de forma a imobilizar o N.

Após o período de incubação, em cada vaso foi realizada a calagem com a aplicação e homogeneização de 7 g de CaCO<sub>3</sub> para a neutralização do Al<sup>3+</sup> tóxico e fornecimento de Ca<sup>2+</sup>. Quinze dias após a calagem, os vasos foram adubados com soluções de nutrientes, nas seguintes doses: 10 mg kg<sup>-1</sup> de Mg, como MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 2 mg kg<sup>-1</sup> de Cu, como CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O; 1 mg kg<sup>-1</sup> de Zn, como ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,1 mg kg<sup>-1</sup> de B, como H<sub>2</sub>BO<sub>3</sub>; 0,2 mg kg<sup>-1</sup> de Mo, como Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 1 mg kg<sup>-1</sup> de Fe, como Fe-EDTA e 80 mg kg<sup>-1</sup> de P, na forma de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Por sua vez, os vasos sob adubação nitrogenada receberam 80 g kg<sup>-1</sup> de N (plantio) e 40 g kg<sup>-1</sup> (cobertura), como CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>. Posteriormente, todos os vasos foram homogeneizados por revolvimento do solo.

A estirpe de rizóbio utilizada foi a CIAT 899 (SEMIA 4077, BR 322) de *Rhizobium tropici*, recomendada como inoculante comercial do feijoeiro no Brasil. As estirpes de bactérias promotoras de crescimento utilizadas foram a USDA 110 (SEMIA 5080, BR 116) de *Bradyrhizobium diazoefficiens* e a Sp 245 (BR 11.005) de *Azospirillum brasilense*, pertencentes à Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia.

A estirpe de *Rhizobium* foi crescida em meio TY líquido (Döbereiner et al., 1999), por três dias, a temperatura de 30°C e agitação de 150 RPM. As células foram centrifugadas a 4.000 x g por 10 min., a 4°C, e posteriormente lavadas por três vezes em solução 0,55% NaCl seguindo o mesmo procedimento de centrifugação. Posteriormente, a densidade óptica da suspensão de células foi ajustada em espectrofotômetro para 1.0 ( $\lambda = 600$  nm), correspondente a aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>.

A estirpe de *Bradyrhizobium* foi crescida em meio TY (Döbereiner et al., 1999), por quatro dias, e a estirpe Sp 245 em meio DYGS (Döbereiner et al., 1999) com pH 6,8 por dois dias, ambas a temperatura de 30°C e sob agitação de 150 RPM. O procedimento de lavagem e ajuste da densidade óptica foi o mesmo aplicado para a estirpe CIAT 899. As concentrações correspondentes a 10<sup>6</sup> e 10<sup>4</sup> UFC mL<sup>-1</sup> foram obtidas através de diluição do meio em concentração equivalente a 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> em solução salina (0,55% NaCl).

A cultivar de feijoeiro utilizada foi a Pérola. As sementes foram desinfetadas por 30 segundos em álcool 96° e 2 minutos em peróxido de hidrogênio (30%), seguidos por dez lavagens em água destilada autoclavada. A semeadura foi realizada em 12 de setembro de 2014. Foram semeadas quatro sementes por vaso com posterior desbaste para duas plantas aos 7 dias após a emergência das plântulas.

No momento do plantio, cada semente foi inoculada com 1 mL do inoculante de *R. tropici* e, doze dias após a emergência, as plântulas receberam, no solo, 1 mL da bactéria promotora de crescimento nas concentrações correspondentes. O tratamento que recebeu a adubação nitrogenada e a testemunha absoluta não foram inoculados com rizóbio. Todas as sementes foram posteriormente cobertas com uma camada de aproximadamente 1 cm de terra.



**Figura 4.** Visão geral do experimento aos 46 dias após o plantio. Fonte: Rennan Bastos (2014).





**Figura 5.** Visão geral do experimento aos 64 dias após o plantio. Fonte: Rennan Bastos (2014).

#### 4.4.2 Coletas e determinações

Foram efetuadas duas coletas, a primeira aos 45 DAP (dias após o plantio) e a segunda no final do ciclo da cultura (após a senescência das plantas); para cada coleta utilizaram-se quatro repetições. Na primeira coleta, a parte aérea foi dividida em folhas, caule e vagens. As vagens foram contadas e, posteriormente, juntamente às demais partes, acondicionadas separadamente em sacos de papel e postas a secar em estufa de circulação forçada a 65 °C até atingirem massa constante e serem pesadas para determinação do peso de matéria seca. As amostras da parte aérea foram moídas e submetidas à digestão sulfúrica para a determinação dos teores de N pelo método semimicro Kjeldahl, segundo Malavolta et al. (1997); o conteúdo de N foi obtido pelo produto entre a biomassa e o teor de N.

O sistema radicular foi lavado e recuperado juntamente aos nódulos desprendidos com auxílio de peneira de malha de 2 mm; ambos foram posteriormente acondicionados em frascos de vidro hermeticamente fechados e reservados em geladeira para que se procedesse à contagem do número de nódulos. Em seguida, os nódulos foram destacados e contados e, juntamente as raízes, secos em estufa de circulação forçada a 65°C até atingirem peso constante para a determinação da massa seca.

No período compreendido entre a segunda e a sétima semana de crescimento, foram quantificados os índices de clorofila (a, b e total) expressos em unidade pelo Índice de Clorofila Falker através de clorofilômetro portátil (ClorofiLOG CFL 1030 Falker, Porto Alegre, RS, Brasil), entre 8 e 10 horas da manhã, tomando-se para tal a segunda folha trifoliolada completamente desenvolvida nas duas plantas do vaso.

As demais quatro repetições foram coletadas após a maturidade fisiológica, atingida aos 76 DAP (dias após o plantio). As plantas foram cortadas rente ao solo, sendo as raízes recuperadas com auxílio de uma peneira e as vagens contadas e trilhadas manualmente para a

separação, contagem e pesagem dos grãos. Cada parte vegetal foi seca em estufa e pesada. Foram determinados os componentes de produção número de vagens por planta, número de grãos por vagem, massa de 1 grão e índice de colheita (razão entre a massa das sementes e a massa total de parte aérea). Os grãos foram moídos e submetidos à digestão sulfúrica para a determinação dos teores de N pelo método semimicro Kjeldahl, segundo Malavolta et al. (1997); o conteúdo de N foi obtido pelo produto entre a biomassa e o teor de N.

#### **4.4.3 Análises estatísticas**

Os dados de biomassa, nodulação, teor e conteúdo de N, índice de clorofila Falker e componentes de produção, foram submetidos à análise de variância considerando-se um experimento em blocos ao acaso. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% por meio do programa de estatística ASSISTAT.

## 4.5 RESULTADOS

Aos 45 dias após o plantio (DAP), no estágio R7 (início de formação das vagens), as co-inoculações com *Azospirillum brasilense* ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>), *Bradyrhizobium diazoefficiens* ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) e AZOTOTAL®, apresentaram massa de folhas significativamente igual ao tratamento sob adubação nitrogenada (Tabela 14), entretanto, não diferiram da testemunha rizobiana. Em termos percentuais, este acréscimo na massa de folhas em relação à aplicação única de *R. tropici* corresponde a 9,66, 9,75 e 11,63% para os tratamentos de co-inoculação com *A. brasilense*, *B. diazoefficiens* e AZOTOTAL®, respectivamente. Os demais tratamentos co-inoculados apresentaram médias significativamente inferiores à testemunha nitrogenada.

Em termos de massa seca de caule, não foi detectada diferença significativa entre as testemunhas absoluta e rizobiana. Os tratamentos co-inoculados, com exceção de *A. brasilense* ( $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>), apresentaram resultados significativamente superiores à testemunha apenas inoculada com *R. tropici* e similares ao adubado com N mineral.

A co-inoculação não promoveu aumento significativo na massa seca das vagens coletadas aos 45 dias após a semeadura (DAP). Nenhum tratamento diferiu da testemunha inoculada com rizóbio, sendo este resultado, assim como o da testemunha absoluta, inferior ao apresentado pela adubada com N mineral. Nesta coleta, apenas as inoculações conjuntas de *R. tropici* com *A. brasilense* ( $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>) e AZOTOTAL® proporcionaram elevação da massa de vagens, que mesmo não diferindo significativamente do controle rizobiano, foram capazes de se equiparar à adubação mineral.

Com relação aos resultados de massa seca de parte aérea, a testemunha rizobiana e os tratamentos co-inoculados não diferiram significativamente entre si. As médias das inoculações com duas estirpes foram significativamente inferiores à apresentada pela adubação mineral e superiores à testemunha absoluta. Ressalta-se que os resultados de todos os tratamentos co-inoculados, mesmo na ausência de diferença significativa, foram superiores à inoculação isolada de *R. tropici*. Em média, a inoculação dos promotores de crescimento na dose mais elevada ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) foi a que proporcionou maior incremento de massa de parte aérea, percentualmente equivalente a 11,26% para *A. brasilense* e 12,50% para *B. diazoefficiens* em relação à aplicação exclusiva de *R. tropici*.

A massa seca total das plantas co-inoculadas com *B. diazoefficiens* ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) e AZOTOTAL® foram significativamente superiores à da testemunha rizobiana. Os demais tratamentos apresentaram médias significativamente iguais ao inoculado apenas com *R. tropici*.

O número de vagens formadas nos tratamentos de co-inoculação com *B. diazoefficiens* ( $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>), *A. brasilense* ( $10^6$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) e AZOTOTAL® foi significativamente superior àquele da testemunha inoculada com *R. tropici* e igual ao do tratamento sob adubação mineral. A menor média registrada foi a da testemunha absoluta (35 vagens), apenas duas a menos que o controle rizobiano (37 vagens).

Os resultados do teor de N na folha mostraram que não houve diferença significativa entre os tratamentos co-inoculados e as testemunhas (Tabela 16). Em relação ao conteúdo de N, a média da testemunha absoluta foi inferior às demais, sendo as co-inoculações significativamente iguais ao controle inoculado com *R. tropici*, excetuando *B. diazoefficiens* ( $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>). As co-inoculações não diferiram significativamente do tratamento adubado com N mineral, novamente à exceção de *B. diazoefficiens* ( $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>).

**Tabela 14.** Massa seca de folhas, massa seca de caule, massa seca de vagens, massa seca de parte aérea, massa seca de raiz e número de vagens de feijoeiro co-inoculado com rizóbio (*Rhizobium tropici* = Rhizo) e bactérias promotoras de crescimento vegetal (*A. brasilense* = Azo e *B. diazoefficiens* = Brady) sob três doses de aplicação ( $10^4$ ,  $10^6$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) aos 45 dias após o plantio.

Tratamento	Massa de	Massa de	Massa de	Massa de	Massa de	Massa	Número de vagens
	folhas	caule	vagens	parte aérea	raiz	total	
	g planta <sup>-1</sup>						
Rhizo + Azo 10 <sup>4</sup>	12,07 b	7,71 bc	2,38 b	22,18 b	2,02 bc	24,20 c	42 bc
Rhizo + Brady 10 <sup>4</sup>	12,36 b	8,60 ab	2,40 b	23,37 b	2,30 ab	25,67 bc	48 ab
Rhizo + Azo 10 <sup>6</sup>	12,02 b	8,24 ab	3,28 ab	23,55 b	2,43 ab	25,98 bc	46 ab
Rhizo + Brady 10 <sup>6</sup>	11,91 b	7,86 ab	2,77 b	22,55 b	2,34 ab	24,90 bc	42 bc
Rhizo + Azo 10 <sup>8</sup>	12,82 ab	8,82 ab	2,52 b	24,20 b	2,60 ab	26,80 bc	46 ab
Rhizo + Brady 10 <sup>8</sup>	13,05 ab	8,48 ab	2,93 b	24,47 b	2,77 ab	27,25 b	42 bc
Test. absoluta	9,74 c	7,00 d	2,38 b	19,12 c	1,76 c	20,88 d	35 d
Test. nitrogenada	13,92 a	9,20 a	4,12 a	27,25 a	2,86 a	30,12 a	53 a
Test. - <i>R. tropici</i>	11,69 b	7,35 cd	2,70 b	21,75 b	2,51 ab	24,27 c	37 cd
Rhizo + AZOTOTAL®	12,83 ab	8,26 ab	3,36 ab	24,46 b	2,65 ab	27,11 b	46 ab
C.V. (%)	7,49	10,15	23,16	7,07	19,80	6,78	13,25

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



Na comparação entre os tratamentos, não foi observada diferença significativa no número de nódulos por planta e massa de nódulos (Tabela 15). Com relação à massa de 1 nódulo, a testemunha absoluta apresentou valor superior aos demais.

**Tabela 15.** Número de nódulos, massa de nódulos e massa de 1 nódulo de feijoeiro co-inoculado com rizóbio (*Rhizobium tropici* = Rhizo) e bactérias promotoras de crescimento vegetal (*A. brasilense* = Azo e *B. diazoefficiens* = Brady) sob três doses de aplicação ( $10^4$ ,  $10^6$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) aos 45 dias após o plantio.

Tratamento	Número de nódulos — planta <sup>-1</sup>	Massa de nódulos - mg planta <sup>-1</sup>	Massa de 1 nódulo — µg —
Rhizo + Azo 10 <sup>4</sup>	159 a	286 a	1760 b
Rhizo + Brady 10 <sup>4</sup>	177 a	242 a	1846 b
Rhizo + Azo 10 <sup>6</sup>	123 a	248 a	1841 b
Rhizo + Brady 10 <sup>6</sup>	175 a	288 a	1632 b
Rhizo + Azo 10 <sup>8</sup>	271 a	423 a	2004 b
Rhizo + Brady 10 <sup>8</sup>	110 a	225 a	2050 b
Test. absoluta	80 a	236 a	3088 a
Test. nitrogenada	223 a	484 a	2151 b
Test. - <i>R. tropici</i>	153 a	216 a	1546 b
Rhizo + AZOTOTAL®	75 a	163 a	1998 b
C.V. (%)	83,37	64,75	27,70

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

Com relação ao conteúdo de N na parte aérea, a testemunha rizobiana apresentou resultado inferior à testemunha sob adubação mineral. Os tratamentos co-inoculados não diferiram significativamente da inoculação exclusiva de *R. tropici*, porém, da mesma forma, apresentaram médias estatisticamente equiparadas àquela apresentada pela adubação mineral, com exceção de *B. diazoefficiens* ( $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>).

Aos 45 DAP, período correspondente ao início da fase reprodutiva, a testemunha nitrogenada acumulou a maior quantidade de N nas vagens. Não foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos co-inoculados e as testemunhas rizobiana e absoluta. No entanto, a co-inoculação com o produto comercial AZOTOTAL® apresentou resultado ambíguo, não diferindo da testemunha nitrogenada.

**Tabela 16.** Teor e conteúdo de N na folha, caule, parte aérea e vagem de feijoeiro co-inoculado com rizóbio (*R. tropici* = Rhizo) e bactérias promotoras de crescimento vegetal (*A. brasilense* = Azo e *B. diazoefficiens* = Brady) sob três doses de aplicação ( $10^4$ ,  $10^6$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) aos 45 dias após o plantio.

Tratamento	Teor de N na folha	Conteúdo de N na folha	Teor de N no caule	Conteúdo de N no caule	Teor de N na parte aérea	Conteúdo de N na parte aérea	Teor de N na vagem	Conteúdo de N na vagem
	— mg g <sup>-1</sup> —	- mg planta <sup>-1</sup>	- mg g <sup>-1</sup> -	- mg planta <sup>-1</sup>	— mg g <sup>-1</sup> —	- mg planta <sup>-1</sup> -	— mg g <sup>-1</sup> —	- mg planta <sup>-1</sup>
Rhizo + Azo 10 <sup>4</sup>	40,0 ab	484 ab	16,9 a	130 a	56,9 ab	615 ab	39,9 a	94 b
Rhizo + Brady 10 <sup>4</sup>	43,5 a	513 ab	17,4 a	149 a	61,0 a	663 ab	37,0 ab	91 b
Rhizo + Azo 10 <sup>6</sup>	38,9 ab	484 ab	15,6 a	129 a	54,6 ab	613 ab	34,4 b	113 b
Rhizo + Brady 10 <sup>6</sup>	33,3 b	398 bc	16,0 a	127 a	49,4 b	525 cd	38,0 ab	105 b
Rhizo + Azo 10 <sup>8</sup>	39,1 ab	513 ab	15,0 a	133 a	54,2 ab	647 ab	39,5 a	100 b
Rhizo + Brady 10 <sup>8</sup>	38,4 ab	498 ab	18,6 a	156 a	57,0 ab	654 ab	38,2 ab	112 b
Test. absoluta	39,7 ab	388 c	16,5 a	115 a	56,2 ab	504 d	39,5 a	93 b
Test. nitrogenada	41,6 ab	579 a	16,7 a	154 a	58,3 ab	733 a	39,4 a	163 a
Test. - <i>R. tropici</i>	39,5 ab	462 ab	17,0 a	125 a	56,6 ab	587 bc	39,5 a	103 b
Rhizo + AZOTOTAL®	41,5 ab	533 a	16,2 a	133 a	57,7 ab	667 ab	39,5 a	132 ab
C.V. (%)	13,10	14,82	15,95	20,20	10,46	13,00	7,01	23,92

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

Ao final do ciclo da cultura, na determinação dos componentes de produção, verificou-se que a massa de vagens não foi alterada significativamente pela co-inoculação, comparativamente aos controles inoculado, não inoculado e sob adubação nitrogenada mineral (Tabela 17). No entanto, ao se considerar apenas a massa de grãos, pôde-se observar que há diferença significativa entre as testemunhas inoculada com *R. tropici* e adubada com N mineral e que os tratamentos co-inoculados, apesar de não diferirem da testemunha rizobiana, foram capazes de se equiparar à adubação mineral e foram superiores ao tratamento co-inoculado com o produto comercial AZOTOTAL®.

Houve incremento significativo do número de grãos por planta nos tratamentos sob dupla inoculação, comparativamente à inoculação com somente uma estirpe. A inoculação apenas com *R. tropici* resultou na menor média de grãos produzidos dentre os tratamentos avaliados e, mesmo não diferindo significativamente deste, os co-inoculados novamente se igualaram à adubação nitrogenada mineral. A dupla inoculação com *A. brasilense* ( $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>) foi significativamente superior ao controle de *R. tropici*.

No que se refere ao número de vagens, novamente o tratamento apenas inoculado com rizóbio apresentou a menor média, porém, não diferiu da testemunha nitrogenada. As co-inoculações com *B. diazoefficiens* ( $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>) e o produto comercial AZOTOTAL® apresentaram resultados significativamente superiores à testemunha rizobiana. Os demais tratamentos co-inoculados, assim como a testemunha absoluta, foram ambíguos, não diferindo da aplicação única de rizóbio ou de N mineral.

**Tabela 17.** Produção de grãos, componentes de produção e índice de colheita de feijoeiro co-inoculado com rizóbio (*R. tropici* = Rhizo) e bactérias promotoras de crescimento vegetal (*A. brasilense* = Azo e *B. diazoefficiens* = Brady) sob três doses de aplicação ( $10^4$ ,  $10^6$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>).

Tratamento	Massa de vagens	Massa de grãos	Número de grãos	Número de vagens	Número de grãos por vagem	Massa de 100 grãos	Índice de colheita
	— g planta <sup>-1</sup> —	— g planta <sup>-1</sup> —	— grãos planta <sup>-1</sup> —	— planta <sup>-1</sup> —		— g —	mg g <sup>-1</sup>
Rhizo + Azo 10 <sup>4</sup>	55,77 ab	44,43 ab	138 a	31 ab	4,44 a	29,05 ab	142 a
Rhizo + Brady 10 <sup>4</sup>	58,16 a	46,28 ab	134 ab	32 a	4,15 a	30,87 a	147 a
Rhizo + Azo 10 <sup>6</sup>	59,26 a	47,38 ab	136 ab	31 ab	4,34 a	30,80 ab	160 a
Rhizo + Brady 10 <sup>6</sup>	56,61 ab	45,63 ab	130 ab	28 ab	4,53 a	30,89 a	170 a
Rhizo + Azo 10 <sup>8</sup>	43,06 b	44,06 ab	132 ab	31 ab	4,19 a	29,77 ab	142 a
Rhizo + Brady 10 <sup>8</sup>	57,32 a	45,49 ab	134 ab	31 ab	4,27 a	30,13 ab	153 a
Test. absoluta	55,61 ab	43,63 ab	130 ab	28 ab	4,59 a	29,76 ab	136 a
Test. nitrogenada	60,06 a	48,29 a	142 a	31 ab	4,51 a	30,01 ab	143 a
Test. - <i>R. tropici</i>	55,77 ab	43,45 bc	123 b	28 b	4,42 a	30,06 ab	142 a
Rhizo + AZOTOTAL®	53,15 ab	42,22 c	131 ab	32 a	4,14 a	28,33 b	145 a
C.V. (%)	15,12	6,31	6,68	8,05	10,56	4,97	15,48

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

Não foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos avaliados para o teor e conteúdo de N nos grãos (Tabela 18). Contudo, os valores mais elevados de acúmulo de N nos grãos foram detectados no tratamento sob co-inoculação com *B. diazoefficiens* ( $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>), onde observou-se um acréscimo equivalente a 11,95% do conteúdo de N em relação à média da testemunha rizobiana.

**Tabela 18.** Teor e conteúdo de N nos grãos de feijoeiro co-inoculado com rizóbio (*R. tropici* = Rhizo) e bactérias promotoras de crescimento vegetal (*A. brasilense* = Azo e *B. diazoefficiens* = Brady) sob três doses de aplicação ( $10^4$ ,  $10^6$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>).

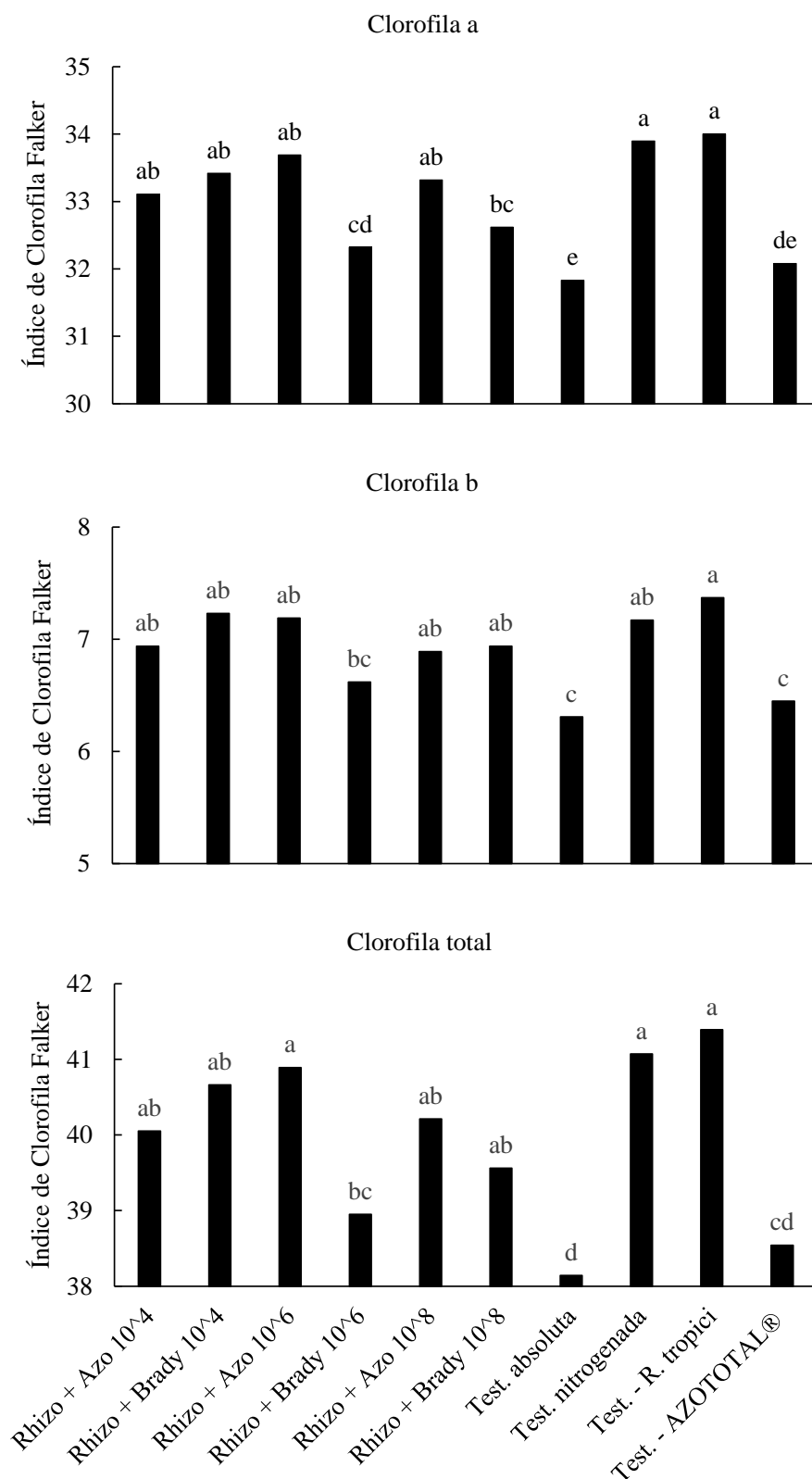
Tratamento	Teor de N nos grãos	Conteúdo de N nos grãos
	— mg g <sup>-1</sup> —	- mg planta <sup>-1</sup> -
Rhizo + Azo $10^4$	36,6 a	1415 a
Rhizo + Brady $10^4$	35,8 a	1440 a
Rhizo + Azo $10^6$	34,4 a	1418 a
Rhizo + Brady $10^6$	33,0 a	1310 a
Rhizo + Azo $10^8$	34,9 a	1337 a
Rhizo + Brady $10^8$	34,3 a	1359 a
Test. absoluta	33,1 a	1259 a
Test. nitrogenada	34,2 a	1438 a
Test. - <i>R. tropici</i>	33,9 a	1286 a
Rhizo + AZOTOTAL®	35,7 a	1308 a
C.V. (%)	6,48	8,43

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

Em termos de índice de clorofila Falker (ICF), correspondente às médias dos tratamentos nas seis primeiras semanas após o plantio (Figura 6), a inoculação com *R. tropici* foi capaz de se igualar à aplicação de N mineral. Dentre os tratamentos avaliados, a testemunha rizobiana apresentou a maior média para clorofila a, b e ab.

A respeito da clorofila a, os tratamentos co-inoculados com *A. brasilense* ( $10^4$ ,  $10^6$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) e *B. diazoefficiens* ( $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>) não diferiram significativamente das testemunhas nitrogenada e rizobiana. O tratamento sob co-inoculação com o produto comercial AZOTOTAL® obteve média equiparada a testemunha absoluta. Para clorofila b, as co-inoculações equipararam-se aos controles rizobiano e adubado com N mineral, à exceção de AZOTOTAL® que, assim como a co-inoculação com *B. diazoefficiens* ( $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>), não diferiram significativamente da testemunha absoluta.

A maior média do ICF para clorofila total, foi a registrada pela testemunha rizobiana, que superou o tratamento sob adubação mineral. As co-inoculações não diferiram significativamente da testemunha inoculada com *R. tropici*, com exceção de *B. diazoefficiens* ( $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>) e AZOTOTAL®, que não apresentaram diferença significativa da testemunha absoluta.



**Figura 6.** Variação média do Índice de Clorofila Falker para os teores de clorofila a, b e ab em folhas de feijoeiro co-inoculadas com rizóbio e bactérias promotoras de crescimento vegetal.

A variação temporal do ICF para os valores de clorofila a (Tabela 19) indicou que até 21 dias após a semeadura (DAP) a testemunha nitrogenada sobressaiu às médias dos demais tratamentos. Na quarta semana após o plantio, os ICFs das co-inoculações e da testemunha rizobiana igualaram-se à aplicação de N mineral, entretanto, ainda não de forma significativamente diferente da testemunha absoluta. Aos 35 DAP, as médias dos tratamentos co-inoculados e da testemunha inoculada com *R. tropici* foram superiores às demais, não obstante o tratamento co-inoculado com AZOTOTAL<sup>®</sup> não ser significativamente diferente da testemunha nitrogenada. Nesta fase, foi registrado o máximo ICF (38,91), na co-inoculação com *A. brasilense* ( $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>). Iniciado o estágio fenológico R7 (início de formação das vagens), que ocorreu na sexta semana após o plantio, a testemunha inoculada com *R. tropici* manteve o maior ICF, significativamente superior à absoluta e nitrogenada, não diferindo dos tratamentos co-inoculados, exceto *B. diazoefficiens* ( $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>). No início do estágio R8 (enchimento das vagens), as médias de ICF igualaram-se.

**Tabela 19.** Variação temporal do Índice de Clorofila Falker para os teores de clorofila a em folhas de feijoeiro co-inoculado com rizóbio (*R. tropici* = Rhizo) e bactérias promotoras de crescimento vegetal (*A. brasilense* = Azo e *B. diazoefficiens* = Brady) sob três doses de aplicação ( $10^4$ ,  $10^6$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>).

Tratamento	Dias após a semeadura					
	14	21	28	35	42	49
Rhizo + Azo $10^4$	26,64 bc	30,40 b	36,93 ab	38,63 ab	34,83 ab	29,07 a
Rhizo + Brady $10^4$	26,92 bc	30,34 b	37,56 ab	39,16 ab	36,10 ab	26,86 ab
Rhizo + Azo $10^6$	27,08 b	31,94 b	36,81 ab	38,91 ab	36,16 ab	28,16 ab
Rhizo + Brady $10^6$	27,03 bc	30,90 b	37,00 ab	38,47 ab	34,01 bc	19,56 b
Rhizo + Azo $10^8$	27,76 b	30,68 b	37,84 a	38,38 ab	34,74 ab	27,57 ab
Rhizo + Brady $10^8$	26,44 bc	31,99 b	36,46 ab	38,08 ab	34,80 ab	22,33 ab
Test. absoluta	26,81 bc	31,00 b	35,49 b	36,78 d	32,21 d	25,07 ab
Test. nitrogenada	29,70 a	36,42 a	37,91 a	36,78 cd	33,19 cd	23,65 ab
Test. - <i>R. tropici</i>	27,55 b	31,17 b	37,68 ab	39,69 a	36,66 a	28,05 ab
Rhizo + AZOTOTAL <sup>®</sup>	25,53 c	31,31 b	36,04 ab	37,64 bc	34,63 ab	21,53 ab
C.V. (%)	7,07	9,44	7,36	5,94	8,35	31,34

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

Na tabela 20 está apresentada a variação temporal do ICF para os teores de clorofila b. Na quarta semana da avaliação (28 DAP), os tratamentos co-inoculados, excetuando AZOTOTAL<sup>®</sup>, se igualaram às testemunhas rizobiana e adubada com N mineral. Posteriormente, nas medições de ICF entre 35 e 42 DAP os tratamentos co-inoculados com *B. diazoefficiens* e *A. brasilense* foram significativamente superiores à testemunha nitrogenada. Somente na última avaliação (49 DAP), com a queda do índice de clorofila, os tratamentos equipararam-se.

**Tabela 20.** Variação temporal do Índice de Clorofila Falker para os teores de clorofila b em folhas de feijoeiro co-inoculado com rizóbio (*R. tropici* = Rhizo) e bactérias promotoras de crescimento vegetal (*A. brasilense* = Azo e *B. diazoefficiens* = Brady) sob três doses de aplicação ( $10^4$ ,  $10^6$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>).

Tratamento	Dias após a semeadura					
	14	21	28	35	42	49
Rhizo + Azo $10^4$	4,51 b	5,30 b	8,78 ab	9,30 ab	7,53 ab	5,42 a
Rhizo + Brady $10^4$	5,08 ab	5,34 b	9,33 a	9,36 ab	8,05 a	4,75 ab
Rhizo + Azo $10^6$	4,59 b	6,77 ab	8,69 ab	9,25 ab	7,71 ab	4,65 ab
Rhizo + Brady $10^6$	4,66 b	5,54 b	8,68 ab	8,75 bc	7,05 ab	3,13 b
Rhizo + Azo $10^8$	4,88 ab	5,42 b	8,95 ab	8,90 ab	7,45 ab	4,55 ab
Rhizo + Brady $10^8$	4,56 b	7,47 ab	8,52 ab	8,61 bc	7,30 ab	3,22 b
Test. absoluta	4,51 b	5,68 b	8,56 ab	7,84 c	6,06 d	3,96 ab
Test. nitrogenada	5,44 a	8,28 a	9,50 a	7,98 c	6,34 cd	3,47 b
Test. - <i>R. tropici</i>	4,88 ab	5,60 b	9,56 a	9,93 a	8,03 a	4,67 ab
Rhizo + AZOTOTAL®	4,36 b	5,62 b	8,08 b	8,49 bc	6,97 bc	3,45 b
C.V. (%)	20,12	52,01	16,25	15,51	17,30	41,10

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

Durante o período de avaliação, mesmo não havendo uma superioridade da testemunha rizobiana quanto ao ICF da clorofila total, suas médias mínima e máxima foram superiores às aquelas apresentadas pelos demais tratamentos (Tabela 21). Nas sete semanas avaliadas, as leituras do clorofilômetro variaram entre 32,43 e 49,63 para o tratamento inoculado apenas com *R. tropici*, e 27,12 e 47,42 no adubado com N mineral.

A variação de ICF seguiu um padrão específico, observando-se aumento dos valores de todos os tratamentos até a quarta semana (28 DAP). A partir da avaliação seguinte, o ICF da testemunha nitrogenada decresce, de forma contrária aos demais, tornando-se significativamente diferente da testemunha rizobiana. Somente na sexta semana de crescimento (42 DAP), todos os tratamentos registraram diminuição simultânea do ICF, resultado este repetido na última época de avaliação (49 DAP). A testemunha absoluta somente diferiu da inoculação conjunta na sexta semana de avaliação (42 DAP).



**Tabela 21.** Variação temporal do Índice de Clorofila Falker para os teores de clorofila total em folhas de feijoeiro co-inoculado com rizóbio (*R. tropici* = Rhizo) e bactérias promotoras de crescimento vegetal (*A. brasilense* = Azo e *B. diazoefficiens* = Brady) sob três doses de aplicação ( $10^4$ ,  $10^6$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>).

Tratamento	Dias após a semeadura					
	14	21	28	35	42	49
Rhizo + Azo $10^4$	31,15 bc	35,70 b	45,71 a	47,93 ab	42,36 ab	34,50 a
Rhizo + Brady $10^4$	32,00 bc	35,68 b	46,90 a	48,53 ab	44,15 ab	31,61 ab
Rhizo + Azo $10^6$	31,67 bc	38,71 b	45,51 a	48,16 ab	43,88 ab	32,81 ab
Rhizo + Brady $10^6$	31,70 bc	36,44 b	45,68 a	47,22 ab	41,07 bc	22,70 b
Rhizo + Azo $10^8$	32,65 b	36,10 b	46,80 a	47,29 ab	42,19 ab	32,12 ab
Rhizo + Brady $10^8$	31,01 bc	39,46 b	44,98 a	46,70 ab	42,10 ab	25,56 ab
Test. absoluta	31,33 bc	36,69 b	44,05 a	44,62 b	38,28 d	29,03 ab
Test. nitrogenada	35,00 a	44,71 a	47,42 a	45,08 b	39,53 cd	27,12 ab
Test. - <i>R. tropici</i>	32,43 b	36,78 b	47,24 a	49,63 a	44,70 a	32,72 ab
Rhizo + AZOTOTAL®	29,90 c	36,93 b	44,13 a	46,13 ab	41,61 ab	24,98 ab
C.V. (%)	8,19	15,62	9,02	7,35	9,60	32,40

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

## 4.6 DISCUSSÃO

O incremento significativo em termos de biomassa promovido pela co-inoculação de *R. tropici* com *A. brasilense* e *B. diazoefficiens* é resultado da ação sinérgica das bactérias sobre as plantas. É amplamente aceito que a promoção do crescimento de plantas por PGPBs não depende de um mecanismo único, mas é o resultado líquido de múltiplos mecanismos (PRAKAMHANG et al., 2015), podendo resultar em aumento significativo de biomassa e rendimento da cultura. Este estudo demonstrou a eficácia da co-inoculação, que foi capaz de igualar a massa de folhas, caule e de vagens aos resultados obtidos pelas plantas sob adubação nitrogenada mineral e de forma superior aos das plantas apenas inoculadas com rizóbio.

O aumento na produção de matéria seca do feijoeiro em função da co-inoculação tem sido descrito em diversos estudos realizados em diferentes condições edafoclimáticas (STAJKOVIC et al., 2011; SAMAVAT et al., 2012; AAMIR et al., 2013; HUNGRIA et al., 2013; MISHRA et al., 2014). Este maior crescimento em termos de biomassa das plantas co-inoculadas é constantemente atribuído à produção de fitormônios pelos promotores de crescimento, entretanto, outros fatores como fixação de nitrogênio, supressão de patógenos e solubilização de nutrientes são frequentemente citados. Mais especificamente, alguns resultados experimentais relacionaram a potencial elevação de biomassa do feijoeiro sob inoculação de PGPBs com a produção de auxinas (REMANS et al., 2008), aumento da atividade da nitrogenase e do conteúdo de leghemoglobina (FIGUEIREDO et al., 2007), antagonismo em relação a patógenos (PEIX et al., 2001), solubilização de fósforo (STAJKOVIC et al., 2011), potássio e zinco (KUMAR et al., 2012) e redução dos efeitos negativos causados por estresse (DARDANELLI et al., 2008).

O efeito proporcionado pela inoculação das PGPBs é de pequena magnitude. No entanto, sob co-inoculação, pode promover a elevação da biomassa dos tratamentos de forma equiparada ao resultado obtido pela adubação nitrogenada mineral, mesmo que alguns tratamentos não apresentem diferença significativa da inoculação somente com *R. tropici*, como demonstram os resultados obtidos para massa de folhas e de vagens. Desta forma, considerando a baixa resposta da inoculação do feijoeiro em termos de simbiose para fornecimento de nitrogênio, a inoculação conjunta pode representar uma estratégia eficaz para elevar-se a produção de biomassa aos níveis alcançados pela aplicação dos fertilizantes de alta solubilidade, especialmente nas áreas de cultivo anterior e com elevada população de rizóbio nativo.

Mesmo havendo clara tendência de que a dupla inoculação aumente a biomassa total, alguns tratamentos não resultaram neste efeito de forma significativamente diferente do controle. Observou-se que houve uma resposta padrão das co-inoculações que elevaram de forma significativa o acúmulo de biomassa total acima do obtido pela testemunha apenas inoculada com *R. tropici*; as que atingiram este resultado corresponderam as aplicações de elevadas doses do promotor de crescimento, *B. diazoefficiens* ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) e AZOTOTAL® ( $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>), acrescentando-se ainda o fato de que *A. brasilense* ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) obteve massa seca mais elevada que nas demais doses, mesmo não sendo significativamente diferente do controle rizobiano. Este cenário revela que, possivelmente, as doses mais baixas não foram suficientemente eficazes para o estabelecimento de populações efetivas dos inóculos no solo, capazes de concorrer com a comunidade microbiana nativa.

Sob condições não estéreis, é necessária uma elevada capacidade competitiva com as populações indígenas do solo (BIRÓ et al., 2000) e, no caso da co-inoculação, com as demais estirpes aplicadas. Peters & Alexander et al. (1966) observaram que a população de *B. diazoefficiens* se multiplica rapidamente no solo quando outras bactérias são suprimidas, mas

não quando outros gêneros bacterianos não são inibidos. De maneira semelhante, Bacilio-Jiménez et al. (2001) relataram que no rizoplano de arroz houve a exclusão do *A. brasilense* inoculado em função da competição com *Corynebacterium flavescens* e *Bacillus pumilus*. Estas falhas podem refletir a incapacidade das estirpes inoculantes para colonizar a rizosfera efetivamente ou competir agressivamente com bactérias nodulantes indígenas para sítios de nodulação (FUHRMANN & WOLLUM, 1989), sugerindo que a aplicação de doses elevadas do inoculante, como observado no presente estudo, proporcionariam que a estirpe se tornasse mais competitiva no solo e, conseqüentemente, mais eficiente para a promoção de crescimento.

No tocante aos aspectos produtivos, as co-inoculações de *B. diazoefficiens* e *A. brasilense* foram capazes de elevar o número de vagens acima do controle com rizóbio. Este resultado é concordante com o encontrado por Yadegari et al. (2008) que, estudando o efeito da inoculação de *R. tropici* associada a *Pseudomonas fluorescens* e *Azospirillum lipoferum* em feijoeiro, observaram aumento significativo do número de vagens nos tratamentos co-inoculados. De maneira semelhante, Rokhzadi et al. (2008) relataram aumento deste componente pela co-inoculação em grão de bico, atribuindo-o aos efeitos cumulativos do reforço no fornecimento de N e P para as plantas e produção de substâncias indutoras de crescimento pelos microrganismos.

Acredita-se que o feijoeiro seja um pobre fixador de nitrogênio, devido às características genéticas dos parceiros simbióticos (YADEGARI & RAHMANI, 2010), o que tem resultado em esforços crescentes na avaliação das respostas de novas estirpes para fixação biológica de nitrogênio e de sua dinâmica na interação com a cultura. Uma questão importante relativa às bactérias fixadoras de N associativas e endofíticas é se elas contribuem diretamente com N fixado para a planta (CARVALHO et al., 2014). O modo de transferência do nitrogênio fixado, transferido diretamente desde a atmosfera na forma de nitrogênio molecular ou indiretamente, através da morte e mineralização, é desconhecido (HUREC et al., 2002; INIGUEZ et al., 2004), no entanto, em contraste com a fixação simbiótica de N<sub>2</sub>, onde existe transferência direta de N através da interface simbiótica, é evidente que as bactérias diazotróficas associadas ao sistema radicular parecem não ser capazes de liberar prontamente o N para a planta hospedeira (LETHBRIDGE & DAVIDSON, 1983). Este cenário pode explicar a reduzida, porém significativa contribuição das PGPBs para o acúmulo de N nos tecidos das plantas.

Samavat et al. (2012) relataram que a interação de feijoeiro co-inoculado com *Rhizobium* e *Pseudomonas fluorescens*, resultou em incremento significativo no teor e conteúdo de N e atividade da nitrogenase, comparativamente às inoculações isoladas. Esta possível elevação na oferta de N para as plantas proporcionada pelas PGPBs, trata-se de uma das hipóteses que poderiam explicar, em parte, os efeitos positivos da co-inoculação sobre o crescimento das plantas. Neste experimento, observou-se que a inoculação simultânea de rizóbio e promotores de crescimento foi capaz de elevar o conteúdo de N na parte aérea, não sendo detectada diferença significativa destes em relação aos controles adubado com N mineral e inoculado com *R. tropici*, corroborando a tese de que a técnica seja efetiva, porém, que este efeito seja de pequena magnitude. Os resultados mais expressivos dos tratamentos co-inoculados dentre as doses avaliadas resultaram em um acúmulo de N 9,23% superior ao controle rizobiano para *A. brasilense*, 11,45% para *B. diazoefficiens* e 12% para AZOTOTAL®.

Yadegari & Rahmani (2010) observaram que a co-inoculação de rizóbio e PGPBs promoveu aumento significativo no rendimento e componentes de produção do feijoeiro. Resultados semelhantes foram observados em outras leguminosas. Em grão de bico, por exemplo, Rai (1983) verificou aumento no rendimento de grãos sob co-inoculação de

*Rhizobium* e *A. brasilense*. Da mesma forma, na cultura da soja, foi relatado que a associação de *B. diazoefficiens* e PGPBs aumentou a produtividade de grãos (HUNGRIA et al., 2013).

Estes aumentos observados nos componentes de produção, resultantes da combinação sinérgica da fixação biológica de nitrogênio pelo rizóbio associado aos diversos efeitos das PGPBs, demonstram a efetiva contribuição dos promotores de crescimento para incrementar a produção das culturas, e podem explicar os resultados obtidos neste experimento. A massa de grãos foi 8,3% superior à testemunha rizobiana em função da co-inoculação com *A. brasilense* ( $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>) e 6,1% para *B. diazoefficiens* ( $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>). A inoculação apenas com *R. tropici* resultou nas menores médias dentre os tratamentos avaliados para número de grãos e de vagens. O incremento equivalente a 15 grãos por planta (10,8%) apresentado pela dupla inoculação com *A. brasilense* ( $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>) e de 4 vagens por planta (13,9%) para *B. diazoefficiens* ( $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>), quando comparado ao controle rizobiano, confirmam a potencialidade da técnica de co-inoculação. Acrescenta-se o fato da co-inoculação com o produto comercial AZOTOTAL<sup>®</sup> apresentar resultados inferiores ou não diferentes dos materiais testados, o que indica o potencial destes isolados para a promoção de crescimento do feijoeiro.

Rajendran et al. (2008), em estudo realizado com a co-inoculação de *Rhizobium* spp. e *Bacillus* strains, demonstraram que a inoculação conjunta é capaz de proporcionar aumento significativo do teor de clorofila do feijão guandu. Resultados similares foram obtidos pela associação de diversos microrganismos nas culturas do tomate (SINGH et al., 2012), milho (ROJAS-TAPIAS et al., 2014) e amora (BAQUAL et al., 2005). Em termos de índice de clorofila, neste experimento verificou-se que a co-inoculação de *R. tropici* com *A. brasilense* ou *B. diazoefficiens* foi capaz de proporcionar valores equiparáveis aos obtidos pela adubação nitrogenada mineral, não obstante, inferiores ao da inoculação exclusiva de *R. tropici*. Este resultado está de acordo com o encontrado por Corsini (2014), onde a testemunha rizobiana registrou o maior índice de clorofila foliar comparativamente aos demais tratamentos, nas condições de ausência de adubação nitrogenada e sob aplicação de 60 kg N ha<sup>-1</sup>.

## 4.7 CONCLUSÕES

As co-inoculações de *R. tropici* com *A. brasilense*, *B. diazoefficiens* e AZOTOTAL<sup>®</sup> igualaram a massa de folhas, caule e vagens aos resultados obtidos pelas plantas adubadas com N mineral, superando a testemunha exclusivamente inoculada com *R. tropici*.

As co-inoculações com *B. diazoefficiens* e AZOTOTAL<sup>®</sup> elevaram a biomassa total das plantas de forma significativamente superior à inoculação com *R. tropici*.

As co-inoculações com *A. brasilense*, *B. diazoefficiens* e AZOTOTAL<sup>®</sup> elevaram o conteúdo de N na parte aérea.

As co-inoculações com *B. diazoefficiens* e *A. brasilense* elevaram a massa de grãos e, juntamente a AZOTOTAL<sup>®</sup>, o número de vagens acima do controle exclusivamente inoculado com *R. tropici*.

A inoculação apenas com *R. tropici* resultou nas menores médias para número de grãos e de vagens.

Em termos de índice de clorofila, as co-inoculações com *A. brasilense* e *B. diazoefficiens* proporcionaram incrementos equiparáveis aos obtidos pela adubação nitrogenada mineral, não obstante, inferiores ao da inoculação exclusiva de *R. tropici*.

## 5 CAPÍTULO III

### **CO-INOCULAÇÃO DE *Rhizobium tropici* e *Azospirillum brasilense* EM FEIJOEIRO SUBMETIDO À ADUBAÇÃO NITROGENADA MINERAL**

## 5.1 RESUMO

O desenvolvimento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) está relacionado ao manejo e fontes de nitrogênio (mineral ou biológica) para a nutrição das plantas, podendo ser impulsionado pela inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal. Objetivando-se avaliar o desenvolvimento vegetativo e produção do feijoeiro comum em função de diferentes estratégias de adubação nitrogenada mineral associada à co-inoculação com *Rhizobium tropici* e *Azospirillum brasilense*, conduziu-se um experimento em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia, em Seropédica, RJ. O experimento foi realizado em vasos com 12 kg de terra provenientes do horizonte A de um Planossolo Háplico, em delineamento em blocos ao acaso com quatro repetições. Para avaliação do crescimento vegetativo, foram adotados sete tratamentos: testemunha absoluta; inoculação com *R. tropici* e ausência de aplicação de N; testemunha nitrogenada (aplicação de 20 kg ha<sup>-1</sup> de N na sementeira); co-inoculação com *R. tropici* e *A. brasilense* e ausência de adubação nitrogenada; co-inoculação com *R. tropici* e *A. brasilense* e 20 kg ha<sup>-1</sup> de N em sementeira; inoculação com *R. tropici* e 20 kg ha<sup>-1</sup> de N em sementeira; inoculação com *A. brasilense* e 20 kg ha<sup>-1</sup> de N em sementeira. As plantas foram coletadas aos 45 dias após plantio (DAP) e separadas em folhas, caule, vagens, raiz e nódulos; posteriormente foram secas e pesadas, sendo determinado o teor de N da parte aérea. Para avaliação do desempenho produtivo, foram acrescentados três tratamentos: co-inoculação com *R. tropici* e *A. brasilense* e aplicação de 20 kg ha<sup>-1</sup> de N em sementeira e 20 kg ha<sup>-1</sup> de N 45 DAP (dias após o plantio); inoculação com *R. tropici* e aplicação de 20 kg ha<sup>-1</sup> de N em sementeira e 20 kg ha<sup>-1</sup> de N 45 DAP; inoculação com *A. brasilense* e aplicação de 20 kg ha<sup>-1</sup> de N em sementeira e 20 kg ha<sup>-1</sup> de N 45 DAP. As plantas foram coletadas após a senescência (76 DAP), o material foi separado em vagens e grãos, e determinado o teor de N e os componentes de produção. Entre a segunda e a sexta semana de crescimento, foi determinado o índice de clorofila Falker através de clorofilômetro portátil. A co-inoculação combinada com a adubação nitrogenada mineral resultou em maiores valores de massa de folhas, massa de caule, massa de parte aérea, massa total, massa seca de grãos, número de grãos por planta e acúmulo de N nas vagens e grãos. A co-inoculação como estratégia para oferta exclusiva de N ou sua associação à suplementação nitrogenada mineral apenas no plantio ou em cobertura não se mostraram eficazes com relação aos componentes de produção. A adubação nitrogenada mineral aumentou o número de vagens e de grãos por planta quando associada à inoculação de *A. brasilense*, assim como a massa de folhas, caule, vagens, parte aérea e o acúmulo de N na folha e na parte aérea quando associada à co-inoculação de *R. tropici* e *A. brasilense*.

**Palavras-chave:** *Phaseolus vulgaris*. Co-inoculação. Manejo do nitrogênio.

## 5.2 ABSTRACT

The development of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is related to the management and sources of nitrogen (mineral or organic) for plant nutrition, which can be driven by the inoculation of bacteria that promote plant growth. Aiming to evaluate the vegetative development and production of common bean due to different strategies of mineral nitrogen fertilization associated with co-inoculation with *R. tropici* and *A. brasilense*, an experiment was conducted in greenhouse at Embrapa Agrobiologia, in Seropédica, RJ. The experiment was conducted in pots with 12 kg ground from the horizon of a Haplic Planosol, in randomized block design with four replications. To evaluate the vegetative growth, seven treatments were used: absolute control; inoculation with *Rhizobium tropici* and absence of N application; nitrogen control (application of 20 kg ha<sup>-1</sup> of N at sowing); co-inoculation with *Rhizobium tropici* and *Azospirillum brasilense* and absence of nitrogen fertilization; co-inoculation with *Rhizobium tropici* and *Azospirillum brasilense* and 20 kg ha<sup>-1</sup> of N at sowing; inoculation with *Rhizobium tropici* and 20 kg ha<sup>-1</sup> of N at sowing; inoculation with *Azospirillum brasilense* and 20 kg ha<sup>-1</sup> N at sowing. Plants were harvested at 45 days after planting (DAP), separated into leaves, stems, pods, roots and nodules, dried and weighed, and the shoot N content was determined. To evaluate the productive performance, three treatments were added: co-inoculation with *Rhizobium tropici* and *Azospirillum brasilense* and application of 20 kg ha<sup>-1</sup> of N at sowing and 20 kg ha<sup>-1</sup> of N 45 DAP (days after sowing); inoculation of *Rhizobium tropici* and application of 20 kg ha<sup>-1</sup> N at sowing and 20 kg ha<sup>-1</sup> N 45 DAP; inoculation with *Azospirillum brasilense* and application of 20 kg ha<sup>-1</sup> N at sowing and 20 kg ha<sup>-1</sup> N 45 DAP. Plants were harvested after senescence (76 DAP), separated in pods and grains, and N content and yield components were determined. In the period between the second and sixth weeks of growth, Falker chlorophyll content was determined through chlorophyll. Co-inoculation combined with the mineral N fertilization resulted in higher values of mass of leaves, stem and shoot, dry mass of grains, number of grains per plant and accumulation of N in pods and grains. Co-inoculation as a strategy for the exclusive N supply or its association with mineral N fertilization only at sowing or coverage were not effective with respect to yield components. The mineral N fertilization increased the number of pods and grains per plant when associated with inoculation of *A. brasilense* as well as the mass of leaves, stems, pods, shoot and N accumulation in leaf and shoot when associated with co-inoculation of *R. tropici* and *A. brasilense*.

**Keywords:** *Phaseolus vulgaris*. Co-inoculation. Nitrogen management.



### 5.3 INTRODUÇÃO

Na última década, a utilização integrada de produtos químicos e biofertilizantes para aumentar a produtividade das culturas e melhorar a fertilidade do solo visando a produção agrícola sustentável ganhou importância (YASARI et al., 2009). Neste contexto, tem sido testada a utilização de fertilizantes nitrogenados de alta solubilidade de forma associada à inoculação de estirpes bacterianas tolerantes ao N mineral. Na cultura do feijoeiro, por exemplo, diversos resultados experimentais relataram tentativas de integrar-se a adubação nitrogenada mineral com a inoculação de *Rhizobium tropici* (CARVALHO, 2002; PELEGRIN et al., 2009; BARROS et al., 2013) e *Azospirillum brasilense* (GITTI et al., 2012; SABUNDJIAN et al., 2014), porém, como um manejo incorporado à co-inoculação destas bactérias, estudos mais aprofundados ainda são necessários.

Algumas bactérias promotoras de crescimento vegetal que estimulam associações leguminosas-rizóbios parecem influenciar mais diretamente o desenvolvimento das simbioses (VESSEY, 2003). Quando co-inoculado com *Rhizobium*, *Azospirillum* estimula a formação de células epidérmicas, que se tornam células ciliadas nas raízes infectadas, ou cria locais de infecção adicionais que são posteriormente ocupados por rizóbios (PLAZINSKI & ROLFE 1985; CHEBOTAR et al., 1998), contribuindo para a otimização da interação da planta com o simbionte introduzido. Os efeitos da inoculação com *Azospirillum* têm recebido atenção crescente nos últimos anos, sendo os resultados positivos da inoculação combinada com bactérias do gênero *Rhizobium* descritos em várias leguminosas (BURDMAN et al., 1998) sobre a produção de matéria seca, produtividade de grãos e teor de N em comparação com a inoculação exclusiva de rizóbio (BURDMAN et al., 1998; GONZALEZ, 2006; BENINTENDE et al., 2010).

O grande desafio que se apresenta para a cultura do feijão é conseguir um manejo adequado dessa simbiose, visando aumentar a eficiência do sistema de fixação de nitrogênio (CASSINI & FRANCO, 2013). No feijoeiro comum, têm sido reportadas contribuições relevantes da FBN em condições de campo, como valores de N<sub>2</sub> fixado atingindo 90 kg ha<sup>-1</sup> de N, correspondente a 50 % do N acumulado na maturação (WESTERMANN et al., 1981). No entanto, a quantidade fornecida por esse processo normalmente é insuficiente, necessitando ser complementada, por meio da adubação mineral (BINOTTI et al., 2007). A maioria dos solos em que as leguminosas são comumente cultivadas contém população nativa de rizóbios (GRAHAM, 1981; RENNIE & KEMP, 1983; MOXLEY et al., 1986; LOVATO et al., 1991; PERES et al., 1994), ineficiente na maioria das vezes, mas bem adaptada às condições edáficas locais (FONSECA, 2011). Esta população pode, por meio da competitividade de sítios de nodulação, interferir na ocupação nodular das estirpes inoculadas (MEDEIROS et al., 2009), reduzindo a eficiência do processo e, conseqüentemente, a oferta de N para a planta. Sob estas circunstâncias, os ensaios de inoculação devem enfatizar não apenas as vantagens de inoculação do feijoeiro, mas também da combinação com a prática de fertilização com N (ARGAW & AKUMA, 2015), considerando-se que a utilização exclusiva de inoculantes com *R. tropici* pode não atender à demanda da cultura por este nutriente.

Teores muito baixos de nitrato no solo podem ser limitantes à atividade simbiótica (FRANCO & DÖBEREINER, 1968; RUSCHEL & SAITO, 1977; FERREIRA et al., 2000). Isto ocorre porque, no feijoeiro nodulado, normalmente há um período de estresse de N entre 15 e 20 dias após a emergência, devido a uma falta de sincronização entre o esgotamento de N nos cotilédones e o início de fixação de N<sub>2</sub> e seu transporte (HUNGRIA et al., 1991). Assim, é necessário que haja disponibilidade de N combinado para o crescimento do rizóbio até o início da fixação de N<sub>2</sub> (SPRENT & SPRENT, 1990), de forma a evitar que a planta passe por

estado de carência (BRITO et al., 2011), favorecendo o estabelecimento inicial da nodulação na planta, talvez como uma fonte adicional de nitrogênio (BECANA & SPRENT, 1987).

A apropriação destes atributos fisiológicos, de forma integrada àqueles oriundos da inoculação de *A. brasilense* e *R. tropici*, pode resultar em uma estratégia eficaz para a nutrição nitrogenada da cultura. Isto permitiria que a planta, de forma sinérgica, se favorecesse dos efeitos oriundos da promoção de crescimento, fixação biológica de nitrogênio e adubação mineral. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho, foi avaliar o efeito da co-inoculação de *Rhizobium tropici* e *Azospirillum brasilense* associado a diferentes manejos da adubação nitrogenada mineral sobre o desenvolvimento e produção do feijoeiro comum.

## 5.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.4.1 Condições experimentais

O experimento em vasos com solo foi montado em delineamento experimental de blocos casualizados. Para avaliação do crescimento vegetativo, foram adotados sete tratamentos com quatro repetições: T1 - testemunha absoluta; T2 - inoculação de *Rhizobium tropici*; T3 - aplicação de 20 kg ha<sup>-1</sup> de N na semeadura; T4 - co-inoculação de *R. tropici* e *Azospirillum brasilense*; T5 - co-inoculação de *R. tropici* e *A. brasilense* e aplicação de 20 kg ha<sup>-1</sup> de N em semeadura; T6 - inoculação de *R. tropici* e aplicação de 20 kg ha<sup>-1</sup> de N em semeadura; T7 - inoculação de *A. brasilense* e aplicação de 20 kg ha<sup>-1</sup> de N em semeadura. Para o desempenho produtivo, foram adotados dez tratamentos com quatro repetições: T1 - testemunha absoluta; T2 - inoculação de *R. tropici*; T3 - aplicação de 20 kg ha<sup>-1</sup> de N na semeadura; T4 - aplicação de 20 kg ha<sup>-1</sup> de N na semeadura e 20 kg ha<sup>-1</sup> de N 45 dias após o plantio (DAP); T5 - co-inoculação de *R. tropici* e *A. brasilense*; T6 - co-inoculação de *R. tropici* e *A. brasilense* e aplicação de 20 kg ha<sup>-1</sup> de N na semeadura; T7 - co-inoculação de *R. tropici* e *A. brasilense* e aplicação de 20 kg ha<sup>-1</sup> de N 45 DAP; T8 - co-inoculação de *R. tropici* e *A. brasilense* e aplicação de 20 kg ha<sup>-1</sup> de N na semeadura e 20 kg ha<sup>-1</sup> de N 45 DAP; T9 - inoculação de *R. tropici* e aplicação de 20 kg ha<sup>-1</sup> de N na semeadura e 20 kg ha<sup>-1</sup> de N 45 DAP; T10 - inoculação de *A. brasilense* e aplicação de 20 kg ha<sup>-1</sup> de N na semeadura e 20 kg ha<sup>-1</sup> de N 45 DAP.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia, entre os meses de outubro a dezembro de 2014, em conformidade às exigências do Protocolo Oficial para Avaliação da Viabilidade e Eficiência Agronômica de Cepas, Inoculantes e Tecnologias Relacionados ao Processo de Fixação Biológica do Nitrogênio em Leguminosas (BRASIL, 2011).

Os vasos foram preenchidos com 12 kg terra proveniente do horizonte A de um Planossolo Háptico oriundo da área experimental da Embrapa Agrobiologia, peneirado em malha de 4 mm. A análise química de fertilidade do solo foi realizada segundo a metodologia descrita pela Embrapa (1997), no Laboratório de Química Agrícola da Embrapa Agrobiologia e mostrou os seguintes valores: pH em água de 5,04; MO de 68,0 g kg<sup>-1</sup>; P de 4,61 g kg<sup>-1</sup>; Al<sup>3+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> de 0,18; 0,74 e 0,40 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>. Os vasos foram incubados por um período de 45 dias, através da adição de 36 g (3,0 g kg<sup>-1</sup> de solo) de palha de milho triturada em desintegrador, de forma a imobilizar o N.

Após o período de incubação, em cada vaso foi realizada a calagem com a aplicação e posterior homogeneização de 7 g de CaCO<sub>3</sub> para a neutralização do Al<sup>3+</sup> tóxico e fornecimento de Ca<sup>2+</sup>. Quinze dias após a calagem, todos os vasos foram adubados com soluções de nutrientes nas seguintes doses: 10 mg kg<sup>-1</sup> de Mg, como MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 2 mg kg<sup>-1</sup> de Cu, como CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O; 1 mg kg<sup>-1</sup> de Zn, como ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,1 mg kg<sup>-1</sup> de B, como H<sub>2</sub>BO<sub>3</sub>; 0,2 mg kg<sup>-1</sup> de Mo, como Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 1 mg kg<sup>-1</sup> de Fe, como Fe-EDTA, 80 mg kg<sup>-1</sup> de P, na forma de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Por sua vez, os vasos sob adubação nitrogenada receberam 20 kg ha<sup>-1</sup> de N (plantio) e 20 kg ha<sup>-1</sup> N 45 DAP, como CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>. Posteriormente, todos os vasos foram homogeneizados por revolvimento do solo.

As estirpes utilizadas foram CIAT 899 (BR 322) de *Rhizobium tropici* e Sp 245 (BR 11.005) de *Azospirillum brasilense*, pertencentes à Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia. A estirpe de CIAT 899 foi crescida em meio TY (DÖBEREINER et al., 1999) por três dias sob agitação e a estirpe Sp 245 em meio DYGS (Döbereiner et al., 1999) com pH 6,8 por 4 dias sob agitação. O ajuste da concentração de células bacterianas foi previamente determinado segundo a relação entre a densidade ótica (DO) em espectrofotômetro a 600 nm

e o número de unidades formadoras de colônia (UFC), de forma a estabelecer a DO correspondente a  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>.



**Figura 7.** Visão geral do experimento aos 45 dias após plantio. Rennan Bastos (2014).



**Figura 8.** Visão geral do experimento aos 74 dias após plantio. Rennan Bastos (2014).

A cultivar de feijoeiro utilizada foi a Pérola. As sementes foram desinfetadas por 30 segundos em álcool 96° e 2 minutos em peróxido de hidrogênio (30%), seguidos por dez lavagens em água destilada autoclavada. A sementeira foi realizada em 19 de setembro de 2014. Foram semeadas quatro sementes por vaso com posterior desbaste para duas plantas aos 7 dias após a emergência das plântulas.



No momento do plantio, cada semente foi inoculada com 1 mL do inoculante de *R. tropici* e 1 mL de *A. brasilense*, ambas na concentração equivalente a  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Todas as sementes foram posteriormente cobertas com uma camada de aproximadamente 1 cm de terra.

#### 5.4.2 Coletas e determinações

Foram efetuadas duas coletas, a primeira aos 45 dias após o plantio (DAP), no estágio R7 (início de formação das vagens), e a segunda no final do ciclo da cultura (após a senescência das plantas, com a maturação dos grãos); para cada coleta utilizaram-se quatro repetições de cada tratamento. Na primeira coleta, a parte aérea foi dividida em folhas, caule e vagens. As vagens foram contadas e, posteriormente, juntamente às demais partes, acondicionadas separadamente em sacos de papel e postas a secar em estufa de circulação forçada a 65 °C até atingirem massa constante e pesadas para determinação do peso de matéria seca. As amostras da parte aérea foram moídas e submetidas à digestão sulfúrica para a determinação dos teores de N pelo método semimicro Kjeldahl, segundo Malavolta et al. (1997); o conteúdo de N foi obtido pelo produto entre a biomassa e o teor de N.

O sistema radicular foi lavado e recuperado juntamente aos nódulos desprendidos com auxílio de peneira de malha de 2 mm; ambos foram posteriormente acondicionados em frascos de vidro hermeticamente fechados e reservados em geladeira para que se procedesse à contagem do número de nódulos. Em seguida, os nódulos foram destacados e contados e, juntamente as raízes, secos em estufa de circulação forçada a 65 °C até atingirem peso constante para a determinação da massa seca.

No período compreendido entre a segunda e a sétima semana de crescimento, foram quantificados os índices de clorofila (a, b e total) expressos em unidade pelo Índice de Clorofila Falker através de clorofilômetro portátil (ClorofiLOG CFL 1030 Falker, Porto Alegre, RS, Brasil), entre 8 e 10 horas da manhã, tomando-se para tal a segunda folha trifoliada completamente desenvolvida nas duas plantas do vaso.

A segunda coleta foi efetuada após a maturidade fisiológica, aos 76 DAP. As plantas foram cortadas rente ao solo, sendo as raízes recuperadas com auxílio de uma peneira e as vagens contadas e trilhadas manualmente para a separação, contagem e pesagem dos grãos. Cada parte vegetal foi seca em estufa e pesada. Foram determinados os componentes de produção massa seca de grãos, número de vagens por planta, número de grãos por planta, número de grãos por vagem e massa de 100 grãos. Os grãos foram moídos e submetidos à digestão sulfúrica para a determinação dos teores de N pelo método semimicro Kjeldahl, segundo Malavolta et al. (1997); o conteúdo de N foi obtido pelo produto entre a biomassa e o teor de N.

#### 5.4.3 Análises estatísticas

Os dados de biomassa, nodulação, teor e conteúdo de N, índice de clorofila Falker e componentes de produção foram submetidos à análise de variância considerando-se um experimento em blocos ao acaso. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% por meio do programa de estatística ASSISTAT.

## 5.5 RESULTADOS

Aos 45 dias após o plantio (DAP), no estágio R7 (início de formação das vagens), os tratamentos que associaram a adubação nitrogenada mineral com a inoculação de *R. tropici* e co-inoculação foram os únicos que aumentaram a massa de folhas em relação à testemunha absoluta (Tabela 22). Em termos de massa seca de caule, não foi detectada diferença significativa entre as testemunhas absoluta e rizobiana, e os tratamentos que receberam adubação nitrogenada exclusivamente no plantio ou de forma associada à co-inoculação e inoculação com *R. tropici*, apresentaram valores superiores às testemunhas em questão. A co-inoculação associada à adubação nitrogenada de plantio resultou no maior peso de massa seca de caule aos 45 DAP, 8,54% superior à testemunha nitrogenada e 4,85% à inoculação com *R. tropici* associada à adubação nitrogenada, das quais não diferiu significativamente.

A adubação nitrogenada de forma conjunta à inoculação de *R. tropici*, *A. brasilense* ou sua co-inoculação proporcionou aumento significativo da massa de vagens em relação à testemunha absoluta e a co-inoculação (Tabela 22). O tratamento sob adubação nitrogenada mineral em plantio, assim como o inoculado exclusivamente com *R. tropici*, não diferiu da testemunha absoluta. Quanto à massa de matéria seca da parte aérea, a maior produção foi observada no tratamento sob co-inoculação e adubado com nitrogênio mineral, que apresentou resultado significativamente superior às testemunhas absoluta e inoculada com rizóbio e que, mesmo não diferindo da testemunha nitrogenada, promoveu um acréscimo de 10,29% (3,27 g planta<sup>-1</sup>) em relação a esta. De forma semelhante, o tratamento adubado e inoculado com *R. tropici* apresentou valores superiores às referidas testemunhas sem diferir da nitrogenada, entretanto, não foi significativamente superior à inoculação apenas com *A. brasilense* e adubação.

Houve aumento significativo na massa de raiz em função da aplicação conjunta de co-inoculação e adubação nitrogenada (Tabela 22), não obstante, a inoculação isolada de *R. tropici* associada à adubação mineral, assim como a testemunha absoluta, não apresentaram diferença significativa deste tratamento.

A co-inoculação associada à adubação nitrogenada proporcionou o maior incremento na massa de matéria seca total (41,71 g planta<sup>-1</sup>), sendo significativamente superior às testemunhas absoluta e inoculada com *R. tropici*, assim como ao tratamento co-inoculado. Mesmo não apresentando diferença significativa, foi capaz de promover aumentos de 12,27% e 4,82% em relação à testemunha nitrogenada e a inoculação com *R. tropici* associada à adubação mineral, respectivamente.

Os dados referentes à nodulação, não apresentaram diferenças significativas para o número de nódulos, massa de nódulos e massa de 1 nódulo (Tabela 23).

**Tabela 22.** Massa seca de folha, caule, vagens, parte aérea, raiz e total de feijoeiro co-inoculado com *R. tropici* e *A. brasilense* associado à adubação nitrogenada, aos 45 dias após a semeadura.

Tratamento	Massa de folha	Massa de caule	Massa de vagens	Massa de parte aérea	Massa de raiz	Massa total
Test. absoluta	12,45 b	9,96 b	3,37 b	25,78 d	5,44 ab	31,23 d
Test. - <i>R. tropici</i>	13,71 ab	10,06 b	3,67 ab	27,44 cd	5,19 b	32,64 cd
N - plantio	14,71 ab	12,53 a	4,25 ab	31,49 ab	5,10 b	36,59 ab
Co-inoculação	13,10 b	9,41 b	3,40 b	25,91 d	4,04 b	29,95 d
Co-inoculação + N plantio	15,83 a	13,60 a	5,33 a	34,76 a	6,94 a	41,71 a
<i>R. tropici</i> + N plantio	15,75 a	12,97 a	5,32 a	34,03 ab	5,66 ab	39,70 ab
<i>A. brasilense</i> + N plantio	13,65 ab	10,60 b	5,48 a	29,74 bc	5,10 b	34,84 bc
C. V. (%)	10,70	9,95	26,41	9,41	20,23	9,34

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

**Tabela 23.** Número de nódulos, massa seca de nódulos e massa seca de 1 nódulo de feijoeiro co-inoculado com *R. tropici* e *A. brasilense* associado à adubação nitrogenada, aos 45 dias após o plantio.

Tratamento	Número de nódulos — planta <sup>-1</sup> —	Massa de nódulos - mg planta <sup>-1</sup> -	Massa de 1 nódulo — mg —
Test. - <i>R. tropici</i>	101 ab	375 ab	3,62 ab
N - plantio	119 ab	444 ab	3,46 ab
Co-inoculação	119 ab	379 ab	3,29 ab
Co-inoculação + N plantio	153 a	509 ab	3,81 ab
<i>R. tropici</i> + N plantio	113 ab	267 b	2,46 b
<i>A. brasilense</i> + N plantio	140 ab	572 a	4,72 a
C.V. (%)	49,58	43,07	29,03

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

Com relação ao conteúdo de N na folha, apenas os tratamentos sob adubação nitrogenada mineral isolada ou de forma combinada com a co-inoculação ou inoculação de *R. tropici*, foram capazes de diferir significativamente da testemunha absoluta (Tabela 24). Em termos de acúmulo de N nas vagens, a co-inoculação associada à adubação nitrogenada mineral diferiu significativamente das testemunhas absoluta, inoculada com *R. tropici* e nitrogenada. A somatória da acumulação, expressa pelo conteúdo de N na parte aérea, demonstrou que apenas os tratamentos adubado com N mineral, de forma isolada ou combinada à co-inoculação ou inoculação de *R. tropici*, diferiram significativamente da testemunha absoluta. A co-inoculação de *R. tropici* e *A. brasilense* resultou em menor acúmulo de N na parte aérea, comparativamente à inoculação isolada de *R. tropici*.

**Tabela 24.** Teor e conteúdo de N na folha, caule e vagem de feijoeiro co-inoculado com *R. tropici* e *A. brasilense* associado à adubação nitrogenada, aos 45 dias após o plantio.

Tratamento	Teor de N na folha	Conteúdo de N na folha	Teor de N no caule	Conteúdo de N no caule	Teor de N na vagem	Conteúdo de N na vagem	Teor de N na parte aérea	Conteúdo de N na parte aérea
	mg g <sup>-1</sup>	mg planta <sup>-1</sup>	mg g <sup>-1</sup>	mg planta <sup>-1</sup>	mg g <sup>-1</sup>	mg planta <sup>-1</sup>	mg g <sup>-1</sup>	mg planta <sup>-1</sup>
Test. absoluta	36,9 b	464 b	19,2 ab	190 ab	33,9 b	111 c	90,1 a	766 b
Test. - <i>R. tropici</i>	39,3 ab	538 ab	22,6 a	234 a	37,1 ab	136 bc	99,1 a	909 ab
N - plantio	42,4 a	624 a	16,8 ab	210 ab	39,8 a	167 ab	99,1 a	1003 a
Co-inoculação	41,5 a	543 ab	13,2 b	124 b	37,4 ab	127 c	92,2 a	795 b
Co-inoculação + N plantio	39,3 ab	626 a	16,9 ab	228 a	38,7 ab	206 a	95,0 a	1060 a
<i>R. tropici</i> + N plantio	41,1 a	646 a	17,8 ab	231 a	36,9 ab	196 ab	95,9 a	1073 a
<i>A. brasilense</i> + N plantio	39,9 ab	546 ab	18,0 ab	190 ab	36,7 ab	199 ab	94,7 a	936 ab
C.V. (%)	6,25	12,43	26,20	28,88	9,19	24,01	5,72	11,95

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



Na massa seca de grãos, a co-inoculação sob associação à adubação nitrogenada mineral em plantio e cobertura, consistiu no único tratamento significativamente superior à testemunha absoluta (Tabela 25). O acréscimo correspondeu a 13,76% (8,1 g planta<sup>-1</sup>) em relação à testemunha nitrogenada e de 27,05% (16 g planta<sup>-1</sup>) à co-inoculação de *R. tropici* e *A. brasilense*. A estratégia de utilização da co-inoculação, como única fonte para oferta de N em plantio associada à adubação nitrogenada mineral em cobertura, não foi capaz de promover incremento de massa seca de grãos acima dos tratamentos co-inoculados de maneira isolada ou associados a diferentes manejos de adubação.

A adubação nitrogenada mineral de cobertura não promoveu aumento significativo no número de vagens, comparativamente ao tratamento que recebeu este adubo apenas no plantio (Tabela 25). Não houve diferença significativa entre os tratamentos co-inoculados que receberam adubação nitrogenada mineral apenas no plantio ou plantio e cobertura. A dupla inoculação de *R. tropici* e *A. brasilense* como estratégia para fornecimento inicial de N seguida de cobertura mineral, não foi significativamente diferente das testemunhas absoluta e inoculada com rizóbio. A inoculação de *A. brasilense* acrescida de adubação mineral em plantio e cobertura, promoveu a formação do maior número de vagens dentre os tratamentos avaliados - apenas uma vagem superior à co-inoculação associada a adubação nitrogenada em plantio e cobertura - e, mesmo não sendo significativamente diferente, proporcionou um acréscimo de 20,6% (7 vagens) em relação à testemunha inoculada com *R. tropici*, 11,7% (4 vagens) à testemunha nitrogenada e 14,7% (5 vagens) à combinação de rizóbio e adubação mineral.

Em termos de número de grãos por planta, somente a co-inoculação e a inoculação de *A. brasilense*, ambas associadas à adubação nitrogenada em plantio e cobertura, apresentaram resultado significativamente diferente da testemunha absoluta. Ambos produziram 124 grãos planta<sup>-1</sup> e este resultado representa um incremento de 12% (15 grãos) e 20,9% (26 grãos) em relação à adubação nitrogenada mineral e à co-inoculação, respectivamente.

A análise estatística dos dados revelou que as diferenças entre os tratamentos para número de grãos por vagem e massa de 100 grãos não foi significativa.

**Tabela 25.** Massa seca de grãos e componentes de produção de feijoeiro co-inoculado com *R. tropici* e *A. brasilense* associado à adubação nitrogenada.

Tratamento	Massa seca de grãos — g planta <sup>-1</sup> —	Número de vagens por planta	Número de grãos por planta	Número de grãos por vagem	Massa de 100 grãos —— g ——
Test. absoluta	39,01 b	24 c	91 b	3,94 ab	27,46 ab
Test. - <i>R. tropici</i>	46,43 ab	27 ab	103 ab	3,76 ab	27,57 ab
N - plantio	52,04 ab	31 ab	109 ab	3,40 b	29,67 ab
N (plantio e cobertura)	51,42 ab	30 ab	109 ab	3,69 ab	30,03 a
Co-inoculação	43,50 b	26 bc	98 b	3,74 ab	27,88 ab
Co-inoculação + N (plantio)	52,75 ab	33 a	112 ab	3,33 b	28,91 ab
Co-inoculação + N (cobertura)	48,98 ab	25 bc	110 ab	4,26 a	26,96 ab
Co-inoculação + N (plantio e cobertura)	59,93 a	33 a	124 a	3,70 ab	28,60 ab
<i>R. tropici</i> + N (plantio e cobertura)	44,32 b	29 ab	98 b	3,28 b	28,80 ab
<i>A. brasilense</i> + N (plantio e cobertura)	50,40 ab	34 a	124 a	3,70 ab	25,83 b
C.V. (%)	16,81	14,20	13,30	13,42	8,70

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

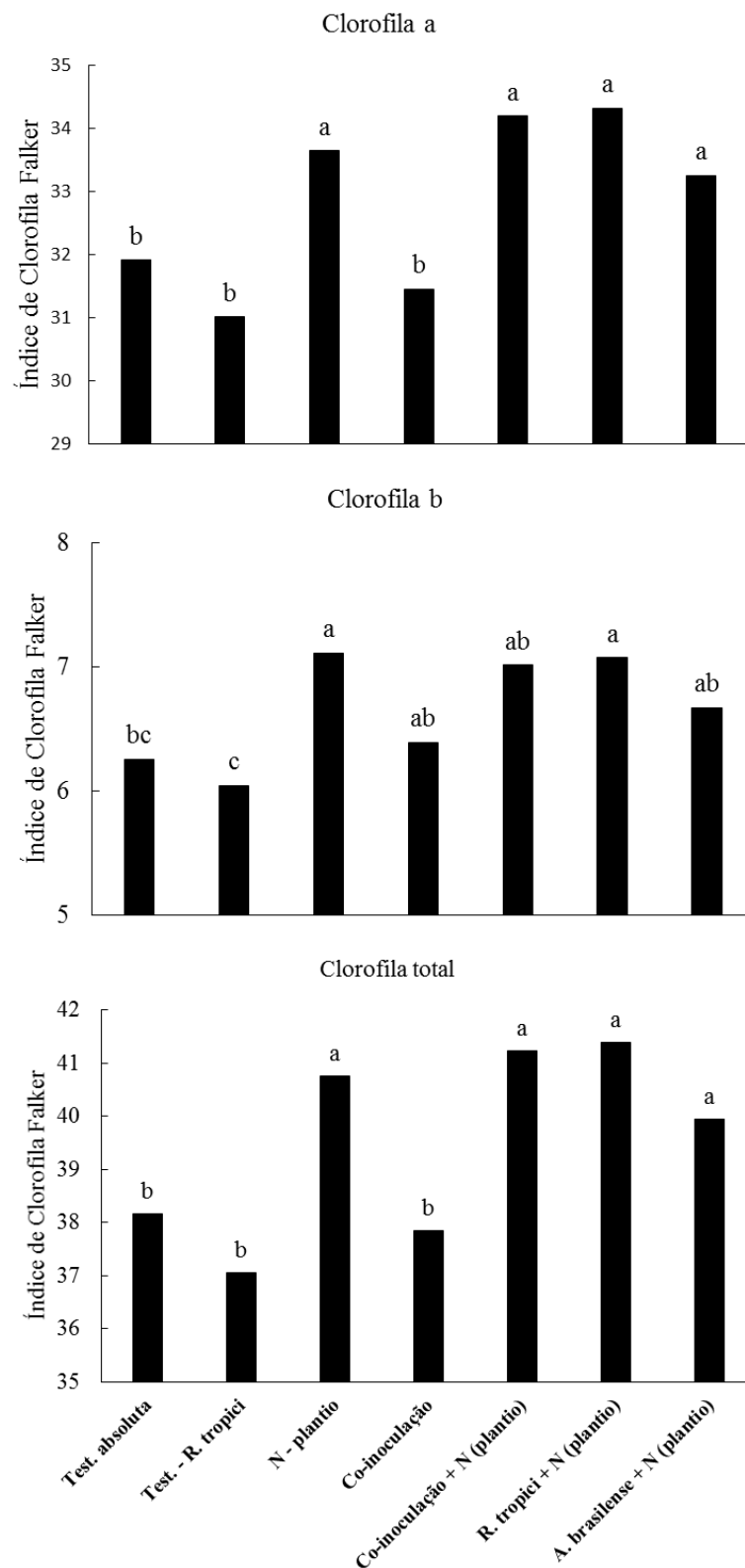
A quantidade de N acumulado nos grãos diferiu significativamente em função dos manejos de adubação nitrogenada (Tabela 26). O maior conteúdo foi verificado nas plantas co-inoculadas e adubadas com nitrogênio mineral em plantio e cobertura, consistindo este no único tratamento que diferiu significativamente da testemunha inoculada com *R. tropici*. A testemunha absoluta apresentou o menor acúmulo de N nos grãos, tendo seu resultado não diferido significativamente da inoculação com rizóbio. A média de 1257 mg planta<sup>-1</sup> obtida pela co-inoculação sob adubação nitrogenada de plantio e cobertura, corresponde a um aumento de 8,29% (104 mg planta<sup>-1</sup>) no conteúdo de N dos grãos, comparativamente ao tradicional manejo de adubação nitrogenada mineral do feijoeiro com duas aplicações do fertilizante. A adubação nitrogenada somente em cobertura das plantas sob co-inoculação, não foi capaz de aumentar seu acúmulo de N nos grãos em relação ao tratamento apenas co-inoculado.

**Tabela 26.** Teor e conteúdo de N nos grãos de feijoeiro co-inoculado com *R. tropici* e *A. brasilense* associado à adubação nitrogenada.

Tratamento	Teor de N nos grãos — mg g <sup>-1</sup> —	Conteúdo de N nos grãos — mg planta <sup>-1</sup> —
Test. absoluta	33,72 ab	844 c
Test. - <i>R. tropici</i>	34,02 ab	964 bc
N - plantio	35,45 ab	1145 ab
N (plantio e cobertura)	35,00 ab	1152 ab
Co-inoculação	34,42 ab	942 bc
Co-inoculação + N (plantio)	36,37 ab	1174 ab
Co-inoculação + N (cobertura)	32,35 b	961 bc
Co-inoculação + N (plantio e cobertura)	35,75 ab	1257 a
<i>R. tropici</i> + N (plantio e cobertura)	35,12 ab	994 bc
<i>A. brasilense</i> + N (plantio e cobertura)	37,62 a	1201 ab
C.V. (%)	7,36	14,79

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

A Figura 9 apresenta os resultados do índice de clorofila Falker (ICF) correspondente às médias dos tratamentos para um período de cinco semanas de avaliação. Os tratamentos que receberam adubação nitrogenada mineral apresentaram médias de clorofila a significativamente superiores às testemunhas absoluta, inoculada com *R. tropici* e a co-inoculação. No que se refere à clorofila b, apenas os tratamentos adubado com N mineral de forma isolada ou associada à inoculação de rizóbio, apresentaram resultados significativamente superiores à testemunha absoluta. As médias de clorofila total dos tratamentos adubado com nitrogênio mineral de forma exclusiva ou associada à inoculação de *R. tropici*, *A. brasilense* e sua co-inoculação foram significativamente iguais entre si e superiores às testemunhas absoluta, inoculada com *R. tropici* e a co-inoculação.



**Figura 9.** Variação das leituras do clorofilômetro (ICF) para o teor de clorofila a e b em folhas de feijoeiro co-inoculado com *R. tropici* e *A. brasilense* associado à adubação nitrogenada.

A variação temporal do ICF para os valores de clorofila a (Tabela 27) indicou que na terceira semana de avaliação (21 DAP) os tratamentos que receberam adubação nitrogenada mineral igualaram-se estatisticamente, sendo significativamente superiores aos demais. Este quadro se repete na avaliação efetuada aos 42 DAP, período correspondente ao estágio fenológico R7 (início de formação das vagens), onde a testemunha inoculada com *R. tropici* apresentou o menor ICF (9,11) dentre os tratamentos avaliados, sendo este significativamente inferior ao da co-inoculação e igual ao da testemunha absoluta.

**Tabela 27.** Variação temporal do Índice de Clorofila Falker para os teores de clorofila a em folhas de feijoeiro co-inoculado com *R. tropici* e *A. brasilense* associado à adubação nitrogenada.

Tratamento	Dias após a semeadura				
	14	21	28	35	42
Test. absoluta	30,55 bc	33,26 b	36,34 a	34,35 ab	15,90 bc
Test. - <i>R. tropici</i>	30,34 bc	32,60 b	36,65 a	33,98 ab	9,11 c
N - plantio	31,13 ab	37,61 a	36,18 a	32,01 b	28,26 a
Co-inoculação	29,87 c	32,85 b	34,61 a	34,85 a	16,97 b
Co-inoculação + N (plantio)	31,27 ab	38,45 a	35,94 a	33,84 ab	28,11 a
<i>R. tropici</i> + N (plantio)	31,58 ab	38,41 a	36,19 a	33,22 ab	28,75 a
<i>A. brasilense</i> + N (plantio)	31,86 a	38,36 a	35,25 a	31,66 b	28,55 a
C.V. (%)	5,44	5,61	8,13	10,17	31,76

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

Na tabela 28 está apresentada a variação temporal do ICF para os teores de clorofila b. Na segunda semana, dentre os tratamentos avaliados, o co-inoculado apresentou a menor média de ICF (5,17), sendo significativamente inferior ao da testemunha absoluta e igual ao inoculado com *R. tropici*. Aos 35 DAP, a co-inoculação registrou o máximo ICF (9,08) dentre os tratamentos avaliados, sendo este significativamente superior à testemunha nitrogenada. Na sexta semana, os tratamentos que receberam adubação nitrogenada mineral apresentaram as maiores médias de ICF e não diferiram entre si, sendo significativamente superiores às testemunhas absoluta e inoculada com rizóbio e ao tratamento co-inoculado.

Na avaliação da clorofila total, até a segunda semana após o plantio, os tratamentos que receberam aplicação de nitrogênio mineral não apresentaram diferença significativa da testemunha absoluta, sendo a inoculação de *A. brasilense* associada à adubação nitrogenada o único significativamente superior à testemunha inoculada com rizóbio (Tabela 29). Aos 21 DAP, os tratamentos que receberam adubação nitrogenada se igualaram, apresentando resultados significativamente superiores às testemunhas nitrogenada e rizobiana, assim como em relação ao tratamento co-inoculado. Na sexta semana (estádio R7), os tratamentos sob adubação nitrogenada mineral mantiveram a superioridade em relação aos demais.

**Tabela 28.** Variação temporal do Índice de Clorofila Falker para os teores de clorofila b em folhas de feijoeiro co-inoculado com *R. tropici* e *A. brasilense* associado à adubação nitrogenada.

Tratamento	Dias após a semeadura				
	14	21	28	35	42
Test. absoluta	5,41 ab	6,00 b	7,89 a	7,05 ab	2,90 b
Test. - <i>R. tropici</i>	5,32 bc	5,78 b	8,19 a	6,95 ab	1,36 b
N - plantio	5,63 ab	8,70 a	9,15 a	5,88 b	5,12 a
Co-inoculação	5,17 c	5,77 b	7,30 a	9,08 a	2,85 b
Co-inoculação + N (plantio)	5,83 a	8,66 a	7,58 a	6,85 ab	5,10 a
<i>R. tropici</i> + N (plantio)	5,75 a	8,70 a	7,78 a	6,75 ab	5,32 a
<i>A. brasilense</i> + N (plantio)	5,72 ab	8,67 a	7,36 a	5,99 b	5,15 a
C.V. (%)	9,75	13,91	34,20	55,90	41,84

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

O ICF da co-inoculação cresceu até a quinta semana de avaliação, quando todos os demais tratamentos já haviam registrado declínio. Não obstante, apresenta uma queda acentuada em relação à última avaliação, efetuada no início da fase reprodutiva (42 DAP). Na última semana, a testemunha inoculada com *R. tropici* registrou o menor ICF dos tratamentos avaliados (10,47).

**Tabela 29.** Variação temporal do Índice de Clorofila Falker para os teores de clorofila a e b em folhas de feijoeiro co-inoculado com *R. tropici* e *A. brasilense* associado à adubação nitrogenada.

Tratamento	Dias após a semeadura				
	14	21	28	35	42
Test. absoluta	35,96 ab	39,26 b	44,23 a	41,40 ab	18,80 bc
Test. - <i>R. tropici</i>	35,66 bc	38,39 b	44,84 a	40,93 ab	10,47 c
N - plantio	36,76 ab	46,31 a	45,33 a	37,90 b	33,38 a
Co-inoculação	35,05 c	38,62 b	41,92 a	43,93 a	19,82 b
Co-inoculação + N (plantio)	37,11 ab	47,11 a	43,53 a	40,69 ab	33,21 a
<i>R. tropici</i> + N (plantio)	37,33 ab	47,12 a	43,98 a	39,97 ab	34,07 a
<i>A. brasilense</i> + N (plantio)	37,59 a	47,03 a	42,59 a	37,66 b	33,70 a
C.V. (%)	5,94	6,69	12,23	16,70	33,08

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

## 5.6 DISCUSSÃO

Os usos de  $\text{NO}_3\text{-N}$  do solo ou fertilizante e  $\text{N}_2$  por associação simbiótica com rizóbios, simultaneamente ou de forma complementar por leguminosas noduladas, é uma característica única entre as plantas superiores (BECANA & SPRENT, 1987; SILVEIRA et al., 2001), sendo sugerido que a combinação destas duas rotas de redução de nitrogênio pode representar um importante fator no processo evolutivo em leguminosas sobre a otimização da utilização do nitrogênio disponível (CABA et al., 1990). Os resultados obtidos neste experimento corroboram esta hipótese, demonstrando a superioridade dos tratamentos que associaram a adubação nitrogenada mineral com a inoculação de rizóbio ou co-inoculação. Neste contexto, destacou-se a integração do fertilizante com a inoculação conjunta, onde, de forma geral, foram registrados os maiores incrementos em termos de acúmulo de biomassa (Tabela 22). Na fase vegetativa, mesmo não diferindo da adubação nitrogenada mineral ou de sua associação com a inoculação exclusiva de *R. tropici*, proporcionou o maior acréscimo de massa seca total. Em valores relativos, este resultado correspondeu a uma elevação de 12,57% ( $5,12 \text{ g planta}^{-1}$ ), 4,82% ( $2,01 \text{ g planta}^{-1}$ ) e 16,47% ( $6,87 \text{ g planta}^{-1}$ ) comparativamente a adubação nitrogenada mineral isolada, associada à inoculação exclusiva de *R. tropici* ou de *A. brasilense*, respectivamente.

O maior acúmulo de biomassa nas plantas co-inoculadas e adubadas com N mineral, em detrimento dos demais tratamentos, poderia ser explicado pelo sinergismo resultante dos efeitos de promoção de crescimento por *A. brasilense* integrado à maior oferta de N, nas formas altamente solúvel (prontamente disponível) do fertilizante e via fixação biológica por *R. tropici*. Diversos resultados experimentais documentaram a contribuição da inoculação de *A. brasilense* quando associada à adubação nitrogenada mineral (GITTI et al., 2012; SABUNDJIAN et al., 2014) ou a co-inoculação com *R. tropici* (DARDANELLI et al., 2008; REMANS et al., 2008; HUNGRIA et al., 2013), o que pode estar relacionado aos potenciais mecanismos de promoção de crescimento descritos para esta bactéria, como a produção de ácido indol-3-acético (IAA) (COSTACURTA et al., 1994), citocininas e giberelinas (LERNER et al., 2006), melhoria no desenvolvimento radicular (DARDANELLI et al., 2008), aumento da quantidade de nitrogênio fixado (REMANS et al., 2008) e do número de nódulos (BURDMAN et al., 1997). Ainda nesta cultura, foram demonstrados efeitos promissores em função da inoculação de *R. tropici* de forma conjunta à fertilização com N solúvel (PERES et al., 1994; VARGAS et al., 2000; VALADÃO et al., 2009; BRITO et al., 2015). Entretanto, ainda são escassas as informações sobre a co-inoculação de *R. tropici* e *A. brasilense* juntamente à aplicação de fertilizantes nitrogenados.

O êxito obtido pela co-inoculação associada ao N mineral na fase vegetativa foi confirmado pelos componentes de produção, com destaque para massa seca de grãos - único tratamento significativamente superior à testemunha absoluta -, através da obtenção de expressivos  $59,93 \text{ g planta}^{-1}$  (Tabela 25). O cenário em questão justifica a integração da co-inoculação à adubação com N mineral para a elevação dos índices de produção da cultura, relatada como pouco responsiva à inoculação de *Rhizobium* (HARDARSON, 1994) e aplicação de fertilizante nitrogenado (TSAI et al., 1993), como confirmam a ausência de diferença significativa entre as testemunhas absoluta, nitrogenada e inoculada com *R. tropici* obtidos para esta variável.

Em termos de produtividade, a ausência de resposta do feijoeiro comum à inoculação com *R. tropici* foi descrita em diversos experimentos (FERREIRA et al., 2000; FERREIRA et al., 2009; KANEKO et al., 2010) da mesma forma que para adubação nitrogenada mineral (FERREIRA et al., 2000; SILVA et al., 2009; SOUZA et al., 2011). Pelegrin et al. (2009) observaram que a aplicação de  $20 \text{ kg ha}^{-1}$  de N nas formas isolada ou associada à inoculação

de rizóbio não promoveram incrementos significativos de produtividade de grãos em comparação à testemunha absoluta, verificando, ainda, que nas doses equivalentes a 40 e 80 kg ha<sup>-1</sup> de N não se detectou diferença da inoculação com *R. tropici*.

Segundo Bliss (1993), tanto a quantidade total de nitrogênio derivado da atmosfera (Ndfa total) quanto à porcentagem de nitrogênio da planta a partir da atmosfera (% Ndfa), em cultivares comumente cultivadas de feijoeiro comum, são muitas vezes insuficientes para produzir rendimentos de sementes economicamente atraentes, o que tem promovido a utilização de N mineral na cultura com vistas à elevação da produção. No entanto, Remans et al. (2008) relataram que na co-inoculação de *Azospirillum* com *Rhizobium* em feijoeiro comum, a quantidade de nitrogênio fixado variou entre 13,8 e 24,8 kg ha<sup>-1</sup>, enquanto a inoculação única de *Rhizobium* resultou em valores de 0 a 23,0 kg ha<sup>-1</sup>. Desta forma, a co-inoculação de *R. tropici* e *A. brasilense* associada à adubação nitrogenada mineral pode representar uma potencial alternativa para o manejo da cultura, otimizando o aproveitamento das fontes de N disponíveis às plantas com reflexo direto no aumento de produção, como demonstram os dados registrados por este experimento.

Uma hipótese para explicar a elevação da massa de grãos obtida pela co-inoculação de forma associada à aplicação de N mineral em plantio e cobertura, seria que esse manejo proporcionaria assimilação e remobilização mais eficientes de N para as vagens, como comprova o maior conteúdo de N na parte reprodutiva das plantas aos 45 DAP (Tabela 24) e, posteriormente, nos grãos (Tabela 26) obtidos por este manejo. A manutenção da fixação do nitrogênio e do transporte do nitrogênio fixado durante o período de formação das vagens pode aumentar a produção de grãos e o teor de nitrogênio nestes (CAMPO et al., 2009). O acúmulo de nitrogênio por sementes durante o enchimento depende da oferta externa de N: assimilação mineral de N do solo e/ou fixação simbiótica de N<sub>2</sub> atmosférico (SCHILTZ et al., 2005). Além destes mecanismos, o acúmulo de N no feijoeiro pode também ser otimizado pela inoculação conjunta, como demonstraram Remans et al. (2008), observando clara diferença em termos de N total acumulado em resposta à co-inoculação de *Rhizobium* e *Azospirillum*. O N exógeno geralmente pode não sustentar a alta demanda de N das sementes no período de enchimento, de modo que o N endógeno anteriormente acumulado em partes vegetativas é largamente remobilizado para cumprir essa demanda (SINCLAIR & WIT, 1976; SALON et al., 2001), como sustenta os resultados obtidos pelas associações inoculação-adubação mineral na fase vegetativa (Tabela 24).

A inoculação com *Azospirillum* não substitui os fertilizantes nitrogenados, mas sim melhora a sua utilização (OKON, 1985), resultando em substanciais aumentos de crescimento das plantas. Este experimento demonstrou que o efeito da aplicação de *Azospirillum* juntamente à adubação nitrogenada proporcionou os maiores resultados em termos de número de vagens e número de grãos por planta, comparativamente aos demais tratamentos (Tabela 25); resultando, porém, na produção da menor massa de 100 grãos. Gitti et al. (2012), avaliando a aplicação de *A. brasilense* em cultivares de feijões adubados com N mineral, obtiveram aumentos numéricos nos componentes de produção, porém não significativos, o que está de acordo com efeito obtido neste estudo, considerando que mesmo havendo incremento expressivo de vagens e grãos, não se detectou diferença significativa em relação à testemunha nitrogenada.

A adubação nitrogenada também provocou efeitos positivos em termos de clorofila, expressa pela ausência de diferença significativa entre as médias dos tratamentos que receberam N mineral. Esse comportamento indica que, como o N faz parte da molécula de clorofila, o aumento de N foliar se reflete diretamente na leitura do ICF (COSTA et al., 2012). O índice de clorofila nas folhas apresenta alta correlação com o teor de N da planta (ARGENTA et al., 2001) o que pode confirmar a eficiência da adubação mineral, que favoreceu a nutrição das plantas.



## 5.7 CONCLUSÕES

A co-inoculação de *R. tropici* e *A. brasilense* combinada com a adubação nitrogenada mineral, resultou em maiores valores de massa seca de folhas, caule, parte aérea, massa seca de grãos, número de grãos por planta e acúmulo de N nas vagens e grãos.

A proposta de co-inoculação como estratégia para oferta exclusiva de N ou sua associação à suplementação nitrogenada mineral apenas no plantio ou em cobertura não se mostraram eficazes com relação aos componentes de produção. Dentre as estratégias de co-inoculação e adubação nitrogenada, apenas a que recebeu N mineral em plantio e cobertura diferiu da testemunha absoluta.

A inoculação de *A. brasilense* aumentou o número de vagens e o número de grãos por planta quando aplicada juntamente à adubação nitrogenada mineral.

A inoculação de *R. tropici* associada à adubação nitrogenada mineral aumentou a massa seca de folhas, massa de caule, massa de vagens, massa de parte aérea, acúmulo de N na folha e na parte aérea.

## 6 CONCLUSÕES GERAIS

*A. amazonense* e *A. brasilense* não apresentaram ação antagonista a *R. tropici*, podendo ser inoculados de forma conjunta. A co-inoculação, em condição estéril, aumentou a nodulação, teor e conteúdo de N parte aérea, enquanto em vasos com solo, a inoculação com *A. brasilense* associada à adubação nitrogenada aumentou a massa de parte aérea.

As co-inoculações de *R. tropici* com *A. brasilense*, *B. diazoefficiens* e AZOTOTAL<sup>®</sup> igualaram a massa de folhas, caule e vagens aos resultados obtidos pelas plantas adubadas com N mineral, superando a testemunha exclusivamente inoculada com *R. tropici*. As co-inoculações com *B. diazoefficiens* e AZOTOTAL<sup>®</sup> elevaram a biomassa total das plantas de forma significativamente superior à inoculação com *R. tropici*. As co-inoculações com *A. brasilense*, *B. diazoefficiens* e AZOTOTAL<sup>®</sup> elevaram o conteúdo de N na parte aérea. As co-inoculações com *B. diazoefficiens* e *A. brasilense* elevaram a massa de grãos e, juntamente a AZOTOTAL<sup>®</sup>, o número de vagens acima do controle exclusivamente inoculado com *R. tropici*.

A co-inoculação de *R. tropici* e *A. brasilense* combinada com a adubação nitrogenada mineral, resultou em maiores valores de massa seca de folhas, caule, parte aérea, massa seca de grãos, número de grãos por planta e acúmulo de N nas vagens e grãos. A proposta de co-inoculação como estratégia para oferta exclusiva de N ou sua associação à suplementação nitrogenada mineral apenas no plantio ou em cobertura não se mostraram eficazes com relação aos componentes de produção.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAMIR, M.; ASLAM, A.; KHAN, M. Y.; JAMSHAD, M. U.; AHMAD, M.; ASGHAR, H. N. & ZAHIR, Z. A. Co-inoculation with *Rhizobium* and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for inducing salinity tolerance in mung bean under field condition of semi-arid climate. *Asian J. Agri. Biol.* v.1, p. 7-12, 2013.
- AHMAD, F.; AHMAD, I. & KHAN, M. S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, v.163, p. 73-181, 2008.
- ALMEIDA, C.; CARVALHO, M.A.C.; ARF, O. & SÁ, M.E. Uréia em cobertura e via foliar em feijoeiro. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v.57, n.2, p.293-298, 2000.
- ARGAW, A. & AKUMA, A. *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae sp. inoculation improves the agronomic efficiency of N of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Environ Syst Res*, v. 4, p. 1-13, 2015.
- ARGENTA, G.; SILVA, P. R. F.; BORTOLINI, C. G.; FORSTHOFER, E. L.; STRIEDER, M. L. Relação da leitura do clorofilômetro com os teores de clorofila extraível e de nitrogênio na folha de milho. *R. Bras. Fisiol. Veg.*, v.13, p.158-167, 2001.
- ARSHAD, M. & FRANKENBERGER JR., W.T. Microbial production of plant growth regulators. In: BLAINE, F. & METTING, Jr. (eds.), *Soil Microbial Ecology*. New York: Marcel and Dekker, 1993, p. 307-347.
- ASSIS, G. A. Faixas críticas e teores foliares de nitrogênio e potássio para o cafeeiro em produção fertirrigado. Tese. 2012. UFLA.
- BADAWI, F. Sh.; BIOMY, A. M. M. & DESOKY, A. H. Peanut plant growth and yield as influenced by co-inoculation with *Bradyrhizobium* and some rhizo-microorganisms under sandy loam soil conditions. *Annals of Agricultural Science*, v.56, p.17-25, 2011.
- BAI, Y.; D'AOUST, F.; SMITH, D. L. & DRISCOLL, B. T. Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus strains* from soybean root nodules. *Can. J. Microbiol*, v.48, p.230-238, 2002.
- BACILIO-JIMÉNEZ, M; AGUILAR-FLORES, S.; VALLE, M.V., PÉREZ, A.; ZEPEDA, A. & ZENTENO, E. Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*. *Soil Biology & Biochemistry*, v.33, p.167-172, 2001.
- BAQUAL, M. F.; DAS, P. K. & KATIYAR, R. S. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants on chlorophyll content of mulberry (*Morus* spp.). *Mycorrhiza News*, v.17, p.12-14, 2005.
- BÁRBARO, I. M.; MACHADO, P. C.; BÁRBARO JUNIOR, L. S.; TICELLI, M.; MIGUEL, F. B. & SILVA, J. A. A. Produtividade da soja em resposta a inoculação padrão e co-inoculação. *Colloquium Agrariae*, v. 5, n.1, p.1-7, 2009.
- BÁRBARO, I. M.; BRANCALIÃO, S. R.; TICELLI, M.; MIGUEL, F. B.; SILVA, J. A. A. Técnica alternativa: co-inoculação de soja com *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* visando incremento de produtividade. Disponível em: [http://www.infobibos.com/Artigos/2008\\_4/coinoculacao/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/coinoculacao/index.htm). Acesso em: 06 de agosto de 2014.

- 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, p.1443-1450, 2013.
- BASET MIA, M. A.; SHAMSUDDIN, Z. H.; WAHAB, Z. & MARZIAH, M. Effect of plant growth promoting rhizobacterial (PGPR) inoculation on growth and nitrogen incorporation of tissue-cultured musa plantlets under nitrogen-free hydroponics condition. *Aus J Crop Sci*, v.4, p.85-90, 2010.
- BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, v.16, n.4, p.729-770, 1998.
- BASHAN, Y. & HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Can. J. Microbiol*, v.43, p.103-121, 1997.
- BASHAN, Y. & HOLGUIN, G. Short- and medium-term avenues for *Azospirillum* inoculation. In.: OGOSHI, A.; KOBAYASHI, K.; HOMMA, Y.; KODAMA, F.; KONDO, N. & AKINO, S. (eds.) *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria -present status and future prospects*. Sapporo: Hokkaido University, 1997. p. 130-149.
- BASSAN, D. A. Z.; ARF, O.; BUZETTI, S.; CARVALHO, M. A. C.; SANTOS, N. C. B. & SÁ, M. E. 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*, Londrina, v.23, n.1, p.76-83, 2001.
- BECANA, M. & SPRENT, J. Nitrogen fixation and nitrate reduction in the root nodules of legumes. *Physiol. Plant.*, v.70, p.757-765, 1987.
- BENINTENDE, S.; UHRICH, W.; HERRERA, M.; GANGGE, F.; STERREN, M. & BENINTENDE, M. Comparación entre coinoculación con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense* e inoculación simple con *Bradyrhizobium japonicum* en la nodulación, crecimiento y acumulación de N en el cultivo de soja. *Agriscientia*, v.27, p.71-77, 2010.
- BETHLENFALVAY, G. J., BROWN, M. S., STAFFORD, A. E. Glycine – *Glomus-Rhizobium* symbiosis. II. Antagonistic effects between mycorrhizal colonization and nodulation. *Plant Physiol.*, v.79, p.1054–1058, 1985.
- BHATTACHARYYA, P. N. & JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol*, v.28, p.1327-1350, 2012.
- BINOTTI, F. F. S.; ARF, O.; ROMANINI JUNIOR, A.; FERNANDES, F. A.; SÁ, M. E.; BUZETTI, S. Manejo do solo e da adubação nitrogenada na cultura de feijão de inverno e irrigado. *Bragantia*, v.66, n.1, p.121-129, 2007.
- BIRÓ, B.; KOVES-PECHY, K.; VORS, I.; TAKACS, T.; EGGENBERG, P. & STRASSER, R. J. Interrelations between *Azospirillum* and *Rhizobium* nitrogen-fixers and arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of alfalfa in sterile, AMF-free or normal soil conditions. *Applied Soil Ecology*, v.15, p.159-168, 2000.
- BLISS, F. A. Breeding common bean for improved biological nitrogen fixation. *Plant and Soil*, v. 152, p.71-79, 1993.
- BOIERO, L.; PERRIG, D.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; CASSÁN, F. & LUNA, V. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.74, p.874–880, 2007.

BORTHAKUR, D.; DOWNIE, J. A.; JOHNSTON, A. W. B. & LAMB, J. W. psi, a plasmid-linked *Rhizobium phaseoli* gene that inhibits exopolysaccharide production and which is required for symbiotic nitrogen fixation. *Molecular and General Genetics*, v.200, p.278-282, 1985.

BOTTINI, R.; FULCHIERI, M. PEARCE, D. & PHARIS, R. Identification of gibberelins A1, A3, and iso-A3 in cultures of *A. lipoferum*. *Plant Physiol*, v.90, p.45-47, 1989.

BRANDÃO JÚNIOR, O & HUNGRIA, M. Efeito de doses de inoculante turfoso na fixação biológica de nitrogênio pela cultura da soja. *R. Bras. Ci. 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*, Campinas, v. 70, n. 1, p.206-215, 2011.

BRITO, L. F.; PACHECO, R. S.; SOUZA FILHO, B. F.; FERREIRA, E. P. B.; STRALIOTTO, R. & ARAÚJO, A. P. Resposta do feijoeiro comum à inoculação com rizóbio e suplementação com nitrogênio mineral em dois biomas brasileiros. *Rev. Bras. Ciênc. Solo*, v.39, n.4, 2015.

BROMFIELD, E. S. P. & BARRAN, L. R. Promiscuous nodulation of *Phaseolus vulgaris*, *Macropitilium atropurpureum* and *Leucaena leucocephala* by indigenous *R. meliloti*. *Can. J. Microbiol.* v.36, p. 369-172, 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 13 de 24 de março de 2011. Protocolo Oficial para Avaliação da Viabilidade e Eficiência Agrônômica de Cepas, Inoculantes e Tecnologias Relacionados ao Processo de Fixação Biológica do Nitrogênio em Leguminosas. *Diário Oficial da União*, n. 58, 25 de março de 2011, Seção 1, p. 3-7.

BROM, S.; MARTÍNEZ, E.; D'ÁVILA, G. & PALACIOS, R. Narrow and broad-host-range symbiotic plasmids of *Rhizobium* spp. strains that nodulate *Phaseolus vulgaris*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.54, p.1280-1283, 1988.

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

BURDMAN, S.; VEDDER, D.; GERMAN, M.; ITZIGSOHN, R.; KIGEL, J.; JURKEVITCH, E. & OKON, Y. Legume crop yield promotion by inoculation with *Azospirillum*. In: ELMERICH, C.; KONDOROSI, A.; NEWTON, W. E. *Biological Nitrogen Fixation for the 21<sup>st</sup> Century*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998, p.609-612.

BURDMAN, S.; VOLPIN, H.; KIGEL, J.; KAPULNIK, Y. & OKON, Y. Promotion of nod gene inducers and nodulation in common bean (*Phaseolus vulgaris*) roots inoculated with *Azospirillum brasilense* Cd. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, p.3030-3033, 1996.

CABA, J. M., HERVAS, A., LLUCH, C., LIGERO, F. Nitrate metabolism in roots and nodules of *Vicia faba* in response to exogenous nitrate. *Physiol. Plant.*, v.79, 531-539, 1990.

CAMPO, J. R.; ARAUJO, R. S. & HUNGRIA, M. Molybdenum-enriched soybean seeds enhance N accumulation, seed yield, and seed protein content in Brazil. *Field Crops Research*, v.110, p.219- 224, 2009.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In.: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B. & NEVES, J. C. L. *Fertilidade do Solo*. Viçosa: Editora UFV, 2007. p.375-470.

- CARVALHO, E. A. Avaliação agrônômica da disponibilização de nitrogênio à cultura do feijão sob sistema de semeadura direta. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Picaricaba, SP, Brasil. 80p., 2002.
- CARVALHO, T. L. G.; BALSEMÃO-PIRES, E.; SARAIVA, R. M.; FERREIRA, P. C. G. & HEMERLY, A. S. Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. *Journal of Experimental Botany*, v.65, p. 5631-5642, 2014.
- CASSINI, S.T.A. & FRANCO, M.C. Fixação biológica de nitrogênio: microbiologia, fatores ambientais e genéticos. In.: Vieira, C.; Paula Júnior, T. J. & Borém, A. (ed.). Feijão. Viçosa: Editora UFV, 2013. p.143-170.
- CATTELAN, A. J. Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal. Londrina: Embrapa, 1999.
- CHANWAY, C. P.; SHISHIDO, M.; NAIRN, J.; JUNGWIRTH, S.; MARKHAM, J.; XIAO, G. & HOLL, F. B. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. *For. Ecol. Manag.*, v.133, p.81-88, 2000.
- CHAPARRO, J. M.; SHEFLIN, A. M.; MANTER, D. K. & VIVANCO, J. M. Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. *Biol Fertil Soils*, v. 48, p.489-499, 2012.
- CONRATH, U.; BECKERS, G. J.; FLORS, V.; GARCIA-AGUSTIN, P.; JAKAB, G.; MAUCH, F.; NEWMAN, M. A.; PIETERSE, C. M.; POINSSOT, B.; POZO, M. J.; PUGIN, A.; SCHAFFRATH, U.; TON, J.; WENDEHENNE, D.; ZIMMERLI, L. & MAUCH-MANI, B. Priming: Getting ready for battle. *Mol. Plant Microbe Interact*, v. 19, p.1062-1071, 2006.
- CORSINI, D. C. D. C. Inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* e *Rhizobium tropici* e adubação nitrogenada em cobertura em feijoeiro de inverno irrigado em sistema plantio direto. Ilha Solteira: UNESP, 2014. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Ilha Solteira, 2014.
- COSTA, N. R.; ANDREOTTI, M.; GAMEIRO, R. A.; PARIZ, C. M.; BUZETTI, S. & LOPES, K. S. M. Adubação nitrogenada no consórcio de milho com duas espécies de braquiária em sistema plantio direto. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.47, p.1038-1047, 2012.
- COSTACURTA, A.; KEIJERS, V. & VANDERLEYDEN, J. Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. *Mol Gen Genet.*, v.243, p.463-72, 1994.
- CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J. M.; MONTEIRO, A. M. & SANDBERG, G. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 54, p.2833-2837, 1988.
- DARDANELLI, M. S.; CÓRDOBA, F. J. F.; ESPUNY, M. R.; CARVAJAL, M. A. R.; DÍAZ, M. E. S.; SERRANO, A. M. G.; OKON, Y. & MEGÍAS, M. Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. *Soil Biology & Biochemistry*, v.40, p.2713-2721, 2008.
- DEKHIL, S. B.; CAHILL, M.; STACKEBRANDT, E.; SLY, L. I. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the Genus AZOSPIRILLUM as

*Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, Stuttgart, v. 20, p. 72-77, 1997.

DEL GALLO, M. & FABBRI, P. Effect of soil organic matter on chickpea inoculated with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium leguminosarum* bv. *ciceri*. *Plant and Soil*, v.137, p.171-175, 1991.

DEY, R.; PAL, K. K.; BHATT, D.M. & CHAUHAN, S.M. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, v. 159, p.371-394, 2004.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; VANDERLEYDEN, J.; DUTTO, P.; LABANDERA-GONZALEZ, C.; CABALLERO-MELLADO, J.; AGUIRRE, J. F.; KAPULNIK, Y.; BRENER, S.; DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. de O.; BALDANI, V.L.D. Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1999. 38p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 110).

DUBEY, S. K. Combined effect of *Bradyrhizobium japonicum* and phosphatase solubilizing *Pseudomonas striata* on nodulation, yield attributes and yield of rainfed soybean (*Glycine max*) under different sources of phosphorus in vertisols. *Ind. J. Agri. Sci.*, v. 66, p. 28-32, 1996.

EARDLY, B. D.; HANNAWAY, D. B.; BOTTOMLEY, P. J. Characterization of rhizobia from ineffective alfalfa nodules: ability to nodulate bean plants (*Phaseolus vulgaris* (L.) Savi.). *Appl. Environ. Microbiol.*, v.50, p. 1422-1427, 1985.

EGAMBERDIEVA, D.; BERG, G.; LINDSTROM, K.; RASANEN, L. A. Co-inoculation of *Pseudomonas* spp. with *Rhizobium* improves growth and symbiotic performance of fodder galega (*Galega orientalis* Lam.). *Eur. J. Soil Biol.*, v.46, p.269-272, 2010.

ELKOCA, E.; KANTAR, F.; SAHIN, K. Influence of nitrogen fixing and phosphorus solubilizing bacteria on the nodulation, plant growth, and yield of chickpea. *Journal of Plant Nutrition*, v.31, p.157-171, 2008.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA ACROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Manual de métodos de análise de solo. 2.ed. Rio de Janeiro, 1997. 212p.

EGAMBERDIEVA, D. & LUGTENBERG, B. Use of plant growth-promoting rhizobacteria to alleviate salinity stress in plants. In: MIRANSARI, M. (ed.). *Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses*. Volume I. New York: Springer Science+Business Media, 2014. p. 73-96.

ESTÉVEZ, J.; DARDANELLI, M. S.; MEGÍAS, M. & RODRÍGUEZ-NAVARRO, D. N. Symbiotic performance of common bean and soybean co-inoculated with rhizobia and *Chryseobacterium balustinum* Aur9 under moderate saline conditions. *Symbiosis*, v.49, p.29-36, 2009.

FAGES, J. An industrial view of *Azospirillum* inoculants: formulation and application technology. *Symbiosis*, v.13, p.15-26, 1992.

FERLINI, H. A. Co-Inoculación en Soja (*Glycine max*) con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense*. *Artículos Técnicos – Agricultura*. 2006. Disponível em:

[http://www.engormix.com/co\\_inoculacion\\_soja\\_g](http://www.engormix.com/co_inoculacion_soja_g) licyne\_s\_articulos\_800\_AGR.htm.  
Acesso: 10 abr. 2008.

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

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

FIGUEIREDO, M. V. B.; MARTINEZ, C. R.; BURITY, H. A. & CHANWAY, C. P. Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *World J Microbiol Biotechnol*, DOI 10.1007/s11274-007-9591-4, 2007.

FIGUEIREDO, M. V. B.; SOBRAL, J. K.; STAMFORD, T. L. M. & ARAÚJO, J. M. Bactérias promotoras de crescimento de plantas: estratégia para uma agricultura sustentável. In.: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; OLIVEIRA, J. P.; SANTOS, C. E. R. S. & STAMFORD, N. P. (ed.). *Biotecnologia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Recife: Instituto Agronômico de Pernambuco, 2010. p.387-414.

FONSECA, G. G. CARVALHO, E. A. Resposta de cultivares de feijoeiro-comum à inoculação das sementes com duas estirpes de rizóbio em Minas Gerais. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2011. 166p.

FLORES, M.; GONZÁLEZ, V.; PARDO, M. A.; LEIJA, A.; MARTÍNEZ, E.; ROMERO, D.; PINERO, D.; D'ÁVILA, G. & PALACIOS, R. Genomic instability in *Rhizobium phaseoli*. *Journal of Bacteriology*, v.170, p.1191-1196, 1988.

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

FRED, E. B.; BALDWIN, I. L. & MCCOY, W. Root nodule bacteria and leguminous plants. Madison: University of Wisconsin, 1932. 343p.

FREITAS, S. S. & PIZZINATTO, M. A. Interações de *Pseudomonas* sp. e *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici na rizosfera de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). *Summa Phytopathol.*, v.17, p.105-112, 1991.

FUHRMANN, J. & WOLLUM, A. G. Nodulation competition among *Bradyrhizobium japonicum* strains as influenced by rhizosphere bacteria and iron availability. *Biol Fertil Soils*, v.7, p.108-112, 1989.

GALVÃO, P.G.; URQUIAGA, S.; VIDAL, M.S. & BALDANI, J.I. Interação entre plantas e bactérias promotoras do crescimento vegetal. Seropédica: EMBRAPA-AGROBIOLOGIA, 2010. 63p. (Documentos, 270).

GAUR, A. C. & OSTWAL, K. P. Influence of phosphate dissolving Bacilli on yield and phosphate uptake of wheat crop. *Indian J Exp Biol*, v. 10, p. 393-394, 1972.

GERMAN, M. A.; BURDMAN, S.; YAACOV, O. & KIGEL, J. Effects of *Azospirillum brasilense* on root morphology of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under different water regimes. *Biol Fertil Soils*, v. 32, p.259-264, 2000.



- GILLER, K. E. & CADISCH, G. Future benefits from biological nitrogen fixation: An ecological approach to agriculture. *Plant and Soil*, v.174, p.255-277, 1995.
- GITTI, D. C.; ARF, O.; KANEKO, F. H.; FERREIRA, R. A.; BUZETTI, S.; PORTUGAL, J. R. & CORSINI, D. C. D. C. Inoculação de *Azospirillum brasilense* em cultivares de feijões cultivados no inverno. *Agrarian*, v.5, p.36-46, 2012.
- GLICK, B. R.; PATTEN, C. L.; HOLGUIN, G. & PENROSE, D. M. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. London: Imperial College Press, 1999.
- GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free living bacteria. *Can. J. Microbiol.*, v.41, p.109-114, 1995.
- GONZALEZ, N.; PERTICARI, A.; GURFINKEL, B. S. & CÁCERES, E. R. Nutrición nitrogenada. In: GIORDA, L & BAIGORRI, H. (ed.). *El cultivo de la soja en la Argentina*. San Juan: INTA-SAGP y A. Editar, 1997, p.188-198.
- GONZALEZ, N., 2006. Fijación de nitrógeno en soja. Situación actual y perspectivas en la Argentina. In: 3° Congreso de Soja del Mercosur, Conferencia Plenaria, Rosario, Argentina. 376 p.
- GRAHAM, P. H. Some problems of nodulation and symbiotic fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: A review. *Field Crops Res.*, v.4, p.93-112, 1981.
- GRAHAM, P. H. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. Microbiol.*, v.38, p.475-484, 1992.
- GRAHAM, P. H.; DRAEGER, K. J.; FERREY, M. L.; CONRAY, M. J.; HAMMER, B. E.; MARTINEZ, E.; AARONS, S. R. & QUINTINO, C. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR 1899. *Canadian J. Microbiol.*, v.40, p.198-207, 1994.
- GRAHAM, P. H., & PARKER, C. A. Diagnostic features in the characterization of the root-nodule bacteria of legumes. *Plant Soil*, v.20, p.383-396, 1964.
- GROPPA, M. D.; ZAWOZNIK, M. S.; TOMARO, M. L. Effect of co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* on soybean plants. *European Journal of Soil Biology*, v.34, p. 75-80, 1998.
- HARDARSON, G. International FAO/IAEA programmes on biological nitrogen fixation. In.: GRAHAM, P. H.; SADOWSKY, M. J. & VANCE, C. P. (ed.). *Symbiotic Nitrogen Fixation*, 1994. p.189-2.
- HERNANDEZ-LUCAS, I.; SEGOVIA, L.; MARTINEZ-ROMERO, E. & PUEPPKE, S. G. Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. *Appl. Environ. Microbiol.* v.61, p.2775-2779, 1995.
- HERRIDGE, D. F. & PATE, J. S. Utilization of net photosynthate for nitrogen fixation and protein production in an annual legume. *Plant Physiol.*, v.60, p.759-764, 1977.
- HUNGRIA, M. & ARAUJO, R. S. Relato da VI Reunião de Laboratórios para recomendação de estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. In.: HUNGRIA, M.; BALOTA, E. L.; COLOZZI-FILHO, A. & ANDRADE, D. S. (eds.). *Microbiologia do Solo: desafios para o século XXI*. Londrina: IAPAR/Embrapa-CNPSO, 1995, p.479-489.
- HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. M. O.; PROBANZA, A.; GUTIERREZ-MAÑERO, F. J. & MEGIAS, M. Isolation and characterization of new efficient and

competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biol. Biochem.*, v.32, p.1515-1528, 2000.

HUNGRIA, M.; BARRADAS, C. A. A. & WALLSGROVE, R. M. Nitrogen fixation, assimilation and transport during the initial growth stage of *Phaseolus vulgaris* L. *J. Exp. Bot.*, v.42, p. 839-844, 1991.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. & ARAUJO, R. S. Fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M. A. T. & HUNGRIA, M. (ed.). *Biologia dos solos dos cerrados*. Planaltina: EMBRAPA – CNPC, 1997. p.187-258.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J. & MENDES, I. Fixação biológica de nitrogênio na cultura da soja. Londrina: Embrapa - Centro Nacional de Pesquisas em Soja, 2001. 48p. (Centro Nacional de Pesquisa em Soja. Circular técnica, 35).

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

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. & ARAUJO, R. S. Tecnologia de coinoculação da soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*: incrementos no rendimento com sustentabilidade e baixo custo. In: XXXIII Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil, 2013, Londrina. Resumos expandidos. Brasília: Embrapa, 2013. p.151-153.

HUREK, T.; HANDLEY, L.L.; REINHOLD-HUREK, B. & PICH, Y. *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. *Mol. Plant-Microbe Interact*, v.15, p.233–242, 2002.

INIGUEZ, A. L.; DONG, Y. M. & TRIPLETT, E. W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Mol. Plant-Microbe Interact*, v.17, p.1078-1085, 2004.

IRUTHAYATHAS, E. E.; GUNASEKARAN, S. & VLASSAK, K. Effect of combined inoculation of *Azospirillum* and *Rhizobium* on nodulation and N<sub>2</sub>-fixation of winged bean and soybean. *Scientia Horticulturae*, v. 20, p.231-240, 1983.

ISHIZAWA, S. Studies on the root-nodule bacteria of leguminous plants. II. The relationship between nodule bacteria and leguminous plants, part 1. From the view of nodule production.2 Cross-inoculation test. *J. Sci. Soil Manure*, v. 24, p.297-302, 1954.

JORDAN, D. C. Family III Rhizobiaceae. In: KRIEG, N. R., (ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. p.234-256.

KAN, F. L.; CHEN, Z. Y.; WANG, E. T.; TIAN, C. F.; SUI, X. H. & CHEN, W. X. Characterization of symbiotic and endophytic bacteria isolated from root nodules of herbaceous legumes grown in Qinghai-Tibet plateau and in other zones of China. *Archives of Microbiology*, v.188, p.103-115, 2007.

KANAYAMA, Y. & YAMAMOTO, Y. Formation of nitrosylleghemoglobin in nodules of nitrate-treated cowpea and pea plants. *Plant and Cell Physiology*. Kyoto, v. 32, p.19-24, 1991.

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

KOCH, B.; EVANS, H. J. & RUSSEL, S. Reduction of acetylene and nitrogen gas by bries and cell free extracts of soybean root nodules. *Plant Physiol.*, v.42, p.466-467,1967.

- KUMAR, B. S. D.; BERGGREN, I.; MARTENSSON, A. M. Potential for improving pea production by co-inoculation with fluorescent *Pseudomonas* and *Rhizobium*. *Plant Soil*, v.229, p.25-34, 2011.
- KUMAR, P.; DUBEY, R. C. & MAHESHWARI, D. K. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiological Research*, v.167, p.493-499, 2012.
- KUMAR RAN, J. V. D. K. & PATIL, R. B. Effect of inoculation with *Rhizobium* and *Azotobacter* on nodulation, growth and yield of soybean. *Current Science*, v.45, p.523-524, 1976.
- KRASILNIKOV, M. On the role of soil bacteria in plant nutrition. *J Gen Appl Microbiol*, v. 7, p.128-144, 1961.
- LADHA, J. K.; TIROL, A. C.; DAROY, M. L. G.; CALDO, G.; VENTURA, W. & WATANABE, I. Plant-associated N<sub>2</sub> fixation (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-reduction) by five rice varieties, and relationship with plant growth characters as affected by straw incorporation. *Soil Sci. Plant Nutr.*, v.32, p.91-106, 1986.
- LAWN, R. J.; BRUN, W. A. Symbiotic nitrogen fixation in soybeans. I. Effect of photosynthetic source sink manipulations. *Crop Science*, v.14, p.11-16, 1974.
- LERNER, A.; HERSCHKOVITZ, Y.; BAUDOIN, E.; NAZARET, S.; MOENNE-LOCCOZ, Y.; OKON, Y. & JURKEVITCH, E. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on rhizobacterial communities analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis and automated ribosomal intergenic spacer analysis. *Soil Biology & Biochemistry*, v.38, p.1212-1218, 2006.
- LETHBRIDGE, G. & DAVIDSON, M. S. Microbial biomass as a source of nitrogen for cereals. *Soil Biol Biochem*, v.15, p.375-376, 1983.
- LI, D-M. & ALEXANDER, M. Co-inoculation with antibiotic-producing bacteria to increase colonization and nodulation by rhizobia. *Plant and Soil*, v.108, p.211-219, 1988.
- LOPES, E. S. Fixação Biológica de Nitrogênio no sistema solo-planta. In.: YAMADA, T.; STIPP, S. R. & VITTI, G. C. (ed.). Nitrogênio e Enxofre na Agricultura Brasileira. Piracicaba: IPNI, 2007. p.43-72.
- LOVATO, P. E.; PEREIRA, J. C. & VIDOR, C. Sobrevivência de *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli em solo e sua relação com a ocorrência em nódulos e fixação de nitrogênio em feijoeiro. *Rer. Bras. Ci. Solo*, v.15, p.227-282, 1991.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C. & OLIVEIRA, S.A. Avaliação do estado nutricional das plantas: Princípios e aplicações. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319p.
- MARTÍNEZ, E.; PALACIOS, R. & SÁNCHEZ, F. Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *Journal of Bacteriology*, v.169, p.2828-2834, 1987.
- MARTÍNEZ, E.; FLORES, M.; BROM, S.; ROMERO, D.; DÁVILA, G. & PALACIOS, R. *Rhizobium phaseoli*: a molecular genetics view. *Plant and Soil*, v.108, p.179-184, 1988.
- MARTÍNEZ, E.; PARDO, M. A. PALACIOS, R. & CEVALLOS, M. A. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *Journal of General Microbiology*, v. 131, p.1779-1786, 1985.
- MARTINEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F. M.; FRANCO, A. A.; GRAHAM, P & PARDO, M. A. *Rhizobium tropici*, a Novel Species Nodulating *Phaseolus*

*vulgaris* L. Beans and *Leucaena* sp. Trees. International Journal of Systematic Bacteriology, v.41, p.417-426, 1991.

MARTINEZ-ROMERO, E. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. Plant and Soil, v.252, p.11-23, 2003.

MEDEIROS, E. V.; MARTINS, C. M.; LIMA, J. A. M.; FERNANDES, Y. T. D.; OLIVEIRA, V. R. & BORGES, W. L. Diversidade morfológica de isolados de caupi cultivado em solos do Estado do Rio Grande do Norte. Acta Scientiarum. Agronomy, v. 31, n. 3, p. 529-535, 2009.

MERCANTE, F. M. Uso de *Leucaena leucocephala* na obtenção de *Rhizobium* tolerante a temperatura elevada para inoculação do feijoeiro. Tese de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ, Brasil. 1993. 149p.

MERCANTE, F. M.; STRALIOTTO, R.; DUQUE, F. F. & FRANCO, A. A. A inoculação do feijoeiro comum com rizóbio. Seropédica: Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa em Biologia do Solo, 1992. 8p. (Centro Nacional de Pesquisa em Biologia do Solo. Comunicado Técnico, 10).

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

MICHIELS, J.; DOMBRECHT, B.; VERMEIREN, N.; XI, C.; LUYTEN, E. & VANDERLEYDEN, J. *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. Microbiology Ecology, v.26, p.193-205, 1998.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. Feijão. <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao>. Acesso em 24 de novembro de 2014.

MISHRA, P. K.; BISHT, S. C.; JEEVANANDAN, K.; KUMAR, S.; BISHT, J. K & BHATTA, J. C. Synergistic effect of inoculating plant growth-promoting *Pseudomonas* spp. and *Rhizobium leguminosarum*-FB1 on growth and nutrient uptake of rajmash (*Phaseolus vulgaris* L.). Archives of Agronomy and Soil Science, v. 60, p. 799-815, 2014.

MOLLA, A.H.; SHAMSUDDIN, Z.H.; HALIMI, M.S.; MORZIAH, M. & PUTEH, A. B. Potential for enhancement of root growth and nodulation of soybean co-inoculated with *Azospirillum* and *Bradyrhizobium* in laboratory systems. Soil Biology & Biochemistry, v.33, p.457-463, 2001.

MOREIRA, F. M. S. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosae. In.: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. & BRUSSAARD, L. (ed.). Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros. Lavras: Ed. UFLA, 2008.

MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J. O. Rizosfera. In.: MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. (ed.). Microbiologia e Bioquímica do Solo. Lavras: Ed. UFLA, 2006. p.407-447.

MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J. O. Fixação biológica de nitrogênio atmosférico. In.: MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. (ed.). Microbiologia e Bioquímica do Solo. Lavras: Ed. UFLA, 2006. p.449-541.

MOXLEY, J. C.; HUME, D. J. & SMITH, D, L. N<sub>2</sub> fixation and competitiveness of *Rhizobium phaseoli* strains isolated from Ontario soils. Can. J. Plant. Sci., v.66, p.825-836, 1986.

NEVES, M. C. P. Interdependência fisiológica entre os componentes do sistema simbiótico *Rhizobium*-leguminosa. Rev. Bras. Cienc. Solo, Campinas, v. 5, p.79-92, 1981.

- NAVEED, M.; MEHBOOB, I.; BAQIR HUSSAIN, M. & ZAHIR, Z. A. Perspectives of Rhizobial Inoculation for Sustainable Crop Production. *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets*, p. 209-239, 2015.
- NEVES, M. C. P.; RUMIJANEK, N. G. Ecologia das bactérias diazotróficas nos solos tropicais. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. (ed.). *Ecologia microbiana*. São Paulo: Jaguariúna, cap. 1, p. 15-60, 1998.
- NIU, D. D.; LIU, H. X.; JIANG, C. H.; WANG, Y. P.; WANG, Q. Y.; JIN, H. L. & GUO, J. H. The plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* by simultaneously activating salicylate- and jasmonate/ethylene-dependent signaling pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.24, p. 533–542, 2011.
- NORRIS, D.O.; T'MANNETJE, L. The symbiotic specialization of African *Trifolium* spp. In relation to their taxonomy and their agronomic use. *East African Agricultural and Forestry Journal*, Nairobi, v. 29, p. 214-235, 1964.
- OKON, Y. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. *Trends in Biotechnology*, v.3, p.223-228, 1985.
- OKON, Y.; ITIIGSOHN, R.; BURDMAN, S. & HAMPEL, M. Advances in agronomy and ecology of the *Azospirillum*/plant association. In: KHONOVICH, I. A. T.; PROVOROV, N. A.; RAMANOV, V. I. & NEWTON, W. E. *Nitrogen Fixation. Fundamentals and Applications*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 635-640.
- OKON, Y. & KAPULNIK, Y. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. *Plant Soil*, v. 90, p.3-16, 1986.
- PEIX, A.; MATEOS, P. F.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C.; MARTINEZ-MOLINA, E. & VELAZQUES, E. Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions. *Soil Biology & Biochemistry*, v.33, p.1927-1935, 2001.
- PANKIEVICZ, V. C. S.; AMARAL, F. P.; SANTOS, K. F. D. N.; AGTUCA, B.; XU, Y.; SCHUELLER, M. J.; ARISINI, A. C. M.; SETEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; STACEY, G. & FERRIERI, R. A. Robust biological nitrogen fixation in a model grass-bacterial association. *The Plant Journal* v.81, p.907–919, 2015.
- PELEGRIN, R.; MERCANTE, F. B.; 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.
- PEREIRA, P. A. A. Fixação biológica de nitrogênio do feijoeiro. *Informe Agropecuário*, v.8, p.41-46, 1982.
- 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. *Rer. Bras. Cienc. Solo*, v.18, p. 415-420, 1994.
- PESSOA, A. C. S.; RIBEIRO, A. C.; CHAGAS; J. M. & CASSINI, S. T. A. Atividades de nitrogenase e redutase de nitrato e produtividade do feijoeiro “ouro negro” em resposta à adubação foliar com molibdênio. *R. Bras. Ci. Solo*, v.24, p.217-224, 2001.
- PETERS, R. J. & Alexander, M. Effect of legume exudates on the root nodule bacteria. *Soil Sci.* v.102, p.380-387, 1966.
- PIMENTEL-GOMES, F. *Curso de estatística experimental*. Piracicaba: Nobel, 1990. 468p.

- PLAZINSKI, J. & ROLFE, B. G. Influence of *Azospirillum* strains on the nodulation of clovers by *Rhizobium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 49, p.984-989, 1985.
- PLAZINSKI, J. & ROLFE B. G. Interaction of *Azospirillum* and *Rhizobium* strains leading to inhibition of nodulation. *Applied and Environmental Microbiolog*, v. 49, p.990-993, 1985.
- PODILE, A. R. & KISHORE, G. K. Plant growth-promoting rhizobacteria. In.: GNANAMANICKAM, S. S. *Plant-Associated Bacteria*. Dordrecht: Springer, p. 195-230, 2006.
- PRAKAMHANG, J.; TITTABUTR, P.; BOONKERD, N.; TEAMTISONG, K.; UCHIUMI, T.; ABE, M. & TEAUMROONG, N. Proposed some interactions at molecular level of PGPR coinoculated with *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 and *B.japonicum* THA6 on soybean symbiosis and its potential of field application. *Applied Soil Ecology*, v.85, p. 38-49, 2015.
- QUINTO, C.; VEJA, H.; FLORES, M.; FERNÁNDEZ, L.; BALLADO, T.; SOBERÓN, G. & PALACIOS, R. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. *Nature*, v.229, p.724-726.
- RAI, R. Efficacy of associative N<sub>2</sub>-fixation by streptomycin-resistant mutants of *Azospirillum brasilense* with genotypes of chick pea *Rhizobium* strains. *The Journal of Agricultural Science*, v.100, p.75-80, 1983.
- RAJENDRAN, G.; SING, F.; DESAI, A. J. & ARCHANA, G. Enhanced growth and nodulation of pigeon pea by co-inoculation of *Bacillus strains* with *Rhizobium* spp. *Bioresource Technology*, v.99, p. 4544-4550, 2008.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F. & EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 1996. p.552-573.
- REIS, V. M.; SCHWAB, S.; ROUWS, L. F. M. & TEIXEIRA, K. R. S. Diazotróficos associativos e de vida livre: avanços e aplicações biotecnológicas. In.: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; OLIVEIRA, J. P.; SANTOS, C. E. R. S. & STAMFORD, N. P. *Biotecnologia aplicada à agricultura: textos de apoio a protocolos experimentais*. Recife: Instituto Agrônômico de Pernambuco, 2010. p.415-437.
- REIS, V.M.; BALDANI, V.L.D. & BALDANI, J.I. *Ecologia, Isolamento e Identificação de Bactérias Diazotróficas*. In.: Aquino, A. M. & Assis, R. L. *Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p.257-279.
- REIS, V. M. & TEIXEIRA, K. R. S. *Fixação Biológica de Nitrogênio – Estado da Arte*. In.: Aquino, A. M. & Assis, R. L. (ed.). *Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p.151-180.
- REMANS, R.; BEEBE, S.; BLAIR, M.; MANRIQUE, G.; TOVAR, E.; RAO, I.; CROONENBORGH, A.; TORRES-GUTIERREZ, R.; EL-HOWEITY, M.; MICHIELS, J. & VANDERLEYDEN, J. Physiological and genetic analysis of root responsiveness to auxin-producing plant growth-promoting bacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Soil*, v.302, p.149-161, 2008.
- RENNIE, R. J.; KEMP, G. A. N<sub>2</sub> fixation in field beans quantified by <sup>15</sup>N isotope dilution. I. Effect of *R. phaseoli*. *Agron. J.*, v.75, p.640-644, 1983.

- RODRIGUÉZ, H. & FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, v. 17, p.319-339, 1999.
- RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I. & BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften*, v. 91, p.552-555, 2004.
- ROKHZADI, A.; ASGHARZADEH, A.; DARVISH, F.; NOUR-MOHAMMADI, G. & MAJIDI, E. Influence of plant growth-promoting rhizobacteria on dry matter accumulation and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under field conditions. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science*, v.3, p.253-257, 2008.
- ROSOLEM, C. A. Nutrição e adubação do feijoeiro. Piracicaba: Potafós, 1987. 91p. (Boletim Técnico, 8).
- RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P. Fixação Biológica de Nitrogênio. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; SILVA, P. H. S.; VIANA, F. M. P. (eds.). Feijão-caupi: avanços tecnológicos. Brasília: Embrapa, 2005. p.281-335.
- RUSCHEL, A. P. & RUSCHEL, R. Sinergia da absorção de nitrogênio do solo, e da fixação simbiótica de nitrogênio atmosférico dirigida para o aumento do nitrogênio total da soja (*Glycine max*). *Pesq. agropec. Bras.*, v.10, p.27-40, 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*, v.1, p.21-24, 1977.
- SABUNDJIAN; M. T.; ARF, O.; TARSITANO, M. A. A.; KANEKO, F. H.; CORSINI, D. C. D. C. Análise econômica da adubação nitrogenada em feijoeiro de inverno sob plantio direto. *Pesq. Agropec. Trop.*, v.44, p.349-356, 2014.
- SADOWSKY, M. J.; CREGAN, P. B.; KEYSER, H. H. Nodulation and nitrogen fixation efficacy of *Rhizobium fredii* with *Phaseolus vulgaris* genotypes. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.54, p.1907-1910, 1988.
- SALAMONE, I. E. G.; HYNES, R. K. & NELSON, L. M. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Canadian Journal of Microbiology*, v.47, p.404-411, 2001.
- SALON, C.; MUNIER-JOLAIN, N. G.; DUC, G.; VOISIN, A. S.; GRANDGIRARD, D.; LARMURE, D.; EMERY, R. J. N. & NEY, B. Grain legume seed filling in relation to nitrogen acquisition: a review and prospects with particular reference to pea. *Agronomie*, v.21, p.539-552, 2001.
- SAMAVAT, S.; SAMAVAT, S.; MAFAKHERI, S. & SHAKOURI, M. J. Promoting common bean growth and nitrogen fixation by the co-inoculation of *Rhizobium* and *Pseudomonas fluorescens* isolates. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, v.18, p.387-395, 2012.
- SANTOS, A. B.; FAGERIA, N. K.; SILVA, O. F. & MELO, M. L. B. Resposta do feijoeiro ao manejo de nitrogênio em várzeas tropicais. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.38, p.1265-1271, 2003.
- SATO, T.; YASHIMA, H.; OHTAKE, N. O.; SUEYOSHI, K.; AKAO, S. & OHYAMA, T. Possible involvement of photosynthetic supply changes of nodule characteristics of hypernodulating soybeans. *Soil Sci. Plant Nutr.*, v.45, p.187-196, 1999.

- 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 a exsudato de *Mimosa flocculosa* com diferentes doses de nitrogênio. *Bragantia*, v.68, p.443-451, 2009.
- 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 <sup>15</sup>N in vivo labeling throughout seed filling. *Plant Physiol.*, v.137, p.1463-1473, 2005.
- SILVA, T. R. B.; LEMOS, L. B. & TAVARES, C. A. Produtividade e característica tecnológica de grãos em feijoeiro adubado com nitrogênio e molibdênio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.41, n.5, p.739-745, 2006.
- SILVA, V. N.; SILVA, L. E. S. F. & FIGUEIREDO, M. V. B. Atuação de rizóbios com rizobactéria promotora de crescimento em plantas na cultura do caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). *Acta Sci. Agron.*, v. 28, n. 3, p. 407-412, 2006.
- SILVA, V. N.; SILVA, L. E. S. F.; MARTÍNEZ, C. R.; SELDIN, L.; BURITY, H. A. & FIGUEIREDO, M. V. B. Estirpes de *Paenibacillus* promotoras de nodulação específica na simbiose *Bradyrhizobium-caupi*. *Acta Sci. Agron.*, v.29, p.331- 338, 2007.
- SILVEIRA, J. A. G.; MATOS, J. C. S.; CECATTO, V. M.; VIEGAS, R. A. & OLIVEIRA, J. T. A. Nitrate reductase activity, distribution, and response to nitrate in two contrasting *Phaseolus* species inoculated with *Rhizobium* spp. *Environmental and Experimental Botany*, v.46, p.37-46, 2001.
- SILVEIRA, P. M. & DAMASCENO, M. A. Doses e parcelamento de K e de N na cultura do feijoeiro irrigado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.28, p.1269-1276, 1993.
- SINCLAIR, T. R. & DE WIT, C.T. Analysis of the carbon; nitrogen limitations to soybean yield. *Agronomy Journal*, v.69, p.274-278, 1976.
- SINGH, U. B.; SAHU, A.; SAHU, N.; SINGH, R. K.; RENU; PRABHA, R.; SINGH, D. P.; SARMA, B. K. & MANNA, M. C. Co-inoculation of *Dactylaria brochopaga* and *Monacrosporium eudermatum* affects disease dynamics and biochemical responses in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) to enhance bio-protection against *Meloidogyne incognita*. *Crop Protection*, v.35, p.102-109, 2012.
- SOARES, A. L. L.; FERREIRA, P. A. A.; PEREIRA, J. P. A. R.; 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. *R. Bras. Ci. Solo*, v.30, p.803-811, 2006.
- SOBERÓN-CHAVEZ, G.; NÁJERA, R.; OLIVEIRA, H. & SEGOVIA, L. Genetic rearrangements of a *Rhizobium phaseoli* symbiotic plasmid. *Journal of Bacteriology*, v. 167, p.487-491, 1986.
- SOMERS, E.; VANDERLEYDEN, J.; SRINIVASAN, M. Rhizosphere bacterial signaling: A love parade beneath our feet. *Critical Reviews in Microbiology*, v.30, p.205-240, 2004.
- SOTTERO, A. N.; FREITAS, S. S.; MELO, A. M. T. & TRANI, P. E. Rizobactérias e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. *R. Bras. Ci. Solo*, v.30, p.225-234, 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 braquiária. *Pesquisa agropecuária brasileira*, v.46, p.370-377, 2011.
- SPAEPEN, S.; DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A. & VANDERLEYDEN, J. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant Soil*, v.312, p.15–23, 2008.
- SPRENT, J. I. & SPRENT, P. Nitrogen fixing organisms: pure and applied aspects. London: Chapman and Hall, 1990. 256p.
- STAJKOVIĆ, O.; DELIĆ, D.; JOŠIĆ, D., KUZMANOVIĆ, D.; RASULIĆ, N. & KNEŽEVIĆ-VUKČEVIĆ, J. Improvement of common bean growth by co-inoculation with *Rhizobium* and plant growth-promoting bacteria. *Romanian Biotechnological Letters*, v.16, n.1, p.5919-2011, 2011.
- STRZELCZYK, E.; KAMPER, M. & LI, C. Cytokinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. *Microbiological Research*, v.149, p.55-60, 1994.
- SUBBA RAO, N. S. Advances in agricultural microbiology. In: SUBBA RAO N. S., editor. *Studies in the Agriculture and Food Sciences*. London: Butterworth Scientific, 1982. pp. 295–303.
- TANG, W. H. Yield-increasing bacteria (YIB) and biocontrol of sheath blight of rice. In: RYDER, M. H.; STEPHENS, P. M. & BOWEN, G. D. (eds.). *Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria*. Adelaide: Division of Soils CSIRO, 1994. p. 267-273.
- TANG, W.H. & YANG, H. Research and application of biocontrol of plant diseases and PGPR in China. In: OGOSHI, A.; KOBAYASHI, K.; HOMMA, Y.; KODAMA, F.; KONDO, N. & AKINO, S. (eds.). *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria - present status and future prospects*. Sapporo: Hokkaido University, 1997. p. 4-9.
- ROJAS-TAPIAS, D. F.; BONILLA, R. & DUSSÁN, J. Effect of inoculation and co-inoculation of *Acinetobacter* sp. RG30 and *Pseudomonas putida* GN04 on growth, fitness, and copper accumulation of maize (*Zea mays*). *Water Air Soil Pollut*, v. 225, p.2-13, 2014.
- TCHEBOTAR, V. K., KANG, U. G., ASIS, C. A., & AKAO, J. S. The use of GUS-reporter gene to study the effect of *Azospirillum–Rhizobium* coinoculation on nodulation of white clover. *Biology and Fertility of Soils*, v.27, p.349-352, 1998.
- TILAK, K. V. B. R.; RANGANAYAKI, N. & MANOHARACHARI, C. Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and *Rhizobium* on nodulation and nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan*). *European Journal of Soil Science*, v.57, p.67–71, 2006.
- TSAI, S. M.; BONETTI, R.; AGBALA, S. M. & ROSSETTO, R. Minimizing the effect of mineral nitrogen on biological nitrogen fixation in common bean by increasing nutrient levels. *Plant and Soil*, v.152, p.131-138, 1993.
- VALADÃO, F. C. A.; JAKELAITIS, A.; CONUS, L. A.; BORCHARTT, L.; OLIVEIRA, A. A. & VALADÃO JUNIOR, D. D. Inoculação das sementes e adubações nitrogenada e molíbdica do feijoeiro-comum, em Rolim de Moura, RO. *Acta Amazonica*, v.39, p.741-748, 2009.
- VARGAS, M. A. T.; MANDES, I. C. & HUNGRIA, M. Response of field grown bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Rhizobium* inoculation and nitrogen fertilization in two Carrados soils. *Biol Fertil Soils*, v.33, p.228-233, 2000.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*, v.255, p.571–586, 2003.

VOLPIN, H. & KAPULNIK, Y. Interaction of *Azospirillum* with beneficial soil microorganisms. In: OKON, Y. (ed.). *Azospirillum/Plant Associations*. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.111-118.

WANG, S.; HUIJUN, W.; JUNQING, Q.; LINGLI, M.; JUN, L.; YANFEI, X.; XUEWEN, G. Molecular mechanism of plant growth promotion and induced systemic resistance to tobacco mosaic virus by *Bacillus* spp. *J Microbiol Biotechnol*, v.19, p.1250-1258, 2009.

WEIR, B. S. The current taxonomy of rhizobia. 2012. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>. Acesso em: 06 Agosto, 2014.

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

WILCOX, G. E.; FAGERIA, N. K. Deficiências nutricionais do feijão, sua identificação e correção. Goiânia: Embrapa/CNPAF, 1976. 22 p. (Embrapa/CNPAF. Boletim, 5).

YADEGARI, M. & RAHMANI, H. A. Evaluation of bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds inoculation with *Rhizobium phaseoli* and plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) on yield and yield componentes. *African Journal of Agricultural Research*, v.5, p.792-799, 2010.

YADEGARI, M.; RAHMANI, H. A.; NOORMOHAMMAD, G. & AYNEBAND, A. Evaluation of bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds inoculation with *Rhizobium phaseoli* and plant growth promoting rhizobacteria on yield and yield components. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v.11, p.1935-1939, 2008.

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

YASARI, E.; ESMAEILI AZADGOLEH, M. A.; MOZAFARI, S. & ALASHTI, M. R. Enhancement of growth and nutrient uptake of Rapeseed (*Brassica napus* L.) by applying mineral nutrients and biofertilizers. *Pak J Biol Sci*, v.12, p.127-133, 2009.

YOUNG, J. M. Correction to the authority of *Rhizobium leguminosarum*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.49, p.1943, 1999.

YOUNG, J. P. W. & HAUKKA, K. E. Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytologist*, Oxford, v.133, p.87-94, 1996.

ZUFFO, A. M.; REZENDE, P. M.; BRUZI, A. T.; OLIVEIRA, M. T.; SOARES, I. O.; NETO, G. F. G.; CARDILLO, B. E. S. & SILVA, L. O. Co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* in the soybean crop. *Revista de Ciências Agrárias*, v.38, p.87-93, 2015.

## 8 ANEXOS

**Tabela 30.** Análise de variância dos caracteres de acúmulo de biomassa e conteúdo de N na parte aérea no experimento em vasos de Leonard.

Fonte de variação	GL	Massa de parte aérea	Massa de raiz	Conteúdo de N na parte aérea
Repetição	7	39,818	2,104	2,080
Estirpe	4	26,020	13,046*	6,918*
Dose	2	46,933	18,025*	1,118
Est x dose	8	50,797	8,185	2,285
Trat. extras	2	629,865**	39,626**	32,653**
Erro	120	38,346	4,588	2,388

\*, \*\* Significativo aos níveis de 5 e 1% pelo teste F.

Interação estirpe x dose significativa a 24% para massa de parte aérea.

**Tabela 31.** Análise de variância dos caracteres de massa de nódulos, número de nódulos e massa unitárias de nódulos no experimento em vasos de Leonard.

Fonte de variação	GL	Massa de nódulos	Número de nódulos	Massa unitária de nódulos
Repetição	3	1,144	6,495	29,607
Estirpe	4	2,978	43,851**	96,092**
Dose	2	58	24,526*	56,492
Est x dose	8	1,538	35,041**	57,872*
Trat. extras	2	19,760**	212,580**	528,117**
Erro	52	1,360	5,143	24,327

\*, \*\* Significativo aos níveis de 5 e 1% pelo teste F.

**Tabela 32.** Análise de variância dos caracteres de biomassa e conteúdo de N no experimento em vasos de solo.

Fonte de variação	GL	Massa de parte aérea	Massa de folha	Conteúdo de N na folha	Conteúdo de N no caule	Conteúdo de N na parte aérea
Repetição	3	20,166	21,416**	105,903	274,458**	272,476
N	1	2.062,552**	853,333**	74.306,610**	17.683,124**	164.494,670**
Estirpe	2	13,952	2,589	248,233	162,319	246,726
N x est	2	5,258	285	69,017	10,820	113,339
Dose	1	8,533	4,219	7,351	32,240	8,802
N x dose	1	1,633	5,208	229,910	323,737**	8,060
Est x dose	2	12,758	3,689	763,976**	117,672	1.409,829**
N x est x dose	2	5,852	5,204	705	174,348	184,707
Trat. extras	3	785,442**	333,595**	25.119,012**	3.257,788**	45.824,516**
Erro	46	9,259	4,188	282,782	72,690	416,984

\*, \*\* Significativo aos níveis de 5 e 1% pelo teste F.

Interação estirpe x dose significativa a 26% para massa de parte aérea.

**Tabela 33.** Análise de variância dos caracteres de nodulação no experimento em vasos de solo.

Fonte de variação	GL	Massa de nódulos	Número de nódulos
Repetição	3	22,530**	33,561*
Estirpe	2	4,279	3,921
Dose	1	4,187	2,838
Est x dose	2	9,359	12,995
Trat. extras	2	225,393**	402,475**
Erro	25	4,772	9,331

\*, \*\* Significativo aos níveis de 5 e 1% pelo teste F.

Interação estirpe x dose significativa a 16% para massa de nódulos.