

UFRRJ

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E
BIOTECNOLOGIA APLICADA**

DISSERTAÇÃO

**AVALIAÇÃO DA NODULAÇÃO EM DIFERENTES ESTÁDIOS
FENOLÓGICOS DO FEIJOEIRO-COMUM**

KAOANY FERREIRA DA SILVA

2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E
BIOTECNOLOGIA APLICADA**

**AVALIAÇÃO DA NODULAÇÃO EM DIFERENTES ESTÁDIOS
FENOLÓGICOS DO FEIJOEIRO-COMUM**

KAOANY FERREIRA DA SILVA

Sob orientação do Pesquisador
Ederson da Conceição Jesus

e Co-orientação do Professor
Adelson Paulo de Araújo

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Biotecnologia Aplicada**, no Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, área de concentração em Biotecnologia Aplicada.

Seropédica - RJ
Julho de 2019.

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

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

S586a Silva, Kaoany Ferreira da, 1994-
Avaliação da Nodulação em Diferentes Estádios Fenológicos Do Feijoeiro-Comum / Kaoany Ferreira da Silva. - Seropédica, 2019.
29 f.: il.

Orientador: Ederson da Conceição Jesus.
Coorientador: Adelson Paulo de Araújo.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, 2019.

1. Fixação Biológica de Nitrogênio. 2. Nodulação Tardia. 3. Feijoeiro comum. I. Jesus, Ederson da Conceição, 1979-, orient. II. Araújo, Adelson Paulo de, -, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada. IV. Título.

"O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001" "This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001"

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

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E BIOTECNOLOGIA
APLICADA

KAOANY FERREIRA DA SILVA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Biotecnologia**, no Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, área de concentração em Biotecnologia Aplicada.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM:

Ederson da Conceição Jesus. Dr. Embrapa Agrobiologia
(Orientador)

Irene da Silva Coelho. Dr. UFRRJ

Rosângela Stralotto. Dr. Embrapa Solos

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder mais essa bênção na minha vida pessoal e acadêmica.

Aos meus pais, Conceição e Floriano, por terem me dado toda a base necessária para chegar até esta etapa da minha vida, com muito amor e compreensão sempre. Esta vitória é de vocês!

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por ter sido minha segunda casa durante estes 7 anos, e ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, pela oportunidade de realizar um curso de Mestrado de qualidade.

À fundação Capes pelo incentivo à pesquisa e concessão da bolsa.

Ao meu orientador Ederson da Conceição Jesus por me instruir com paciência e dedicação singulares. Seu modo de orientação teve grande significado, fica aqui minha eterna gratidão!

Ao meu co-orientador Adelson Paulo de Araújo por me transmitir toda a sua sabedoria com proatividade e paciência. Muito obrigada!

A Embrapa Agrobiologia por, além de proporcionar todo o suporte necessário para o desenvolvimento dos meus trabalhos, ter me presenteado com eternos amigos.

Aos colegas de trabalho e amigos para toda a vida Rita, Albiane, Nathália, Gabriela, Lorraine, Liliandra, Lumi, Wilson, Lúcio, Seu Claudinho, Marcelo, Danilo, Roberto, Tatiana, Thiago, Luan, Tamiris e Cecília. Vocês foram grandes responsáveis por me apresentar um ambiente onde se é imensamente prazeroso trabalhar.

Aos amigos de graduação Roberta, Paula, Ana Rafaela, Yann, Débora, Felipe, Marlon, Ricardo e tantos outros que me apoiaram e acreditaram no meu potencial, tornando todo o meu tempo na UFRRJ fácil e imensamente prazeroso.

Aos membros Irene, Rosângela, Ellen e Rafael por terem aceitado o convite de compor a banca avaliadora.

A todos que, de alguma forma, me apoiaram para atingir mais esta fase.

BIOGRAFIA

Kaoany Ferreira da Silva nasceu em 23 de maio de 1994, na cidade de São Paulo - SP, filha de Conceição de Medeiros Ferreira e Floriano da Silva. Coursou ensino médio na Escola Técnica do Rio de Janeiro, formando-se em 2011 como Técnica em Informática. No segundo semestre de 2012, ingressou no curso de graduação em Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), diplomando-se como Engenheira Agrônoma em 2017. Durante a graduação, atuou como estagiária no Departamento de Fitotecnia, do Instituto de Agronomia, sob orientação da Dra. Margarida Goréte Ferreira do Carmo, desenvolvendo projetos na área de Fitopatologia de Plantas em Tomate. Em agosto de 2017, ingressou como aluna de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada sob orientação do Dr. Ederson da Conceição de Jesus, onde foi bolsista CNPq.

ÍNDICES DE TABELAS

Tabela 1. Atributos químicos das amostras de solo coletadas provenientes de camada superficial e subsuperficial do Argissolo.....	7
Tabela 2. Composição de Solução Nutritiva aplicada no solo dos experimentos.....	10
Tabela 3. Solução nutritiva aplicada aos 7 e 15 dias após semeadura dos vasos com vermiculita e pedrisco.....	13
Tabela 4. Massa seca de parte aérea e de raiz sob tratamentos de solo de camada superficial, de camada subsuperficial com pedrisco e vermiculita com pedrisco.....	15
Tabela 5. Massa seca de parte aérea, massa seca de nódulos e número de nódulos da cultivar Pérola nas coletas em estágios R6 e R8 sob diferentes profundidades de inoculação em Maio de 2018.....	17
Tabela 6. Massa seca de parte aérea, massa seca de nódulos e número de nódulos da cultivar Pérola nas coletas em estágio R6 e R8 sob diferentes profundidades de inoculação em Outubro de 2018.....	18
Tabela 7. Massa seca de parte aérea, massa seca de nódulos e número de nódulos da cultivar Pérola sob diferentes momentos de reinoculação com coleta realizada em floração plena.....	19
Tabela 8. Massa seca de parte aérea, massa seca de nódulos, número de nódulos e percentagem de nódulos inativos da cultivar Pérola sob diferentes momentos de reinoculação com coleta realizada em enchimento de grãos.....	21
Tabela 9. Análise de variância (Quadrados Médios) dos dados de massa seca de parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN) e massa seca de nódulos (MSN) de feijoeiro comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.), cultivar Pérola sob inoculação em diferentes seções do sistema radicular, coletado em R6 (Maio, 2018).....	28
Tabela 10. Análise de variância (Quadrados Médios) dos dados de massa seca de parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN) e massa seca de nódulos (MSN) de feijoeiro comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.), cultivar Pérola, sob inoculação em diferentes seções do sistema radicular, coletado em R8 (Maio, 2018).....	28
Tabela 11. Análise de variância (Quadrados Médios) dos dados de massa seca de parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN) e massa seca de nódulos (MSN) de feijoeiro comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.), cultivar Pérola, sob inoculação em diferentes seções do sistema radicular, coletado em R6 (Outubro, 2018).....	28
Tabela 12. Análise de variância (Quadrados Médios) dos dados de massa seca de parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN) e massa seca de nódulos (MSN) de feijoeiro comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.), cultivar Pérola, sob inoculação em diferentes seções do sistema radicular, coletado em R8 (Outubro, 2018).....	29
Tabela 13. Análise de variância (Quadrados Médios) dos dados de massa seca de parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN) e massa seca de raiz (MSR) de feijoeiro comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.), cultivar Pérola, inoculado sob diferentes tratamentos de reinoculação, coletado em R6 (Maio, 2019).....	29
Tabela 14. Análise de variância (Quadrados Médios) dos dados de massa seca de parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN) e massa seca de raiz (MSR) de feijoeiro comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.), cultivar Pérola, inoculado sob diferentes tratamentos de reinoculação, coletado em R8 (Maio, 2019).....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Produção brasileira de Feijão, com enfoque nos principais Estados produtores (SIDRA, 2019).....	4
Figura 2. Comparativo de produtividade por região (em kg.ha ⁻¹) de feijoeiro entre as safras 2017/18 e 2018/19 (SIDRA, 2019).....	4
Figura 3. Ensaio experimental para avaliação do desenvolvimento do feijoeiro comum cv. Pérola em diferentes substratos e sob diferentes formas de irrigação em casa de vegetação.....	8
Figura 4. Ensaio em casa de vegetação para determinação de densidade de rizóbios das amostras de solo de camada superficial e subsuperficial de Argissolo através do Método de Número Mais Provável (NMP).....	8
Figura 5. Esquema ilustrativo dos tratamentos adotados nos experimentos de avaliação da nodulação do feijoeiro comum sob reinoculação com <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 em diferentes profundidades no solo em Outubro de 2018, sendo eles: T1- Carvão inoculado na terça superior do vaso; T2- Carvão inoculado no terço médio do vaso; T3- Carvão inoculado no terço inferior do vaso; T4- Carvão inoculado ao longo do vaso; T5- Inoculante turfoso em Semente; T6 - Testemunha Absoluta. A cor preta indica que a semente e o carvão de uma dada seção foram inoculados com <i>R. tropici</i>	10
Figura 6. Experimentos instalados em casa de vegetação sob Delineamento em Blocos Casualizados para avaliação da nodulação do feijoeiro comum sob reinoculação em diferentes profundidades no solo aos 15 dias após emergência.....	11
Figura 7. Experimentos instalados em casa de vegetação sob Delineamento em Blocos Casualizados para avaliação da nodulação do feijoeiro comum sob reinoculação em diferentes profundidades no solo aos 47 dias após emergência.....	12
Figura 8. Visão geral dos experimentos instalados em casa de vegetação sob Delineamento em Blocos Casualizados para avaliação da nodulação do feijoeiro comum sob reinoculação em diferentes estágios fenológicos aos 15 dias após emergência.....	13
Figura 9. Vasos coletados em floração plena para avaliação de nodulação em feijoeiro comum sob reinoculação em diferentes estágios fenológicos sob tratamentos: T1- Testemunha absoluta; T2- Cultivar não nodulante (NORH 54); T3- Inoculante Turfoso em Semente; T4- Inoculante Turfoso em Semente + Reinoculação em V3; T5- Inoculante Turfoso em Semente + Reinoculação em V4; T6- Inoculante turfoso em semente + Reinoculação em V3 e V4.....	14
Figura 10. Experimento para avaliação da nodulação do feijoeiro reinoculado em diferentes estágios fenológicos. Os vasos foram coletados no período de enchimento de grãos. Os tratamentos são: T1- Testemunha absoluta; T2- Cultivar não nodulante (NORH 54); T3- Inoculante Turfoso em Semente; T4- Reinoculação em V3; T5- Reinoculação em V4; T6- Reinoculação em R5; T7- Reinoculação em R6; T8- Reinoculação em V3, V4, R5 e R6. Todas as sementes, exceto as do T1 receberam inoculante turfoso no momento da semeadura.....	14

RESUMO

SILVA, Kaoany Ferreira da. **Avaliação da nodulação em diferentes estádios fenológicos do feijoeiro-comum**. 2019. 30 f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia Aplicada). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

A fixação biológica do nitrogênio, processo provedor de N de alta importância para a cultura do feijoeiro, inicia sua contribuição para a nutrição da planta entre 15 e 20 dias após a emergência, não se estendendo a fases mais tardias como enchimento de grãos. Segundo a literatura, o feijoeiro comum possui potencial de nodulação em fases mais avançadas do seu ciclo, o que, se confirmado, poderia resultar em aumento de rendimento de grãos do feijoeiro. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de nodulação tardia no feijoeiro e sua contribuição para o desenvolvimento da planta em casa de vegetação. Primeiro foi realizado um ensaio para se determinar o melhor substrato e o melhor método de irrigação a serem utilizados nos experimentos de nodulação. Uma vez escolhido o substrato ideal, seis experimentos foram conduzidos em casa de vegetação sob delineamento em blocos casualizados. Em quatro deles, a nodulação foi forçada em diferentes seções do sistema radicular da planta. Em outros dois experimentos, avaliou-se o efeito da reinoculação em diferentes estágios de desenvolvimento da planta. De acordo com os resultados obtidos, não houve diferença significativa entre os tipos diferentes de irrigação. O substrato escolhido foi uma camada subsuperficial de solo, a qual, devido à baixa carga de rizóbios, foi identificada como a melhor opção. Os experimentos relacionados à nodulação da planta, apresentaram diferença quanto ao efeito dos tratamentos sobre o número de nódulos. Pôde-se observar que as diferentes estratégias adotadas para estimular a nodulação tardia, tanto a interação da bactéria em diferentes seções da raiz quanto a reinoculação em diferentes estágios de desenvolvimento, não foram suficientes para estimular uma nodulação tardia contribuinte para o desenvolvimento da planta, sendo a inoculação em semente efetiva e suficiente para garantir o bom desenvolvimento da planta.

Palavras-chave: Fixação Biológica de Nitrogênio, *Rhizobium tropici*, simbiose.

ABSTRACT

SILVA, Kaoany Ferreira da. **Assessment of nodulation on different phenological stages of Common Bean.** 2019. 30 f. Dissertation (Master's Applied Biotechnology). Institute of Biological Science and Health, Rural Federal University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

The biological nitrogen fixation, a process that provides N to common beans, starts to contribute significantly to the nutrition of the plant between 15 and 20 days after its emergence. This process does not extend to the latest phases of the cycle, such as pod filling. According to the literature, the common bean has the ability to nodulate in advanced phases of its cycle, which, if confirmed, may result in increased grain yields. The aim of this work was to evaluate the occurrence of late nodulation on common beans and its contribution to the development of the plant under controlled conditions. First, an essay was carried out aiming at choosing the best substrate and irrigation methods to be adopted on the other experiments. Once the ideal substrate was defined, six experiments following a randomized block design were carried in a greenhouse. The nodulation was forced in different sections of the root system in four of these experiments. In the other two experiments, the effect of the re-inoculation of rhizobia in different plant development stages was evaluated. According to the obtained results, all irrigation methods had the same performance. The chosen substrate was the soil subsuperficial layer due to its low content of rhizobia. A significant difference in the number of nodules was observed in the experiments evaluating plant nodulation. The different strategies adopted to stimulate late nodulation were not sufficient to stimulate late nodulation, and the seed inoculation was effective enough to promote a well-developed plant.

Keywords: Biological nitrogen fixation, *Rhizobium tropici*, symbiosis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. A Cultura do Feijoeiro Comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	2
2.2. Importância Sócio-Econômica do Feijoeiro	3
2.3. Fixação Biológica de Nitrogênio em Leguminosas	4
2.4. Nodulação Tardia em Leguminosas	6
3 MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1. Escolha do Substrato Ideal e Melhor Método de Irrigação para Condução dos Experimentos	7
3.1.1. Avaliação do desenvolvimento vegetal sob diferentes substratos e métodos de irrigação em casa de vegetação	7
3.1.2. Determinação da densidade de rizóbio dos solos	8
3.2. Avaliação da Nodulação do Feijoeiro Comum sob Inoculação em Diferentes Seções do Sistema Radicular	9
3.3. Avaliação da Nodulação do Feijoeiro Comum sob Reinoculação em Diferentes Estágios Fenológicos	12
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1. Escolha do Substrato Ideal e Melhor Método de Irrigação para Condução dos Experimentos	15
4.2. Avaliação da Nodulação do Feijoeiro Comum sob Inoculação em Diferentes Seções do Sistema Radicular	16
4.3. Avaliação da Nodulação do Feijoeiro Comum sob Reinoculação em Diferentes Estágios Fenológicos	19
5 CONCLUSÕES GERAIS	23
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
ANEXOS	28
I - QUADROS DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS EXPERIMENTOS	
28	

1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro é uma das culturas de maior importância econômica e social no Brasil, o terceiro maior produtor mundial em 2017 (COELHO, 2017). Pertencente à família Fabaceae e ao gênero *Phaseolus*, o qual apresenta aproximadamente 55 espécies conhecidas na literatura, a espécie *Phaseolus vulgaris* L. (FILGUEIRA, 2008).

Sendo uma cultura altamente dependente do nitrogênio para desenvolvimento e produção de grãos, o feijoeiro tem o processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN) em leguminosas, resultado da simbiose entre plantas e bactérias conhecidas como rizóbios, como fonte primária para o suprimento da demanda fisiológica de nitrogênio. Esta interação simbiótica do feijoeiro com rizóbios, bactérias capazes de induzir nodulação em leguminosas, abrange diversos estágios para formação de nódulos, que se inicia entre 7 a 15 dias após a emergência, enquanto a contribuição significativa da FBN para planta em termos de desenvolvimento se inicia por volta de 15 a 20 dias após emergência (CARNEIRO et al., 2014).

A resposta da planta em relação à interação simbiótica com o rizóbio é variável de acordo com a estirpe do rizóbio a ser adotada para a inoculação, assim como a cultivar a ser cultivada. Ambos fatores se diferenciam em diversas características influentes no processo de nodulação, onde as cultivares do feijoeiro podem apresentar diferenças no grupo de flavonóides exsudados na rizosfera, enquanto as estirpes podem apresentar diferenças em fatores de nodulação e na especificidade da proteína NodD, que reconhece os sinais químicos, dentre outros (GRAHAM, 1981; SANTOS et al., 2008).

A formação dos nódulos ocorre de forma contínua até a planta atingir o seu pico de nodulação, ocorrente no estágio de floração. A partir deste momento, ocorre grande senescência dos nódulos, por volta dos 45 dias após a emergência, com grande declínio de atividade da nitrogenase nos estágios que a planta mais demanda nitrogênio para enchimento de grãos (VICKMAN e VESSEY, 1992).

Em trabalhos já desenvolvidos anteriormente, a possibilidade da ocorrência de nodulação tardia e contribuinte para fixação biológica de nitrogênio no feijoeiro-comum foi muito questionada. Em alguns, pôde-se comprovar que o feijoeiro possui potencial para fixação biológica de nitrogênio em estágios mais tardios. Porém, os mesmos não foram conclusivos para continuidade na formação de nódulos, onde alguns autores consideram como possibilidade a presença de estirpes nativas competitivas, características de solo e cultivo e entre outros (VICKMAN e VESSEY, 1992; HUNGRIA et al., 2003).

Com estas questões em mente, a hipótese científica adotada neste trabalho foi a de que o feijoeiro-comum possui potencial de nodulação secundária capaz de contribuir para fixação biológica de nitrogênio em estágios avançados do ciclo da planta. Para testar tal hipótese, as plantas foram submetidas a duas estratégias de inoculação, sendo estas a distribuição espacial em profundidade de *Rhizobium tropici* (CIAT 899) no solo e a reinoculação das plantas em diferentes estágios de desenvolvimento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A Cultura Do Feijoeiro Comum (*Phaseolus vulgaris* L.)

O feijoeiro é uma cultura originária das Américas Central e do Norte, com grande ocorrência botânica na área entre México e Argentina, onde passou por processos de domesticação (GEPTS e DEBOUCK, 1991) e, desde então, continua sendo amplamente cultivada e consumida. Originalmente, o feijoeiro comum apresenta desenvolvimento prostrado ou trepador, o que se refletia em dificuldades quanto a pratos culturais, colheita e sanidade dos grãos (CARNEIRO et al., 2014). A proximidade da planta em relação ao solo facilita o acamamento de plantas, impedimento do trânsito de maquinários, alta incidência de pragas e doenças devido a baixa aeração entre plantas, além da baixa qualidade dos grãos devido a alta umidade na lavoura e perdas durante a colheita. Diante deste quadro, diversos programas de melhoramento genético foram desenvolvidos com a cultura, visando solução destes problemas e conservando a boa produtividade da planta (STONE et al., 1994; OLIVEIRA et al., 2018).

O feijoeiro apresenta dois tipos de folha: 1 par de folhas simples ou primárias, emitidas inicialmente, seguido da emissão de trifólios, chamadas de folhas verdadeiras. A emissão dessas folhas se dá a partir de um único caule herbáceo com um determinado número de nós, que varia de acordo com a planta e manejo, equivalente ao número de ramificações do caule. Cada nó apresenta uma tríade de gemas axilares, as quais têm potencial para assumir função vegetativa, floral ou ambos, ou seja, qualquer gema pode emitir somente folhas, ramos e hastes ou somente flores e vagens e, em alguns casos, pode exercer ambas funções, constituindo uma unidade de produção (CARNEIRO et al., 2014). Este potencial se expressa de acordo com a fenologia do feijoeiro, composta pelas fases vegetativa, de transição e reprodutiva. O início da fase vegetativa é demarcado pela germinação da semente (fase V0) e se estende à abertura do terceiro trifólio ou folha verdadeira (fase V4). Após esta fase, encontra-se a fase de transição, onde a partir da divisão, expansão e diferenciação celular ocorrente nas gemas, têm-se a determinação da função das mesmas. O aparecimento de botões florais (fase R5) ou racimos florais demarca o início da fase reprodutiva, caracterizada pela emissão de flores completas e frutos caracterizados como vagens ou legumes, que alcançam a maturidade com a seca e queda das folhas e secagem de sua parte externa (fase R9), caracterizado pelo fim da fenologia da planta. Todo o ciclo fenológico de feijoeiro dura em torno de 75 a 110 dias, sendo a duração das fases dependentes de fatores bióticos, como características intrínsecas do genótipo da planta, e abióticos, como temperatura e umidade, os quais interferem diretamente nos estágios fenológicos da planta (CARNEIRO et al., 2014).

A planta do feijoeiro é em maioria de caráter arbustivo, porém sua morfologia tende a variar em função do hábito de crescimento, podendo ser classificado como determinado, onde a planta finaliza o aparecimento de partes vegetativas com a emissão de inflorescências, ou indeterminado, apresentando plantas com emissão simultânea de estruturas vegetativas e reprodutivas durante um período (OLIVEIRA et al., 2018). Diante disto, o feijoeiro apresenta 4 hábitos de crescimento: Tipo I, caracterizado por plantas de crescimento determinado, emissão de flores a partir de gemas apicais da haste principal e das ramificações e apresentam período curto de floração; Tipo II, apresenta cultivares arbustivas de crescimento indeterminado, com emissão de inflorescência a partir de gemas axilares, de caule com poucas ramificações laterais e curtas; Tipo III, agrupado por plantas de crescimento indeterminado, com tendência a serem prostradas

ou trepadoras com caule bem ramificado e bem desenvolvido, com presença de guias longas, caracterizada pela não uniformidade de maturação dos grãos; Tipo IV, constituído por plantas de crescimento indeterminado e hábito trepador ou prostrado, apresenta poucas ramificações laterais e forte dominância da porção apical, além de ter a não uniformidade na maturidade dos grãos mais expressiva chegando a ter grandes perdas na produtividade. As plantas mais utilizadas comercialmente são as variedades de hábito de crescimento indeterminado devido a continuidade de emissão de estruturas reprodutivas durante seu crescimento. Além disto, também apresentam maior número de nós, refletindo em um maior número de unidades de produção (CARNEIRO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2018).

A cultura apresenta três principais safras no Brasil: safra das águas, a qual a colheita se concentra entre os meses de novembro a março, safra da seca, onde a colheita se estende de abril a julho, e safra de inverno, com a colheita ocorrendo entre agosto e outubro. Os períodos de safra não apresentam duração e/ou data definidos, porém se diferenciam quanto à região brasileira a que se aplica, sendo que na região Sudeste predomina a safra das águas e da seca (CARNEIRO et al., 2014).

2.2. Importância Sócio-econômica do Feijoeiro

O feijão é caracterizado por ser um componente básico do prato brasileiro, sendo que 71,9% de pessoas com 18 anos ou mais consomem feijão regularmente (PNS, 2016), além de ser um forte atuante na alimentação de outros países em desenvolvimento, os quais já foram responsáveis por 86,7% do consumo mundial de feijão. Segundo o PNAD, o Brasil já apresentou índices de aproximadamente 40% de sua população com quadros de insegurança alimentar, onde 56,5% de maiores de 18 anos com quadros de sobrepeso e obesidade e 6% das crianças com quadro de desnutrição crônica, ressaltando ainda mais a necessidade de uma boa fonte de proteína na alimentação básica (FAO, 2018). Apesar de o último índice citado aparentar ser baixo, a fome no Brasil e a dificuldade ao acesso ao bom alimento ainda é um fato bastante presente no país (PNAD, 2013).

Atualmente, grande parte da produção nacional atual é sustentada por pequenos produtores e pela agricultura familiar, de propriedades pequenas e mão-de-obra menos qualificada. A cultura do feijoeiro é cultivada em todos os estados brasileiros, tanto em cultivo solteiro quanto consorciado com outras culturas, ainda que em menor escala. Os principais estados produtores são os Estados de Paraná, Minas Gerais, Mato Grosso, Goiás e São Paulo, compondo aproximadamente 70% da produção nacional (SIDRA, 2019) (Figura 1). Na safra 2017/18, a região Nordeste apresentou a maior área plantada e a região Sudeste, a maior produtividade (KLUTHCOUSKI et al., 2009; CONAB, 2018). Segundo a Conab, a safra de 2016/17 atingiu a produtividade média de 1.067 kg ha⁻¹. Entre os consumidores, os mais populares são os tipos carioca (63% da produção) e preto (18%). Segundo dados da Conab, em 2017 a demanda para consumo interno ainda era superior à produção, o que caracteriza uma produção direcionada quase que em totalidade para o próprio consumo.

No que se refere à safra 2018/19, apesar da cultura ter apresentado uma pequena redução de 5% em área plantada e aproximadamente 2% em produção, a produtividade se apresentou maior comparado à safra 2017/18, atingindo 1.017 kg ha⁻¹. Este aumento da produtividade foi expressivo regionalmente, como ocorreu na região Sul e Sudeste, que mais expressaram este aumento (Figura 2) (SIDRA, 2019).

Produção brasileira de Feijão (t) (2018)

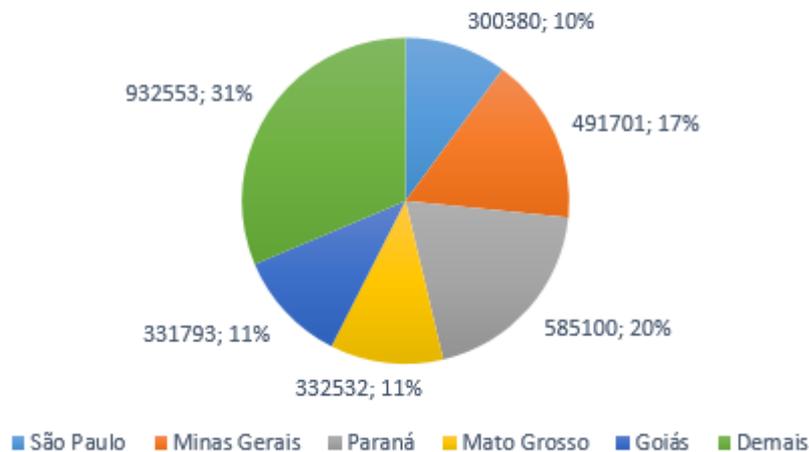


Figura 1. Produção brasileira de Feijão, com enfoque nos principais Estados produtores (SIDRA, 2019).

Produtividade por região (kg/ha)

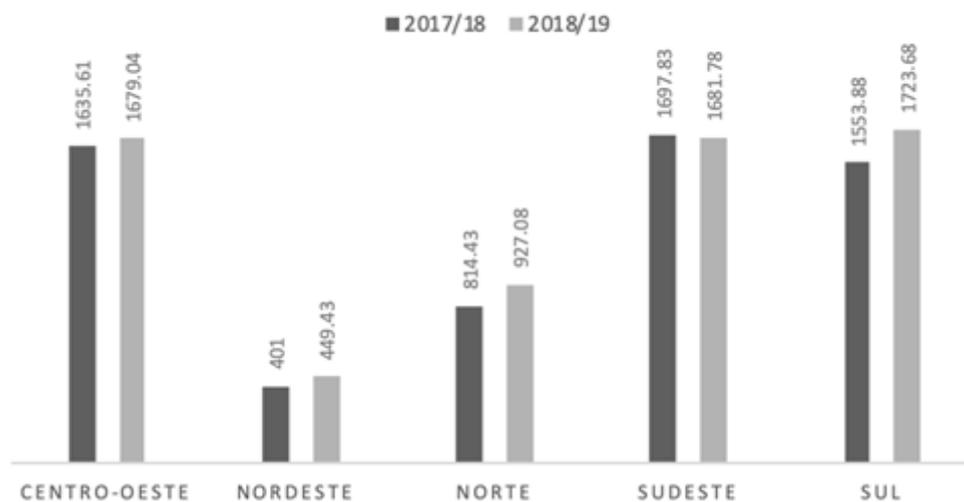


Figura 2. Comparativo de produtividade por região (em kg ha⁻¹) de feijoeiro entre as safras 2017/18 e 2018/19 (SIDRA, 2019).

2.3. Fixação Biológica de Nitrogênio em Leguminosas

O nitrogênio é um dos macronutrientes de maior importância para o desenvolvimento e produtividade das plantas, assumindo papel funcional e estrutural, através da constituição de proteínas e ácidos nucleicos. A absorção do nitrogênio pode se dar de duas formas distintas, na forma de nitrato através de sistema simporte, e na forma de amônio por sistema uniporte, onde as duas vias se distinguem em rota metabólica e demanda de energia (POSTGATE, 1998). A disponibilidade deste macronutriente para as plantas também pode ocorrer de diversas formas, sendo de origem atmosférica, decomposição da matéria orgânica, fertilizantes nitrogenados, dentre outros. A adubação nitrogenada via fertilizantes é comum nas lavouras, apesar do encarecimento exercido sobre o custo de produção e da ação poluente sobre solos e

corpos hídricos. Além disto, fertilizantes nitrogenados tendem a causar grandes impactos na biota do solo, composta por diversos microrganismos que realizam inúmeras funções relevantes à manutenção da biosfera e desenvolvimento das plantas. Dentre estes encontram-se as bactérias nitrificantes, as quais convertem amônia disponível no solo para nitrato ou nitrito, e os rizóbios (POSTGATE, 1998).

O termo Rizóbio está atrelado a todas as bactérias que apresentam a capacidade de induzir a formação de nódulos em raízes de leguminosas, e de fixar nitrogênio a partir da simbiose com a planta, pertencentes a espécies de gêneros como *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Bradyrhizobium*, dentre outros. Estas bactérias se encontram localizadas originalmente na rizosfera, se beneficiando de exsudatos radiculares, o que promove a aproximação entre a bactéria e o sistema radicular da planta. A interação tem início na comunicação estabelecida entre a bactéria e a planta através de moléculas denominadas de flavonoides, liberadas pelas raízes, e fatores de nodulação (fatores Nod), liberadas pelos rizóbios e relacionadas diretamente ao processo de formação de nódulos. Feita esta comunicação, a bactéria dá início à infecção do pelo radicular, o qual se curva em resposta aos fatores Nod (SANTOS et al., 2008). A partir da deformação do pelo radicular, começa a degradação de sua parede celular e a extensão do cordão de infecção para que, posteriormente, ocorra a formação propriamente dita dos nódulos, onde a bactéria assume uma forma endo-simbiótica chamada de bacteróide. A formação de nódulos ocorre também devido à necessidade do isolamento de seu interior, onde atua a nitrogenase, que é altamente sensível ao oxigênio, transformando o N₂ (nitrogênio atmosférico) em NH₃ (amônia), para que então possa ocorrer a assimilação do nutriente pela planta, o qual é transportado prioritariamente na forma de ureídeos (POSTGATE, 1998; JESUS, 2003).

O fenômeno mais importante após o estabelecimento da bactéria nos nódulos é o *quorum-sensing*, fator que controla a densidade de rizóbios dentro de cada nódulo e, juntamente aos fatores Nod, há também o controle do número de nódulos no sistema radicular, além de atuar baseado na percepção da necessidade de nitrogênio (SANTOS et al., 2008).

Os rizóbios apresentam-se suscetíveis às características de seu meio até o momento de seu estabelecimento na planta. Portanto, a relação entre a bactéria e a planta pode ser afetada por fatores como a fertilidade do solo, principalmente quando ácidos; a temperatura, uma vez que a maioria das estirpes podem apresentar instabilidade genética em relação a altas temperaturas; e umidade, já que a presença de água no meio permite a locomoção dos rizóbios no solo (HUNGRIA et al., 2000).

O feijoeiro é considerado uma leguminosa de alta promiscuidade, devido aos distintos gêneros de rizóbios com os quais pode apresentar relação simbiótica, facilitando o fácil estabelecimento desta relação, porém gerando alta competitividade entre bactérias em sua rizosfera. Segundo Hungria et al. (2000), é devido a este quadro de competitividade que se faz necessário o uso de estirpes competitivas e eficientes, uma vez que o feijoeiro pode estabelecer simbiose com bactérias de baixo potencial para realização da FBN, fato que é de comum ocorrência nos solos brasileiros. Todas estas problemáticas ocorrentes no âmbito da nutrição nitrogenada do feijoeiro, despertaram em pesquisadores a necessidade de seleção de estirpes de rizóbios nativos, como SEMIA 4088 e SEMIA 4080, que são atualmente estirpes recomendadas para a confecção de inoculantes comerciais (HUNGRIA e NEVES, 1987; HUNGRIA et al., 2000; HUNGRIA et al., 2003).

2.4. Nodulação Tardia em Leguminosas

Uma das maiores problemáticas da cultura do feijoeiro comum em questão de nodulação e fixação biológica de nitrogênio é o curto ciclo fenológico da planta (ANDRAUS et al., 2016). Devido a esta característica, a senescência dos nódulos se inicia aos 45 dias após a emergência, onde ocorre um declínio brusco de fixação biológica de nitrogênio antes do período de enchimento de grãos, estágio com potencial de grande contribuição para a produtividade da planta. É sugerido na literatura que o declínio da FBN aos 45 dias após a emergência é relacionado a nódulos antigos, onde, na ocorrência de nódulos novos/tardios, a FBN poderia demonstrar continuidade, mesmo que em taxas menores (VICKMAN e VESSEY, 1992; VICKMAN e VESSEY, 1993; HUNGRIA et al., 2000). A ocorrência de nodulação tardia foi constatada para a cultura da Soja, constatando a contribuição para produção de grãos, porém nada conclusivo para a cultura do feijoeiro (DANSO et al., 1990).

O resultado da interação simbiótica entre leguminosas e rizóbios é dependente de diversos atributos relacionados tanto a cultivar adotada quanto a estirpe utilizada para inoculação, os quais interferem em padrão de nodulação, fixação biológica de nitrogênio e ocorrência de nodulação tardia (GRAHAM, 1981). Alguns atributos de alta importância em cultivares são os grupos de flavonóides exsudados pela planta, afetando diretamente a comunicação com os rizóbios no solo, e também o hábito de crescimento, o qual interfere sobre a continuidade da fixação biológica de nitrogênio no ciclo fenológico da planta. Em alguns trabalhos, relata-se que a fixação biológica de nitrogênio pode ser controlada por fatores hormonais relacionados aos frutos, ou mesmo pela demanda de nitrogênio no período de enchimento de grãos (HUNGRIA e NEVES, 1987; DANSO et al., 1990). No que se refere à estirpe de rizóbio, a comunicação química com a planta pode se diferenciar de acordo com o número de cópias de gene Nod e com a especificidade da proteína NodD, responsável pelo reconhecimento dos flavonóides. A síntese de celulosas e fibrilas, apresenta alta importância para a proteção do local de infecção. Além disso, as classes de plasmídeos simbióticos, os quais contém os genes relacionados à nodulação e fixação biológica de nitrogênio, também se distinguem de acordo com a estirpe (SANTOS et al., 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Escolha do Substrato Ideal e Melhor Método de Irrigação para Condução dos Experimentos

De forma que substrato e irrigação adotados não se apresentassem como fator influente sobre o efeito dos tratamentos sobre a nodulação, foi realizada como primeira etapa a escolha do melhor substrato e forma de irrigação para a condução dos experimentos envolvendo avaliação da nodulação do feijoeiro.

3.1.1. Avaliação do desenvolvimento vegetal sob diferentes substratos e métodos de irrigação em casa de vegetação

Para a condução desta etapa, foi conduzido um ensaio em casa de vegetação sob delineamento inteiramente casualizado com fatorial duplo, admitindo por fatores substrato e irrigação. Os substratos foram: (1) amostra de solo de camada superficial de um Argissolo; (2) amostra de solo de camada subsuperficial de um Argissolo com pedrisco (brita nº1) na proporção 1:1; e (3) vermiculita com pedrisco. Os métodos de irrigação foram: (1) superficial (necessidade da planta); (2) por capilaridade (vaso inserido abaixo vaso de cano de PVC com água); e (3) maior frequência de rega (espaço de 10 cm na parte superior do vaso de cano de PVC) (Figura 1).

As amostras de solo foram provenientes de um Argissolo com histórico de cultivo de milho, localizado no Campo Experimental da Embrapa Agrobiologia. Estas amostras passaram por análise química, a fim de avaliar suas propriedades químicas (Tabela 1).

Tabela 1. Atributos químicos das amostras de solo coletadas provenientes de camada superficial e subsuperficial do Argissolo.

Atributos	Camada Superficial	Camada subsuperficial
Atributos químicos		
pH (unid)	5,19	5,03
P (mg L ⁻¹)	13,07	1,90
K (mg L ⁻¹)	64,15	12,87
Ca (cmol _c dm ⁻³)	1,64	0,6
Mg (cmol _c dm ⁻³)	0,85	0,61
Al (cmol _c dm ⁻³)	0,04	0,44



Figura 3. Ensaio experimental para avaliação do desenvolvimento do feijoeiro comum cv. Pérola em diferentes substratos e sob diferentes formas de irrigação em casa de vegetação.

O ensaio foi conduzido com 2 plantas da cultivar Pérola por vaso até o estágio V4, caracterizado pela abertura do terceiro trifólio aos 26 dias após emergência. As variáveis analisadas foram massa seca de parte aérea e de raiz, utilizando a análise de variância e o teste de Tukey a 5% de significância. As análises foram realizadas com o pacote ExpDes.pt (FERREIRA et al., 2018) para o programa estatístico R (R CORE TEAM, 2017).

3.1.2. Determinação da densidade de rizóbio dos solos

As amostras de solo coletadas tiveram sua densidade de rizóbio determinada através de contagem microbiana pelo método de Número Mais Provável (Figura 3) (INSTRUÇÃO NORMATIVA SDA Nº 30, DE 12 DE NOVEMBRO DE 2010).



Figura 4. Ensaio em casa de vegetação para determinação de densidade de rizóbios das amostras de solo de camada superficial e subsuperficial de Argissolo através do Método de Número Mais Provável (NMP).

Para a realização deste ensaio, 54 garrafas “long neck” de vidro de 250 mL contendo 200 mL de solução nutritiva de Norris (NORRIS et al., 1964) foram cobertas com papel pardo e, em seu interior, foram inseridas 2 tiras de papel *germitest*, conectando o interior da garrafa com o gargalo, e algodão na região do gargalo. Todo este conjunto foi autoclavado e transferido para casa de vegetação. Cada garrafa recebeu 1 semente de cultivar Pérola desinfestada com álcool 70% e hipoclorito de sódio 1%, pré-germinadas em estufa até obtenção de radícula de 1 cm.

Para inoculação das garrafas, foi feita uma diluição seriada na base 10 até a diluição de 10^{-8} . Dez gramas de cada amostra de solo foram diluídos em um erlenmeyer contendo 100 mL de NaCl 0,85% e condicionados a um período de 20 min de agitação. Posteriormente, 1 mL foi transferido para um tubo contendo 9 mL da mesma solução salina e assim se procedeu até atingir-se a diluição de 10^{-8} . Cada diluição foi utilizada para se inocular plantas de feijoeiro em triplicata. Cada planta recebeu 1 mL de cada diluição. Três garrafas não foram inoculadas e serviram como controle para detectar possíveis contaminações.

O ensaio foi conduzido em casa de vegetação por 15 dias, após os quais se avaliou a presença de nódulos nas raízes das plantas de cada diluição, atribuindo valor 0 para ausência de nódulos e 1 presença de nódulos nas raízes. O número mais provável de rizóbios foi determinado conforme Wollum (1994).

3.2. Avaliação da Nodulação do Feijoeiro Comum sob Inoculação em Diferentes Profundidades no Solo

A estratégia utilizada nos experimentos descritos a seguir foi forçar a nodulação em diferentes seções da raiz através da distribuição do inóculo em diferentes profundidades. O princípio utilizado é o de que as raízes nodulariam primeiro quando o inóculo estivesse disponível superficialmente e tardiamente quando estivesse disponível em profundidade. Assim, forçou-se a nodulação da planta em diferentes seções e ao longo de diferentes estádios do ciclo da planta.

Foram conduzidos 2 experimentos no delineamento em blocos casualizados (DBC) com 6 tratamentos e 4 repetições. Estes foram conduzidos nos meses de Maio e Outubro de 2018, um em cada mês, com coletas nos estádios de floração plena e enchimento de grãos. Utilizou-se vasos compostos por 3 segmentos de PVC de 10 x 13 cm cada, onde cada segmento correspondeu a uma profundidade de inoculação. De forma a estruturar partes isoladas de inoculação, foi escolhido o carvão como veículo devido a sua alta capacidade de absorção e fácil disponibilidade.

Os tratamentos estabelecidos para os experimentos do mês de maio foram: (1) carvão inoculado na terço superior do vaso; (2) carvão inoculado na terço médio do vaso; (3) carvão inoculado no terço inferior do vaso; (4) carvão inoculado em todo o vaso; (5) semente inoculada com inoculante turfoso sem carvão inoculado; (6) testemunha absoluta.

Os experimentos iniciados no mês de Outubro apresentaram os mesmos tratamentos citados anteriormente com o acréscimo inoculante turfoso na semente em todos os tratamentos relacionados inoculados, de modo a possibilitar as mesmas condições iniciais para todas as plantas. Cada experimento apresentou 6 tratamentos com 4 repetições.

Os experimentos de outubro são ilustrados na figura abaixo (Figura 5). Na representação dos tratamentos, as partes escuras representam o carvão inoculado, tanto em diferentes seções do cano quanto na semente (inoculante turfoso), e as partes claras representam o carvão não inoculado no substrato.

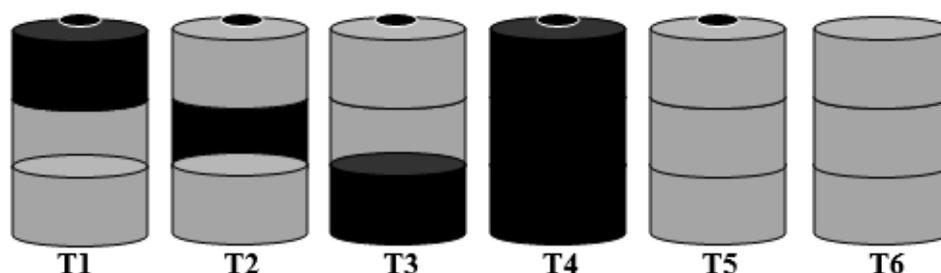


Figura 5. Esquema ilustrativo dos tratamentos adotados nos experimentos de avaliação da nodulação do feijoeiro comum sob reinoculação com *Rhizobium tropici* CIAT 899 em diferentes profundidades no solo em Outubro de 2018, sendo eles: T1- Carvão inoculado na terça superior do vaso; T2- Carvão inoculado no terço médio do vaso; T3- Carvão inoculado no terço inferior do vaso; T4- Carvão inoculado ao longo do vaso; T5- Inoculante turfoso em Semente; T6 - Testemunha Absoluta. A cor preta indica que a semente e o carvão de uma dada seção foram inoculados com *R. tropici*.

O solo utilizado para a formação do substrato correspondeu à camada subsuperficial de um Argissolo de barranco, coletado no Campo experimental da Embrapa Agrobiologia e escolhido de acordo com os resultados do capítulo anterior. O solo foi corrigido com calcário e adubado com solução nutritiva de acordo com a análise química (Tabela 2). O substrato foi formado a partir da mistura de proporção 1:1 de amostra de solo e pedrisco com o objetivo de promover melhor penetração do sistema radicular e facilitar a percolação de água em todo o conteúdo, além da adição do carvão em partes com e sem inoculação.

Tabela 2. Composição de Solução Nutritiva aplicada no solo dos experimentos de Maio e Outubro de 2018.

Reagente	mg/kg solo	mg Reagente/kg solo
MgSO ⁴ .7H ₂ O	10	101,4
CuSO ⁴ .5H ₂ O	2	7,9
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1	4,4
H ₃ BO ₃	0,1	0,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,2	0,5
KH ₂ PO ₄	120	526,8
Reagente	mg Fe/kg solo	mL Reagente/kg solo
Fe-EDTA	1	0,1

Para a constituição da parte inoculada, cultivou-se a estirpe CIAT 899 (= BR 322), estirpe da espécie *Rhizobium tropici* (MARTINEZ-ROMERO et al., 1991), recomendada pelo MAPA para composição de inoculantes para o feijoeiro comum e amplamente utilizada em escala comercial (INSTRUÇÃO NORMATIVA SDA Nº 13, DE 24 DE MARÇO DE 2011). A partir de um estoque, um pré-inóculo da bactéria foi preparado em 200 mL de meio de cultura YM. A cultura foi agitada durante 3 dias e utilizada para preparação de um outro pré-inóculo com 600 mL de YM, o qual foi agitado por mais 3 dias até se obter densidade ótica de valor 1, aferido com o auxílio de espectrofotômetro ($\lambda = 600$ nm). Atingido o ponto ótimo do inóculo final, o mesmo foi

diluído em água filtrada (1:1) para realizar uma mistura homogênea com 2,6 kg de carvão em recipiente limpo.

Para garantir homogeneidade do substrato com carvão, foram realizados ensaios para conferir boa distribuição do carvão no solo, determinando a proporção de 108 g de carvão para cada 3 kg de substrato. O carvão inoculado foi misturado com o substrato e distribuído nos vasos um dia após sua mistura com inóculo final.

As sementes de feijão foram desinfestadas com álcool 70% e hipoclorito de sódio 2%. O inoculante turfoso foi obtido do Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (CRB-JD) da Embrapa Agrobiologia, e teve sua concentração verificada pela técnica de contagem em placa por espalhamento. O inoculante turfoso foi misturado à solução açucarada a 10% e aplicado às sementes, que receberam inoculante suficiente para garantir a dose de 1.2×10^6 células bacterianas por semente (HUNGRIA et al., 2017). Cada vaso recebeu 5 sementes.

Para a condução dos experimentos, houve irrigação de acordo com a necessidade da planta e aplicação de óleo de nim quando detectada a ocorrência de trips. Aos 15 dias após a emergência, houve o desbaste para 2 plantas por vaso, as quais foram tutoradas em estádios mais avançados de desenvolvimento.



Figura 6. Experimentos instalados em casa de vegetação sob Delineamento em Blocos Casualizados para avaliação da nodulação do feijoeiro comum sob reinoculação em diferentes profundidades no solo aos 15 dias após emergência.

As plantas foram coletadas nos estágios R6, floração plena, e início de R8, enchimento de vagens. As variáveis analisadas foram: massa seca de parte aérea e de raiz, número de nódulos, massa seca de nódulos e massa seca de um único nódulo. A parte aérea e o sistema radicular foram separados. As raízes foram lavadas em água corrente, e tiveram os nódulos destacados e quantificados. O sistema radicular de cada planta foi separado em três porções, correspondendo ao terço superior, médio e inferior do vaso, respectivamente. Todas as partes das plantas foram secas a 65°C em estufa, até peso constante, e foram pesadas em balança de precisão. Para a determinação da massa seca de um nódulo, dividiu-se massa seca de nódulos pelo número de nódulos.

Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Duncan a 5% de significância. A análise estatística dos dados foi realizada com o pacote ExpDes.pt (FERREIRA et al., 2018) no programa R (R CORE TEAM, 2017).



Figura 7. Experimentos instalados em casa de vegetação sob Delineamento em Blocos Casualizados para avaliação da nodulação do feijoeiro comum sob reinoculação em diferentes profundidades no solo aos 47 dias após emergência.

3.3. Avaliação da Nodulação do Feijoeiro Comum sob Reinoculação em Diferentes Estádios Fenológicos

A estratégia utilizada nos experimentos descritos a seguir foi estimular a nodulação em diferentes estádios fenológicos da planta através da reinoculação, pela aplicação de inoculante líquido, em diferentes épocas.

O primeiro experimento foi conduzido no delineamento de blocos ao acaso, com 5 tratamentos e 4 repetições que foram coletadas na floração plena (Figura 9). Os tratamentos foram: (1) testemunha absoluta (não inoculada); (2) inoculante turfoso; (3) Aplicação de inoculante líquido no estágio V3; (4) aplicação de inoculante líquido no estágio V4; (5) aplicação de inoculante líquido nos estádios V3 e V4. Todas as sementes foram inoculadas com turfa antes da semeadura.

O segundo experimento também foi conduzido no delineamento de blocos ao acaso, porém com 7 tratamentos e 4 repetições que foram coletadas no início do estágio R8 (Figura 10). Os tratamentos foram: (1) testemunha absoluta (não inoculada); (2) inoculante turfoso; (3) inoculante turfoso + aplicação de inoculante líquido no estágio V3; (4) inoculante turfoso + aplicação de inoculante líquido no estágio V4; (5) inoculante turfoso + aplicação de inoculante líquido no estágio R5; (6) inoculante turfoso + aplicação de inoculante líquido no estágio R6; (7) inoculante turfoso + aplicação de inoculante líquido nos estádios V3, V4, R5 e R6.

Foram utilizados vasos de 5 L contendo vermiculita e pedrisco (brita nº 1) na proporção 1:2 (v:v). A semeadura de ambos os experimentos foi realizada em maio de 2019. Cada vaso recebeu 5 sementes, as quais foram inoculadas com inoculante turfoso da estirpe CIAT 899 (= BR 322) de *Rhizobium tropici*. O inoculante turfoso foi aplicado de modo a garantir uma contagem de $1,2 \times 10^6$ UFC por semente (HUNGRIA et al., 2017) a partir da mistura com solução açucarada a 10%. Todas as sementes dos tratamentos, com exceção da testemunha, foram inoculadas. Aplicou-se uma solução nutritiva aos 7 e 15 dias após a semeadura para o suprir a demanda nutricional da planta (Tabela 3). O desbaste foi realizado 15 dias após emergência e foram deixadas duas plantas por vaso. A irrigação foi realizada de acordo com a necessidade das plantas e a capina manual foi realizada sempre que necessário.

As plantas receberam 2 mL de meio YM líquido contendo a estirpe CIAT 899 (densidade ótica = 1.0, $\lambda = 600$ nm) nas épocas indicadas pelos respectivos tratamentos. Este volume foi diluído 5 vezes em água filtrada antes de sua aplicação.

Tabela 3. Solução nutritiva aplicada aos 7 e 15 dias após semeadura dos vasos com vermiculita e pedrisco do experimento de Maio de 2019

Reagente	mg/kg Solo	mg Reagente/kg Solo
MgSO ₄ .7H ₂ O	10	101,4
CuSO ₄ .5H ₂ O	2	7,9
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1	4,4
H ₃ BO ₃	0,1	0,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,2	0,5
KH ₂ PO ₄	80	351,2
Reagente	mL/kg Solo	mL Reagente/kg Solo
Fe-EDTA	1	0,1



Figura 8. Visão geral dos experimentos instalados em casa de vegetação sob Delineamento em Blocos Casualizados para avaliação da nodulação do feijoeiro comum sob reinoculação em diferentes estágios fenológicos aos 15 dias após emergência.

Na ocasião das coletas, as plantas foram divididas em parte aérea e raiz, sendo a última lavada em água corrente e os nódulos destacados e quantificados. As seguintes variáveis foram avaliadas: número de nódulos e massa seca de parte aérea, raiz, nódulos e massa seca de um único nódulo. No segundo experimento, além dessas variáveis, foi incluída a percentagem de nódulos inativos. Todas as partes da planta foram secas em estufa, até peso constante e pesadas em balança de precisão. Para avaliar a porcentagem de nódulos inativos, cinquenta nódulos foram coletados aleatoriamente por vaso e classificados como inativos ou não a partir de sua coloração interna, indicativa da presença de leghemoglobina.

Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Duncan a 5% de significância. A análise estatística dos dados foi realizada com o pacote ExpDes.pt (FERREIRA et al., 2018) no programa R (R CORE TEAM, 2017).



Figura 9. Experimento para avaliação da nodulação do feijoeiro reinoculado em diferentes estágios fenológicos. Os vasos foram coletados na floração plena. Os tratamentos são: T1- Testemunha absoluta; T2- Cultivar não nodulante (NORH 54); T3- Inoculante Turfoso na Semente; T4- Reinoculação em V3; T5- Reinoculação em V4; T6- Reinoculação em V3 e V4. Todas as sementes, exceto as do T1 receberam inoculante turfoso no momento da semeadura.

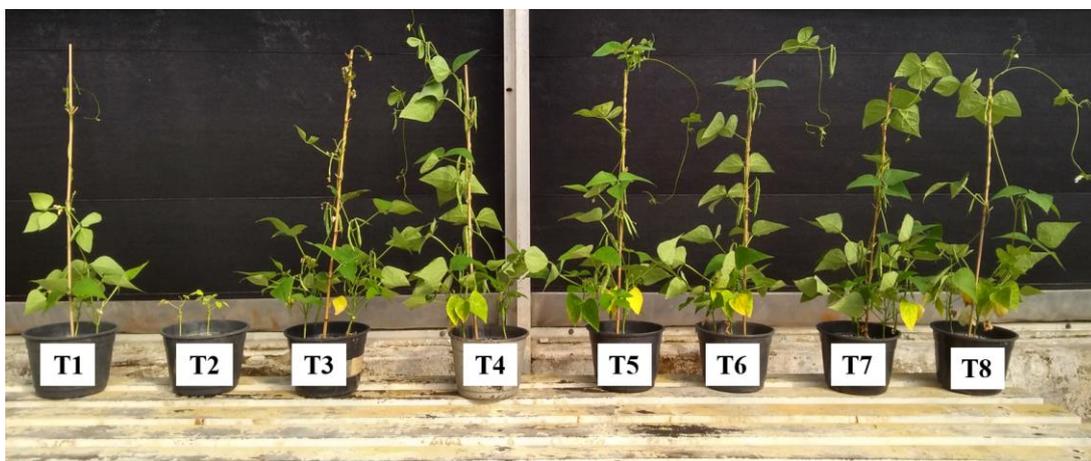


Figura 10. Experimento para avaliação da nodulação do feijoeiro reinoculado em diferentes estágios fenológicos. Os vasos foram coletados no período de enchimento de grãos. Os tratamentos são: T1- Testemunha absoluta; T2- Cultivar não nodulante (NORH 54); T3- Inoculante Turfoso em Semente; T4- Reinoculação em V3; T5- Reinoculação em V4; T6- Reinoculação em R5; T7- Reinoculação em R6; T8- Reinoculação em V3, V4, R5 e R6. Todas as sementes, exceto as do T1 receberam inoculante turfoso no momento da semeadura.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Escolha do Substrato Ideal e Irrigação para Condução dos Experimentos

Não houve interação entre substrato e irrigação em nenhuma das variáveis analisadas. Quando os fatores foram analisados separadamente, a irrigação não apresentou significância quanto ao efeito de tratamento para massa seca de parte aérea e de raiz, enquanto o substrato apresentou efeito de tratamento significativo sobre ambas as variáveis. A amostra de solo de camada superficial foi a que proporcionou o maior acúmulo de massa seca da parte aérea e raiz ($P < 0,05$). Enquanto a amostra de solo de camada subsuperficial com pedrisco apresentou efeito intermediário para massa seca de parte aérea e ambiguidade para massa seca de raiz, o substrato composto por vermiculita com pedrisco apresentou o menor efeito de tratamentos sobre as variáveis analisadas (Tabela 4).

Tabela 4. Massa seca de parte aérea e de raiz da cultivar Pérola de feijoeiro comum crescida em diferentes substratos (solo de camada superficial, solo de camada subsuperficial com pedrisco e vermiculita com pedrisco)

Substrato	Massa seca de Parte Aérea (g.planta ⁻¹)	Massa seca de Raiz (g.planta ⁻¹)
solo superficial	2,48 a	1,34 a
solo subsuperficial + pedrisco	1,30 b	0,97 ab
vermiculita + pedrisco	0,66 c	0,59 b
CV (%)	23,89	67,1

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Esta etapa foi determinante para a condução dos experimentos envolvendo avaliação de nodulação, uma vez que a principal forma de interação planta-bactéria acontece pelo solo, ambiente ao qual a simbiose está exposta e se apresenta sensível às características como pH, umidade, temperatura e entre outros fatores, capazes de interferir sobre o sucesso da interação (HUNGRIA et al., 2000; MADIGAN et al., 2004). Além disso, a concentração microbiana de estirpes nativas também interfere sobre o processo de infecção e fixação biológica de nitrogênio da planta a partir da competição com estirpes selecionadas (VICKMAN e VESSEY, 1992).

A amostra de solo de camada superficial do Argissolo, de maior efeito de tratamento, foi retirada de uma profundidade de 0 a 20 cm. Com maior concentração de raízes, conseqüentemente é o substrato de maior conteúdo de matéria orgânica e nutrientes livres. Assim também ocorreu para densidade de rizóbios, avaliada em 1,118 (NMP.g⁻¹solo), característica que poderia interferir sobre o efeito da inoculação (HUNGRIA et al., 2000; CUNHA et al., 2005; COTTA, 2016). No que se refere à amostra de solo de camada subsuperficial, o efeito inferior a amostra de camada superficial pode justificado pelo menor teor de matéria orgânica, relatado em alguns trabalhos sobre a necessidade de mistura a compostos orgânicos para melhor desenvolvimento de plantas. A densidade de rizóbios na camada subsuperficial foi de 0,357 NMP.g⁻¹solo. Essa baixa densidade faz com que essa camada seja, do ponto de vista microbiológico, a mais adequada para condução dos próximos experimentos de inoculação (CUNHA et al., 2005; MOREIRA et al., 2006; MONTANARI, 2010; COTTA, 2016).

4.2. Avaliação da Nodulação do Feijoeiro Comum sob Inoculação em Diferentes Seções do Sistema Radicular

Os experimentos conduzidos em Maio de 2018 (Tabela 5) não apresentaram diferença significativa quanto ao efeito dos tratamentos nas massas secas da parte aérea, dos nódulos, das raízes e de um nódulo (dados não apresentados) (Tabelas 9 e 10). Em relação aos dados analisados do experimento coletado em plena floração (R6), observou-se diferença significativa entre os tratamentos para o número de nódulos. As plantas dos tratamentos que receberam o carvão inoculado na parte superior e ao longo de todo o vaso, bem como aquelas do tratamento que recebeu o inoculante turfoso na semente, apresentaram o maior número de nódulos. O menor número, por sua vez, de nódulos foi observado no tratamento que recebeu o carvão inoculado no terço inferior do vaso. A testemunha absoluta e carvão inoculado no terço mediano do vaso apresentaram resultado ambíguo em relação ao efeito dos tratamentos, impossibilitando a conclusão sobre os mesmos.

Tabela 5. Massa seca da parte aérea, massa seca de nódulos, número de nódulos e peso seco de um nódulo de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, sob inoculação em diferentes seções do sistema radicular, coletado nos estádios R6 e R8 (Maio, 2018)

Coleta	Tratamentos	Massa seca de Parte Aérea (g. planta ⁻¹)	Massa seca de nódulos (mg.planta ⁻¹)	Número de Nódulos (planta)
R6	Terço superior com inoculação	6,46	32,45	327 a
	Terço mediano com inoculação	5,93	31,82	273,55 ab
	Terço inferior com inoculação	4,60	29,4	191,52 b
	Inoculação ao longo do vaso	6,11	31,81	329 a
	Inoculante turfoso na semente	4,68	17,33	359 a
	Testemunha absoluta	4,96	31,27	260 ab
CV (%)		24,67	30,3	22,28
R8	Terço superior com inoculação	12,7	26,98	372,62
	Terço mediano com inoculação	10,72	34,45	269,62
	Terço inferior com inoculação	15,8	29,27	300,87
	Inoculação ao longo do vaso	13,59	27,6	408,87
	Inoculante turfoso na semente	14,12	26,6	355,5
	Testemunha absoluta	16,12	39,07	398,25
CV (%)		29,69	41,15	23,45

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Ao analisar os dados coletados dos experimentos de Outubro de 2018 (Tabela 6), não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para nenhuma das variáveis analisadas na floração plena (R6) (Tabelas 11 e 12). No enchimento de grãos (R8), observou-se diferença significativa no número de nódulos. Cabe lembrar que, nesse experimento, as sementes foram inoculadas com inoculante turfoso, exceto no controle absoluto. A aplicação de carvão inoculado ao longo de todo o vaso e a inoculação na semente foram os tratamentos de maior efeito sobre a nodulação as plantas e os únicos que se diferenciaram significativamente da testemunha absoluta. A testemunha absoluta apresentou o menor número de nódulos, demonstrando que os diferentes tipos de inoculação proporcionaram um aumento na nodulação das plantas.

Os demais tratamentos de inoculação apresentaram ambiguidade em relação aos efeitos, não diferindo significativamente dos melhores tratamentos e da testemunha.

Tabela 6. Massa seca da parte aérea, massa seca de nódulos, número de nódulos e peso seco de um nódulo da cultivar Pérola de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, sob inoculação em diferentes seções do sistema radicular, coletado nos estádios R6 e R8 (Outubro de 2018)

Coleta	Tratamentos	Massa seca de parte aérea (g. planta ⁻¹)	Massa seca de nódulos (g. planta ⁻¹)	Número de nódulos (planta)
R6	Inoculante turfoso + terço superior com inoculação	4,94	0,31	544
	Inoculante turfoso + terço mediano com inoculação	5,03	0,43	522
	Inoculante turfoso + terço inferior com inoculação	6,08	0,44	575,5
	Inoculante turfoso + inoculação ao longo do vaso	4,75	0,29	491,5
	Inoculante turfoso na semente	6,91	0,53	599,5
	Testemunha absoluta	5,84	0,38	457
CV (%)		25,92	29,05	23,63
R8	Inoculante turfoso + Terço superior com inoculação	13,08	0,81	540,12 abc
	Inoculante turfoso + Terço mediano com inoculação	10,45	0,92	479,5 bc
	Inoculante turfoso + Terço inferior com inoculação	10,67	0,81	551,5 abc
	Inoculante turfoso + Inoculação ao longo do vaso	12,1	0,82	639,5 a
	Inoculante turfoso na semente	13,9	0,93	592,5 ab
	Testemunha absoluta	10,26	0,71	419,5 c
CV (%)		25,62	12,87	15,8

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Segundo Vickman e Vessey (1993), a ocorrência de nodulação tardia e/ou aumento do número de nódulos não são diretamente correlacionados à fixação biológica de nitrogênio e contribuição em desenvolvimento, justificando o efeito de tratamentos para número de nódulos, sem reflexo para massa seca de parte aérea. Segundo Andraus et al. (2016), a fixação biológica de nitrogênio pode apresentar continuidade em fases mais tardias da planta, porém de forma limitada, não se estendendo mais que 5 dias de atividade da nitrogenase a partir da fase de enchimento de grãos. A duração do processo também pode variar com a cultivar de feijoeiro comum e a estirpe de rizóbio adotados (GRAHAM, 1981).

Ao se comparar os 2 experimentos coletados em Maio e Outubro de 2018, foi possível observar a inversão de comportamento nodular das plantas em função das diferentes coletas. Em Maio, houve efeito de tratamentos para número de nódulos no estágio de floração enquanto, em Outubro, a foi observada no período de enchimento de grãos. É possível que isso tenha se dado em função das diferentes épocas de cultivo, uma vez que em Outubro, época de primavera, há maior período de luminosidade do que em Maio, época de Outono (Graham, 1981). Graham (1981) aborda em seu trabalho que taxas altas de luminosidade influenciam a nodulação e a fixação biológica de nitrogênio, assim como também observaram Vickman e Vessey (1992) em experimentos de laboratório com feijão comum.

A partir da análise dos resultados, foi possível concluir que a inoculação em diferentes profundidades no solo não foi suficiente para confirmar a hipótese científica adotada neste trabalho, uma vez que a diferença de número de nódulos entre tratamentos não apresentou resposta conclusiva e não houve qualquer efeito em aumento de biomassa da planta.

4.3. Avaliação da Nodulação do Feijoeiro Comum sob Reinoculação em Diferentes Estágios Fenológicos

De acordo com a análise estatística realizada para o experimento coletado em floração plena (Tabela 7), não houve diferença significativa entre o efeito dos tratamentos para massa seca de parte aérea, de nódulos, de raiz e de um nódulo (dados não mostrados), apenas para número de nódulos. O número de nódulos foi comparável entre todos os tratamentos inoculados e significativamente maior nestes se comparados à testemunha absoluta.

Tabela 7. Massa seca de parte aérea, massa seca de nódulos e número de nódulos de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, sob reinoculação em diferentes estágios do ciclo da cultura, coletado no estágio de floração plena (R6)

Tratamento	Massa seca de parte aérea (g.planta ⁻¹)	Massa seca de raiz (g.planta ⁻¹)	Número de nódulos (planta)	Massa seca de nódulos (mg.planta ⁻¹)
Testemunha absoluta	3,87	0,86	242,87 b	431,88
Inoculante turfoso	5,16	1,02	368,62 a	447,78
Inoculante turfoso + reinoculação em V3	4,01	0,91	356,75 a	400,52
Inoculante turfoso+ reinoculação em V4	3,95	0,84	278,62 ab	434,92
Inoculante turfoso + reinoculação em V3 e V4	4,11	0,94	373,37 a	460,2
CV (%)	21,44	8,57	18,34	11,6

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Em relação ao experimento coletado no período de enchimento de grãos, não houve diferença do efeito de tratamentos para nenhuma das variáveis analisadas, apesar

de alguns tratamentos apresentarem valores próximo ao dobro de taxas de massa seca de parte aérea e número de nódulos da testemunha absoluta.

Tabela 8. Massa seca de parte aérea, massa seca de nódulos, número de nódulos e porcentagem de nódulos inativos de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, sob reinoculação em diferentes estádios do ciclo da cultura, coletado no período de enchimento de grãos

Tratamento	Massa seca de parte aérea (g.planta ⁻¹)	Massa seca de raiz (g.planta ⁻¹)	Número de nódulos (planta)	Massa seca de nódulos (g.planta ⁻¹)	Nódulos inativos (%)
Testemunha	4,69	1,01	269	0,35	36,5
Inoculante turfoso	6,55	1,17	355,87	0,34	29,5
Inoculante turfoso + reinoculação em V3	9,35	1,11	450,75	0,41	33
Inoculante turfoso + reinoculação em V4	7,35	1,16	407,25	0,65	45
Inoculante turfoso + reinoculação em R5	9,15	1,19	469,5	0,48	43,5
Inoculante turfoso + reinoculação em R6	7,81	1,04	195,37	0,38	40
Inoculante turfoso + reinoculação em V3, V4, R5 e R6	8,07	1,15	482,37	0,74	56,5
CV (%)	34,18	11,88	39,46	49,31	43,29

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Moretti et al. (2018) analisaram os efeitos da reinoculação com rizóbios na cultura da soja e obtiveram resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho. Não foi observada diferença significativa no número de nódulos entre os tratamentos reinoculados e o tratamento inoculado durante o estágio vegetativo da cultura (V4) e nos estádios R2 e R4. Os autores observaram um número de nódulos significativamente maior no estágio R6, mas este não se refletiu em um maior acúmulo de biomassa vegetal e numa maior massa de nódulos. Contudo, a reinoculação contribuiu para uma maior produtividade em uma das duas safras avaliadas. Embora Vickman e Vessey (1992) tenham indicado um potencial de contribuição da nodulação secundária, os resultados aqui apresentados mostram que a nodulação secundária induzida não foi suficiente para promover o melhor desenvolvimento da planta. A resposta da planta quanto à inoculação está ligada a diversos fatores intrínsecos e extrínsecos, que podem interagir ou não entre si para limitar/interferir no desenvolvimento da planta (HUNGRIA et al., 2000). Segundo Graham (1981), a resposta das variáveis aqui analisadas pode variar de acordo com a cultivar e a estirpe adotadas. Assim, trabalhos futuros com diferentes cultivares e estirpes podem ser uma alternativa viável a partir de uma mesma diretriz abordada por Andraus et al., 2016.

Assim como a inoculação em diferentes profundidades no solo, a reinoculação em diferentes estádios fenológicos do feijoeiro-comum apresentou efeito apenas no número de nódulos das plantas, não havendo qualquer reflexo desta mudança em biomassa de nódulos e parte aérea.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, chega-se à conclusão de que apesar de ter ocorrido aumento no número de nódulos com as diferentes estratégias adotadas, o mesmo não se refletiu em termos de biomassa de nódulos e da parte aérea, sendo a inoculação em semente efetiva e suficiente para garantir o bom desenvolvimento da planta.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRAUS, M. P.; CARDOSO, A. A.; FERREIRA, E. P. B. Differences in Nodulation and Grain Yield on Common Bean Cultivars with Different Growth Cycles. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Goiânia, v. 47, n. 9, p. 1148-1161, 2016.

BRASIL. Instrução Normativa SDA nº 13, de 24 de março de 2011. **Diário Oficial da União**, Seção 1, nº 58. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-sda-13-de-24-03-2011-inoculantes.pdf>>. Acesso em: 09/07/2019.

BRASIL. Instrução Normativa SDA nº 30, de 12 de novembro de 2010. **Diário Oficial**. Disponível em: <https://www.normasbrasil.com.br/norma/instrucao-normativa-30-2010_78100.html>.

CARNEIRO, J. E.; JÚNIOR, T. P.; BORÉM, A. **Feijão do Plantio a Colheita**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2014. 384 p.

COÊLHO, J. D. Produção de Grãos: Feijão, Milho e Soja. **Caderno Setorial ETENE**, Fortaleza, CE: Banco do Nordeste, n. 19, 2017. 13 p.

COTTA, S. R. O solo como ambiente para a vida microbiana. In: CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. (ed.). **Microbiologia do Solo**, Piracicaba: ESALQ, 2 ed., 2016. 221 p.

COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO. **Portal de Informações Agropecuárias**. Disponível em: <<https://portaldeinformacoes.conab.gov.br/index.php/safra-serie-historica-dashboard>>. Acesso em: 01/03/2019.

COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO. **Perspectiva Agropecuária**. Brasília: Conab, v. 5, 2017. 111 p.

CUNHA, A. O.; ANDRADE, L. A.; BRUNO, R. L. A.; SILVA, J. A. L.; SOUZA, V. Z. Efeitos de Substratos e das Dimensões dos Recipientes na Qualidade das Mudanças de *Tabebuia impetiginosa* (Mart. Ex D.C.) Standl. **Revista Árvore**. Viçosa, MG, v. 29, n. 4, p. 507-516, 2005.

DANSO, S. K. A.; KAPUYA, J.; HARDARSON, G. Nitrogen fixation and growth of soybean as influenced by varying the methods of inoculation with *Bradyrhizobium japonicum*. **Plant and Soil**. Netherlands: Springer, v. 125, p. 81-86, 1990.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. Package 'ExpDes. pt'. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/ExpDes.pt/ExpDes.pt.pdf>>. Acesso em: 22/09/2019.

- FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa, MG: UFV, 2 ed, 2008. 421 p.
- GEPTS, P.; DEBOUCK, D. Origin, Domescation, and Evolution of the Common Bean (*Phaseolous vulgaris* L.). In: VAN SCHOONHOVEN, A.; VOYSEST, O. **Common Beans: Research for Crop Improvement**. Califórnia, CO: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1991. Cap. 1.
- GRAHAM. P. H. Some Problems of Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: A Review. **Field Crops Research**, Colombia, v. 4, p. 93-112, 1981.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M. C. P. Cultivar and Rhizobium strain effect on nitrogen fixation and transport in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, Seropédica, v. 103, p. 111-121, 1987.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grains legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, Planaltina, DF, v. 65, p. 151-164, 2000.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. Benefits of inoculation of the common beans (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Soils**, Paraná, v. 39, p. 88-93, 2003.
- HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S.; JÚNIOR, E. B. S.; ZILLI, J. E. Inoculum Rate Effects on the Soybean Symbiosis in New or Old Fields under Tropical Conditions. **Agronomy Journal**, v. 109, n. 3, p. 1106-1112, 2017.
- JESUS, E. C. FBN em feijoeiro: desafios e perspectivas. **Série Documentos**, Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2003. 18p.
- KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L. F.; AIDAR, H. **Fundamentos para uma agricultura sustentável, com ênfase na cultura do feijoeiro**. Santo Antônio de Goías, GO: Embrapa Arroz e Feijão, 2009. 452 p.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10 ed. São Paulo, SP: Prentice Hall, 2004. 608 p.
- 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.
- MONTANARI, R.; CARVALHO, M. P.; ADREOTTI, M.; DALCHIAVON, F. D.; LOVERA, L. H.; HONORATO, M. A. O. Aspectos de Produtividade do Feijão Correlacionados com Atributos Físicos do Solo sob Elevado Nível Tecnológico de Manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, n. 6, p. 1181-1822, 2010.

MOREIRA, M. A.; CARVALHO, J. C.; PASQUAL, M.; FRÁGUAS, C. B.; SILVA, A. B. Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência e Agrotecnologia**. Editora da Universidade Federal de Lavras (UFLA), v. 30, n. 5, p. 875-879, 2006. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/30155>>.

MORETTI, L. G.; LAZARINI, E.; BOSSOLANI, J. W.; PARENTE, T. L.; CAIONI, S.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Can additional inoculations increase soybean nodulation and grain yield? **Agronomy Journal**. USA: American Society of Agronomy, v. 110, p. 1-7, 2018.

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**, v. 29, p. 214-235, 1964.

OLIVEIRA, M. G. C.; OLIVEIRA, L. F. C.; WENDLAND, A.; GUIMARÃES, C. M.; QUINTELA, E. D.; BARBOSA, F. R.; CARVALHO, M. C. S.; JUNIOR, M. L.; SILVEIRA, P. M. Conhecendo a fenologia do feijoeiro e seus aspectos fitotécnicos. Brasília, DF: Embrapa, 2018. 62 p.

POSTGATE, J. R. **Nitrogen Fixation**. 3. ed. Cambridge: Cambridge University, 1998. 120 p.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. Disponível em: < URL <https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 08/07/2019.

SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA. **SNA NEWS**. Disponível em: < <https://www.sna.agr.br/brasil-se-destaca-no-mercado-mundial-de-feijao/>>. Acesso em: 29/06/2019.

SISTEMA IBGE DE RECUPERAÇÃO AUTOMÁTICA - SIDRA. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Disponível em: < <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618> >. Acesso em: 01/03/2019.

STONE, L. F.; SARTORATO, A. O Cultivo do Feijão: Recomendações Técnicas. Brasília, DF: Embrapa, 1994. 83 p.

SANTOS, L. A.; REIS, V. M. A Formação do Nódulos em Leguminosas. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 14 p.

VIKMAN, P.; VESSEY, J. K. The decline in N₂ fixation rate in common bean with the onset of pod-filling: Fact or artifact. **Plant and Soil**, Canada, v. 147, p. 95-105, 1992.

VIKMAN, P.; VESSEY, J. K. Ontogenic Changes in Root Nodule Subpopulations of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.): Nitrogenase Activity and Respiration during Pod-Filling. **Journal of Experimental Botany**, Canada, v. 44, p. 563-569, 1993.

WOLLUM, A. G. Soil Sampling for Microbiological Analysis. In: WEAVER, R. W.; ANGLE, J. S (ed.). **Methods of Soil Analysis: Part 2 - Microbiological and Biochemical Properties**, Madison: SSSA Book Ser. 5, v.2, p. 1-14, 1994.

ANEXOS

I - Quadros de Análise de Variância dos Experimentos

Tabela 9. Análise de variância (Quadrados Médios) dos dados de massa seca de parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN) e massa seca de nódulos (MSN) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, sob inoculação em diferentes seções do sistema radicular, coletado em R6 (Maio, 2018)

Fonte de variação	GL	MSPA	NN	MSN
Tratamento	5	9.8716	55111*	0.042790
Bloco	3	8.0169	8649	0.028166
Resíduo	14	7.3559	16367	0.032015
CV %	-	24,67	22,28	30,3

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 10. Análise de variância (Quadrados Médios) dos dados de massa seca de parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN) e massa seca de nódulos (MSN) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, sob inoculação em diferentes seções do sistema radicular, coletado em R8 (Maio, 2018)

Fonte de variação	GL	MSPA	NN	MSN
Tratamento	5	64.580	48654	0.040457
Bloco	3	38.356	40059	0.032638
Resíduo	15	67.590	27092	0.063714
CV %	-	29,69	23,45	41,16

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 11. Análise de variância (Quadrados Médios) dos dados de massa seca de parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN) e massa seca de nódulos (MSN) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, sob inoculação em diferentes seções do sistema radicular, coletado em R6 (Outubro, 2018)

Fonte de variação	GL	MSPA	NN	MSN
Tratamento	5	11.2134	44514	0.126090
Bloco	3	20.7827	107249	0.022707
Resíduo	15	8.4088	63189	0.055079
CV %	-	25,92	23,63	29,05

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 12. Análise de variância (Quadrados Médios) dos dados de massa seca de parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN) e massa seca de nódulos (MSN) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, sob inoculação em diferentes seções do sistema radicular, coletado em R8 (Outubro, 2018)

Fonte de variação	GL	MSPA	NN	MSN
Tratamento	5	37.059	99308*	0.109969
Bloco	3	55.149	94548	0.279049*
Resíduo	15	36.210	28815	0.046411
CV %	-	25,62	15,8	12,89

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 13. Análise de variância (Quadrados Médios) dos dados de massa seca de parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN) e massa seca de raiz (MSR) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, sob diferentes tratamentos de reinoculação, coletado em R6 (Maio, 2019)

Fonte de variação	GL	MSPA	NN	MSN	MSR
Tratamento	5	4.5416	56568*	0.007987	0.078968
Bloco	3	1.3279	28073	0.057244*	0.036178
Resíduo	15	3.2821	14128	0.010181	0.024841
CV %	-	21,44	18,34	11,66	8,71

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 14. Análise de variância (Quadrados Médios) dos dados de massa seca de parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN) e massa seca de raiz (MSR) de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Pérola, sob diferentes tratamentos de reinoculação, coletado em R8 (Maio, 2019)

Fonte de variação	GL	MSPA	NN	MSN	MSR
Tratamento	5	40.989	93434	0.38808	0.080092
Bloco	3	9.866	34852	0.20178	0.217053
Resíduo	15	26.780	106264	0.22701	0.071097
CV %	-	34,18	34,96	49,31	11,88

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.