

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
CURSO DE AGRONOMIA

Camila Köche Wibbelt

**Eficiência na FBN de isolados de rizóbios de solos da região de Curitibanos
em feijoeiro.**

Curitibanos
2019

Camila Köche Wibbelt

Eficiência na FBN de isolados de rizóbios de solos da região de Curitibanos em feijoeiro.

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Agronomia do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Glória Regina Botelho.

Curitibanos
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Wibbelt, Camila

Eficiência na FBN de isolados de rizóbios de solos da região de Curitibanos em feijoeiro. / Camila Wibbelt; orientadora, Gloria Botelho, 2019.

37 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Curitibanos, Graduação em Agronomia, Curitibanos, 2019.

Inclui referências.

1. Agronomia. 2. Rizobactérias. 3. Simbiose. 4. Feijão
. 5. Inoculação. I. Botelho, Gloria . II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Graduação em Agronomia. III.
Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia

Rodovia Ulysses Gaboardi km3

CP: 101 CEP: 89520-000 - Curitibanos - SC

TELEFONE (048) 3721-2176 E-mail: agronomia.cbs@contato.ufsc.br.

CAMILA KÖCHE WIBBELT

Eficiência na FBN de isolados de rizóbios de solos da região de Curitibanos em feijoeiro.

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Engenheiro Agrônomo, e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Agronomia.

Curitibanos, 20 de novembro de 2019.

Prof. Dr. João Batista Tolentino Junior
Vice- Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Glória Regina Botelho
Orientadora

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Ana Carolina Lara Fioreze
Membro da banca examinadora

Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Dr. João Frederico Mangrich dos Passos
Membro da banca examinadora
EPAGRI - Lages

RESUMO

A cultura do feijão possui grande importância econômica e social em todo o país. O uso de fertilizantes químicos, em especial os nitrogenados, são os maiores responsáveis pelos incrementos aos custos de produção e podem ser danosos ao meio ambiente. Uma alternativa para diminuição do uso de insumos é a utilização das bactérias diazotróficas, capazes de realizar simbiose com leguminosas, dentre as quais se destacam os rizóbios, que são, atualmente, os gêneros mais estudados. Neste contexto, objetivou-se testar dois isolados de rizóbios da Coleção de Rizobactérias da UFSC *campus* Curitibanos. O experimento foi realizado em casa de vegetação da UFSC *campus* Curitibanos, sendo conduzido em Delineamento em Blocos Casualizados (DBC), contendo sete tratamentos e oito repetições. Os tratamentos utilizados foram inoculação dos isolados de rizóbios RBZ14, RBZ15, a estirpe padrão CIAT 899, associação entre CIAT899 e RBZ14, associação entre CIAT899 e RBZ15, associação entre RBZ14 e RBZ15 e testemunha sem adubação e inoculação. Os parâmetros avaliados foram massas fresca e seca da parte aérea (g), massas fresca e seca das raízes (g), massas fresca e seca de nódulos (g) e o teor de nitrogênio foliar (g.kg^{-1}). Todos apresentaram diferenças estatísticas significativas. De modo geral, resultados mais expressivos foram obtidos com a inoculação da estirpe padrão CIAT899.

Palavras-chave: Feijão. Simbiose. Inoculação.

ABSTRACT

The bean crop has great economic and social importance throughout the country. The use of chemical fertilizers, especially nitrogen fertilizers, are the largest responsible for increases in production costs and can be harmful to the environment. An alternative for reducing the use of inputs is the use of diazotrophic bacteria, capable of symbiosis with legumes, among which the rhizobia, which are currently the most studied genera, stand out. In this context, the objective was to test two rhizobial isolates from the UFSC *campus* Curitibanos Rhizobacteria Collection. The experiment was conducted at the vegetation house of UFSC *campus* Curitibanos and was conducted in a randomized block design (RBD), containing seven treatments and eight replications. The treatments used were inoculation of rhizobia isolates RBZ14, RBZ15, the standard strain CIAT 899, association between CIAT899 and RBZ14, association between CIAT899 and RZB15, association between RBZ14 and RBZ15 and control without fertilization and inoculation. The evaluated parameters were fresh and dry shoot mass (g), fresh and dry root mass (g), fresh and dry nodule mass (g) and leaf nitrogen content (g.kg⁻¹). All showed significant statistical differences. In general, more expressive results were obtained by inoculating the standard strain CIAT899.

Key words: Bean. Symbiosis. Inoculation.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
1.1	JUSTIFICATIVA	9
1.2	OBJETIVOS	9
1.2.1	Objetivo Geral	9
1.2.2	Objetivos específicos	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	CARACTERÍSTICAS DO CULTIVO NACIONAL	11
2.2	IMPORTANCIA DO NITROGENIO PARA A CULTURA DO FEIJOEIRO..	11
2.3	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	12
2.4	SELEÇÃO DE RIZÓBIOS MAIS EFICIENTES PARA O FEIJÃO.....	12
2.5	INOCULAÇÃO DAS SEMENTES	13
3	MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1	PREPARO DOS INÓCULOS.....	15
3.2	PREPARO DAS SEMENTES	16
3.3	IMPLANTAÇÃO DO EXPERIMENTO/ DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	17
3.4	COLETA E AVALIAÇÃO.....	18
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1	AVALIAÇÃO DA INOCULAÇÃO NA PLANTA	21
4.1.1	Efeito na parte aérea	21
4.1.2	Efeito no sistema radicular	23
4.2	AVALIAÇÃO DA NODULAÇÃO	25
4.3	TEOR DE NITROGÊNIO FOLIAR	27
5	CONCLUSÃO	29
	REFERÊNCIAS	30
	ANEXO	36

1 INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é considerado um grão de grande importância na alimentação humana. Possui alto potencial nutritivo e é uma fonte básica de proteínas e carboidratos, além de outros nutrientes e minerais como o ferro (BROUGHTON, 2003). É uma alternativa de alimento, que combinado ao arroz formam a base da alimentação da população brasileira (STONE; PEREIRA, 1994; XAVIER *et al.*, 2008).

A produção da cultura se concentra, essencialmente, nas pequenas propriedades agrícolas do país (IBGE, 2006; CONAB, 2019). O cultivo da leguminosa nas grandes propriedades se dá, ocasionalmente, como uma possibilidade de ganho a curto prazo, em razão do seu ciclo reduzido e de acordo com as variantes do mercado (EPAGRI, 2010). A produção dessa cultura, entretanto, se torna oscilante pois requer alto investimento, para formação adequada (VIEIRA *et al.*, 2013).

Em virtude do seu ciclo rápido de produção, a cultura se torna grande dependente do uso de fertilizantes, pois absorve mais rapidamente os nutrientes do solo. (GERLACH *et al.*, 2013; MALAVOLTA, 1979). De acordo com Amado *et al.* (2002), o principal e mais limitante macronutriente para o desenvolvimento da cultura é o nitrogênio. O suprimento adequado desse nutriente favorece a alta atividade fotossintética, o expressivo crescimento vegetativo e a folhas verde-escuras vigorosas (VIEIRA *et al.*, 2013). Os solos brasileiros, entretanto, apresentam teores baixos de nitrogênio, variando de 0,05 a 0,30%, sendo assim insuficientes para suprir a demanda da cultura (BIZARRO, 2008; FRANCO *et al.*, 2002).

O incremento ou reposição deste macronutriente ao solo tem ocorrido, principalmente, por meio da adubação mineral (BIZARRO, 2008; SILVA *et al.*, 2014). Esta forma de adubação, além de ser uma fonte de N de custo elevado, pode sofrer perdas por lixiviação e volatilização (OSINAME *et al.*, 1983). As perdas ocasionadas por esses eventos, frequentemente causam deficiências nas plantas por falta do nutriente e até mesmo, problemas como poluição, como a eutrofização de rios e lagos e implicações na camada de ozônio (FARIAS, 2000; WIEGAND *et al.*, 2016). A eutrofização causa impactos como o aumento da contaminação dos corpos hídricos por metais e substâncias tóxicas, o esgotamento do oxigênio

dissolvido e a morte da fauna e flora aquática (MORAES, 2009; VIEIRA *et al.*, 2013).

Para evitar tais gastos e consequências, tem-se optado pelo uso de bactérias fixadoras de N₂ (diazotróficas) que ao realizar a simbiose absorvem este elemento do ar e são capazes de transformar em NH₃. A amônia gerada através desse processo será utilizada como suprimento à planta, para que esta transforme em aminoácidos ou outros compostos que serão utilizados na nutrição nitrogenada (RUFINI, 2010). O uso das bactérias diazotróficas através da inoculação, além da economia com a redução de fertilizantes nitrogenados, tem promovido o aumento da matéria orgânica do solo (GUALTER, 2007; BIZARRO, 2008; SANTANA *et al.*, 2018).

Na região sul do país, essa prática ainda não tem seu uso difundido, pelo fato da simbiose apresentar grande sensibilidade aos fatores ambientais (EPAGRI, 1992; SOUZA, 2018). Pouco são os produtos com comprovada eficácia nas condições edáficas presentes na região (EPAGRI, 2010). Considerável esforço tem sido despendido pela pesquisa no sentido de conhecer esses fatores para poder permitir ao produtor usufruir dos benefícios da FBN (EPAGRI, 1992; BASTOS, 2016).

Neste sentido, supõe-se que a utilização de isolados de rizóbios da região de Curitiba possa favorecer a fixação biológica de nitrogênio e com isso, reduzir custos de produção, diminuindo a quantidade de fertilizantes químicos ou até, substituindo totalmente sua utilização. Isto ocorre, pois a fixação biológica do nitrogênio favorece o desenvolvimento de toda a estrutura da planta e consequentemente, propicia o incremento na produtividade.

1.1 JUSTIFICATIVA

A prática da inoculação, ainda pouco utilizada para a cultura na região sul do país, busca tornar a planta autossuficiente na obtenção de nitrogênio (BIZARRO, 2008; EPAGRI, 2010). Para cada cultura são encontradas diferentes bactérias simbióticas. No caso do feijão, as bactérias que comumente realizam simbiose são do gênero *Rhizobium* (HUNGRIA *et al.*, 2001; MEYER *et al.*, 2015). Entretanto, há uma enorme quantidade de espécies, fato que torna necessário pesquisas na área para a obtenção de materiais adaptados a cada região (EPAGRI, 1992; CHAGAS JUNIOR *et al.*, 2010). Estudos realizados em torno desse assunto demonstram que a simbiose entre *Rhizobium* e feijão pode ter resultados muito variáveis (BASSAN *et al.*, 2001; EPAGRI, 2010; VIEIRA *et al.*, 2013; XAVIER *et al.*, 2008).

Os trabalhos existentes apresentam resultados contraditórios, divergindo entre regiões. Em alguns casos (SANTANA *et al.*, 2018) suprindo completamente a demanda de nitrogênio através da FBN, pois foi efetivo na nodulação. Em outros casos (BASTOS, 2016) não teve resposta equivalente à adubação nitrogenada, não recomendando-se a substituição. Isso pode ser resultado de interferências edafoclimáticas, condições de difícil controle. Para isso, há a necessidade de fortalecer os estudos correlacionando dois fatores importantes: a capacidade adaptativa das bactérias e quais as condições edafoclimáticas da região de interesse.

Esse trabalho busca reforçar a importância da cultura e trazer resultados sobre inoculações mais eficazes, trazendo novos isolados da região sul do país, podendo ser uma alternativa viável para reduzir custos e ainda aumentar a produtividade.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficiência da fixação biológica de N de isolados de rizóbios da região de Curitiba para o feijoeiro.

1.2.2 Objetivos Específicos

Avaliar a capacidade de nodulação dos isolados;

Comparar eficiência dos isolados em relação a estirpe padrão;
Avaliar a associação dos isolados entre si e com a estirpe padrão;

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CARACTERÍSTICAS DO CULTIVO NACIONAL DE FEIJÃO

A cultura do feijão tem grande importância no cenário mundial, sobretudo nos países em desenvolvimento (FAO, 2017). Sua produção se dá, principalmente, em pequenas propriedades, sendo uma produção tipificada familiar. É um alimento rico em ferro, podendo ser comparado a carne vermelha. Por isso, é o principal responsável por completar a dieta, principalmente, em estrato social mais carente (MOURA; CANNIATTI-BRAZACA 2006).

Segundo dados da Conab (2019), o feijão representa 1,69% do total de grãos produzido no Brasil, e desse total quase 70% é produzido pela agricultura familiar (IBGE, 2006; CONAB, 2015). O Brasil, apesar de ser um dos maiores produtores agrícolas do mundo, está em segundo lugar na lista dos países que mais importam o grão (FAO, 2013). Parte da necessidade de importação se dá devido ao vagaroso desenvolvimento e ao baixo nível de investimento na cultura (EPAGRI, 2010).

A produtividade de grãos ainda se encontra aquém do potencial produtivo, oscilando em torno de 2.000 kg, podendo ser resultante de diversos fatores como, adubação deficiente, manejo incorreto do solo, incidência de pragas e doenças, baixa qualidade das sementes e procedência desconhecida, manejos culturais inadequados para a cultura, adversidades climáticas, entre outros (EPAGRI, 1992; CONAB, 2019).

2.2 IMPORTÂNCIA DO NITROGÊNIO PARA A CULTURA DO FEIJOEIRO

Os solos brasileiros são classificados, em sua maioria, como antigos e pobres em fertilidade natural (BIZARRO, 2008). A cultura do feijão é, assim como tantas outras, muito responsiva às boas condições de fertilidade, embora seja muito cultivada em solos com fertilidade marginal (EPAGRI, 2010). A cultura tem elevada extração de nutrientes do solo, principalmente do nitrogênio (VIEIRA *et al.*, 2013).

A produção de feijão está diretamente relacionada com a quantidade de nitrogênio disponível, ressaltando que sua absorção ocorre durante, praticamente, todo o ciclo da cultura (AMARO *et al.*, 2002; MALAVOLTA, 1979; VIEIRA *et al.*, 2013). O feijão absorve aproximadamente 100 kg de N.ha⁻¹ para produzir uma média de 2000 kg.ha⁻¹ (EPAGRI, 1992; CONAB 2019). Com isso, a adubação nitrogenada da cultura ainda representa um dos seus principais custos de

produção, sendo esse um dos possíveis entraves da proporção de área cultivada em comparação a outras culturas de grãos (AMADO *et al.*, 2002; CONAB, 2015).

Atualmente, a utilização de rizóbios vem sendo cada vez mais estudada em feijoeiro para que a fixação biológica de nitrogênio possa reduzir ou mesmo, substituir a adubação mineral, reduzindo custos e diminuindo perdas que acabam ocasionando em impactos ecológicos não mensurados (FREIRE FILHO *et al.*, 2005; SINGH *et al.*, 2013; SANTANA *et al.*, 2018).

2.3 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

O processo de fixação biológica de nitrogênio resulta da transformação do nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia (NH_3), intermediado pelo complexo enzimático nitrogenase, presente em determinados grupos de bactérias. (VIEIRA *et al.*, 2013). Essa transformação é realizada por bactérias do grupo dos rizóbios.

Os rizóbios são bactérias de solo, capazes de realizar simbiose com leguminosas, formando nódulos e auxiliando na fixação biológica de nitrogênio (FERNANDES JÚNIOR *et al.*, 2012). Essas bactérias captam o N_2 atmosférico, o qual também ocupa os espaços porosos do solo e que, após a sua redução em formas assimiláveis, poderá, então, ser utilizado pela planta. Este processo é tipicamente simbiótico, pois a bactéria passa a fornecer o nitrogênio, do qual a planta necessita e recebe desta, os carboidratos para sua sobrevivência que por sua vez, serve de fonte de energia para reduzir o N_2 do ar a NH_3 (MERCANTE *et al.*, 2011).

Entretanto, esse grupo de bactérias é composto por uma ampla diversidade taxonômica e fenotípica (VIEIRA *et al.*, 2013). Por este motivo, podem ser encontrados diversos gêneros/espécies adaptados a cada região e a diferentes condições edafoclimáticas. Para isso, torna-se necessária a avaliação em cada região, selecionando isolados capazes de estabelecer relações simbióticas em condições edáficas encontradas (CHAGAS JUNIOR, 2010; FLORENTINO *et al.*, 2010).

2.4 SELEÇÃO DE RIZÓBIOS MAIS EFICIENTES PARA O FEIJÃO

O rizóbio do feijoeiro é uma bactéria gram- negativa, ou seja, possui parede celular menos espessa composta por peptídioglicanos, lipoproteínas, membrana externa e lipopolissacarídeos que são responsáveis por dar resistência, forma e

estabilizar a célula. Os rizóbios são naturalmente encontrados nos solos brasileiros, e o isolamento pode ocorrer através da seleção dos nódulos de plantas leguminosas de interesse. Após a seleção, realiza-se a extração dos nódulos e o procedimento convencional de isolamento em meio de cultivo (VINCENT, 1970; VIEIRA, 2013).

Atualmente, esse processo de fixação biológica de nitrogênio no feijão é realizado por diversas bactérias, entre elas as pertencentes à espécie *Rhizobium tropici* (MARTÍNEZ-ROMERO *et al.*, 1991), compreendendo as estirpes comerciais SEMIA 4077 (CIAT 899) e SEMIA 4080 (PRF 81) (VIEIRA, 2013). Essa espécie é considerada geneticamente estável e tolerante a estresses, tais como temperaturas elevadas e acidez do meio, sendo adaptada às condições de solos tropicais (GRAHAM, 1992; HUNGRIA *et al.*, 2000).

A grande diversidade genética e fisiológica vista nos rizóbios do feijão, em conjunto com a capacidade de nodulação da planta com relação às diferentes espécies, evidência a variabilidade de resposta à nodulação nos diversos cultivares de feijão. Fato que pode, também, explicar a razão do insucesso de alguns inoculantes microbianos para a cultura (VIEIRA *et al.*, 2013; HUNGRIA *et al.*, 2000).

2.5 INOCULAÇÃO DAS SEMENTES

Para a produção dos inoculantes, pesquisadores da área da microbiologia agrícola buscam por estirpes cada vez melhores para suprir a necessidade de fixação de N₂ das cultivares mais produtivas desenvolvidas (HUNGRIA *et al.*, 2001; VIEIRA *et al.*, 2013). Para possibilitar a inserção dessas bactérias na cultura são utilizados inoculantes comerciais, sendo eles líquidos ou turfosos.

Os inoculantes devem conter uma população mínima de 1×10^9 células por grama ou mL de inoculante, ter eficiência simbiótica comprovada pela Reunião da Rede de Laboratórios Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE) e serem registrados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (VIEIRA NETO *et al.*, 2008; VIEIRA *et al.*, 2013).

A inoculação padrão para a cultura do feijão consiste em misturar o inoculante com a semente e realizar a semeadura em até 24 horas (VIEIRA *et al.*, 2013; EPAGRI, 1992; HUNGRIA *et al.*, 2001). Após a germinação das sementes, as bactérias entram em contato com as raízes da planta e iniciam a infecção radicular através dos pelos absorventes, formando, posteriormente, os nódulos.

Dependendo do número de nódulos ativos e da eficiência da FBN, a inoculação pode fornecer todo o N do qual o feijão necessita (ARAÚJO, 1999 *apud* MUNHOZ, 2016).

Outro fator de importância quando se fala em inoculantes é o correto armazenamento em local refrigerado e a correta utilização do produto, garantindo a eficiência oferecida pelo material. Os prazos de validade devem ser sempre respeitados, pois se tratam de microrganismos vivos, os quais podem perder grande parte de sua eficiência após o fim do período recomendado (VIEIRA *et al.*, 2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido em casa de vegetação na Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Rurais, localizada na Rodovia Ulysses Gaboardi Km - 3 na cidade de Curitibanos-SC, entre as coordenadas geográficas 27°17'05" S e 50°32'05" O.

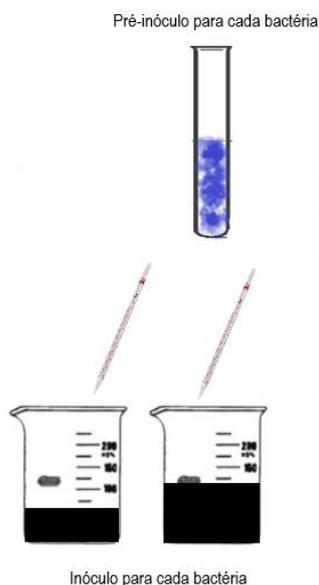
3.1 PREPARO DOS INÓCULOS

Foram preparados, no laboratório de microbiologia da universidade, três tubos de ensaio com 5 mL de meio de cultivo Luria Bertani (LB), para servirem de pré-inóculos de cada estirpe ou isolado bacteriano desejado para os tratamentos. Foram inoculados os isolados RBZ14 e RBZ15, da colação de Rizobactérias da UFSC, e a estirpe padrão CIAT899. Os três tubos de ensaio, foram mantidos em estufa a 26°C por 24 horas, para os isolados RBZ14 e RBZ15 e 48h, para a CIAT899.

Para os inóculos, foram preparados 700 ml de meio de cultivo LB. O volume foi dividido em seis béqueres de 250 ml, com 50 ml (totalizando 300 ml) e em outros quatro béqueres de 250 ml, com 100 ml (totalizando 400 ml).

Um béquer contendo 100 ml e dois béqueres contendo 50 ml de LB foram inoculados com 1ml do pré-inóculos de cada uma das bactérias (Figura 1).

Figura 1: Preparo do inóculo.



Os inóculos dos isolados RBZ14 e RBZ15 permaneceram por 48 horas na estufa a 26°C, enquanto o inóculo da estirpe CIAT899 permaneceu 24 horas a 26°C. Para que todos os inóculos dos tratamentos (incluindo as co-inoculações), possuíssem o mesmo volume (volume final de 100mL), utilizou-se a seguinte distribuição:

Tratamento 1 (T1) - RBZ14 – Volume de 100ml de LB;

Tratamento 2 (T2) - CIAT899 - Volume de 100ml de LB;

Tratamento 3 (T3) – controle - Volume de 100ml de LB sem inoculação;

Tratamento 4 (T4) – RBZ15 - Volume de 100ml de LB;

Tratamento 5 (T5) – CIAT899 (Volume de 50ml de LB) +RBZ14 (Volume de 50ml de LB – Co-inoculação) (Figura 2);

Tratamento 6 (T6) – CIAT899 (Volume de 50ml de LB) +RBZ15 (Volume de 50ml de LB - Co-inoculação) (Figura 2);

Tratamento 7 (T7) – RBZ14 (Volume de 50ml de LB) + RBZ15 (Volume de 50ml de LB - Co-inoculação) (Figura 2);

Figura 2 – Inóculos para co-inoculação.



A inoculação das sementes foi feita no momento da semeadura.

3. 2 PREPARO DAS SEMENTES

As sementes de feijão carioca utilizadas foram da cultivar TAA DAMA. Essa cultivar oferece sementes de ótima qualidade, com longa duração de cor clara no grão, possuem alto potencial produtivo, hábito de crescimento indeterminado e ciclo de 89 dias, garantindo assim o fator de qualidade para o experimento (NUNES, 2017).

As sementes foram, previamente, desinfestadas por imersão em álcool 70% por 1 minuto, imersão em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3%, por 1,5 minutos e por fim, realizou-se a lavagem das sementes 10 vezes em água destilada esterilizada (CALAZANS *et al*, 2010). Posteriormente, realizou-se a contagem e separação das sementes, para obter 30 para cada tratamento.

Cada grupo de 30 sementes foi colocado nos inóculos de cada tratamento, onde ficaram 30 minutos no fluxo laminar, para não haver contaminação.

3. 3 IMPLANTAÇÃO DO EXPERIMENTO / DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Em seguida, o material foi levado do laboratório de microbiologia para a casa de vegetação para semear os vasos Leonard (EMRAPA, 2011). Esses foram previamente preenchidos com substrato areia:vermiculita (1:2) e esterilizados. Cada vaso recebeu três sementes. A semeadura foi realizada manualmente, no dia 14 de dezembro de 2018, com auxílio de materiais esterilizados, para a manipulação das sementes (Figura 3).

Figura 3. Semeadura do feijão TAA DAMA em vasos Leonard.



Fonte: Própria (2019).

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com sete tratamentos e oito repetições, totalizando 56 unidades experimentais, constituídas por cada vasos Leonard. Os vasos receberam reposição constante de

água destilada e autoclavada, e após a queda dos cotilédones receberam solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), semanalmente.

3. 4 COLETA E AVALIAÇÃO

Aos 35 dias após a emergência, as plantas foram coletadas, separando-se as raízes da parte aérea no ponto de inserção cotiledonar (Figuras 4, 5 e 6). Os nódulos destacados das raízes foram separados. A massa úmida de parte aérea, raízes e nódulos foi determinada por pesagem. Esses materiais foram secos em estufa (60°C) até atingir massa constante e em seguida pesados, para determinação de massas secas. A parte aérea foi moída, para a posterior, determinação de Nfoliar pelo método de Kjeldahl (TEDESCO *et al.*, 1995).

Figura 4. Material antes da coleta, aos 35 dias após a emergência.



Fonte: Própria (2019).

Figura 5. Coleta do material e avaliação das plantas.



Fonte: Própria (2019).

Figura 6. Separação das amostras, em parte aérea, raiz e nódulos.



Fonte: Própria (2019).

Todos os dados foram submetidos à análise de variância e quando significativo, as médias dos tratamentos foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, utilizando o software R Core Team (2017) (Em ANEXO, Tabela 4).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o desenvolvimento do experimento, houve uma falha mecânica no sistema de ventilação da casa de vegetação, o que ocasionou um excesso de temperatura em seu interior (aproximadamente 40 graus Celsius), por dois dias, afetando o andamento do experimento.

Observou-se que os três tratamentos com a estirpe CIAT 899 apresentaram resultados significativamente superiores em todos os parâmetros avaliados (Tabela 1, 2, 3 e 4). Os tratamentos com os isolados RBZ14 e RBZ15, separadamente, apresentaram respostas inferiores. Possivelmente, pelo fato dos rizóbios isolados utilizados no experimento serem adaptados às condições edáficas de regiões de altitude. A cidade apresenta características de clima serrano, com temperaturas amenas e chuvas bem distribuídas (CLIMATE-DATA, 2019). Por este motivo, os isolados foram provavelmente afetados pela sensibilidade às temperaturas altas.

Os materiais que receberam a co-inoculação com a estirpe CIAT 899 resistiram de forma mais evidente ao excesso de temperatura, ocorrido na casa de vegetação. A espécie *Rhizobium tropici*, utilizada como tratamento padrão (estirpe CIAT 899), foi isolada na Colômbia. Essa espécie é mais resistente a condições de estresses ambientais, como excessos de temperatura e condições de solos mais ácidos, comuns em regiões tropicais (FERREIRA, 2010; GRAHAM, 1992; HUNGRIA *et al.*, 2000). Possivelmente, devido a isso resistiu melhor que os isolados às condições ocorridas.

A seleção de estirpes de rizóbios adaptáveis a temperaturas elevadas da região semi-árida ampliou as chances de sucesso para o aumento da produtividade de grãos (XAVIER *et al.*, 2007). Hungria *et al.* (1993) também relataram que a utilização de estirpes isoladas em regiões de temperaturas elevadas tem sido descrita como uma rica fonte de recursos genéticos, com potencial de FBN para a cultura do feijoeiro. Entretanto, materiais muito resistentes a condições extremas para a cultura, não têm apresentado resultados satisfatórios em regiões de climas amenos, como a região de Curitiba (EPAGRI, 2010), desestimulando o uso de inoculação.

Recentemente, um trabalho realizado em campo com os mesmos isolados da região de Curitiba demonstraram uma resposta mais significativa com o isolado RBZ15, o qual obteve resultados até superiores ao da estirpe padrão CIAT

899 (ARONI *et al.*, 2019). Com isso, sugere-se que fatores ambientais, como excesso de temperatura, podem ocasionar falha na fixação biológica de nitrogênio realizada através da simbiose. Temperaturas elevadas, superiores a 34°C, são limitantes para o desenvolvimento de rizóbios, pois os plasmídeos que carregam os genes simbióticos podem ser perdidos (XAVIER *et al.*, 2007). Mais estudos na área descreveram a redução dos nódulos em quantidade, tamanho e conteúdo de leghemoglobina, quando submetidas a altas temperaturas, embora outros fatores, além da temperatura, estivessem também envolvidos, afetando diretamente nos resultados de desenvolvimento da planta (DART; MERCER, 1965; VIEIRA *et al.*, 2013).

4.1 AVALIAÇÃO DA INOCULAÇÃO NA PLANTA.

4.1.1 Efeito na parte aérea

Constatou-se que houve diferença significativa em relação a massa da parte aérea, tanto fresca quanto seca, entre os tratamentos (Tabela 1). Apesar do coeficiente de variação estar com valores altos, fato comum quando se trabalha com microrganismos.

Tabela 1 – Efeito da inoculação na parte aérea de feijão comum.

Tratamentos	Massa da Parte Aérea Fresca (g) (MPAF)	Massa da Parte Aérea Seca (g) (MPAS)
Controle (T1)	6.83 b	1.09 b
RBZ14 (T2)	7.64 b	1.50 b
RBZ15 (T3)	4.76 b	0.86 b
CIAT899 (T4)	21.48 a*	4.30 a
CIAT899+RBZ14 (T5)	17.08 a	3.62 a
CIAT899+RBZ15 (T6)	15.95 a	3.29 a
RBZ14+RBZ15 (T7)	4.21 b	0.77 b
CV (%)	34,26	30,78

*Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott knott a 5% de probabilidade.

Os tratamentos T4, T5 e T6 apresentaram as maiores massas da parte aérea, demonstrando a promoção do crescimento vegetal e melhor desenvolvimento da planta com a utilização do inoculante padrão. Outros experimentos também realizados em casa de vegetação, apresentaram isolados de rizóbios como uma alternativa eficaz na promoção de crescimento vegetal em feijoeiro (CERQUEIRA *et al.*, 2015; FARIAS *et al.*, 2012). Tais resultados mostraram que além da fixação biológica de nitrogênio, esses isolados podem ser também responsáveis pela produção de ácido indolacético (AIA), o qual teve relação direta com o crescimento de raiz e desenvolvimento de parte aérea (KUDOYAROVA *et al.*, 1997; LIU, 2010; MEYER *et al.*, 2015).

Em condições de climas tropicais, isolados como o da CIAT899, tem bom potencial de desenvolvimento em plantas, pois estes isolados são adaptados a temperaturas mais elevada e condições climáticas mais extremas, bem como caracterizados pela elevada produção de AIA (GRAHAM, 1992; HUNGRIA *et al.*, 2000; LISOT, 2017). O excesso de temperatura ocorrido por dois dias no experimento, pode ter afetado o desenvolvimento dos isolados, bactérias mais sensíveis, reduzindo seu possível potencial biológico. Os tratamentos CIAT899, e os isolados em co-inoculação com a mesma, permaneceram nodulados e se desenvolvendo adequadamente (Figura 7), demonstrando ainda, que não houve interferência competitiva e alelopática entre os isolados e a bactéria padrão.

Figura 7. Diferenças de coloração na parte foliar dos tratamentos.



Fonte: Própria (2019).

As plantas de feijoeiro inoculadas apenas com os isolados RBZ14 e RBZ15, separadamente, e em co-inoculação (RBZ14 + RBZ15), bem como o tratamento controle, demonstraram sintomas visuais de deficiência de N, apresentando desenvolvimento insuficiente e folhas cloróticas, apesar de testes laboratoriais não terem sido realizados para confirmação (EPAGRI, 2010). A utilização dos isolados separadamente ou associados (RBZ14+ RBZ15), apresentaram respostas estatisticamente semelhantes ao tratamento testemunha, sem o uso de inoculação. Esses resultados demonstraram que os isolados não foram efetivos na promoção de crescimento vegetal. Assim como apresentado por Bastos (2016), que obteve resultados inferiores com isolados de rizóbios em comparação com tratamentos nitrogenados e não recomendou o uso exclusivo de isolados de rizóbios.

4.1.2 Efeito no sistema radicular.

Para o sistema radicular, observou-se também diferenças estatísticas entre os tratamentos. Os tratamentos CIAT899 e RBZ15+CIAT899 tiveram destaque com

as melhores médias em relação a massa de raiz. Essa variável pode ter relação com a produção de AIA (PATTEN; GLICK, 2002). Considerado o fito hormônio mais importante entre as auxinas (MARCHIORO, 2005), funciona como uma importante molécula sinal dentro das células dos vegetais, estimulando o crescimento radicular pelo alongamento e divisão celular e estimulando o aumento do número de pelos radiculares, conferindo a planta, melhor capacidade de absorção de nutrientes e água do solo (CERQUEIRA *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2009). Como demonstrados por Lisot (2017) os isolados testados nesse experimento apresentaram produção de AIA significativas, bem como a bactéria padrão.

Tabela 2. Efeito da inoculação em raízes de feijão comum.

Tratamentos	Massa Fresca de Raiz (g) (MFR)	Massa Seca de Raiz (g) (MSR)
Controle (T1)	12.15 b	0.84 b
RBZ14 (T2)	11.68 b	0.70 b
RBZ15 (T3)	11.91 b	0.68 b
CIAT899 (T4)	17.27 a	1.44 a
CIAT899+RBZ14 (T5)	12.85 b	0.99 b
CIAT899+RBZ15 (T6)	14.40 a	0.94 b
RBZ14+RBZ15 (T7)	11.83 b	0.70 b
CV (%)	23,67	40,23

*Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott knott a 5% de probabilidade.

O isolado RBZ15 em co-inoculação com a CIAT 899 apresentou resultados de MFR estatisticamente semelhantes ao da CIAT 899 solteira, ou seja, não interferiu no potencial de promoção de crescimento da estirpe CIAT 899. Apesar da produção de AIA realizada por ambos os isolados, como apresentado por Lisot (2017), esses não demonstraram resultados significativos na promoção de crescimento de raiz, sendo classificados estatisticamente, no mesmo grupo do tratamento controle, sem inoculação.

4.2 AVALIAÇÃO DA NODULAÇÃO

A partir dos nódulos presentes em cada tratamento, pôde-se observar o efeito simbiótico que os isolados tiveram com a cultura. Os tratamentos CIAT 899, CIAT899+RBZ14 e CIAT899+RBZ15 apresentaram massas de nódulos semelhantes estatisticamente (Figura 10). Ou seja, os isolados em co-inoculação não afetaram o papel da estirpe padrão CIAT 899, pois esses mantiveram os resultados que a estirpe obteve sozinha. Entretanto, não estimularam aumento como o esperado, possivelmente, devido ao período de temperatura alta a que foram expostas.

Tabela 3. Massa de nódulos formados pela inoculação em feijão comum.

Tratamentos	Massa de Nódulos Frescos (g) (MNF)	Massa de Nódulos Secos (g) (MNS)
Controle (T1)	0 b	0 b
RBZ14 (T2)	1.31 b	0.16 b
RBZ15 (T3)	0 b	0 b
CIAT899 (T4)	4.69 a	0.57 a
CIAT899+RBZ14 (T5)	4.87 a	0.50 a
CIAT899+RBZ15 (T6)	4.47 a	0.47 a
RBZ14+RBZ15 (T7)	0.05 b	0.02 b
CV (%)	42,38	39,24

Fonte: Própria (2019).

Os três tratamentos T4, T5 e T6 apresentaram as maiores médias de massas de nódulos, como nas variáveis massas da parte aérea. Esse fato deve ser considerado importante na promoção do crescimento vegetal, visto que uma nodulação eficiente é responsável por grande parte do fornecimento de N à planta. Essa afirmação é confirmada por Meyer *et al.* (2015), quando testaram diversos isolados de rizóbios em comparativo a estirpe padrão CIAT899 e demonstraram que os tratamentos que tiveram as maiores médias de massas da parte aérea, foram os mesmos materiais com resultados superiores em nodulação. A nodulação eficiente apresenta nódulos grandes e com adequada quantidade de

leghemoglobina, fazendo com que os nódulos apresentem, internamente, coloração rosa ou avermelhada, demonstrando a atividade na FBN (Figura 8).

Figura 8. Nódulos viáveis do tratamento CIAT899+RBZ15.



Fonte: Própria (2019).

Os tratamentos Controle e RBZ15 não apresentaram formação de nódulos, sendo o primeiro justificado pela ausência de inoculação, e o segundo, possivelmente, por haver sido afetado pelo excesso de temperatura na casa-de-vegetação. O isolado RBZ15, como apresentado por Lisot (2017), apresentou formação de nódulos em condições de casa-de-vegetação. Entretanto, o isolado não apresentou formação de nódulos, possivelmente, quando exposto ao excesso de temperatura. Além dos resultados de Lisot (2017), o trabalho realizado por Aroni *et al.* (2019) demonstrou que o isolado apresentou nodulação eficiente em condições de campo.

A sobrevivência das células de rizóbios inoculadas, são severamente afetadas de acordo com a temperatura (VIEIRA *et al.*, 2013). Estudos demonstraram que a temperatura ótima desses microrganismos está entre 28 e 31°C. Entretanto, algumas estipes, apresentaram-se resistentes a temperaturas de até 45°C (SOUZA, 2018). As estirpes ou isolados mais sensíveis podem perder sua eficiência na nodulação ou até mesmo na quantificação de fixação biológica de nitrogênio, pois sofrem uma séria alteração nos genes específicos de nodulação

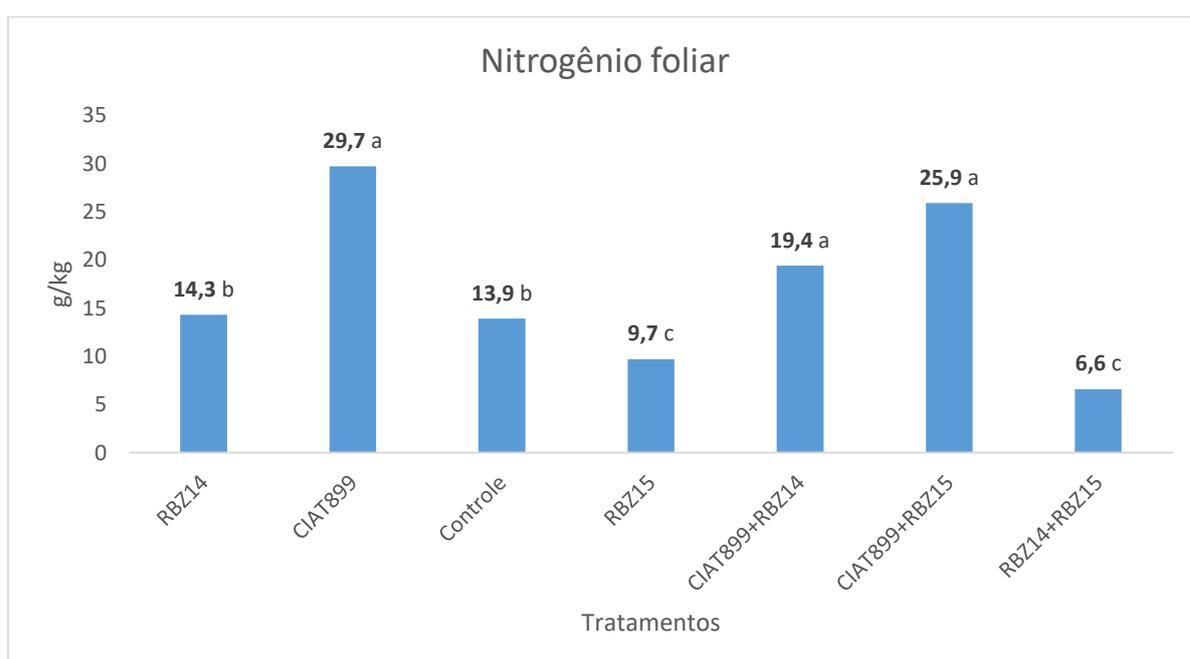
(genes *nod*) presentes no plasmídeo dos rizóbios do feijoeiro (SOUZA, 2018; VIEIRA *et al.*, 2013).

As formações nodulares são eficientes por, aproximadamente, 15 a 20 dias após a emergência das plantas (VIEIRA *et al.*, 2013). Após esse período, a capacidade de fixação decresce acentuadamente, exigindo uma remobilização do N dos tecidos da planta. Sendo assim, a contribuição da fixação é útil desde o início do ciclo até o período de floração, momento em que a maioria dos nódulos perde eficácia (EPAGRI, 1992; EPAGRI, 2010; VIEIRA *et al.*, 2013).

4.3 TEOR DE NITROGÊNIO FOLIAR

Para o nitrogênio foliar, pode-se observar que as plantas que tiveram inoculação com a estirpe CIAT 899 apresentaram maior teor de nitrogênio (Figura 9). Os resultados apresentaram diferenças significativas, variando de 6,6 g.kg⁻¹ até 29,7 g.kg⁻¹. Segundo Dourado Neto e Fancelli (2000), os teores críticos de N na folha do feijoeiro comum variam entre 20,0 a 30,0 g kg⁻¹. O fornecimento de N é muito importante para o crescimento das plantas, pois ele está envolvido em diversos processos fisiológicos, tais como fotossíntese, respiração, desenvolvimento e atividade das raízes, absorção iônica de outros nutrientes, diferenciação celular e genética (MARSCHNER, 2012; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Figura 9. Teor de N foliar.



Grupos relativos à média de g.kg-1 do teor de N foliar dos tratamentos, sendo os que apresentaram melhores médias seguidos da letra a.

Fonte: Própria (2019).

O isolado RBZ15 pode ter sofrido alterações moleculares, que resultaram na falha de eficiência, visto que esse não apresentou formação de nódulos, resultando, também, no antagonismo em relação ao isolado da RBZ14. Os dois isolados em co-inoculação apresentaram efeito antagônico, possivelmente, por algum processo de competição que acabou afetando a fixação de nitrogênio. Talvez pelo fato de ambas serem nativas de solos da mesma região, e por apresentarem características fisiológicas semelhantes. Quando co-inoculados com a CIAT 899 não apresentaram efeito antagônico.

De acordo com os resultados apresentados pode-se constatar que a relação entre a efetiva nodulação ocasionada pela bactéria e os parâmetros de desenvolvimento da planta estão diretamente relacionados. Assim como apresentado por Nascimento *et al.*, (2010), que descreveram que para uma escolha adequada do isolado, deve-se considerar, principalmente, a capacidade de desenvolvimento saudável da parte aérea da planta, pois esta representa, principalmente, a capacidade simbiótica entre a cultivar e o isolado, o qual será grande responsável pela efetividade na produção.

5 CONCLUSÃO

Com base nos dados apresentados, pode-se concluir que o isolado CIAT899, demonstrou-se eficiente na promoção de crescimento da espécie vegetal em estudo, mesmo em condições adversas.

Os isolados RBZ14 e RBZ15 não apresentaram resultados significativos na promoção de crescimento vegetal. No entanto, devido ao excesso de temperatura no período de realização do experimento, possivelmente, houve inibição na ação dos isolados, necessitando novos testes.

REFERÊNCIAS

- AMADO, T. J. C.; MIELNICZUK, J.; AITA C. Recomendação de adubação nitrogenada para o milho no RS e SC adaptada ao uso de culturas de cobertura do solo, sob sistema de plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 26, n. 2, p. 241-248, 2002.
- ARONI, S. A.; WIBBELT, C. K.; MODENA, G.; MAZZUCO, V. R.; BONATO, V.; FERNANDES JUNIOR, M.; BOTELHO, G. R. Feasibility of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia isolates grow in Curitibaanos – SC. **IV Simpósio em Microbiologia Agrícola**, ESALQ, 2019.
- BASTOS, R. A. Co-inoculação de Rizóbio e Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal em Feijoeiro Comum. **Dissertação: UFRRJ**, Rio de Janeiro, 2016.
- BASSAN, D. A. Z. *et al.* Inoculação de sementes e aplicação de nitrogênio e molibdênio na cultura do feijão de inverno: produção e qualidade fisiológica de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 1, p. 76-83, 2001.
- BIZARRO, M. J. **Simbiose e variabilidade de estirpes de *Bradyrhizobium* associadas à cultura da soja em diferentes manejos do solo**. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2008.
- BROUGHTON, W. G.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus spp.*): model food legumes. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 55-128, 2003.
- CALAZANS, G. M.; *et al.* Isolamento e seleção de estirpes de rizóbios eficientes na fixação biológica de nitrogênio da *Cratylia argentea*. **Associação Brasileira de Milho e Sorgo**, 2010.
- CERQUEIRA, W. F. *et al.* Influência de Bactérias do Gênero *Bacillus* sobre o crescimento e feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 11, n. 20, p. 83, 2015.
- CLIMATE-DATA.ORG. **Climograma Curitibaanos-SC**. Disponível em: <https://pt.climate-data.org/america-do-sul/brasil/santa-catarina/curitibaanos-28590/>. Acesso em: 30/10/2019.
- CHAGAS JUNIOR, A. F. *et al.* Eficiência agrônômica de estirpes de rizóbio inoculadas em feijão-caupi no Cerrado, Gurupi- TO. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 4, p. 709-714, 2010.
- CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos. **Companhia Nacional de Abastecimento**. 2015.
- CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos. **Companhia Nacional de Abastecimento**, v.7, n. 20, 2019.

CONAB. Análise Mensal Feijão. **Companhia Nacional de Abastecimento**, Brasília, 2019.

DART, P.J.; MERCER, F.V. The effect of growth temperature, level of ammonium nitrate and light intensity on the growth and nodulation of cowpea. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v.16, p.321-328, 1965.

DOURADO NETO, D.; FANCELLI, A.L. Produção de Feijão. Guaíba: **Agropecuária**, 2000.

EMBRAPA. Análise da qualidade do substrato composto por areia e vermiculita para cultivo de leguminosas em vasos Leonard, nas condições da Embrapa Agrobiologia. **Documentos 289**, Rio de Janeiro, 2011.

EPAGRI. **A Cultura do Feijão em Santa Catarina**. 1 ed. Florianópolis, EPAGRI, 1992. 285 p.

EPAGRI. **Informações técnicas para o cultivo de feijão na Região Sul brasileira**. 1 ed. Florianópolis: GMC, 2010, 164 p.

FAO. Iniciativa regional da FAO aponta agricultura familiar como promotora do desenvolvimento rural sustentável e a agenda 2030. **Organização da Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura**, n.10, 2017. Disponível em: <http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/1043666/> Acesso em: 24/10/2019.

FARIAS, A. R. B. *et al.* Promoção de crescimento vegetal de feijão comum por bactérias isoladas de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Pernambuco**, Recife, v. 17, n. 1, p. 101-104, 2012.

FARIAS, J.R.B. **Compatibilidade de uso de Inoculantes e Fungicidas no tratamento de sementes de soja**. *Circular Técnica*, EMBRAPA Soja, n.11, 2000.

FERNANDES JÚNIOR, P. I.; LIMA, A. A.; PASSOS, S. R.; GAVA, C. A. T.; OLIVEIRA, P. J.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Phenotypic diversity and amylolytic activity of fast growing rhizobia from pigeonpea. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p.1604-1612, 2012.

FERREIRA, P. A. A. Eficiência Simbiótica de Estirpes de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio em Feijoeiro e Sua Tolerância a Acidez e Alumínio "In Vitro". Dissertação, **UFLA**, Lavras- Minas Gerais, 2008.

FLORENTINO, L. A.; SOUSA, P. M.; SILVA, J. S.; SILVA, K. B.; MOREIRA, F. M. S. Diversity and efficiency of Bradyrhizobium strains isolated from soil samples collected from around Sesbania virgata roots using cowpea as trap species. **Revista Brasileira de Ciências Solo**, v. 34, n. 4, p. 1113-1123, 2010.

- FRANCO, M. C.; CASSINI, S. T. A.; OLIVEIRA, V. R.; VIEIRA, C.; TSAI, S. M. Nodulação em cultivares de feijão dos conjuntos gênicos andino e meso-americano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 8, p. 1145-1150, 2002.
- FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa, ed.1, 2005, 519 p.
- GERLACH, G. A. X.; ARF, O.; CORSINI, D. C. D. C.; SILVA, J. C.; COLETTI, A. J. Análise econômica da produção de feijão em função de doses de nitrogênio e coberturas vegetais. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, vol. 43, n.1, p. 42-49, 2013.
- GRAHAM, P. H. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, n. 6, p. 475-484, 1992.
- GUALTER, R. M. R. Avaliação dos efeitos da inoculação de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) walp) com *Bradyrhizobium elkanii*. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 2, 2007.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station**, n.347, p.1-32, 1950.
- HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. M. O.; PROBANZA, A.; GUTTIERREZ-MAÑERO, F. J.; MEGIAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology e Biochemistry**, Oxford, v. 32, n. 11/12, p. 1515-1528, 2000.
- HUNGRIA, M.; CAMPO R.J.; MENDES, I.C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina, Embrapa Soja, 2001. 48 p. (Circular Técnica / Embrapa Soja, ISSN 1516-7860; n.35).
- HUNGRIA, M.; FRANCO, A. A.; SPRENT, J. I. New sources of high-temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 149, n. 3, p. 103-109, 1993.
- IBGE. Censo Agropecuário: Agricultura Familiar, Primeiros Resultados, Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Rio de Janeiro, p. 1- 267, 2006. Disponível em:
- KUDOYAROVA, G.R.; FARKHUTDINOV, R.G.; VESELOV, S.Y. Comparison of the effects of nitrate and ammonium forms of nitrogen on auxin content in roots and the growth of plants under different temperature conditions. **Plant Growth Regulation**, v.23, n.3, p.207-208, 1997.
- LISOT, J. Caracterização e Seleção de Rizóbios Isolados do Planalto Catarinense para Inoculação em Feijoeiro - Comum (*Phaseolus Vulgaris* L.). Trabalho de conclusão de curso (Graduação), **UFSC**, Curitibanos, 2017.

LIU, J.; UM, X.; CHENG, L.; CHEN, F.; BAO, J.; YUAN, L.; ZHANG, F.; MI, G. Auxin transport in maize roots in response to localized nitrate supply. **Annals of Botany Company**, v.106, n.6, p.1019-1026, 2010.

MALAVOLTA, E. **ABC da adubação**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1979. 255 p.

MARTÍNEZ-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, n. 3, p. 417-426, 1991.

MARCHIORO, L. E. T. **Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio**. Curitiba, 2005.

MARSCHNER, H. Marschner's mineral nutrition of higher plants. **Academic press**, 2012.

MERCANTE, F. M.; et al. Estratégias para aumentar a eficiência de inoculantes microbianos na cultura da soja. Comunicado técnico 169. **EMBRAPA**. Dourados, MS. 2011.

MEYER, E.; CANEI, A. D.; ARMAS, R. D.; SOARES, C. R. F. S. Eficiência simbiótica de rizóbios isolados de áreas de restinga em *Phaseolus vulgaris* cv. Tangará. **Repositório Institucional UFSC**, 2015.

MORAES, L.A.F. A visão integrada da ecologia para o manejo sustentável dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 13, n. 4, p. 676-687, 2009.

MOURA, N. C.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Avaliação da disponibilidade de ferro de feijão comum (*Phaseolus VULGARIS* L.) em comparação com carne bovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas. 270-276, abr.-jun. 2006.

MUNHOZ, A. T. Técnicas de inoculação com bactérias de fixação de nitrogênio na cultura da soja. **Repositório Institucional UFSC**. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Curitibaanos. 2016.

NASCIMENTO, L.R.S.; SOUSA, C.A.; SANTOS, C.E.R.S.; FREITAS, A.D.S.; VIEIRA, I.M.M.B.; SAMPAIO, E.V.S.B. Eficiência de isolados de rizóbios nativos do agreste paraibano em caupi. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v.5, n.1, p.36- 42., 2010.

NUNES, H. D. Desempenho agrônomo, qualitativo e eficiência no uso do Nitrogênio em Cultivares de Feijoeiro de Inverno. **UNESP**, Jaboticabal, 2017.

OSINAME, O. *et al.* Effect nitrifications inhibitions of the fate and efficiency of nitrogenoms fertilizers under simulated humid tropical condutions. **Tropical Agriculture**, v. 60, p. 211-217, 1983.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 3795- 3801, 2002.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. 2017. Disponível em: <https://www.R-project.org/> Acesso: 31/10/2019 às: 22:40.

RUFINI, M. Eficiência da simbiose de bactérias fixadoras de nitrogênio com feijoeiro comum em diferentes condições de pH. Dissertação, **UFLA**, Lavras-MG, 2010. Disponível em: http://repositorio.ufla.br/jspui/bitstream/1/2429/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O_Efici%C3%Aancia%20da%20simbiose%20de%20bact%C3%A9rias%20fixadoras%20de%20nitrog%C3%AAnio%20com%20feijoeiro%20comum%20em%20diferentes%20condi%C3%A7%C3%B5es%20de%20pH.pdf. Acesso: 29 outubro 2019.

SANTANA *et al.* Redução da Adubação Nitrogenada em Cobertura de Feijoeiro com *Rhizobium tropici*. **Global Science and Technology**, Rio Verde, v. 11, n. 02, 2018.

SINGH, S. K. JAISWAL, S. K.; VAISHAMPAYAM, A.; DHAR, B. Physiological behavior and antibiotic response of soybean (*Glycine max* L.) nodulating rhizobia isolated from Indian soils. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 19, p. 2093-2102, 2013.

SOUZA, J. S. Caracterização e Seleção de Rizóbios Nativos Associados à *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Trabalho de Conclusão de Curso- UFPB**, 2018.

STONE, L. F.; PEREIRA, A. L. Sucessão arroz-feijão irrigados por aspersão: efeitos de espaçamento entre linhas, adubação e cultivar na produtividade e nutrição do feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária do Brasil**, Brasília, v.29, n.2, p. 521-533, 1994.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre, ArtMed, 2013. 954p.

VIEIRA, C.; PAULA JUNIOR, T. J.; BORÉM, A. **Feijão**. 2 ed. Viçosa. UFV, 2013. 600 p.

VIEIRA NETO, S.A.; et al. Formas de aplicação de inoculante e seus efeitos sobre a nodulação da soja. **Revista brasileira de ciência do solo**. Viçosa, v.4, n.2, 2008.

VINCENT, J. M. Manual for the practical study of root nodule bactéria. **Blackwell Science**, Oxford. 164p.

WIEGAND, M. C.; PIEDRA, J. I. G.; ARAÚJO, J. C. Vulnerabilidade à eutrofização de dois lagos tropicais de climas úmido (Cuba) e semiárido (Brasil). **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 2, 2016. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S141341522016000200415&script=sci_arttext&tlng=pt. Acesso em: 29 outubro 2019.

XAVIER, G. B.; MARTINS, L. M.; RUMJANEK, N. G.; NEVES, M. C. P. Tolerância de Rizóbio de Feijão-Caupi à Salinidade e à Temperatura em Condição *In Vitro*. **Revista Caatinga**, UFERSA, Mossoró, v. 20, n. 4, 2007.

XAVIER, T. F.; ARAÚJO, A. S. F.; SANTOS, V. B.; CAMPOS, F.L. Inoculação e adubação nitrogenada sobre a nodulação e a produtividade de grãos de feijão-caupi. UFSM. **Ciência Rural**, vol. 38, n. 7, p. 2037-2041. 2008.

YANG J.; KLOPPER J. W.; RYU C. M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends in Plant Science**, v.14 n.1, 2009.

ANEXO – Dados gerais do experimento

Variáveis agronômicas em diferentes tratamentos de inoculação em feijoeiro.

Tratamentos	Massa de Raiz (g)	Massa de Raiz Seca (g)	Massa de Nódulos (g)	Massa de Nódulos Secos (g)	Massa Parte Aérea da Planta (g)	Massa da Parte Aérea da Planta Seca (g)	Nitrogênio Foliar (g/kg)
RBZ14	11.68 b	0.70 b	1.31 b	0.16 b	7.64 b	1.50 b	14.3 b
CIAT899	17.27 a	1.44 a	4.69 a	0.57 a	21.48 a	4.30 a	29.7 a
Controle	12.15 b	0.84 b	0 b	0 b	6.83 b	1.09 b	13.9 b
RBZ15	11.91 b	0.68 b	0 b	0 b	4.76 b	0.86 b	9.7 c
CIAT899+RBZ14	12.85 b	0.99 b	4.87 a	0.50 a	17.08 a	3.62 a	19.4 a
CIAT899+RBZ15	14.40 a	0.94 b	4.47 a	0.47 a	15.95 a	3.29 a	25.9 a
RBZ14+RBZ15	11.83 b	0.70 b	0.05 b	0.02 b	4.21 b	0.77 b	6.6 c
CV (%)	23,67	40,23	42,38	39,24	34,26	30,78	59,30

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de significância.