

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA - UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIA DO SOLO

DIEGO PASQUALINI

**POTENCIAL DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM
FEIJÃO EM FUNÇÃO DA DIVERSIDADE DE BACTÉRIA E DA
PLANTA**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em
Ciência do Solo da Universidade do Estado de Santa
Catarina, como requisito parcial para obtenção do título
de Mestre em Ciência do Solo.

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Pires Santos
Co-orientador: Prof. Dr. Osmar Klauberg Filho

LAGES – SC

2008

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA - UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIA DO SOLO**

DIEGO PASQUALINI

BIÓLOGO

**Potencial da Fixação Biológica de Nitrogênio em Feijão em
Função da Diversidade de Bactéria e da Planta**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, para obtenção do título de Mestre em Ciência do Solo.

Aprovado em:
Pela Banca Examinadora:

Homologado em:

Dr. JULIO CESAR PIRES SANTOS

Orientador – UDESC/Lages – SC

Dr. OSMAR KLAUBERG FILHO

**Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Ciências Agrárias
UDESC/ Lages – SC**

Dr. OSMAR KLAUBERG FILHO
Co- orientador – UDESC/Lages – SC

Dr. CILEIDE MARIA M. COELHO
UDESC/Lages – SC

Dr. RICARDO TREZZI CASA
**Coordenador do Programa de
Mestrado em Produção Vegetal
UDESC/ Lages – SC**

Dr. DAVID JOSÉ MIQUELUTTI
UDESC/Lages – SC

ADIL KNACKFUSS VAZ, PhD
**Diretor Geral do Centro de Ciências
Agroveterinárias
UDESC/Lages – SC**

Dra. CAROLINA R. D. M. BARETTA

LAGES – SC JULHO, 2008

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária

Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14ª Região
(Biblioteca Setorial do CAV/UDESC)

Pasqualini, Diego

Potencial da fixação biológica de nitrogênio em feijão em função da diversidade de bactéria e da planta. / Diego Pasqualini. – Lages , 2008.
81 p.

Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências Agroveterinárias / UDESC.

1. Feijão. 2. Rizobio. 3. Cobalto. I. Título.

CDD – 635.652

Em especial a minha Mãe Teresinha Pasqualini (*in memorian*), ao meu pai Valentino Nivaldo Pasqualini, a minha irmã e ao meu cunhado (Patrícia e Gabriel) aos meus dois fantásticos sobrinhos (Guilherme e Arthur) e também a minha querida namorada Juliane.

AGRADECIMENTOS

Ao Deus em que acredito por estar ao meu lado para superar os momentos difíceis.

Ao meu grande amigo e inigualável orientador, Dr. Julio Cesar Pires Santos, pelo apoio, pelos ensinamentos e pela atenção durante esses 3 anos de convívio. Nesse período os conhecimentos transmitidos por ele foram imprescindíveis para a minha formação de mestre.

A minha família (pai, irmã, cunhado e sobrinhos) e a família da minha futura esposa Juliane pelo carinho e pelo incentivo. Sem a ajuda e o auxílio deles teria sido mais difícil ter chego aqui.

À Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Departamento de Solos pela oportunidade de realização deste curso.

Aos professores do curso de Ciência do Solo, em especial, Jaime, Osmar e Paulo Ernani pelos conhecimentos compartilhados.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Aos Bolsistas e não bolsistas que ajudaram nos experimentos no decorrer dos três anos. A Elaine (mestranda) e ao Juliano (graduando) pelo apoio, dedicação, confiança e amizade.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação, pela amizade e companheirismo, principalmente ao Claudinei, Alinne, Franci, James e Tatiana.

A todas as pessoas de A – Z, que contribuíram de uma forma ou de outra para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O feijoeiro ocupa um lugar de destaque em todo o território brasileiro, porém as produtividades médias obtidas são baixas. Em Santa Catarina a maior parte do feijoeiro é cultivada em pequenas propriedades e sem tecnologia alguma, o que dificulta a obtenção de grandes produtividades. Como ocorre com outras leguminosas, o feijoeiro apresenta a capacidade de se associar simbioticamente com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico (N_2), a maioria classificada no gênero *Rhizobium* e a utilização destas bactérias contribui na redução do custo de produção, bem como para aumentar a produtividade. Este trabalho foi dividido em quatro experimentos sendo que o primeiro teve como objetivo a caracterização morfo-fisiológica de isolados de rizóbio coletados em 52 locais das regiões Sul, Vale do Itajaí, Norte e Planalto Norte do estado de Santa Catarina. Após a coleta as plantas foram trazidas para o laboratório de microbiologia do Centro de Ciências Agroveterinárias CAV/UES, onde os nódulos passaram por um processo isolamento e riscagem em placas de petri. Durante 7 dias as placas ficaram em estufa a 28 C sendo avaliadas no terceiro e no sétimo quanto as características morfológicas. Houve uma predominância de estirpes com características brancas e opacas. O segundo experimento foi a avaliação da eficiência agrônômica de isolados de rizóbio nodulantes no feijão coletados em Santa Catarina. Neste experimento foram testadas em areia estéril, 55 estirpes nativas e uma comercial. O experimento foi conduzido em casa de vegetação com delineamento inteiramente casualizado e após 35 dias as plantas foram colhidas e as variáveis analisadas foram: quanto ao número de nódulos, massa de nódulos secos, massa da parte aérea seca e nitrogênio acumulado na parte aérea. Os resultados indicaram que de maneira geral as estirpes nativas proporcionaram incrementos significativos nas variáveis analisadas frente a estirpe comercial. O terceiro experimento teve como objetivo principal a avaliação da fixação de nitrogênio por acessos crioulos do BAF-CAV inoculados com *Rhizobium tropici* (SEMIA 899). Neste experimento foram testados em vasos com solo 14 acessos do BAF-CAV e um acesso comercial quanto a massa da parte aérea seca, massa da raiz seca, número de nódulos e nitrogênio total acumulado. Este experimento foi realizado em condições de telado e com delineamento experimental inteiramente casualizado. Os genótipos testados apresentaram repostas significativas para nitrogênio acumulado e massa seca da parte aérea, indicando assim que deve-se realizar novos estudos para confirmar a eficiência de fixação biológica de nitrogênio. O quarto experimento foi desenvolvido em duas safras com o objetivo de testar diferentes doses de acúmulo de Co e Mo na semente de feijoeiros sobre o rendimento e a quantidade de N acumulado na semente. Neste trabalho foram apresentados somente os dados do segundo ano de cultivo. Há indícios de que com o aumento das doses de Co e Mo nas sementes, também ocorre um aumento no rendimento e na quantidade de N acumulada nas sementes. Estes experimentos buscam obter um maior conhecimento da diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio, em especial rizóbio, e também o papel dos micronutrientes no processo de fixação simbiótica, e isto é

fundamental, para delinear estratégias visando incrementar a contribuição do processo biológico para a nutrição nitrogenada do feijoeiro.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio. *Rhizobium*. Feijoeiro.

ABSTRACT

The common bean occupies an important place in the Brazilian territory, however the gotten yields are low. In Santa Catarina most of the bean is cultivated in small properties and without any technology so the attainment of great yields is difficult. As it occurs with other legume plants, the bean has the capacity of associating symbiotically with atmospheric nitrogen fixing bacteria (N₂), the majority classified as of the genus *Rhizobium* and the use of these bacteria contributes to the reduction of the production cost as well as increases the grain yield. This work was divided into four experiments. The first one aimed to characterize morphofisiologically rhizobia isolates collected in 52 areas of the South region, Vale do Itajaí, North and North Plateaus of the state of Santa Catarina. The collected plants were taken to the microbiology laboratory of the Centro de Ciências Agroveterinárias CAV/UES, where the nodules were isolated, streaked in Petri dishes and incubated for seven days at 28 °C. In the third and seventh days they were evaluated considering their morphologic characteristics. Most of the colonies were white and opalescent. The second trial consisted of the evaluation of agronomic efficiency of the nodulating rhizobia isolates in the bean collected in Santa Catarina. To this second trial 55 native strains and a commercial one were tested in sterile sand. The experiment was lead under greenhouse conditions in a completely randomized design and after 35 days the plants were harvested and evaluated considering the number and dry mass of nodules, shoot dry mass and nitrogen accumulated in the shoots. The results showed that in general the native strains provided significant increments in the analyzed variables in comparison to the commercial one. The third experiment had as the main objective the evaluation of nitrogen fixation by creole accesses of the BAF-CAV inoculated with *Rhizobium tropici* (SEMIA 899). In this trial 14 accesses of the BAF-CAV and a commercial one were tested in pots with soil and evaluated according to shoot and root dry mass, number of nodules and total nitrogen accumulated. This experiment was carried under covered greenhouse conditions and a completely randomized experimental design. The tested genotypes had significant answers to accumulated nitrogen and shoot dry mass, indicating the importance to realize other researches to confirm their nitrogen fixation efficiency. The fourth experiment was realized in the field during two growing seasons with the aim of testing different rates of Co and Mo accumulated in the seeds on the yield and content of N accumulated in the seed. In this work only the data of the second year were shown. There are evidences that with the increase of Co and Mo in the seeds, there is also an increase in the yield and N content accumulated in the seeds. These trials intend to obtain a higher knowledge of the nitrogen fixing bacteria diversity, especially rhizobia, and also role of micronutrients on the symbiotic nitrogen fixation process, and that is very important to delineate strategies to increase the contribution of the biological process to the bean nitrogen nutrition.

Keywords: NBF. *Rhizobium*. Common bean.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Localização geográfica das áreas amostradas no Estado de Santa Catarina.....33

Figura 2 – Porcentagem dos tipos de colônias obtidas após isolamentos de rizóbios isolados de nódulos de feijoeiros.....37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Procedência e propriedades químicas dos solos do estado de Santa Catarina.....	34
Tabela 2 – Morfologia das colônias e reação fisiológica de pH em meio YMA de rizóbios microssimbiontes de feijoeiro do estado de Santa Catarina.....	36
Tabela 3 – Correlação ente número de nódulos, massa nódulos e massa da parte aérea de feijoeiro inoculado com diferentes estirpes após 35 dias de crescimento em casa de vegetação.....	43
Tabela 4 – Massa da parte aérea seca, N total acumulado, massa da raiz seca, massa de nódulos secos e número de nódulos dos 15 genótipos de feijoeiros do BAF/CAV.....	45
Tabela 5 – Identificação, origem do acesso, tipo de faseolina, peso de 100 sementes, proteína total e solúvel dos genótipos do BAF utilizados.....	51
Tabela 6 – Valores médios da massa da parte aérea seca, massa da raiz seca, número de nódulos e nitrogênio total acumulado dos genótipos de feijoeiros testados. Lages, 2008.....	53
Tabela 7 – Massa da parte aérea seca de feijoeiro para diferentes genótipos com e sem inoculação e adição de nitrogênio mineral.....	55
Tabela 8 – Nitrogênio acumulado na parte aérea para diferentes genótipos com e sem inoculação e adição de nitrogênio mineral. Lages, 2008.....	56
Tabela 9 – Massa da raiz seca e número de nódulos nos genótipos de feijoeiro testados com e sem adição de inoculante e nitrogênio mineral. Lages, 2008.....	57

Tabela 10 – Nitrogênio acumulado nos grãos de feijão em função da aplicação de nitrogênio, inoculação com rizóbio e diferentes níveis de Co+Mo acumulado na semente. Lages, 2008.....	64
Tabela 11 – Rendimento de grãos de feijão em função da aplicação de nitrogênio inoculação com rizóbio e diferentes níveis de Co+Mo acumulado na semente. Lages, 2008.....	65

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	14
1 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
1.1 A CULTURA DO FEIJOEIRO EM SANTA CATARINA E NO BRASIL.....	16
1.2 EXIGÊNCIAS CLIMÁTICAS E NUTRICIONAIS DA PLANTA.....	18
1.3 NUTRIÇÃO NITROGENADA NA CULTURA DO FEIJOEIRO.....	19
1.4 MICRONUTRIENTES (Co e Mo).....	23
1.5 DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE N ₂ NA CULTURA DO FEIJOEIRO.....	25
1.6 DIVERSIDADE DE PLANTAS DE FEIJÃO.....	27
2 MATERIAL E MÉTODOS GERAL.....	29
3 CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO MORFO-FISIOLÓGICA DE ISOLADOS DE RIZÓBIO DE DIFERENTES REGIÕES DO ESTADO DE SANTA CATARINA.....	30
3.1 RESUMO.....	30
3.2 SUMMARY.....	31
3.3 INTRODUÇÃO.....	31
3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
3.6 CONCLUSÕES.....	38

4 CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DE ISOLADOS DE RIZÓBIO NODULANTES NO FEIJÃO COLETADOS EM SANTA CATARINA.....	39
4.1 RESUMO.....	39
4.2 SUMMARY.....	40
4.3 INTRODUÇÃO.....	40
4.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.6 CONCLUSÕES.....	46
5 CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO POR ACESSOS CRIoulos DO BAF - CAV INOCULADOS COM <i>Rhizobium tropici</i> SEMIA 4088.....	47
5.1 RESUMO.....	47
5.2 SUMMARY.....	48
5.3 INTRODUÇÃO.....	48
5.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.6 CONCLUSÃO.....	58
6. CAPITULO 4 - NITROGÊNIO ACUMULADO E RENDIMENTO DE GRÃOS DE FEIJÃO EM RESPOSTA A INOCULAÇÃO COM RIZÓBIO E FORNECIMENTO DE COBALTO E MOLIBDENIO.....	59
6.1 RESUMO.....	59
6.2 SUMMARY.....	60
6.3 INTRODUÇÃO.....	60
6.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	62

6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
6.6 CONCLUSÃO.....	66
7 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

INTRODUÇÃO

Importante na alimentação humana, o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) tem sua origem na América Latina e hoje é cultivado em todas as regiões do mundo. Apesar de ser uma planta com cultivo cosmopolita, o Brasil é o maior consumidor e possui a maior produção mundial de feijão. Esta cultura ocupa um lugar de destaque na agricultura brasileira, pois mesmo sendo uma leguminosa de mercado interno, possui uma produtividade baixa quando comparada a outros países produtores, e também não está nas principais frentes de pesquisas da agricultura brasileira.

Em Santa Catarina, estado com estrutura fundiária principalmente baseada em pequenas propriedades (minifúndios), a realidade não é diferente, pois a maior parte da produção estadual é oriunda de propriedades onde o feijoeiro é cultivado em solos marginais, com exploração intensiva e com um baixo nível tecnológico. Além desses fatores que contribuem para a baixa produtividade, temos ainda o fato de que, por apresentar sistema radicular reduzido e pouco profundo, aliado ao ciclo de vida curto e as altas exigências nutricionais, o feijoeiro é uma planta com grande exigência em adubação, sendo a nitrogenada uma das mais fundamentais para uma alta produtividade.

Por se tratar de uma planta da família das leguminosas o feijoeiro possui uma vantagem evolutiva ímpar em relação às plantas de outras famílias, já que as leguminosas possuem uma capacidade de realizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN). Isto se deve ao fato de que as plantas leguminosas são capazes de formar associações simbióticas com bactérias conhecidas por rizóbios. Essas associações formam estruturas típicas nas raízes, denominadas de nódulos, onde ocorre o processo de fixação biológica de (N_2). Essa forma de suprimento de nitrogênio às plantas é fundamental para a redução do uso de fertilizantes nitrogenados e conseqüentemente o custo de produção.

Em que pese à possibilidade de associação com o rizóbio, os programas de melhoramento do feijoeiro deram muito pouca importância a isso, sempre trabalhando mais em função de outras características de interesse da produção, relegando a fixação a segundo

plano. Outros problemas relacionados com a fixação também precisam ser levados em conta, visto que não é somente a promiscuidade do feijoeiro que reduz a eficiência em fixação. Temos ainda relacionado à baixa eficiência de fixação a disponibilidade dos micronutrientes como o cobalto e o molibdênio e a deficiência de variedades melhoradas de feijão mais eficientes para a associação e fixação.

Nos últimos anos um grupo de pesquisadores coordenados pela Embrapa de Londrina e Dourados tem voltado seus esforços para estudar a diversidade de bactérias que associam-se ao feijoeiro, bem como buscado genótipos crioulos que possam contribuir para o melhoramento genético das variedades e do processo de fixação de nitrogênio. Neste grupo insere-se o Laboratório de Biologia do Solo do CAV/UEDESC, tanto nos trabalhos de estudo da diversidade de rizóbios nativos nos solos catarinenses, como pela manutenção de um banco de germoplasma de feijões crioulos (BAF).

Com base nestas preocupações, foram realizados trabalhos com o objetivo de obter informações e tecnologias relacionadas à bactéria e à planta que possam guiar programas de melhoramento de produtividade do feijoeiro via Fixação Biológica de Nitrogênio. Para isto o presente trabalho foi composto de quatro experimentos. O primeiro teve por objetivo coletar e distinguir morfologicamente os rizóbios coletados nas regiões do centro, norte e sul do estado de Santa Catarina nos anos de 2005 e 2006. O segundo foi realizado em casa de vegetação com o intuito de testar estirpes já classificadas morfo-geneticamente com uma única cultivar de feijoeiro. O terceiro foi o teste de 15 acessos de feijoeiro oriundos do BAF/CAV (Banco Ativo de Feijão) quanto à eficiência em fixação de nitrogênio. O quarto experimento teve como objetivo verificar o rendimento e a quantidade de N acumulado na semente de feijoeiro em resposta a inoculação com rizóbio e fornecimento de Co e Mo.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 A CULTURA DO FEIJOEIRO EM SANTA CATARINA E NO BRASIL

As espécies de plantas pertencentes à família *Fabaceae* ou leguminosas, como são conhecidas popularmente, são de suma importância para o homem e para os animais por constituírem a principal fonte protéica vegetal. Nos países em desenvolvimento ou do terceiro mundo estas plantas são à base da dieta humana, sendo que no Brasil, em especial, as leguminosas podem contribuir com 20% a 28% das proteínas ingeridas pela população (HUNGRIA et al., 1997). Entre todas as leguminosas existentes no país o feijão, pertencente ao gênero *Phaseolus* é o mais cultivado. Entretanto, de acordo com YOKOYAMA & STONE (2000) a produção de feijão brasileira ainda é insuficiente para manter o abastecimento da população nacional.

O Brasil é atualmente o primeiro produtor e consumidor dos grãos produzidos pelo feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) seguido por Índia, China, México e EUA (ZUPPI et al., 2005) e o segundo maior produtor mundial de grãos do gênero *Phaseolus* (EMBRAPA, 2003). Esta grande produção é decorrente do cultivo realizado do Norte ao Sul do país praticamente o ano inteiro, já que, em um ano consegue-se produzir três safras (MEIRELES et al., 2000).

De acordo com LAJOLO, et al.,(1996) o feijão possui na sua composição aproximadamente 22 a 26 % de proteínas; 62 a 67% de carboidratos; 3,8 a 4,5% de cinzas; 1 a 2% de lipídios e 3,8 a 5,7 % de fibras brutas. Assim como ele é base da dieta da maioria da população brasileira torna-se um alimento indispensável das famílias mais carentes. Além disso, o feijão ainda é responsável pelo fornecimento de minerais como o Ca, Mg, P, Fe e Zn (MARTÍN – CABREJAS et al., 1997) e de aminoácidos essenciais para a produção de proteínas indispensáveis para o corpo humano (VELASQUEZ et al., 1988).

Além de fornecer proteína para a população de baixa renda, a cultura do feijoeiro tem uma importância econômica e social, pois a maior parte dos produtores pratica agricultura familiar, com baixa quantidade de insumos e de grande relevância para o agronegócio do país.

Nesse contexto, a agricultura familiar no Brasil representa 85,2% do total dos estabelecimentos, que ocupam 30,5% do território nacional e são responsáveis por 37,9% do valor bruto da produção agropecuária nacional (INCRA/FAO, 2000).

Para a safra de 2006/07 segundo a CONAB (2007) a produção brasileira de feijão foi de 3,34 milhões de toneladas, apresentando um decréscimo de 3,8% em relação ao total colhido em 2006. O declínio só não foi maior porque a primeira safra, em razão do aumento de 6,7% na área e da melhora de produtividade, resultou numa produção de 1,57 milhão de toneladas, volume 36% maior que o colhido em igual período de 2006. Esse declínio na produtividade está relacionado com o baixo nível tecnológico empregado pelos produtores, problemas climáticos e também com o cultivo em terras ácidas e de baixa fertilidade, condições essas que agem negativamente sobre a mineralização da matéria orgânica, a disponibilidade de nutrientes e consequentemente a produtividade (MALAVOLTA, 1972, MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Para amenizar este problema de baixa produtividade o uso de uma correta nutrição mineral é de suma importância. Entre os nutrientes mais essenciais para um bom desenvolvimento do feijoeiro temos o fósforo e o nitrogênio. Para MALAVOLTA (1972) o desenvolvimento da cultura só ocorre de maneira correta em solos que não tem deficiência de fósforo. Já o nitrogênio, que em alguns solos é encontrado em teores ínfimos associados à matéria orgânica, também se torna indispensável para a cultura, pois com a intensificação das explorações agrícolas os teores desse elemento vêm decrescendo safra após safra tornando-o, segundo ARAÚJO (1994), um elemento limitante para o desenvolvimento da cultura. Para amenizar os problemas da baixa produtividade do feijão recomendam-se práticas agrícolas como a calagem e a correção dos níveis de fertilidade do solo, porém nem todos os agricultores as realizam anualmente. Outra maneira de reduzir essa baixa produtividade é através do uso de adubação nitrogenada, pois a planta de feijão por ser leguminosa, apresenta uma boa resposta a esta adubação. Embora a adubação nitrogenada seja recomendada, alguns autores a contestam dizendo que não é economicamente viável em razão dos seus custos e também em razão do baixo rendimento (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Em Santa Catarina a realidade não difere da nacional, visto que, o estado caracteriza-se por apresentar uma estrutura fundiária de pequenas propriedades. Assim o cultivo de feijões vem sendo realizado historicamente por pequenos produtores, o que para muitos serve como a primeira entrada de recursos na propriedade (NADAL, 1992). Os agricultores familiares catarinenses possuem 60% da área agrícola e respondem por 71,3% do valor bruto da produção agropecuária catarinense (FETAESC, 2006).

Apesar disto, de acordo com o ICEPA (2001), nas últimas duas décadas vem acontecendo uma redução muito acentuada na área plantada, tanto em Santa Catarina como em todo o Brasil. De acordo com a CONAB (2007) para a primeira safra catarinense de 2006/07, o último levantamento do IBGE/GCEA/SC, aponta para um plantio de 82,5 mil hectares, ou seja, para uma redução de 20,4% em comparação ao total cultivado no ano passado. Esse decréscimo ocorrido na área plantada não proporcionou problemas na produtividade do estado já que a produção catarinense de 2006/07 situou-se em 218,2 mil toneladas, patamar 32,9% maior que o colhido no ano anterior. Tal desempenho decorreu do bom comportamento da primeira safra que além do incremento de 13,8% na área semeada, mostrou avanços na produtividade, resultando numa produção de 182,3 mil toneladas, ou um montante 67% maior que o da anterior.

1.2 EXIGÊNCIAS CLIMÁTICAS E NUTRICIONAIS DA PLANTA

Pertencente a família *fabaceae* e cultivado em todos os estados do Brasil o feijoeiro é uma planta que durante o seu desenvolvimento apresenta duas fases distintas, denominadas de Fases Vegetativa e Reprodutiva. Na primeira fase ocorre o desdobramento das folhas primárias e vai até o aparecimento dos botões florais, já na segunda temos a emissão dos botões florais, o enchimento das vagens e a maturação das sementes (DOURADO NETO & FANCELLI, 2000). Sendo assim é indispensável que nessas duas etapas as exigências climáticas e nutricionais da planta sejam atendidas para que se obtenha uma boa produtividade.

A temperatura para o bom desenvolvimento do feijoeiro deve estar entre 21 e 29 °C (noite/dia) (DOURADO NETO & FANCELLI, 2000; EMBRAPA, 2003). Baixas temperaturas acarretam na redução do crescimento dos ramos, enquanto as altas temperaturas podem causar aborto nas flores, crescimento vegetativo exagerado, redução do número de grãos por vagem, entre outras (EMBRAPA, 2003). Em relação aos problemas encontrados sob deficiência hídrica, as fases vegetativas e reprodutivas respondem de maneira diferente a quantidade de precipitação pluviométrica. Desta forma a cultura necessita de uma precipitação mínima de 400 mm ciclo⁻¹ bem distribuídos (PORTES, 1996). Na fase vegetativa não há grande problema a falta de precipitação, porém na fase reprodutiva, estresses, como a falta de água, podem reduzir drasticamente a produtividade do feijoeiro (DOURADO NETO & FANCELLI, 2000).

A fertilidade é o fator mais importante para que o produtor possa conseguir uma alta produtividade, entretanto, como sendo uma cultura de subsistência e de pequenos produtores os investimentos na fertilidade são parcos, o que acaba prejudicando a cultura. Para que ocorra um bom estabelecimento da cultura devem-se corrigir os problemas de acidez e de baixa disponibilidade de nutrientes, pois são essas as condições mais nocivas para a alta produtividade da planta (BALDISSERA & SCHERER, 1992). Por possuir um sistema radicular pequeno e superficial e um ciclo de vida relativamente curto, a maior exigência nutricional ocorre entre a floração e o enchimento dos grãos. Dessa forma, são nessas fases que ocorre uma grande demanda de nutrientes num curto espaço de tempo (BALDISSERA & SCHERER, 1992; ROSOLEM & MARUBAYASHI, 1994; DOURADO NETO & FANCELLI, 2000). Os nutrientes mais exigidos pela cultura é o nitrogênio, o fósforo e o potássio (OLIVEIRA et al., 1996; EMBRAPA, 2003).

Esta alta exigência nutricional, num curto espaço de tempo, pode estar diretamente relacionada com os programas de melhoramento genéticos. De acordo com TSAI et al., (1993), na América Latina dá-se prioridade a pesquisa e ao desenvolvimento de cultivares com alto índice de produtividade e responsivas a nutrição mineral. Estas pesquisas, entretanto, acabam descartando o uso da fixação biológica de nitrogênio (DENARDIN, 1991). Este direcionamento da pesquisa acaba trazendo um prejuízo enorme para os pequenos agricultores, já que para a pequena propriedade muitas vezes é inviável o uso de fertilizantes, devido ao alto custo.

1.3 NUTRIÇÃO NITROGENADA NA CULTURA DO FEIJOEIRO

As plantas de maneira geral necessitam de vários nutrientes para um desenvolvimento correto e para que consigam alcançar grandes produtividades. Dentre todos os elementos, o nitrogênio é o mais exigido pelas plantas e em especial pelo feijoeiro (EMBRAPA, 2003) e isto se deve principalmente pelo seu curto ciclo de vida, sistema radicular pequeno e também pelo grande acúmulo de nitrogênio nos grãos e na parte aérea. Na região tropical o nitrogênio é um dos elementos que mais limitam o crescimento das plantas por ser exigido em grandes quantidades e por participar dos processos relacionados à fotossíntese (PERIN, *et al*, 2004; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

As plantas podem obter nitrogênio de quatro maneiras distintas, a primeira é através do sistema radicular; a segunda é através da aplicação de adubos nitrogenados; a terceira ocorre pelas descargas elétricas e a quarta, e talvez a mais importante, ocorre por um processo

natural, denominado de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (OLIVEIRA & DANTAS, 1984; HUNGRIA, 1997; MOREIRA E SIQUEIRA, 2006).

A quantidade de nitrogênio disponível no solo depende diretamente da quantidade de Matéria Orgânica também existente no solo, bem como da relação C/N dos resíduos vegetais (MEURER, 2004). Quanto maior a relação C/N menor será quantidade de nitrogênio disponível para as plantas, pois grande parte do nitrogênio ficará imobilizada pelos microrganismos (ERNANI, et al, 2005). O nitrogênio também pode apresentar-se em quantidades baixas ou limitantes, com o cultivo sucessivo e sem a reposição de adubos nitrogenados.

Para suprir esta demanda de nitrogênio os produtores de feijão utilizam à adubação mineral, pois é a forma mais prática e fácil de suprir as necessidades nutricionais da planta. Nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul faz-se o parcelamento da adubação nitrogenada em duas vezes, sendo uma no momento da semeadura e outra em cobertura, 3 semanas após a primeira.

A quantidade de fertilizante recomendada é baseada na quantidade de matéria orgânica encontrada no solo, pois a quantidade de matéria orgânica do solo vem sendo utilizada como o principal indicador da disponibilidade de nitrogênio para as culturas de maneira geral (RAMBO et al, 2007) Para o feijoeiro utiliza-se de 20 a 100 Kg de N/ha, sendo que as maiores doses são utilizadas em solos com baixa quantidade de matéria orgânica (COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO PARA RS E SC, 2004). A utilização de adubos nitrogenados traz respostas positivas para o rendimento de grãos e consequentemente para a produtividade. Contudo, deve-se levar em consideração que aproximadamente 50% do nitrogênio adicionado é utilizado pelas plantas (MEIRA et al., 2001), já que através de fertilizantes no solo pode ser facilmente perdido por lixiviação, desnitrificação ou volatilização (OLIVEIRA et al., 2002).

Com relação ao processo de fixação de nitrogênio oriundo de descargas elétricas, a quantidade de nitrogênio fixada é insignificante, uma vez que o número de descargas elétricas que ocorrem na superfície da terra é insuficiente para que possa ocorrer um grande acúmulo de nitrogênio no solo (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Além dos três tipos de disponibilidade de nitrogênio citados acima, temos ainda o mais importante de todos, que se trata da utilização do nitrogênio atmosférico pelas plantas. Encontramos nitrogênio em todo o planeta terra, porém a maior quantidade está contida na crosta terrestre (93,8%). Nesta a atmosfera é responsável por cerca de 80% do nitrogênio na forma de N₂, (MALAVOLTA, 1980). Esses dados mostram que a atmosfera é uma fonte

inesgotável deste macronutriente. Mesmo presente em grande quantidade na natureza o nitrogênio é um dos macronutrientes mais escassos e com maior custo na nutrição vegetal.

Nas plantas, o nitrogênio é componente de proteínas, aminoácidos, vitaminas e coenzimas, participando da clorofila, e também das reações vitais da planta (RAIJ, 1991; BALDISERRA & SCHERER 1992). A falta deste nutriente nas plantas provoca um amarelecimento das folhas mais velhas, já que ocorre a translocação de nitrogênio para as folhas mais novas (BALDISERRA & SHERER 1992). No feijoeiro, de acordo com MALAVOLTA, 1989, a quantidade de nitrogênio encontrada no tecido vegetal varia de 3 a 5%. Sendo esta fonte inesgotável, a atmosfera acaba disponibilizando o nitrogênio para todos os tipos de vida existentes no planeta, porém para que este elemento seja utilizado muitas vezes ele deve passar por transformações que o deixa disponível para algumas plantas e organismos.

A maioria dos organismos existentes na natureza necessita de nitrogênio numa forma mais reduzida do que a encontrada na atmosfera para sobreviver. Na natureza somente um pequeno número de microrganismos conhecido como procariotos são capazes de reduzir o nitrogênio atmosférico a amônia. Dentro deste grupo temos organismos fixadores de vida livre, e organismos que formam simbioses com as plantas. Destes dois tipos, a maioria das espécies de fixadores é de vida livre e ocorrem nos mais variados tipos de solos e com a maioria das espécies vegetais (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). O outro tipo de fixação biológica encontrada na natureza ocorre entre espécies vegetais e bactérias do gênero *Rhizobium* (HUNGRIA, et al. 1997). Neste tipo de associação ocorre uma simbiose entre a bactéria fixadora de nitrogênio e a planta hospedeira. De acordo com DOBEREINER, 1989 esse mecanismo é o mais sofisticado e eficiente entre as associações de plantas superiores com bactérias fixadoras de N_2 .

A utilização do nitrogênio atmosférico pelas plantas é um processo que depende da transformação, redução do N_2 para a forma amoniacal NH_3 e NH_4 , através de interações com microrganismos do solo (HALBLEIB & LUDDEN, 2000). Esta transformação é indispensável, uma vez que, se permanecer na forma de N_2 , o nitrogênio é indisponível devido a forte ligação existente entre as duas moléculas de nitrogênio (ARAUJO, 2008). O processo de fixação biológica ocorre através do complexo enzimático denominado de dinitrogenase, que é composto por duas unidades protéicas, a Fe-proteína e a Mo-Fe-proteína e que, auxiliadas pela ferridoxina, reduzem o N_2 à amônia (NH_3) (MORGANTE, 2003).

A fixação biológica de N_2 , principal via de incorporação do nitrogênio à biosfera (HUNGRIA et al., 2001), ocorre com a associação de bactérias do gênero *Rhizobium* com

plantas da família *fabaceae* (leguminosas) (MERCANTE et al, 2002; MOREIRA E SIQUEIRA, 2006). Para que ocorra o processo de fixação é necessário haver um reconhecimento entre planta e hospedeiro, ou seja, há uma troca de sinais moleculares que ativam genes dos dois parceiros e liberam substâncias com propriedades quimiotáticas pelas raízes hospedeiras, aproximando e estimulando a multiplicação dessas bactérias na rizosfera. Assim, induzem à transcrição dos genes dessas bactérias essenciais à nodulação, *nod*, *nol* e *noe* (HUNGRIA et al., 1997). Em seguida ocorre a formação de estruturas hipertróficas nas raízes e raramente no caule denominadas de nódulos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Contudo, o processo de nodulação muitas vezes não ocorre em algumas leguminosas, mas isso não significa que a fixação também não ocorra. A distinção entre plantas nodulantes e não nodulantes está relacionada com o processo de evolução das espécies vegetais. Espécies vegetais pertencentes a famílias menos evoluídas tendem a não nodularem enquanto espécies pertencentes a famílias mais evoluídas nodulam predominantemente (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Para que ocorra um adequado fornecimento de nitrogênio para o feijoeiro através da FBN (fixação biológica de nitrogênio) é necessário fazer a inoculação de sementes com bactérias do gênero *Rhizobium*, as quais já passaram por testes de competitividade e capacidade de fixação. Esta prática de inoculação visa assegurar um número suficiente de células que garantam a nodulação com as estirpes desejadas. Atualmente existem inoculantes comerciais produzidos por diferentes empresas, que indiferem no que diz respeito às espécies de bactérias utilizadas. Existem duas espécies de rizóbio, ambas classificadas como *Rhizobium tropici*: CIAT 899 (SEMIA 4077) indicada desde 1994 e PRF 81 (SEMIA 4080) indicada a partir de 1998 considerando as estirpes SEMIA 4077 e SEMIA 4080 como as mais eficientes (BERTON JÚNIOR, 2003). O que levou a escolha destas estirpes frente às demais foram características intrínsecas da bactéria como estabilidade genética, a grande competitividade com as estirpes nativas e também devido a alta eficiência simbiótica (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Contudo, o sucesso esperado pela prática da inoculação nem sempre é alcançado e quando obtido pode tornar-se limitado devido a características da planta, como baixa capacidade de formar associação com a bactéria, fatores edáficos como pH solo, toxidez de Al, nutrição nitrogenada e pragas. Além disso, temos ainda, problemas climáticos como estresse hídrico ou temperaturas muito altas e também a competitividade das estirpes nativas do solo que acabam dificultando o processo de infecção e fixação das estirpes inoculadas, uma vez que, na mesma planta podem ocorrer nódulos formados por diferentes estirpes e

também por diferentes espécies (VARGAS & HUNGRIA, 1997; HUNGRIA et al. 1999; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Estudos realizados por SILVA, 2002; FERREIRA et al., 2003 mostram que para o feijão, somente a inoculação com *Rhizobium* não fornece a quantidade de N demandada para atingir níveis econômicos de produtividade.

Quando o processo de inoculação e a simbiose *Rhizobium* - feijoeiro ocorre de uma maneira mutualística os ganhos com o processo de fixação biológica de nitrogênio são altíssimos, principalmente no que diz respeito a produtividade, e a redução de gastos com a adubação nitrogenada. Pesquisas realizadas pela EMBRAPA (2003) demonstram que a produtividade de feijão inoculado com rizóbio foi capaz de atingir 2500 kg ha⁻¹/ano. Experimentos com o feijão caupi em Petrolina, estado de Pernambuco, revelou que esta cultura pode ter um aumento de produtividade de até 85%, passando de 400 kg ha⁻¹ para potenciais 700 kg ha⁻¹, com a inoculação do rizóbio adequado - resistente a altas temperaturas e a deficiência de água (EMBRAPA, 2004).

1.4 MICRONUTRIENTES (Co e Mo)

A baixa nodulação e fixação simbiótica de N₂ pelas leguminosas em solos ácidos tropicais e subtropicais tem como uma das causas principais, a deficiência de molibdênio (FRANCO et al., 1978), agravada pela sua imobilização em pH baixo. (SIQUEIRA & VELLOSO, 1978). Os teores adequados de cobalto e molibdênio no solo são também importantes, porque estes nutrientes estão ligados ao complexo enzimático envolvido na fixação do N₂.

O molibdênio e o cobalto são essenciais para o processo de fixação simbiótica do nitrogênio em leguminosas e para outros processos fisiológicos das plantas superiores. A aplicação de micronutrientes, visando à correção de deficiências nutricionais, pode ser realizada de três modos: diretamente no solo junto com a adubação convencional, em aplicação foliar e via tratamento de sementes (MESCHEDÉ et al., 2004). Dentre todos os micronutrientes o molibdênio é o mais escasso no solo e o menos exigido pelas culturas, porém, é de suma importância para as plantas fixadoras de nitrogênio, já que ativa as enzimas nitrogenase e nitrato redutase (MALAVOLTA, 1980)

O metabolismo do N pode ser seriamente prejudicado pela deficiência de Mo, pois esse micronutriente faz parte da enzima nitrogenase que, catalisa a redução do N₂ atmosférico a NH₃, reação esta que ocorre no interior dos nódulos radiculares, realizada pelos bacterióides

e que fornece nitrogênio a planta hospedeira (DECHEN et al, 1991; SIQUEIRA E MOREIRA, 2006). Por esse motivo, a carência de Mo provoca, no feijoeiro, sintomas semelhantes aos induzidos pela falta de N, ou seja, plantas com crescimento reduzido e folhas cloróticas.

O molibdênio encontra-se pouco disponível em solos ácidos (HUNGRIA et al., 1997). Embora tenha sido constatado, inicialmente, que a simples calagem pode liberar o Mo necessário ao feijoeiro, tem sido cada vez mais freqüente o relato de deficiência desse micronutriente em solos que vêm sendo cultivados intensivamente.

Plantas de feijoeiro originadas de sementes com alto teor de Mo mantiveram a atividade da nitrogenase similar à de plantas que receberam Mo nas raízes (BRODRICK & GILLER, 1991), e o uso de sementes com suficientes conteúdos de Mo em solos pobres preveniu o aparecimento de deficiência de Mo até o quarto cultivo consecutivo no mesmo local (BRODRICK et al., 1995). Considera-se que o nível crítico de Mo nas sementes de feijão é de 3,5 µg por semente (JACOB-NETO & FRANCO, 1986), o que permitiria ao feijoeiro crescer e fixar N₂ mesmo em solos deficientes. Entretanto, muitas sementes, particularmente no Brasil, apresentam baixos teores de Mo (JACOB NETO, 1985). De acordo com JACOB-NETO, 1985; VIEIRA et al., 1995a para atingir o nível adequado de Mo nas sementes, ou o nível adequado de molibdênio para a simbiose, a aplicação foliar é mais eficiente do que a aplicação no solo. O fornecimento de molibdênio também promove a elevação na produção de, seja em aplicação no solo ou nas sementes (JUNQUEIRA NETO et al., 1977), como também em aplicação via foliar (AMANE et al., 1994).

Existem poucos estudos mostrando os benefícios do cobalto nas plantas. Especificamente, este elemento não é considerado essencial para o feijoeiro, entretanto, sabe-se que está intimamente ligado ao processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) e, conseqüentemente, é essencial aos microrganismos fixadores de N (VIEIRA, 1998).

De acordo com OLIVEIRA et al. (1996), o Co é indispensável á produção do feijoeiro quando a necessidade em nitrogênio está sendo suprida através da associação simbiótica feijoeiro-bactéria, já que esta última depende do Co para seus mecanismos de fixação. A maioria dos trabalhos tem sido desenvolvidos com aplicação de Co no solo ou via semente, com resultados positivos (JUNQUEIRA NETTO et al., 1977; CORRÊA et al.,1990). Entretanto, apesar de serem conhecidos os efeitos benéficos do Co nas leguminosas, não existem recomendações precisas de doses do nutriente para o feijoeiro em aplicações foliares.

A aplicação de micronutrientes nas sementes de feijoeiro em associação a inoculação com *Rhizobium*, quando em concentrações elevadas, tem causado grande mortalidade de

células de rizóbio em função de seu efeito salino sobre as bactérias, causando prejuízos a fixação de N_2 . Assim, tornam-se pertinentes estudos sobre o fornecimento destes micronutrientes via foliar, de forma a obter informações referentes ao acúmulo destes elementos nos grãos de feijoeiro e sua relação com eficiência de uso do nitrogênio através do processo de fixação biológica do nitrogênio.

O molibdênio e o cobalto são essenciais para o processo de fixação simbiótica do nitrogênio em leguminosas. O metabolismo do N pode ser seriamente prejudicado pela deficiência de Mo, pois esse micronutriente faz parte da enzima nitrogenase, responsável pela fixação biológica do N_2 pelo *Rhizóbio*, e da redutase do nitrato. Para atingir o nível adequado de Mo nas sementes, ou o nível adequado de molibdênio para a simbiose, a aplicação foliar é mais eficiente do que a aplicação no solo (JACOB NETO, 1985). Não existem muitos estudos mostrando os benefícios do cobalto (Co) nas plantas, e os resultados obtidos muitas vezes são contraditórios. Especificamente, este elemento não é considerado essencial para o feijoeiro, mas é essencial aos microorganismos fixadores de N (VIEIRA, 1998).

1.5 DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE N_2 NA CULTURA DO FEIJOEIRO

Rizóbio são bactérias de solo com capacidade de formar associações com plantas leguminosas formando assim estruturas denominadas de nódulos nas raízes e em alguns casos no caule cuja função é a conversão do nitrogênio atmosférico em formas utilizáveis pela planta. Existem aproximadamente 18000 espécies de plantas leguminosas, entretanto sabe-se que somente em 8% ocorre a formação de nódulos (SPRENT, 1994).

Dentre as plantas leguminosas o feijoeiro é um exemplo típico que representa bem a capacidade de formar associações com bactérias do gênero *rhizobium*. O único entrave desta associação é que nem sempre o processo de fixação é eficiente, uma vez que a planta do feijoeiro é considerada promíscua, podendo assim formar associações com diversas bactérias do gênero rizóbio. Esta grande capacidade de associar-se nem sempre é benéfica, pois em muitos casos as bactérias que formam essa associação não são eficientes no processo de fixação biológica de nitrogênio.

Várias são as bactérias fixadoras de N_2 que possuem a capacidade de formar associação com as plantas leguminosas como o feijoeiro sendo que até o momento já foram descritos os gêneros: *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*,

Sinorhizobium, *Burkholderia* e *Methylobacterium*. Tradicionalmente, essas bactérias vêm sendo chamadas, coletivamente, de “rizóbios”.

Inicialmente a especificidade hospedeira dos rizóbios foi indispensável para que se conseguisse realizar a sua classificação hospedeira. Assim sendo as bactérias que nodulam o feijoeiro primeiramente foram classificadas como *Rhizobium phaseoli*. Posteriormente a classificação, considerou as características morfofisiológicas, genéticas e a especificidade hospedeira JORDAN (1984). PIÑERO et al. (1988) sugeriram que uma classificação biologicamente mais representativa de *Rhizobium* spp. deveria ser baseada em critérios genéticos e evolucionários que refletissem a similaridade total das estirpes e suas prováveis linhas genealógicas de evolução.

Na classificação de JORDAN (1984), o gênero *Rhizobium* é caracterizado como bactérias de crescimento rápido em meio de cultura específico e todas as estirpes de rizóbios isoladas do feijoeiro passaram a pertencer à espécie *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. No entanto, este novo arranjo taxonômico não foi totalmente aceito, havendo várias evidências de que deveriam existir novas espécies.

Atualmente o uso da engenharia genética vem facilitando os estudos sobre a classificação e diversidade das mais diferentes formas de vida existentes no planeta. Autores como MARTÍNEZ-ROMERO (2000), relatam que a filogenia de um organismo é indispensável para se conhecer sobre a taxonomia do mesmo, visto que é através da filogenia que se consegue fazer a separação e a relação existentes entre os organismos e seus grupos e também com as famílias e reinos. Dentro da engenharia genética a biologia molecular é de suma importância para os estudos taxonômicos e de classificação de bactérias. Assim sendo, com esta ferramenta conseguiu-se descobrir que para os rizóbios a região 16S RNAr é indispensável para estimar a filogenia, pois nessa região à presença de domínios altamente conservados nas seqüências dos genes que a codificam, permitindo assim a formulação de “primers” indispensáveis para as análises moleculares (THIES et al., 2001).

No Brasil as espécies de rizóbios reconhecidas como simbioses do feijoeiro são *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. etli* e *R. tropici*. STRALIOTTO et al., (1999) após pesquisas realizadas em solos tropicais do Brasil e da África encontraram um número bastante representativo de isolados de nódulos de feijoeiro, que após análise genética de restrição do 16S rDNA, foram incluídos dentro do gênero *Sinorhizobium*. Este fato contribui para demonstrar a diversidade dos rizóbios simbioses do feijoeiro.

1.6 DIVERSIDADE DE PLANTAS DE FEIJÃO

Originário das Américas, a origem evolutiva do gênero *Phaseolus* ainda é controversa. Sua domesticação é considerada não cêntrica, ou seja, sem um centro de domesticação definido. Encontram-se populações selvagens de feijão que se desenvolvem anualmente desde o Norte do México até o Norte da Argentina, em altitudes de 500 a 2000m, porém nenhuma destas populações é encontrada naturalmente no Brasil. Análises eletroforéticas demonstraram os vários tipos de faseolina, onde o tipo “S” e sementes pequenas predominaram nos centros meso-americano e norte andino, enquanto que o tipo “T” e sementes grandes predominaram no centro sul andino.

SINGH et al., (1991c) propõem que para cada grupo gênico (meso-americano e andino), apresenta três raças podem ser distinguidas sobre a base de diferenças nas plantas, morfologia de semente, regimes de adaptação e hábitos de crescimento. O grupo gênico andino foi subdividido em três raças, denominados de raça Nueva Granada (N), representando feijoeiros com sementes de tamanho médio a grande (> 40 g/100 sementes), faseolina tipo “T” e hábitos de crescimento tipo I e II; raça Peru (P), com feijoeiros com hábito de crescimento tipo III e IV, adaptados a altitudes acima de 2.000 metros, sementes grandes e faseolina dos tipos “T”, “C”, “H” e “A”; e raça Chile (C), composta tipicamente por raças locais do Chile, caracterizada por hábitos de crescimento tipo III, sementes de tamanho médio e ovais, geralmente com mais de uma cor e padrões de faseolina tipo “C” e “H”.

No grupo meso-americano mais três subdivisões são sugeridas: raça Mesoamérica (M), encontrada no México e América Central, caracterizada por sementes pequenas (< 25 g/100 sementes), faseolina tipo “S”, hábitos de crescimento tipo II e III e sementes com tegumentos de coloração preta e vermelha; raça Durango (D), composta principalmente por hábitos de crescimento tipo III, folhas pequenas, sementes médias (25 a 40 g/100 sementes), faseolina tipo “S” e adaptados em áreas de sequeiro provenientes do México; e raça Jalisco (J), encontrada em áreas úmidas do México, hábitos de crescimento tipo IV, faseolina tipo “S” e sementes de tamanho médio.

Em estudo sobre a diversidade de feijoeiros andinos e baseados em marcadores AFLP, BEEBE et al., (2001) observaram uma estreita base genética neste grupo, acreditando-se que esta diversidade não foi menor devido a introgressões de feijoeiros meso-americanos.

No Brasil o feijoeiro é cultivado em todas as regiões, sendo que pode ser considerada como uma cultura com até três safras, dependendo da região do país. Em cada região ou estado da-se preferência por cultivares que são adaptadas ao clima, ao solo e também as

exigências do mercado consumidor. ZIMMERMANN & TEIXEIRA (1996) relatam que o gênero *Phaseolus* apresenta quatro espécies cultivadas, derivadas de um único ancestral comum, sendo elas *P. vulgaris*, *P. lunatos*, *P. acutifolis* e *P. coccineus*, sendo que a espécie *P. vulgaris* é a mais importante do ponto de vista alimentar em todo o mundo.

FREITAS (2006) após suas pesquisas sobre evidências genético-arqueológicas sobre a origem do feijão comum no Brasil sugeriu que existia uma troca de variedades, um fluxo gênico entre as populações de feijão do México até o Norte da América do Sul, formando um grupo a parte do outro encontrado ao Sul do Peru. Este mesmo autor relata também que o aumento do fluxo gênico deve-se as migrações humanas e suas relações inter-étnicas. Durante o processo de migração as variedades que estavam separadas por grandes distâncias puderam ficar muito próximas, facilitando assim o fluxo gênico. Através desta troca de genes entre as populações passadas acredita-se que no Brasil o feijoeiro tenha surgido através das rotas migratórias dos indígenas que habitavam as regiões fronteiriças.

No Brasil, dentre os vários tipos de feijoeiros cultivados há à predominância dos tipos de grãos carioca e preto e isto de acordo com CHIORATO et al., (2005) é um dado esperado, uma vez que, os programas brasileiros de melhoramento de feijão direcionam suas pesquisas para os tipos de grãos carioca e preto, com características tipicamente de feijões meso-americanos.

2 MATERIAL E MÉTODOS GERAL.

Esta dissertação é composta de quatro experimentos distintos: caracterização morfofisiológica de rizóbios (experimento 1); avaliação da eficiência de rizóbio (experimento 2); avaliação da eficiência de acessos do BAF (Banco Ativo de Feijão – CAV/UDESC) (experimento 3) e avaliação a campo de acúmulo de cobalto e molibdênio nas sementes de feijoeiro e na produtividade com a utilização de cobalto e molibdênio via foliar (experimento 4). O experimento 1 foi desenvolvido no laboratório de biologia do solo do Centro de Ciências Agroveterinárias/CAV- UDESC, Lages, no período compreendido entre os meses de novembro de 2006 a abril de 2007. Os experimentos 2 e 3 realizados desta dissertação foram realizados em condições parcialmente controladas em casa de vegetação no Centro de Ciências Agroveterinárias/CAV- UDESC, Lages – SC, durante o período de novembro de 2006 a dezembro de 2007. O experimento 4 experimento foi desenvolvido em condições de campo no município de Lages no entre os meses de dezembro de 2007 a fevereiro de 2008.

3 CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO MORFO-FISIOLÓGICA DE ISOLADOS DE RIZÓBIO DE DIFERENTES REGIÕES DO ESTADO DE SANTA CATARINA

3.1 RESUMO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é largamente cultivado em todo o território brasileiro, sendo seus grãos responsáveis pela fonte de proteína e minerais ingeridos por boa parte da população brasileira. Em Santa Catarina estado caracterizado por minifúndios, a maioria as lavouras são em áreas marginais com solos pobres, reduzindo assim a produtividade. Uma das maneiras de amenizar esta baixa produtividade e aumentar a renda dos produtores é a utilização de bactérias fixadoras de nitrogênio que atuam transformando o nitrogênio atmosférico para a forma em que as plantas conseguem absorver. Estas bactérias são conhecidas como Rizóbios e são de extrema importância para as leguminosas. Assim, este trabalho tem como objetivo, promover a caracterização da diversidade morfológica de feijoeiros das principais regiões produtoras de Santa Catarina e identificar estirpes de *Rhizobium* mais competitivas e com maior capacidade de fixação biológica de nitrogênio. Foram realizadas 52 coletas em 31 municípios Santa Catarina. De cada coleta 10 nódulos ao acaso foram isolados e cultivados em placa de Petri contendo meio de cultura YMA. Após isto as placas foram postas em estufa para crescimento das colônias de bactéria. Foram realizadas duas avaliações morfológicas uma aos 3 e outra aos 7 dias de crescimento e em cada uma as seguintes características foram avaliadas: transparência, cor, tamanho da colônia, formato da borda, elevação, taxa de crescimento, forma, produção de muco e mudança de coloração quanto ao pH. Esta última caracterização será realizada em meio YM com Azul de Bromotimol. Os grupos predominantes foram aqueles que apresentaram colônias de cor branca, transparência opaca em YMA, borda lisa, elevação cupular e produção moderada de muco. Há uma grande diversidade de *Rhizobium* presente no estado de Santa Catarina e o conhecimento desta torna-se imprescindível para que se possa buscar novas estirpes mais competitivas e com boa capacidade de fixação de nitrogênio.

Palavras-chave: *Rhizobium*. *Phaseolus vulgaris*. Nódulos.

3.2 SUMMARY

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is widely cultivated in Brazilian territory being one of the protein and minerals source for good part of the country population. The state of Santa Catarina is characterized for small properties, most of the fields in marginal areas with poor soil and low yields. One of the ways to reduce this problem and increase the farmer's incomes is the use of nitrogen fixing bacteria that reduce the atmospheric nitrogen to forms that plants can uptake. These bacteria know as rhizobia are extremely important to legume plants. This work had the objective to characterize the morphological diversity of common bean in the main producers region of Santa Catarina and do the identification of competitive *Rhizobium* strains with higher biological nitrogen fixation capacity. To this work 52 collects were done in 31 cities of Santa Catarina. In each collect, 10 nodules were randomly isolated and grown in Petri dishes with YMA broth. Two morphological evaluations were done, one at the third incubation day and the second at the seventh. The morphological characteristics analyzed were: transparency, color, colony size, edge form, elevation, growth time, form, production of exopolysaccharides and change of the broth pH. The last characteristic was realized in YM broth with bromothymol blue. There is a great *Rhizobium* diversity in Santa Catarina state and its knowledge is important so it is possible to get new and more competitive strains and with a good capacity of nitrogen fixation.

Keywords : *Rhizobium*. *Phaseolus vulgaris*. Nodules.

3.3 INTRODUÇÃO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) vem sendo utilizado na alimentação a cerca de 7.000 a 10.000 anos a.C. por indígenas que habitavam a região inca e a região meso-americana. Desde aquele período até os dias atuais o feijoeiro continua sendo largamente utilizado na alimentação humana, pois constitui a principal fonte de proteína e de minerais para a população de baixa renda (LAJOLO et al., 1996 e VIEIRA & RAVA, 2000).

Em Santa Catarina, estado que se caracteriza por apresentar uma estrutura fundiária de minifúndios, o feijoeiro tem se destacado como uma cultura praticada por pequenos produtores (FETAESC, 2007), em áreas marginais onde a fertilidade do solo é baixa e sem a utilização de fertilizantes, premissas essas que contribuem para o declínio da produtividade, afetando negativamente o rendimento da cultura.

O feijoeiro, a exemplo de outras leguminosas, possui a capacidade de formar associação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio da ordem *Rhizobiales*, porém é uma planta altamente promiscua em relação a seus simbiontes, o que vem dificultando estudos de melhoramento da fixação de nitrogênio por esta planta. Para aprimorar esse processo de fixação o primeiro passo a ser dado é a caracterização morfológica das bactérias para que se faça um levantamento da biodiversidade das comunidades nativas.

Este trabalho teve como objetivos: promover a caracterização da diversidade morfológica de feijoeiros das principais regiões produtoras de Santa Catarina e identificar estirpes de *Rhizobium* mais competitivas e com maior capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN).

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

O levantamento da diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio em feijão foi realizado nas safras de 2005/2006 e 2006/2007. As coletas realizadas para a realização deste experimento ocorreram na safra de 2006/2007.

Para o levantamento da diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio em feijão, foram realizadas coletas de nódulos radiculares de feijoeiro colhidos diretamente em lavouras das regiões Sul, Vale do Itajaí, Norte e Planalto Norte do estado de Santa Catarina (Figura 1). Ao total foram obtidas 52 amostras nestas regiões. Entre cada amostragem foi sempre respeitada uma distância mínima de 10 km e em cada local foram retirados nódulos de no mínimo 3 plantas de feijoeiro. Deste total de 52 amostras, somente 2 lavouras eram comerciais e as demais eram todas para subsistência familiar. Todos os locais de coleta foram identificados com o nome do município e georeferenciados com a ajuda de um GPS EXTRIN.

Durante a coleta, as plantas bem como o solo foram armazenados em caixas de isopor com gelo para que o material se mantivesse conservado até o retorno ao laboratório e processamento das amostras. Os solos foram submetidos a análises químicas de pH (H₂O), pH (KCl), Ca, Mg, Al, Na, K, P e N determinando segundo os métodos propostos por TEDESCO et al. (1995) (Tabela 1). De cada local coletado, 10 nódulos ao acaso foram retirados cuidadosamente das raízes dos feijoeiros coletados. Após a retirada dos nódulos eles foram previamente lavados em água estéril para diminuir o risco de contaminação dentro da câmara de fluxo.

No interior da câmara de fluxo, os nódulos foram desinfestados individualmente, durante um minuto em álcool (95%), 5 minutos em hipoclorito de sódio (2-3%) e lavados por 5 vezes em água destilada estéril (VINCENT,1970). Após a lavagem dos nódulos os mesmos foram macerados com um bastão de vidro flambado e, com uma alça de platina repicados em placas de Petri esterilizadas, contendo meio de cultura YMA (pH 6,8) [manitol, 5,0g; K₂HPO₄.H₂O, 0,5g; NaCl, 0,1g; MgSO₄.H₂O, 0,2g; extrato de levedura, 1,0g; ágar, 12g; vermelho Congo, 2,5mL (solução estoque de 0,25g 100 mL⁻¹)], dissolvidos em um litro de água destilada.

O método de riscagem das placas buscou maximizar o esgotamento de bactérias para uma melhor obtenção de colônias isoladas. Alguns cuidados especiais como sempre flambar a alça depois de cada movimento, esfriá-la no ágar na extremidade das placas e inverter as placas antes da incubação, foram tomadas para evitar a contaminação por gotículas de água que condensam na parte interna da tampa da placa. Seguido ao isolamento as placas foram incubadas em estufa a 28° C no escuro e o crescimento foi verificado diariamente.

Tabela 1 – Procedência e propriedades químicas dos solos do estado de Santa Catarina

(continua)

Município	pH (H ₂ O)	pH (KCl)	Ca*	Mg*	Al*	Na**	K**	P**	N**
1 Lauro Muller	5,24	4,98	3,84	0,237	0,33	8	293	1767,19	14,00
2 Orleans	6,53	5,77	10,2	0,770	0,25	17	400	2077,09	16,00
3 Siderópolis	5,59	5,01	2,52	0,119	0,14	3	131	2540,49	184,00
4 Nova Veneza	5,71	5,11	4,08	0,593	0,55	5	114	4154,18	8,00
5 Nova Veneza	6,41	5,88	3,24	3,674	0,10	26	562	5192,73	636,00
6 Braço do Norte	5,68	4,92	3,24	0,830	0,66	7	540	10603,1	15,00
7 Braço do Norte	5,42	4,70	1,32	0,000	0,50	0	163	7269,83	11,00
8 Santa Rosa de Lima	6,68	6,02	6,12	0,711	0,25	19	199	6774,66	25,00
9 Santa Rosa de Lima	5,40	4,12	6,24	0,830	0,10	14	620	15904,7	28,00
10 Anitápolis	5,24	4,05	9,48	0,593	0,35	36	406	17671,9	46,00
11 Anitápolis	6,53	6,03	6,48	0,770	0,25	5	134	19439,1	120,00
12 Angelina	5,59	4,36	6,48	0,296	0,25	0	77	21206,3	90,00
13 Angelina	5,71	4,64	2,16	0,198	0,30	0	91	13501,1	32,00
14 Leoberto Leal	5,12	4,56	2,16	0,652	0,20	0	309	14539,6	24,00
15 Leoberto Leal	6,01	3,79	8,76	0,711	1,93	0	226	15578,2	18,00
16 Imbuia	5,54	4,50	8,28	0,830	0,45	0	388	16616,7	23,00
17 Imbuia	4,67	4,53	11,28	0,889	0,99	0	323	30042,35	116,00
18 Ituporanga	5,37	5,00	7,56	1,007	0,50	0	233	15242,99	48,00
19 Aurora	4,22	3,67	7,44	0,830	0,25	3	191	19732,41	65,00
20 Ibirama	6,06	5,11	6,36	0,474	0,34	0	81	35343,94	18,00
21 Rodeio	6,53	5,02	9,96	0,830	0,40	6	155	37111,14	22,00
22 Benedito Novo	5,59	5,51	3,36	0,356	0,20	0	241	18630,32	10,00
23 Benedito Novo	6,41	6,23	3,72	0,533	0,15	0	140	19477,15	116,00
24 Rio dos Cedros	4,41	5,21	8,88	1,363	0,25	0	198	24925,18	438,00
25 Rio dos Cedros	6,52	5,11	13,92	1,126	0,33	10	288	44179,93	76,00
26 Rio dos Cedros	4,35	3,91	5,28	0,533	0,35	0	41	27002,23	190,00
27 Pomerode	5,67	5,21	11,64	1,481	0,28	39	168	28040,78	54,00
28 Jaraguá do Sul	6,23	5,54	10,08	0,711	0,15	0	189	49481,52	13,00
29 Campo Alegre	5,78	4,36	6,48	1,719	0,20	0	213	24558,15	27,00
30 Campo Alegre	5,43	5,10	11,4	2,252	0,25	0	299	26251,81	14,00
31 Canoinhas	5,51	5,12	12	2,193	0,41	0	185	27098,65	16,00
32 Canoinhas	4,99	3,79	12	2,963	0,40	0	336	58317,51	184,00
33 Canoinhas	5,16	4,28	9,48	0,770	0,30	0	211	28792,31	25,00
34 Canoinhas	5,60	5,21	19,32	1,541	0,55	0	788	29639,14	28,00
35 Irineópolis	5,48	4,85	17,76	1,304	0,80	51	251	37387,77	66,00
36 Canoinhas	6,23	5,72	7,68	1,363	0,45	4	572	31332,81	144,00
37 Major Vieira	5,87	5,44	9,84	0,593	0,95	24	602	32179,64	261,00
38 Major Vieira	6,19	5,87	16,8	1,304	0,10	30	3522	68920,79	95,00
39 Papanduva	6,36	6,00	19,32	0,474	0,15	21	341	41541,87	27,00
40 Monte Castelo	5,77	5,21	16,44	1,778	0,25	45	614	42580,44	15,00
41 Monte Castelo	4,99	4,45	3,72	0,415	0,34	0	269	35566,97	10,00
42 Monte Castelo	6,06	5,54	6,96	1,185	0,50	0	527	36413,83	33,00
43 Santa Cecília	6,52	4,79	6,72	0,415	0,25	4	90	37260,64	23,00
44 Santa Cecília	5,71	5,23	8,52	0,711	0,41	22	9720	79523,97	171,00
45 Ponte Alta do Norte	4,98	4,47	11,52	1,481	0,34	54	355	47773,11	15,00
46 Presidente Getúlio	5,77	5,22	7,2	0,652	0,40	0	71	48811,79	11,00
47 Presidente Getúlio	6,81	6,15	9,24	1,007	0,45	0	132	40647,97	48,00

Tabela 1 – Procedência e propriedades químicas dos solos do estado de Santa Catarina.

Tabela 1 – Procedimento e propriedades químicas dos solos de estados de Santa Catarina.									(conclusão)
Município	pH (H ₂ O)	pH (KCl)	Ca*	Mg*	Al*	Na**	K**	P**	N**
48 Dona Emma	6,35	5,80	8,64	0,889	0,15	0	414	41494,83	17,00
49 Vitor Meireles	5,90	5,45	7,32	0,711	0,80	4	154	42341,63	46,00
50 Vitor Meireles	6,21	5,68	9,36	0,593	0,10	0	100	43188,47	120,00
51 Salete	5,20	4,80	13,08	1,126	0,25	20	577	91894,35	21,00
52 Rio do Sul	6,11	5,66	8,28	0,948	0,41	0	64	44882,13	14,00

*Teores de Ca, Mg e Al no solo (cmolc dm⁻³)**Teores de Na, K, P e N no solo (mg dm⁻³)

A caracterização morfológica foi realizada após a obtenção de colônias, sendo que estas foram avaliadas aos três e aos sete dias quanto a: transparência (translúcida ou opaca), cor (branca ou rosa), tamanho da colônia (cm), formato da borda (lisa ou serrilhada), elevação (convexa ou côncava), forma e produção de muco (números de dias necessários para que a produção de muco escorresse pela placa). A partir do quinto dia de crescimento também foi observada a acidificação ou alcalinização do meio YMA contendo na sua fórmula o indicador de pH azul de bromotimol. Foi formada assim uma coleção de trabalho que passou ainda por um processo de certificação para verificar a reinfecção e formação dos nódulos pelas bactérias isoladas em feijoeiro.

O processo de certificação das bactérias isoladas foi desenvolvido em condições parcialmente controladas de casa de vegetação no Centro de Ciências Agroveterinárias CAV/UEDESC, Lages-SC, no ano de 2007.

O processo de certificação foi realizado em copos plásticos de 200ml desinfestados e perfurados no fundo para que não ocorresse acúmulo de água. O substrato utilizado foi uma mistura estéril de areia, vermiculita expandida e carvão mineral na proporção de (1:1:1). Como planta hospedeira foi utilizada o feijoeiro da variedade México 309. As sementes foram desinfestadas com álcool absoluto por 30 segundos e, em seguida, imersas em hipoclorito de sódio (2 %), por 2 minutos e lavadas 5 (cinco) vezes com água esterilizada. Foram colocadas 2 sementes em cada copo a uma profundidade de 1,5 cm. juntamente com o processo de semeadura foi realizada a inoculação das sementes com as bactérias isoladas. No quarto dia, após a emergência, foi realizado o desbaste, sendo deixada somente uma planta por copo. As plantas foram regadas diariamente com solução nutritiva livre de nitrogênio (solução de Norris) e 35 dias após a emergência realizou-se a coleta do experimento.

No momento da coleta a raiz foi destacada da parte aérea na proximidade do colo da planta e, das plantas onde se encontraram nódulos, foi realizado um novo isolamento de um nódulo por planta. Após o isolamento, as placas foram colocadas em estufa a 28° C e depois

de 5-7 dias de crescimento as placas foram retiradas da estufa e armazenadas dentro de containeres em câmara fria e seca. Esta armazenagem tem como objetivo a conservação das bactérias sem contaminação para que posteriormente seja realizada a análise molecular das mesmas.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos isolados das regiões Sul, Vale do Itajaí, Norte e Planalto Norte do estado de Santa Catarina (Figura 1).

De um total de 52 áreas amostradas, em 10 delas não se obteve isolado algum, no entanto nas 42 remanescentes foi obtido um total de 206 isolados. Todos os isolados apresentaram crescimento rápido, sendo possível realizar a caracterização morfofisiológica em três dias. Os grupos predominantes foram aqueles que apresentaram colônias de cor branca, transparência opaca em YMA, borda lisa, elevação cupular e produção moderada de muco (Tabela 3.2).

Tabela 2 - Morfologia das colônias e reação fisiológica de pH em meio YMA de rizóbios microssimbiontes de feijoeiro do estado de Santa Catarina. Caracterização realizada aos três dias de crescimento.

Cor	Transparência	Produção de Muco	Reação ao meio YMA	Número de isolados
Branca	Opaca	Abundante	Ácido	32
			Alcalino	3
			Neutro	4
		Moderada	Ácido	77
			Neutro	6
			Ácido	43
		Pouca	Alcalino	7
			Ácido	1
Rosa	Opaca	Pouca	Ácido	1
		Abundante	Ácido	3
		Moderada	Alcalino	1
			Ácido	25
			Ácido	4
		Total		206

Em relação à característica transparência todos os isolados apresentaram-se opacos com exceção de um único isolado que apresentou transparência translúcida. As colônias de coloração rosa, independente das demais características avaliadas, representavam 21% do

total das colônias obtidas (Figura 3.2), por outro lado somente as colônias brancas de transparência opaca e produção de muco moderada representam sozinhas 38% das colônias obtidas.

Os rizóbios encontrados nas áreas amostradas, dificilmente são oriundos de inoculação, uma vez que, não há registro do uso desta técnica pelos produtores, sugerindo provavelmente que estes rizóbios sejam nativos. Assim sendo, uma provável fonte de disseminação de rizóbio nas áreas cultivadas com feijoeiro, é a própria semente da planta que de acordo com PÉREZ-RAMÍREZ e colaboradores (1998) podem ser uma fonte infinita de células viáveis, facilitando assim o estabelecimento desta bactéria.

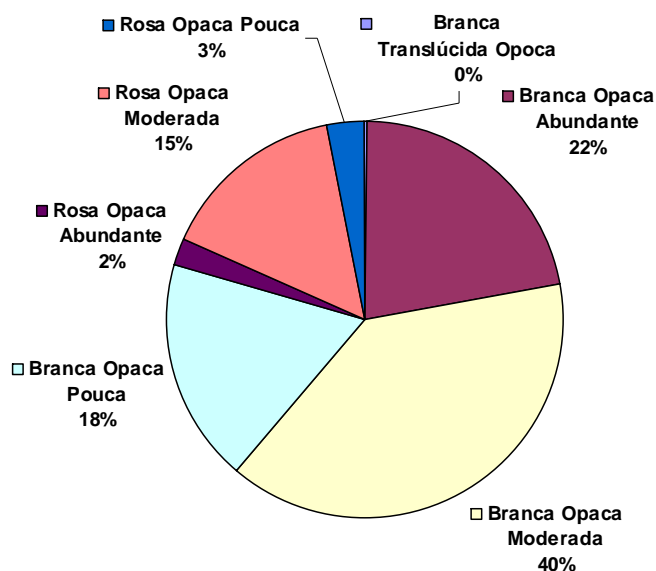


Figura 2 - Porcentagem dos tipos de colônias obtidas após isolamentos de Rizóbios isolados de nódulos de feijoeiros.

Em relação à distribuição das espécies de rizóbios do feijoeiro no mundo, tem sido argumentado que, nos locais onde a leguminosa foi introduzida pela região Mesoamericana, ou do norte da Argentina, as sementes devem ter carregado *R. etli*; posteriormente, a colonização européia e o comércio com Europa e África poderiam explicar a presença dessa espécie na Espanha, Senegal e Áustria, (PEREZ – RAMÍREZ et al, 1998). De modo semelhante, *R. tropici* parece ser nativa da região tropical da América do Sul (MARTINEZ-ROMERO et al., 1991) e, como a espécie também tem sido encontrada em algumas regiões da

África e diversos locais da França, também pode ter sido introduzida nesses locais por vias comerciais (ARMAGER et al, 1993, ARMAGER et al, 1994, ARMAGER et al, 1995 e ANYANGO et al, 1995).

Das 52 áreas coletadas, dez não apresentaram nenhum isolado, o que pode estar relacionado com os teores de N existentes no solo, pois nestas áreas os resultados indicam que houve uma aplicação de adubos nitrogenados nas culturas que antecederam ao feijão. E, como a nodulação ocorre em resposta às demandas nutricionais da planta, nas áreas em que a quantidade de N presente no solo já era suficiente para atender as demandas nutricionais da planta o processo de FBN pode ser afetado negativamente (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006 e STRALIOTO et al, 2006).

3.6 CONCLUSÕES

Foram encontradas colônias com diferentes características morfológicas, representando assim a diversidade das áreas coletadas; contudo houve uma predominância de colônias brancas e opacas.

Novos estudos de caracterização molecular devem ser realizados para contemplar as análises da diversidade de rizóbios no estado de Santa Catarina. Posteriormente devem ser avaliadas quais estirpes podem ser utilizadas de maneira comercial para a inoculação de feijoeiro.

4 CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DE ISOLADOS DE RIZÓBIO NODULANTES NO FEIJÃO COLETADOS EM SANTA CATARINA

4.1 RESUMO

O feijão é uma cultura de grande interesse social e econômico para o estado de Santa Catarina, por representar uma importante fonte de proteína e uma das principais culturas do pequeno agricultor catarinense. Apesar dessa importância as produtividades obtidas são baixas. Uma das alternativas economicamente viáveis para melhorar a produtividade é através da fixação de nitrogênio via associação com bactérias do gênero *rhizobium*. Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a eficiência simbiótica de estirpes de rizóbios isoladas em regiões produtoras de feijão do estado de Santa Catarina. Estirpes já caracterizadas morfo-geneticamente foram testadas no genótipo de feijão México 309, em condições de casa de vegetação. O experimento foi conduzido em vasos, o pH do solo foi corrigido para 6,0 e também houve a correção de P e K de acordo com a necessidade da cultura. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 5 repetições por tratamento, e a unidade experimental considerada foi vaso com uma planta. Em cada vaso foram colocadas três sementes previamente lavadas e desinfetadas. Os tratamentos constituíram-se de 55 estirpes nativas, uma estirpe comercial CIAT 899 (N biológico), um tratamento com adição de N e sem inoculação (T+) denominado de N mineral e um tratamento sem adição de N e sem inoculação (T-), perfazendo um total de 58 tratamentos. As plantas foram crescidas em vaso de 1,5kg com solo não estéril. Durante o período de desenvolvimento, as plantas foram regadas com água diariamente. Aos 20 dias após a emergência foi realizada a adubação nitrogenada no tratamento T+, e aos 35 após a emergência as plantas foram colhidas. A parte aérea, bem como as raízes e os nódulos foram acondicionados em sacos de papel e postos em estufa para determinação da matéria seca. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de correlação e teste de comparação por contrastes. O desempenho das estirpes nativas para as variáveis massa seca da parte aérea e para massa de nódulo secos frente a estirpe comercial CIAT 899 pode ser considerado um indicativo da existência de estirpes nativas tão ou mais

eficientes do que esta recomendada, portanto, com potencial para aproveitamento em estudos futuros.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*. FBN. *Rhizobium*.

4.2 SUMARRY

The bean is a culture of great social and economic interest for the state of Santa Catarina because it is an important protein source and one of the main cultures cultivated by the small producers in the state. Although this importance, the yields are low. One of the viable alternatives to increase the yields is the biological nitrogen fixation through the association with bacteria of the genus *Rhizobium*. This research aimed to evaluate the symbiotic efficiency of rhizobia strains isolated from bean production regions at Santa Catarina. Strains before characterized morphogenetically were tested in the bean genotype México 309 under greenhouse conditions. The trial was lead in pots. Soil pH was corrected to 6,0 and there was also P and K fertilization according to the culture needs. The experimental design was completely randomized with five replicates per treatment and each pot was considered an experimental unit. Three previously washed and disinfect seeds were put in each pot. The 58 treatments consisted of 55 native strains, the commercial strain CIAT 899 (biological N), one treatment with N addition without inoculation (T+) denominated mineral N, and one treatment without N and without inoculation (T-). Plants were grown in pots with 1,5 Kg of non sterile soil. During the growth period, plants were irrigated every day. At the 20 days after emergence, nitrogen fertilization in the T+ was done and at the 35 days after emergence the plants were harvested. The shoots, roots and nodules were put in paper bags and taken to the oven for dry matter determination. The obtained results were submitted to correlation analysis and comparison by contrasts.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*. BNF. *Rhizobium*.

4.3 INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum, espécie pertencente ao gênero *Phaseolus* e a família *Fabaceae*, tem a capacidade de formar associações simbióticas com bactérias do gênero *Rhizobium*, que

possuem a capacidade de assimilar, o N^2 atmosférico repassando para a planta (MORGANTE, 2006). Esta possibilidade de obtenção de nitrogênio via biológica sem a necessidade de aporte de nitrogênio obtido via industrial é a alternativa economicamente mais viável para a melhoria da produtividade da cultura, principalmente entre os pequenos produtores (HUNGRIA et al., 1997).

Embora já se tenha observado consideráveis quantidades de nitrogênio fixado no feijão via associação com rizóbio, a eficiência desse processo ainda deixa a desejar (PEREIRA & BRAIDOTI, 2001), porque esta simbiose nem sempre é muito eficaz, visto que o feijão é uma espécie muito promiscua, formando associação com estirpes de rizóbio de baixa capacidade competitiva e de baixa eficiência fixadora. Dessa forma o conhecimento da diversidade de estirpes nativas de rizóbios presentes em nossos solos pode beneficiar fortemente o processo de fixação biológica nitrogênio no feijoeiro. Além disso, a simbiose com o feijoeiro é bastante sensível a estresses ambientais, tais como temperaturas elevadas e baixa umidade do solo.

Existem, porém, alguns fatores que dificultam a escolha da espécie de rizóbio nodulante em feijão, já que há uma ampla distribuição geográfica de rizóbio e uma grande variabilidade genética da planta hospedeira. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a eficiência simbiótica de estirpes de rizóbios isoladas em regiões produtoras de feijão do estado de Santa Catarina.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi conduzido com o objetivo de testar estirpes de Rizóbios coletadas na safra de 2005/2006 e que já passaram pelo processo de caracterização molecular no CNPSoja - EMBRAPA. Estas estirpes fazem parte da primeira de três coletas de nódulos radiculares de feijoeiros de lavouras do estado de Santa Catarina.

As estirpes foram colocadas para crescer em erlenmeyers esterilizados com meio líquido com extrato de levedura e manitol (VINCENT, 1970). Após a inoculação do meio nos erlenmeyers, estes foram acondicionados em incubadora orbital por um período de 72 horas a 28° C e 90 rpm, sendo que a incubadora foi fechada com papel para que o ambiente permanecesse escuro.

De um total de 117 estirpes, neste primeiro ensaio 55 foram testadas. O critério para a seleção destas 55 estirpes foi a numeração delas de acordo com a caracterização genética. Desta forma, o experimento foi composto com os seguintes tratamentos: 55 estirpes nativas, 1

estirpe comercial - CIAT 899 (fornecida pela FEPAGRO), (N biológico), um tratamento sem adição de N e sem inoculação (T-) e um tratamento com adição de N e sem inoculação (T+), denominado de N mineral, totalizando assim 58 tratamentos. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 5 repetições por tratamento, perfazendo um total de 290 unidades amostrais. Como planta teste utilizou-se a variedade México 309 por apresentar abundante nodulação. As plantas foram cultivadas em vasos obtidos pelo corte de garrafas pet, com capacidade de 1,5 kg, cortadas no quarto superior e furadas na base para que houvesse a correta drenagem da água utilizada na irrigação. Antes de completados com solo, foi realizada a lavagem dos vasos com água e detergente e também a desinfestação com álcool.

Os vasos foram completados com solo não esterilizado, classificado como Cambissolo Húmico textura média seco ao ar. O solo teve pH corrigido para 6,0 e a adubação de P e K foi corrigida para $75 \text{ kg ha}^{-1} \text{ P}_2\text{O}_5$ e $70 \text{ kg ha}^{-1} \text{ K}_2\text{O}$, conforme a recomendação técnica para a cultura do feijoeiro (COMISSAO DE QUIMICA E FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC, 2004). Como corretivo de acidez foi utilizado calcário Filler e como fonte de fósforo e potássio foram utilizados os fertilizantes superfosfato triplo e cloreto de potássio, respectivamente.

Previamente à semeadura, as sementes foram desinfestadas, com álcool absoluto por 30 segundos e, em seguida, imersas em hipoclorito de sódio (2 %) por 2 minutos e lavadas 5 (cinco) vezes com água esterilizada (VINCENT, 1970).

Após a lavagem, três sementes foram postas para germinar em cada vaso a uma profundidade aproximada de 1,5cm. A inoculação dos isolados de rizóbio testados foi feita sobre a semente (1,0ml de meio YM contendo os respectivos rizóbios) antes da cobertura das sementes com o próprio solo. No 4º dia após a emergência, foi realizado o desbaste deixando-se somente uma planta por vaso.

No período de desenvolvimento das plantas foram disponibilizadas todas as condições necessárias para o crescimento das mesmas. Durante a primeira semana foram fornecidos 50ml de água para cada planta por dia, e a partir da segunda semana foram administrados 100ml de água para cada planta diariamente. Aos 20 dias após a emergência foi realizada a adubação nitrogenada do tratamento T+ (60 kg N ha^{-1}), sendo utilizada uréia como fonte de Nitrogênio.

A colheita das plantas ocorreu aos 35 dias após a emergência, momento este, em que as raízes foram separadas cuidadosamente da parte aérea, através de um corte realizado na região do colo da planta. As raízes foram lavadas e os nódulos destacados e contados. Os

nódulos, raízes e parte aérea foram acondicionados em sacos de papel e secos em estufa a 65°C por um período de 72 horas, para determinação da matéria seca.

Após a pesagem, a massa da parte aérea seca foi moída e submetida a digestão úmida para a determinação do teor de N na parte aérea (MALAVOLTA et al., 1989). O nitrogênio total acumulado da parte aérea foi obtido pela multiplicação do teor de N dos tecidos da parte aérea pela matéria seca da parte aérea.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as variáveis cujos resultados apresentaram significância a 95% de confiabilidade, tiveram as medias comparadas por contrastes.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de correlação linear e simples obtidos para número de nódulos, massa seca de nódulos e massa seca da parte aérea nos mostram que todos apresentam correlação significativa e positiva com matéria seca da parte aérea, exceto número de nódulos que apresentou correlação não significativa (Tabela 3).

Tabela 3 - Correlação ente número de nódulos, massa nódulos e massa da parte aérea e feijoeiro inoculado com diferentes estirpes após 35 dias de crescimento em casa de vegetação.

	Número Nódulos	Massa Nódulos Secos	Massa Parte Aérea Seca
Número Nódulos	-----	0.63246 (<0.001)	N.S.
Massa Nódulos Secos	0.63246 (<0.001)	-----	0.38998 (<0.001)
Massa Parte Aérea Seca	N.S.	0.38998 (<0.001)	-----

A que se considerar que normalmente os resultados de número de nódulos e massa de nódulos secos apresentam correlação variável com rendimento de matéria seca e acúmulo de N na parte aérea. A avaliação dos resultados obtidos nesse trabalho deve levar em consideração a promiscuidade do feijão que tem uma grande facilidade em formar associações simbióticas com espécies nativas, o que resulta numa dificuldade de introdução, estabelecimento e desenvolvimento da simbiose com as estirpes desejadas, constituindo assim, um dos fatores mais limitantes à máxima fixação biológica de nitrogênio (VARGAS & HUNGRIA, 1997 e MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Este trabalho foi realizado num solo coletado em área com vegetação de campo nativo sem registro de uso de inoculantes

biológicos, então isso pode ter sido um fator dificultador de nodulação/fixação das estirpes testadas.

Os resultados referentes à Massa da parte aérea seca, N total acumulado na parte aérea, Massa da raiz seca, Massa de nódulos secos e Número de nódulos e massa da parte aérea seca encontram-se na Tabela 4. Em relação à massa seca de raiz não foi verificado diferenças estatísticas através do estudo de contrastes C1, C2 e C3 entre os tratamentos utilizados.

O contraste C3 (Estirpes Nativas x CIAT 899) mostra que a utilização das estirpes nativas influenciou significativamente os resultados de massa da parte aérea seca e massa de nódulos secos quando comparadas com a estirpe comercial CIAT 899.

O desempenho da estirpe comercial CIAT 899 na produção de massa da parte aérea seca e massa de nódulos secos em relação às demais estirpes avaliadas, pode ser considerado um indicativo da existência de estirpes nativas tão ou mais eficientes do que esta recomendada, portanto, com potencial para aproveitamento em estudos futuros.

Para as variáveis N total acumulado na parte aérea e Número de nódulos observa-se através do C2 (N biológico x T+) que a utilização do tratamento N biológico proporcionou um incremento nestas variáveis quando comparado com o tratamento T+.

A existência da simbiose nem sempre garante uma alta eficiência na fixação biológica de nitrogênio, já que, em alguns casos há estirpes nativas mais competitivas que as comerciais, porém com menor eficiência na fixação de nitrogênio. Os resultados obtidos neste trabalho revelam que as estirpes nativas encontradas no estado de Santa Catarina quando comparadas com a estirpe comercial CIAT 899, mostraram grande capacidade de competitividade, que resultou em resultados superiores aos obtidos pela estirpe comercial

Outro resultado importante e que deve ser levado em consideração para novos estudos é a capacidade que algumas estirpes nativas apresentaram em acumular maior quantidade de N na parte aérea quando comparadas com o tratamento N mineral. Para a planta de feijão, o N mineral disponível no solo muitas vezes é mais fácil de ser assimilado e menos oneroso do que o N disponível pela da fixação biológica, porém a quantidade presente no solo nem sempre é suficiente para o desenvolvimento da planta e para atingir grandes produtividades. Além disso, a aplicação de N mineral aumenta os custos de produção o que acarreta em maiores gastos com a cultura. Mesmo estando disponível mais facilmente que o N biológico, neste trabalho a utilização de N mineral proporcionou resultados inferiores aos encontrados com a utilização de N biológico, demonstrando assim mais uma vez que estirpes nativas e comerciais podem e devem ser utilizadas como uma fonte de fornecimento de N para a cultura do feijão.

Tabela 4 – Massa da parte aérea seca, N total acumulado, massa da raiz seca, massa de nódulos secos e número de nódulos dos 15 genótipos de feijoeiros do BAF/CAV.

Contrastes	Massa Parte Aérea Seca		N Total Acumulado		Massa Raiz Seca		Massa Nódulos Secos		Número Nódulos	
	Estimativa	Pr>t	Estimativa	Pr>t	Estimativa	Pr>t	Estimativa	Pr>t	Estimativa	Pr>t
C1*	-3,5688	0,6400	19,4340	0,1476	3,2520	0,1987	0,1862	0,7128	457,5000	0,6231
C2	-5,1173	0,4950	39,9540	0,0026	1,0420	0,6747	0,4617	0,3532	1730,5000	0,0168
C3	16,0973	0,295	8,0340	0,5344	2,2553	0,3554	1,5350	0,0018	825,1666	0,3606
CV %	24,72		12,88		22,53		46,58		27,02	

*C1 = Todos Tratamentos X T+ T-; C2 = N biológico x T+; C3 = Estirpes Nativas x CIAT 899,

4.6 CONCLUSÕES

O desempenho das estirpes nativas para as variáveis massa seca da parte aérea e para massa de nódulo secos frente a estirpe comercial CIAT 899 pode ser considerado um indicativo da existência de estirpes nativas tão ou mais eficientes do que esta recomendada, portanto, com potencial para aproveitamento em estudos futuros.

A utilização de N biológico apresentou resultados superiores ao T+ (N mineral) na variável N total acumulado, indicando assim que FBN foi mais eficiente que a adubação mineral nesta variável.

5 CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO POR ACESSOS CRIoulos DO BAF - CAV INOCULADOS COM *Rhizobium tropici* SEMIA 4088

5.1 RESUMO

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de identificar genótipos de feijoeiro crioulo com boa capacidade de fixação biológica de nitrogênio. Desta forma quinze genótipos de feijão de importância agrônômica, do Banco Ativo de Feijão (BAF) do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina – CAV - UDESC, Lages – SC foram testados quanto à nodulação produção de massa aérea e fixação de nitrogênio a partir da inoculação com *Rhizobium tropici* e adubação nitrogenada, sob condições de telado. O delineamento experimental adotado foi o de Blocos Inteiramente Casualizados, com três tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos consistiram de: (T₁) Testemunha sem inoculação e sem Nitrogênio (T₂), Inoculação com *Rhizobium* e sem Nitrogênio; (T₃) Adubação Nitrogenada a base de uréia, num esquema de arranjo de tratamentos fatorial. A colheita das plantas foi realizada aos 35 dias após emergência (DAE), separando-se parte aérea e raiz, secadas em estufa a 65° C até massa constante e seus nódulos após separados foram contados. Da parte aérea foi determinada massa seca e submetida a digestão úmica para quantificar N acumulado. As raízes foram pesadas e os dados de nodulação (número de nódulos por planta, massa seca nodular e média de nódulos) assim como massa seca da parte aérea e raiz foram submetidos à análise de variância e ao teste de contrastes. Como resultado houve uma interação significativa entre genótipos e os tratamentos testemunha (s/ inoculação e s/ Nitrogênio) e inoculado. As variáveis massa da parte aérea seca e nitrogênio total acumulado na parte aérea apresentaram interação entre genótipo e fonte de nitrogênio, ou seja, os genótipos respondem de maneira diferente frente à adubação nitrogenada mineral e nitrogênio biológico.

Palavras-chave: Feijão. Rizóbio. Nodulação.

5.2 SUMMARY

This work was realized with the objective of identifying creoles bean genotypes with good capacity of biological nitrogen fixation. Fifteen agronomical important genotypes, from the Banco Ativo de Feijão (BAF), of the Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina – CAV - UDESC, Lages – SC were tested about nodulation, shoot mass production and nitrogen fixation, considering the inoculation with *Rhizobium tropici* and nitrogen fertilization, under covered greenhouse. The experimental design was completely randomized blocks with three treatments and four replicates. The treatments were: (T₁) Control without inoculation and nitrogen; (T₂), inoculation with *Rhizobium* and without nitrogen; (T₃) Nitrogen fertilization with urea, under a factorial design. Plants were harvested 35 days after emergence (DAE) separating the root from the shoot, dried in the oven at 65 °C up to constant mass e their nodules were counted. From the shoots were determined dry mass and then the N accumulated was accounted by wet digestion. The roots were weighed and the nodulation data (number of nodules per plant, nodule dry mass and nodule mean) as well as shoot and root dry mass were submitted to variance analysis and contrast test. The results showed a significant interaction between genotypes and the inoculated treatments and the control (without inoculation and without nitrogen).

Keywords: Common bean. Rhizobia. Nodules.

5.3 INTRODUÇÃO

No Brasil, o feijão é frequentemente cultivado em áreas ácidas, de baixa fertilidade e como fonte de subsistência para a agricultura familiar, condições estas que agem negativamente sobre a mineralização da matéria orgânica e a produtividade (DIAS-ROMEY et al., 1970; MALAVOLTA, 1972). Para POLIDORO et al., (1998) um dos fatores mais limitantes à produtividade do feijoeiro é a baixa disponibilidade de nutrientes no solo, sobretudo fósforo e nitrogênio. Apesar disso, o Brasil, nas ultimas duas décadas vem se concretizando como o maior produtor mundial de feijão do gênero *Phaseolus*, com área de aproximadamente 5,0 milhões e hectares correspondendo a 3,0 milhões de toneladas ZUPPI et al., 2005; EMBRAPA 2003; DOURADO NETO & FANCELLI, 1999).

A utilização de adubos nitrogenados tem trazido boas respostas para o crescimento e desenvolvimento da planta de feijão. Entretanto, o feijoeiro é uma leguminosa conhecida como deficitária na obtenção de nitrogênio via fixação biológica de N. embora a adubação nitrogenada seja recomendada para essa cultura, alguns autores citam que ela não é economicamente viável em razão de seus custos e do baixo rendimento (VARGAS et al., 1991).

Uma das formas de fornecimento de N para o feijoeiro é através da FBN (fixação biológica de nitrogênio). Este processo é realizado por algumas bactérias específicas (*Bradirhizobium*, *Azorhizobium* e *Rhizobium*), denominadas genericamente de rizóbios (JORDAN, 1984). Esta simbiose rizóbio-hospedeiro depende da compatibilidade genética de ambos, sendo que a planta hospedeira desempenha papel crucial nos estágios iniciais de nodulação (PEREIRA & BLISS, 1987). Há, entretanto, vários fatores relacionados à planta, bactéria e ao solo que contribuem para uma baixa FBN. Em relação ao feijoeiro, a variabilidade entre cultivares de feijoeiro quanto à habilidade de FBN foi detectada desde os primeiros estudos conduzidos no Brasil (DÖBEREINER & RUSCHEL, 1961; FRANCO & DÖBEREINER, 1967). De acordo com HUNGRIA (1997) existe uma grande variabilidade entre cultivares, tanto em relação à FBN, como na habilidade de translocar o N para os grãos. Além disso fatores como o ciclo curto da cultura do feijoeiro, são apontado como um dos principais fatores limitantes à fixação biológica de N₂.

Neste contexto, o estudo sobre a resposta de diferentes cultivares de feijoeiro a adubação nitrogenada mineral e a fixação biológica de nitrogênio vem de encontro ao desenvolvimento de estratégias que possam atender a demanda de diferentes setores da sociedade, quanto à geração de conhecimento e desenvolvimento de tecnologias para maximizar a contribuição da FBN na cultura do feijoeiro e, conseqüentemente, elevar os níveis de produtividade média da cultura, sem onerar o custo de produção e mantendo a sustentabilidade ambiental.

Assim sendo neste trabalho, foram testados 15 genótipos de feijoeiros em ambiente com telado, quanto à eficiência agronômica, associados com inoculante comercial a base de turfa contendo *Rhizobium tropici*, com o objetivo final de identificar possíveis genótipos crioulos do BAF/CAV com boa capacidade de nodulação e fixação biológica de nitrogênio.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi realizado em telado sendo que foi composto de 14 acessos do BAF/CAV que foram testados quanto a eficiência agrônômica, associados com inoculante comercial a base de turfa contendo *Rhizobium tropici*. Além dos acessos do BAF/CAV, foi utilizado o genótipo comercial Pérola como testemunha por apresentar características de boa nodulação; desta forma foram testados 15 genótipos de feijão. Dentre 112 acessos disponíveis do BAF/CAV, estes 15 foram selecionados por apresentarem melhores características comerciais quanto a qualidade tecnológica e pela qualidade nutricional dos grãos e também por já estarem sendo pesquisados por outros profissionais.

Na Tabela 5 é apresentada a caracterização quanto a origem do acesso, o tipo de faseolina, peso (g) de 100 sementes, proteína total (g.kg^{-1}) e proteína solúvel (g.kg^{-1}) dos 15 genótipos testados. O ensaio foi composto de 3 tratamentos: T1 sem adição de Inoculante e sem adição de Nitrogênio, T2 (N biológico) com adição de Inoculante turfoso e sem adição Nitrogênio e T3 (N mineral) sem adição de Inoculante e com adição de Nitrogênio mineral na dose recomendada. Para cada tratamento foram utilizadas 4 repetições perfazendo um total de 180 unidades amostrais por ensaio. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado.

As sementes de cada acesso foram previamente desinfestadas, com álcool absoluto por 30 segundos e, em seguida, imersas em hipoclorito de sódio (2 %), por 2 minutos e lavadas 5 (cinco) vezes com água esterilizada. Para os tratamentos 1 e 3 não houve a inoculação das sementes, então logo após a desinfestação das mesmas, procedeu-se a semeadura. Para o tratamento 2, após a desinfestação as sementes foram inoculadas com inoculante comercial a base de turfa, na dose de 300g inoculante/50 kg sementes. Independente do tratamento utilizado duas sementes foram postas para germinar em cada vaso a uma profundidade de aproximadamente 1,5cm.

As plantas foram cultivadas em vasos com capacidade de 3,0 L de solo. Estes vasos foram completados com solo não esterilizado, classificado como Cambissolo Húmico, textura média, seco ao ar. Os atributos químicos do solo utilizado no experimento apresentaram os seguintes resultados: pH (H_2O) = 4,9; pH (SMP) 5,01; K = 48,6 mg dm^{-3} ; H+Al = 49,12 cmolc dm^{-3} ; Al = 2,00 cmolc dm^{-3} ; C total = 2,32 m m^{-1} ; M.O = 3,39%; P = 15,4 mg L; Ca = 5,1ppm; Mg = 0,63 ppm.

Tabela 5 - Identificação, origem do acesso, tipo de faseolina, peso de 100 sementes, proteína total e solúvel do genótipos do BAF utilizados.

BAF	Origem da Coleção	Tipo de Faseolina	Peso de 100 sementes (g)	Proteína Total (g.kg ⁻¹)	Proteína Solúvel (g.kg ⁻¹)
02	Pelotas (RS)	S	22,70	229,69	83,02
03	Palmitos	T	29,14	289,84	89,47
04	Lages	T	40,81	295,31	98,39
07	Lages	S	17,61	295,31	88,47
14	Piracicaba (SP)	S	21,10	278,91	85,22
19	Palmitos	S	20,97	278,91	98,63
42	Capão Alto	S	17,32	267,97	92,73
46	Lages	T	39,19	218,75	98,49
50	Lebon Régis	S	20,45	246,09	90,94
69	Bocaína do Sul	S	51,51	267,97	94,37
74	Irineópolis	T	18,01	295,31	87,72
75	Formigueiro (RS)	S	20,37	273,44	85,77
77	Formigueiro (RS)	S	16,76	282,19	100,23
95	Pinheiro Machado (RS)	S	18,36	267,97	80,35
111	Lages	S	21,07	311,72	98,49

BAF = Número da coleção dos genótipos do banco ativo de feijão do CAV-UDESC;

Genótipos comerciais BAFs: 111 = Pérola.

FONTE: Pereira et al., 2008.

O solo teve o pH elevado a 6,0 pela adição de calcário Filler e os nutrientes P e K foram fornecidos pela adição de 75 Kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 70 Kg ha⁻¹ de K₂O na forma de Superfosfato triplo e Cloreto de Potássio, respectivamente, conforme a recomendação técnica para a cultura do feijoeiro (COMISSÃO DE QUIMICA E FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC, 2004). O desenvolvimento das plantas ocorreu sobre as condições de telado.

No 4º dia após a emergência foi realizado o desbaste deixando-se somente uma planta por vaso. A colheita foi realizada aos 35 dias após a emergência, sendo que, as raízes foram separadas cuidadosamente da parte aérea, através de um corte realizado próximo ao colo da planta. As raízes então foram lavadas e os nódulos destacados e contados. Os nódulos, raízes e parte aérea foram acondicionados em sacos de papel e secos em estufa a 65°C por um período de 72 horas. Após este período houve a determinação da massa seca do material.

Após a pesagem da parte aérea o material foi moído e submetido a digestão úmida para a determinação do teor de N na parte aérea (MALAVOLTA et al., 1989). O nitrogênio total da parte aérea foi obtido pela multiplicação do teor de N dos tecidos da parte aérea pela matéria seca da parte aérea.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as variáveis cujos resultados apresentaram significância a 95% de confiabilidade, tiveram as médias comparadas pelo teste SNK e por contrastes. Sendo que para Contraste 1 (C1) foi realizada uma comparação das médias do Tratamento 1 [(T1) – Sem adição de inoculante e sem adição de nitrogênio] X Tratamento 2 [(T2) – Com adição de inoculante e sem adição de nitrogênio] e Tratamento 3 [(T3) – sem adição de inoculante e com adição de nitrogênio mineral]. Para o Contraste 2 (C2) foi realizada uma comparação das médias entre os tratamentos T2 (Com adição de inoculante e sem adição de nitrogênio) X T3 (sem adição de inoculante e com adição de nitrogênio mineral).

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância não detectou diferença entre as variáveis massa da parte aérea seca, massa da raiz seca e nitrogênio total acumulado, entretanto verificou-se interação entre genótipo X fonte de nitrogênio (mineral e biológica). Dessa forma, procedeu-se o desdobramento da interação através dos contrastes C1: T1 X T2 T3 e C2: T2 X T3 para massa da parte aérea seca e para nitrogênio acumulado dentro de cada genótipo estudado.

Na Tabela 6 são apresentados os resultados da massa da parte aérea seca, massa da raiz seca, número de nódulos e nitrogênio total acumulado, comparados pelo teste de médias SNK. Para número de nódulos encontrou-se diferença estatística sendo que o genótipo 3 e 4 (124,4 e 146,0) respectivamente apresentaram as maiores médias, diferindo significativamente dos genótipos 2 e 77 (45,5 e 55,0) respectivamente (Tabela 6). VENTURINI et al., (2004) verificaram que o número de nódulos sofreu um baixo incremento com a inoculação das sementes de feijão em relação à utilização de adubação mineral. Estes dados ajudam a comprovar que a prática da inoculação pode contribuir para a redução dos custos de produção e também para um bom processo de fixação biológica de nitrogênio.

Segundo FERREIRA et al. (2002) o maior número de nódulos (capacidade nodulante) tem sido um dos principais fatores considerados em programas de seleção, buscando aumento na eficiência de fixação de nitrogênio. Entretanto, segundo HERRIDGE & DANSO (1995), o número de nódulo e tamanho não são considerados como medidas da eficiência da funcionalidade dos nódulos.

Tabela 6 – Valores médios da massa da parte aérea seca, massa da raiz seca, número de nódulos e nitrogênio total acumulado dos genótipos de feijoeiros testados. Lages, 2008.

Genótipos	Massa da parte aérea seca (g)	Massa da raiz seca (g)	Número de nódulos	Nitrogênio total acumulado (mg parcela)
2	4,58a*	0,73a	45,5b	144,77a
3	5,30a	0,77a	124,4a	145,31a
4	4,18a	0,79a	146,0a	125,08a
7	5,87a	0,87a	65,5ab	178,86a
14	5,87a	0,87a	96,25ab	180,21a
19	5,27a	0,85a	70,0ab	161,74a
42	5,25a	1,00a	38,75ab	160,65a
46	7,08a	0,86a	108,5ab	212,59a
50	4,37a	0,81a	95,5ab	136,62a
69	5,28a	0,76a	75,25ab	150,69a
74	4,71a	0,79a	33,25ab	148,50a
75	4,28a	0,86a	81,25ab	123,88a
77	3,63a	0,64a	55,0b	109,53a
95	5,01a	0,70a	114,25ab	147,91 ^a
111	3,33a	0,64a	107,0ab	96,82 ^a
CV (%)	53,66	36,29	68,92	55,47

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste SNK ($P > 0,05$)

Pode-se esperar que o genótipo 111 (Pérola) por ser uma variedade comercial apresentasse respostas diferenciadas e melhores para a massa da parte aérea seca e N acumulado, o que não se verificou. Os resultados obtidos podem tanto indicar algum problema particularizado com o genótipo durante o período da experimentação quanto um bom potencial dos genótipos do BAF/CAV testado.

Os resultados dos contrastes realizados para a massa da parte aérea seca são apresentados na Tabela 7. O contraste C1 mostrou que para os genótipos 2 e 75, a estimativa (-7,37775 e -7,347) respectivamente e os valores de ($Pr > t$) (0,02343 e 0,02493) respectivamente, dos tratamentos T2 e T3 foi maior do que a média do T1, indicando que estes dois genótipos têm melhores perspectivas de respostas a adubação nitrogenada ou fixação biológica de N. Todos os demais genótipos apresentaram resultados iguais neste contraste.

O contraste C2 que testou T2 X T3 revelou que o genótipo 4 apresentou melhor desempenho com a fonte mineral de nitrogênio em relação à fonte biológica na produção de matéria de parte aérea seca (estimativa = -5,839 e $Pr > t = 0,002225$). O contrario foi verificado no genótipo 14, quando a fonte biológica de nitrogênio mostrou-se mais eficiente que fonte mineral (estimativa = 4,8165 e $Pr > t = 0,3732$). No genótipo 50, a fonte biológica de

nitrogênio esteve muito próxima de ser significativamente melhor que a fonte mineral ($Pr > t = 0,05871$) motivo pelo qual entendemos que este genótipo deve ser melhor estudado.

O genótipo 4 pode ter apresentado melhores resultados com a utilização de N mineral, devido a maior disponibilidade desse nutriente quando fornecido diretamente no solo. FERNANDES et al., (2005) verificaram que a aplicação de adubo nitrogenado no feijão proporcionou uma maior disponibilidade desse nutriente no solo o que por sua vez facilitou a absorção desse nutriente pelas raízes e consequentemente aumentou a produção de matéria seca.

A diferença obtida na quantidade de matéria seca produzida entre o tratamento controle (T1) e os tratamentos T2 e T3 pode estar relacionada com a eficiência das fontes de inoculo presentes no solo, ou seja, as estirpes nativas que atuaram no T1 podem ter uma boa capacidade de fixação de N atmosférico, porém, geralmente as estirpes nativas são menos eficientes que as comerciais. HARA & OLIVEIRA (2005) concluíram que a baixa eficiência das fontes de inóculo em proporcionar aumento na matéria seca pode estar relacionada com a baixa capacidade de fixação do N atmosférico da população de rizóbio nativa do solo.

SOARES et al., (2005), verificaram que nem sempre as estirpes recomendadas são as mais eficientes na produção de matéria seca e na fixação de nitrogênio. Em muitos casos a alta produção de matéria seca e a alta quantidade de N fixado está diretamente relacionado com a planta e não somente com a bactéria.

Os resultados dos contrastes realizados para o N acumulado na parte aérea estão apresentados na Tabela 8. O C1 (T1 X T2 T3) revelou que novamente para os genótipos 2 (estimativa = -243,8798 e $Pr > t = 0,01651$) e 75 (estimativa = -200,729 e $Pr > t = 0,0476$) a utilização dos tratamentos T2 e T3 promoveu maiores quantidades de N acumulado quando comparados com o tratamento controle (T1).

Para os genótipos que não apresentaram diferenças significativas no processo de fixação o estabelecimento de simbiose com as estirpes nativas (T1) foram suficientes para atender parte da demanda da planta por nitrogênio.

Os valores do C1 (T1 X T2 T3) obtidos para o genótipo 4 ($Pr > t = 0,06044$) quanto a massa da parte aérea seca podem indicar que, a utilização do N mineral e biológico mesmo não tendo atingido valores significativos em relação à testemunha o valor do contraste obtido indica que o genótipo 4 tem um potencial para ser novamente submetido a testes. Outro dado relevante é que o genótipo 4 apresenta um ciclo de vida curto o que favorece a resposta a adubação mineral e não a biológica.

Tabela 7 – Massa da parte aérea seca de feijoeiro para diferentes genótipos com e sem inoculação e adição de nitrogênio mineral. Lages, 2008.

Genótipo	Contraste	Estimativa	Valor de Pr>t
2	C1 = T1* X T2 T3	-7,37775	0,02434
	C2 = T2 X T3	-2,84075	0,1309
3	C1 = T1 X T2 T3	-3,91275	0,2288
	C2 = T2 X T3	1,88125	0,3158
4	C1 = T1 X T2 T3	-5,874	0,07189
	C2 = T2 X T3	-5,839	0,002225
7	C1 = T1 X T2 T3	-5,883917	0,0792
	C2 = T2 X T3	-0,2670833	0,8949
14	C1 = T1 X T2 T3	2,8435	0,4173
	C2 = T2 X T3	4,8165	0,03732
19	C1 = T1 X T2 T3	-1,467	0,651
	C2 = T2 X T3	-1,984	0,2902
42	C1 = T1 X T2 T3	2,98675	0,3577
	C2 = T2 X T3	-2,36425	0,208
46	C1 = T1 X T2 T3	0,5734167	0,8633
	C2 = T2 X T3	-3,405417	0,09398
50	C1 = T1 X T2 T3	-1,485	0,647
	C2 = T2 X T3	3,5645	0,05871
69	C1 = T1 X T2 T3	2,0695	0,5235
	C2 = T2 X T3	-0,4795	0,7978
74	C1 = T1 X T2 T3	-2,387583	0,515
	C2 = T2 X T3	-2,05425	0,3105
75	C1 = T1 X T2 T3	-7,347	0,02493
	C2 = T2 X T3	1,987	0,2895
77	C1 = T1 X T2 T3	-5,58425	0,08687
	C2 = T2 X T3	-1,95375	0,2976
95	C1 = T1 X T2 T3	-4,624	0,1667
	C2 = T2 X T3	1,476	0,4657
111	C1 = T1 X T2 T3	-0,67025	0,8516
	C2 = T2 X T3	0,68425	0,7147

* T1 sem adição de Inoculante e sem adição de Nitrogênio, T2 (N biológico) com adição de Inoculante turfoso e sem adição Nitrogênio e T3 (N mineral) sem adição de Inoculante e com adição de Nitrogênio mineral na dose recomendada.

O C2 mostra que, os genótipos 4, 14 e 50 foram os que apresentaram resultados significativamente diferentes entre os tratamentos T2 e T3. Para o genótipo 4 (estimativa = 159,1843 e Pr>t = 0,006905) utilização de N mineral (T3) propiciou um maior incremento na quantidade de N total acumulado do que a utilização de N biológico (T2) (Tabela 8). TSAI et al., (1993) verificaram que quando o feijoeiro recebeu um balanço adequado de nutrientes, não houve inibição, mas sim um efeito sinérgico da adubação nitrogenada sobre a nodulação e a fixação de N.

Tabela 8 – Nitrogênio acumulado na parte aérea para diferentes genótipos com e sem inoculação e adição de nitrogênio mineral, Lages, 2008.

Genótipo	Contraste	Estimativa	Valor de Pr>t
2	C1 = T1* X T2 T3	-243,8798	0,01651
	C2 = T2 X T3	-87,68075	0,1326
3	C1 = T1 X T2 T3	-158,0903	0,1176
	C2 = T2 X T3	87,07125	0,1352
4	C1 = T1 X T2 T3	-190,0948	0,06044
	C2 = T2 X T3	-159,1843	0,006905
7	C1 = T1 X T2 T3	-173,0666	0,09562
	C2 = T2 X T3	5,347083	0,932
14	C1 = T1 X T2 T3	53,53925	0,622
	C2 = T2 X T3	163,1233	0,02317
19	C1 = T1 X T2 T3	-79,605	0,4289
	C2 = T2 X T3	-74,929	0,1981
42	C1 = T1 X T2 T3	61,64625	0,5399
	C2 = T2 X T3	-89,54725	0,1246
46	C1 = T1 X T2 T3	54,53958	0,5975
	C2 = T2 X T3	-81,15108	0,1969
50	C1 = T1 X T2 T3	-80,40575	0,4242
	C2 = T2 X T3	128,4868	0,02837
69	C1 = T1 X T2 T3	84,717	0,3999
	C2 = T2 X T3	-5,0255	0,931
74	C1 = T1 X T2 T3	-66,61583	0,5578
	C2 = T2 X T3	-63,13583	0,3147
75	C1 = T1 X T2 T3	-200,729	0,0476
	C2 = T2 X T3	79,375	0,173
77	C1 = T1 X T2 T3	-155,675	0,1232
	C2 = T2 X T3	-43,7455	0,4514
95	C1 = T1 X T2 T3	-148,4885	0,1521
	C2 = T2 X T3	82,227	0,1911
111	C1 = T1 X T2 T3	-55,59417	0,617
	C2 = T2 X T3	10,608	0,8549

* T1 sem adição de Inoculante e sem adição de Nitrogênio, T2 (N biológico) com adição de Inoculante turfoso e sem adição Nitrogênio e T3 (N mineral) sem adição de Inoculante e com adição de Nitrogênio mineral na dose recomendada.

Para os genótipos 14 (estimativa = 163,1233 e Pr>t= 0,02317) e 50 (estimativa = 128,4868 e Pr>t = 0,02837) a utilização de N biológico (T2) proporcionou uma maior quantidade de N total acumulado do que a utilização de N mineral (T3), Esta maior quantidade de N acumulado na parte aérea com a utilização de rizóbio (T2) mostra que o processo de fixação biológica de nitrogênio entre esses genótipos e a bactéria foi eficiente, porém novos estudos devem ser feitos para comprovar definitivamente esta maior eficiência.

ENDO (1986) verificou maiores teores do nutriente nas folhas, resultantes da aplicação de N em cobertura, quando comparado com a testemunha, N no plantio, N parcelado, e inoculação associada ao nitrogênio no plantio. Por outro lado, CARVALHO (1994) não encontrou efeito significativo no N acumulado quando testou nodulação de sementes e diferentes modos e épocas de aplicação de nitrogênio.

BINOTTI *et al.*, (2007) em estudo realizado durante três anos em três cultivares de feijão verificaram que não houve efeito do N aplicado no teor de N do feijoeiro. Porém estes mesmo autores dizem que quando comparada com a testemunha sem N a adubação nitrogenada aumenta a produtividade em 62%.

Quanto aos teores foliares de nitrogênio, os resultados encontrados não estão de acordo com ENDO (1986), o qual verificou maiores teores do nutriente N nas folhas, resultante da aplicação de N em cobertura, quando comparado com a testemunha, N no plantio, N parcelado, e inoculação associada ao nitrogênio no plantio. Por outro lado, concordam com resultados obtidos por CARVALHO (1994) que não encontrou efeito significativo quando testou nodulação de sementes e diferentes modos e épocas de aplicação de nitrogênio.

Os contrastes realizados C1 e C2 mostram que não houve interação significativa entre a utilização ou não de rizóbio e nitrogênio para as características de massa da raiz seca e número de nódulos (Tabelas 5.5).

Tabela 9 – Massa da raiz seca e número de nódulos nos genótipos de feijoeiro testados com e sem adição de inoculante e nitrogênio mineral, Lages, 2008.

Contraste	Massa da raiz seca		Número de nódulos	
	Estimativa	Valor de Pr>t	Estimativa	Valor de Pr>t
C1 = T1 * X T2 T3	-0,2633849	0,005633	1,454525	0,07226
C2 = T2 X T3	0,006902094	0,899	-0,1516702	0,7453

* T1 sem adição de Inoculante e sem adição de Nitrogênio, T2 (N biológico) com adição de Inoculante turfoso e sem adição Nitrogênio e T3 (N mineral) sem adição de Inoculante e com adição de Nitrogênio mineral na dose recomendada.

A análise dos resultados obtidos nesse trabalho precisam sempre ser precedidas e acompanhadas do conhecimento de que os genótipos crioulos testados não representam linhagens e sim populações com um elevado grau de variabilidade genética, o que pode justificar os elevados valores dos coeficientes de variação obtidos na Tabela 8.

5.6 CONCLUSÃO

As variáveis massa da parte aérea seca e nitrogênio total acumulado na parte aérea apresentaram interação entre genótipo X fonte de nitrogênio, ou seja, os genótipos respondem de maneira diferente frente à adubação nitrogenada mineral e biológica. Para alguns genótipos há necessidade de novos testes para que se possa comprovar definitivamente a eficiência em fixação de nitrogênio.

6. CAPITULO 4 - NITROGÊNIO ACUMULADO E RENDIMENTO DE GRÃOS DE FEIJÃO EM RESPOSTA A INOCULAÇÃO COM RIZÓBIO E FORNECIMENTO DE COBALTO E MOLIBDÊNIO

6.1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar a influência de diferentes quantidades de Co e Mo acumuladas na semente sobre o N total acumulado na semente e a produtividade do feijoeiro. Este trabalho foi conduzido em duas safras de feijão, uma no ano de 2006/2007 e outra 2007/2008. A primeira safra teve como meta a produção de sementes com diferentes doses de acúmulo de Co e Mo para serem plantadas na safra 2007/2008. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com 3 repetições. Os tratamentos testados foram: 1) (T1) testemunha sem adubação nitrogenada mineral; 2) (T2) testemunha com adubação nitrogenada mineral; 3) (T3) CoMo – 0 sem inoculante; 4) (T4) CoMo – 1 sem inoculante; 5) (T5) CoMo – 2 sem inoculante; 6) (T6) CoMo – 0 com inoculante; 7) (T7) CoMo – 1 com inoculante; 8) (T8) CoMo – 2 com inoculante. A semeadura, realizada na primeira quinzena de novembro de 2007, foi feita manualmente colocando-se 13 sementes por metro linear, a uma profundidade média de 3 a 5cm. A variedade de feijão utilizada no ensaio foi a IAPAR 81. Após 35 dias de cultivo as plantas foram colhidas foram analisadas as seguintes variáveis rendimentos de grãos e nitrogênio acumulado na semente. Os resultados obtidos foram submetidos à análise da variância e as variáveis cujos resultados revelaram significância a 95% de confiabilidade, tiveram as médias comparadas pelo teste SNK através da significância dos contrastes. A utilização de sementes com diferentes doses de acúmulo de Co e Mo mostrou que há interação entre as doses de Co e Mo acumuladas na semente e as variáveis testadas.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*. Molibdênio. Cobalto.

6.2 SUMMARY

The objective of this work was verifying the influence of different rates of Co and Mo in the seed on the total N accumulated in it and the common bean yield. The research was realized during two growing seasons (2006/2007 and 2007/2008). The first growing season aimed to produce seeds with different rates of Co and Mo accumulated to be used in the next one (2007/2008). The experimental design was in randomized blocks with three replicates and the treatments tested were: 1) (T1) control without nitrogen fertilization; 2) (T2) control with nitrogen fertilization; 3) (T3) CoMo – 0 without inoculant; 4) (T4) CoMo – 1 without inoculant; 5) (T5) CoMo – 2 without inoculant; 6) (T6) CoMo – 0 with inoculant; 7) (T7) CoMo – 1 with inoculant; 8) (T8) CoMo – 2 with inoculant. The sowing, realized in the first fifteen days of November 2007, was done manually putting 13 seeds per linear meter at a 3 to 5 cm of depth. The variety used was IAPAR 81. The plants were harvested after 35 days of cultivation and analyzed about grain yield and nitrogen accumulated in the seeds. The results were submitted to variance analysis and the significant variables at 95% of reliability had their means compared by the SNK test by the contrasts significance. The use of seeds with different rates of Mo accumulation showed that there is interaction between the rates of Mo accumulated in seeds and the variables tested.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*. Molybdenum. Cobalt.

6.3 INTRODUÇÃO

O Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é entre as leguminosas de grãos, uma das espécies mais importantes para a alimentação humana, constituindo-se numa importante fonte de proteínas, vitaminas e mineral (YOKOYAMA & STONE 2000). Apesar dessa importância, a produtividade média nacional da cultura do feijão está em torno de 768,9 kg ha⁻¹ (ICEPA, 2004), considerada baixa e de acordo com YOKOYAMA & STONE (2000) a produção de feijão brasileira ainda é insuficiente para manter o abastecimento da população nacional.

Para amenizar este problema de baixa produtividade o uso de uma correta nutrição mineral é de suma importância. Entre os nutrientes mais essenciais para um bom desenvolvimento do feijoeiro temos o fósforo e o nitrogênio. O nitrogênio, geralmente encontrado em teores ínfimos associados à matéria orgânica também se torna indispensável para a cultura, pois com a intensificação das explorações agrícolas os teores desse elemento

vêm decrescendo safra após safra e que, segundo ARAÚJO (1994), o torna um elemento limitante para o desenvolvimento da cultura.

Para amenizar os problemas da baixa produtividade do feijão recomendam-se práticas agrícolas como a calagem e a correção dos níveis de fertilidade do solo, porém nem todos os agricultores as realizam anualmente. Outra maneira de reduzir essa baixa produtividade é através do uso de adubação nitrogenada, pois a planta de feijão por ser leguminosa, apresenta uma boa resposta a esta adubação. Embora a adubação nitrogenada seja recomendada, alguns autores a contestam dizendo que não é economicamente viável em razão dos seus custos e também em razão do baixo rendimento (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Outra tecnologia utilizada para suprir o déficit de N é a inoculação das sementes de feijoeiro com bactérias do gênero *Rhizobium* que se apresenta como uma tecnologia de baixo custo para o fornecimento de nitrogênio às plantas e pode contribuir para reverter o quadro de queda de produção e produtividade do país (VARGAS & HUNGRIA 1997). A prática de utilização de bactérias para suprir a deficiência de N é uma alternativa pouco onerosa para o produtor, porém, se não for realizada de maneira correta, e obedecendo a alguns princípios ela pode não ser eficiente. Os nutrientes que mais interferem no processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) são: Nitrogênio (N), Cobalto (Co) e Molibdênio (Mo).

A aplicação de micronutrientes, visando à correção de deficiências nutricionais, pode ser realizada de três modos: diretamente no solo junto com a adubação convencional, em aplicação foliar e via tratamento de sementes (MESCEHDE et al., 2004). Dentre todos os micronutrientes o molibdênio é o mais escasso no solo e o menos exigido pelas culturas, porém, é de suma importância para as plantas fixadoras de nitrogênio, já que ativa as enzimas da Nitrogenase e da Nitrato redutase (MALAVOLTA, 1980)

Plantas de feijoeiro originadas de sementes com alto teor de Mo mantiveram a atividade da Nitrogenase similar à de plantas que receberam Mo nas raízes (BRODRICK & GILLER, 1991), e o plantio de sementes com suficientes conteúdos de Mo em solos pobres preveniu o aparecimento de deficiência de Mo até o quarto cultivo consecutivo no mesmo local (BRODRICK et al., 1995). De acordo com JACOB-NETO, (1985) para atingir o nível adequado de Mo nas sementes, ou o nível adequado de molibdênio para a simbiose, a aplicação foliar é mais eficiente do que a aplicação no solo. O cobalto não é especificamente considerado essencial para o feijoeiro, entretanto, sabe-se que está intimamente ligado ao processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) e, conseqüentemente, é essencial aos microorganismos fixadores de N (VIEIRA, 1998). De acordo com OLIVEIRA et al. (1996), o Co é indispensável à produção do feijoeiro quando a necessidade em Nitrogênio está sendo

suprida através da associação simbiótica feijoeiro-bactéria, já que esta última depende do Co para seus mecanismos de fixação. Entretanto, apesar de serem conhecidos os efeitos benéficos do Co nas leguminosas, não existem recomendações precisas de doses do nutriente para o feijoeiro em aplicações foliares.

A aplicação de micronutrientes nas sementes de feijoeiro em associação a inoculação com *Rhizobium*, quando em concentrações elevadas, tem causado grande mortalidade de células de rizóbio em função de seu efeito salino sobre as bactérias, causando prejuízos a fixação de N₂. Assim, tornam-se pertinentes estudos sobre o fornecimento destes micronutrientes via foliar, de forma a obter informações referentes ao acúmulo destes elementos nos grãos de feijoeiro e sua relação com eficiência de uso do nitrogênio através do processo de fixação biológica do nitrogênio. Desta maneira este trabalho teve como objetivo verificar a influência de diferentes quantidades de Mo acumuladas na semente sobre o N total acumulado e a produtividade do feijoeiro.

6.4 MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi conduzido em duas safras de feijão. A primeira no ano de 2006/07 e a segunda no ano de 2007/08.

No primeiro ano o experimento foi conduzido no Município de Lages - SC, no período de 15/11/2006 à 23/02/2007 em solo classificado como Nitossolo Vermelho distroférico (EMBRAPA, 1999b). O objetivo desta safra foi à produção de sementes de feijão com diferentes níveis de acúmulo de cobalto e molibdênio para serem utilizadas no experimento do segundo ano. Para a produção destas sementes foi realizado o fornecimento de Co e Mo via foliar. Os níveis fornecidos de cobalto e molibdênio foram: 0 g ha⁻¹ de Co e Mo (CoMo 0) 1,5 g ha⁻¹ de Co e 15 g ha⁻¹ de Mo (CoMo 1); 1,5 g ha⁻¹ de Co e 60 g ha⁻¹ de Mo (CoMo 2) e 1,5 g ha⁻¹ de Co e 120 g ha⁻¹ de Mo (CoMo 3).

Após a coleta uma amostra de sementes de cada nível de fornecimento foi encaminhada para o Laboratório de Espectrometria Atômica e Massa da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) onde realizou-se a determinação da quantidade de Mo acumulado nas sementes de feijoeiro através do processo de Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS), com introdução da amostra por nebulização pneumática. A quantidade de Co acumulada na semente não foi verificada uma vez que foram fornecidos sempre os mesmos níveis deste micronutriente. As quantidades de Mo acumulado nas sementes foram as seguintes: Mo 0: 1,0 mg Kg⁻¹; Mo 1: 2,55 mg Kg⁻¹; Mo 2: 2,80 mg Kg⁻¹;

Mo 3: 6,08 mg Kg⁻¹. As sementes obtidas então foram armazenadas em câmara fria para a safra 2007/2008.

A safra 2007/2008 foi realizada no Município de Campo Belo do Sul - SC, no período de 15/11/2007 à 23/02/2008, em solo classificado como Nitossolo Vermelho distroférico (EMBRAPA, 1999b). A área utilizada para a instalação do experimento é manejada no sistema de semeadura direta. O solo apresentou as seguintes características químicas pH em água 4,7; P = 6 mg dm⁻³; K = 113 mg dm⁻³; M.O. = 5,3%; Al = 1,0 cmolc dm⁻³; Ca = 3,8 cmolc dm⁻³ e Mg = 3,0 cmolc dm⁻³.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com 3 repetições. Os tratamentos testados foram: 1) (T1) testemunha sem adubação nitrogenada mineral; 2) (T2) testemunha com adubação nitrogenada mineral; 3) (T3) CoMo – 0 sem inoculante; 4) (T4) CoMo – 1 sem inoculante; 5) (T5) CoMo – 2 sem inoculante; 6) (T6) CoMo – 0 com inoculante; 7) (T7) CoMo – 1 com inoculante; 8) (T8) CoMo – 2 com inoculante. As sementes utilizadas para os tratamentos testemunhas fora produzidas sem aplicação foliar de Co e Mo.

Cada parcela foi constituída de 5 linhas com 6 metros de comprimento espaçadas entre si por 0,45 metros, sendo considerado como área útil os 5 metros centrais das 3 linhas internas de cada parcela, perfazendo uma área útil de 6,75 m².

A adubação realizada seguiu a recomendação técnica para a cultura do feijoeiro, para produtividade de 2.500 kg ha⁻¹ (COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - RS/SC, 2004). Na adubação de semeadura aplicou-se 80 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 90 kg ha⁻¹ de K₂O, respectivamente nas formas de Superfosfato Triplo e Cloreto de Potássio, em todas as parcelas. Os fertilizantes foram distribuídos mecanicamente no sulco com auxílio de semeadora. Nos tratamentos que receberam inoculação, essa foi feita com duas doses de inoculante comercial turfoso contendo a estirpe de *Rhizobium tropici* SEMIA 4080, imediatamente antes da semeadura.

A semeadura, realizada na primeira quinzena de novembro de 2007, foi feita manualmente colocando-se 13 sementes por metro linear, a uma profundidade média de 3 a 5cm, o que resultou em população final de 250.000 plantas por hectare. A variedade de feijão utilizada no ensaio foi a IAPAR 81.

Durante o ciclo da cultura foram realizados tratos culturais como controle de doenças, insetos e plantas daninhas, quando necessário. Quando 90% das plantas da área útil atingiram ponto de colheita essa foi efetuada. Após a colheita das plantas, avaliou-se o nitrogênio total acumulado no grão (kg ha⁻¹) e rendimento de grãos (kg ha⁻¹).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise da variância e as variáveis cujos resultados revelaram significância a 95% de confiabilidade, tiveram as médias comparadas pelo teste SNK. Após este teste foi realizada uma análise estatística complementar através da significância dos contrastes entre os níveis os tratamentos utilizados.

6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados para o nitrogênio acumulado na semente estão apresentados na Tabela 10. De acordo com os resultados observados através da análise de contrastes detectou-se diferença significativa para nitrogênio acumulado quando são comparados os tratamentos não inoculados e sem Co e Mo (T3, T4 e T5) contra os inoculados e com o e Mo (T6, T7 e T8), com as maiores médias verificadas nos tratamentos que receberam inoculação. Como a diferença existente entre os tratamentos não inoculados e os inoculados resume-se a ausência ou presença da bactéria selecionada, este resultado evidencia a eficiência da inoculação no aumento do acúmulo de nitrogênio nas sementes. O que se pode notar também é que a utilização de Co e Mo pode ter estimulado uma melhor eficiência na fixação biológica de nitrogênio com a utilização de estirpes recomendadas, o que não foi observado com as plantas que se desenvolveram com a população nativa de bactérias, fortalecendo a importância da utilização de estirpes recomendadas e adaptadas às condições locais.

Tabela 10 - Nitrogênio acumulado nos grãos de feijão em função da aplicação de nitrogênio, inoculação com rizóbio e diferentes níveis de Co+Mo acumulado na semente. Lages, 2008.

Contraste	Estimativa	Valor de Pr>t
C1 T1 X T3, T4, T5	- 2.8309913	0.7737
C2 T2 X T6, T7, T8	- 13.5966667	0.1809
C3 T3, T4, T5 X T6, T7, T8	- 26.8256753	0.0015
C4 Inoc- T6 X T7,T8	- 10.6066667	0.1426
C5 Inoc- T7 X T8	- 2.6066667	0.5192

T1 testemunha sem adubação nitrogenada mineral; T2 testemunha com adubação nitrogenada mineral; T3 CoMo – 0 sem inoculante; T4 CoMo – 1 sem inoculante; T5 CoMo – 2 sem inoculante; T6 CoMo – 0 com inoculante; T7 CoMo – 1 com inoculante; T8 CoMo – 2 com inoculante;
Coef. Variação = 11,3566

Para os demais contrastes C4 e C5 não foram encontrado diferenças estatísticas. Resultados semelhantes a esse foram encontrados por FERREIRA *et al.* (2003), onde o conteúdo de molibdênio na semente não afetou significativamente os teores de N da matéria seca das folhas. FERNANDES *et al.* (2005) encontraram resultados diferentes aos desse

estudo quanto à concentração de N na parte aérea, para estes autores houve resposta à concentração de N na parte aérea frente à adubação com molibdênio e nitrogênio.

Em relação ao rendimento de grãos os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 11. O resultado encontrado para (C1) mostrou que os resultados de rendimento não diferiram quando se comparou a testemunha sem nitrogênio (T1) contra os tratamentos não inoculados (T6, T7 e T8). Por outro lado a média dos tratamentos inoculados foi maior do que a média do tratamento T2 que recebeu nitrogênio na base e em cobertura (C2). Aqui é importante destacar que além da inoculação existe a diferença de Co+Mo acumulado nas sementes.

O C3 mostra que a média dos tratamentos não inoculados foi menor do que a dos inoculados, isto mais uma vez a evidencia que o nível de Mo+Co na semente foi importante para que ocorresse um aumento no rendimento de grãos, e isto pode ter ocorrido devido a maior concentração de CoMo nas sementes. FERNANDES *et al.*, (2005) encontraram resultados semelhantes ao desse estudo, pois evidenciaram um incremento na produtividade em função das doses de Mo fornecidas. Estes autores relatam que a aplicação de 80 g^{-1} de Mo incrementou em 63% a produção de vagens em relação a obtida sem a aplicação do Mo. Assim sendo os incrementos obtidos neste experimento com a utilização de Mo comprovam que há uma maior assimilação do N e consequentemente uma maior produtividade e rendimento quando se utiliza a adubação mólíbdica.

Tabela 11 - Rendimento de grãos de feijão em função da aplicação de nitrogênio, inoculação com rizóbio e diferentes níveis de Co+Mo acumulado na semente. Lages, 2008.

Contraste	Estimativa	Valor de Pr>t
C1 T1 X T3, T4 e T5 com CoMo e sem inoculante	67.120000	0.7733
C2 T2 X T6, T7 e T8 com CoMo e com inoculante	-545.033333	0.0318
C3 T3, T4 e T5 X T6, T7 e T8	-773.053333	0.0003
C4 Inoc- T6 X (T7,T8)	-393.033333	0.0290
C5 Inoc- T7 X T8	- 65.366667	0.4951

T1 testemunha sem adubação nitrogenada mineral; T2 testemunha com adubação nitrogenada mineral; T3 CoMo – 0 sem inoculante; T4 CoMo – 1 sem inoculante; T5 CoMo – 2 sem inoculante; T6 CoMo – 0 com inoculante; T7 CoMo – 1 com inoculante; T8 CoMo – 2 com inoculante
Coef. Variação = 9,1392

MESCHEDE *et al.*, (2005) demonstraram que o tratamento com cobalto e molibdênio via semente promoveu um aumento significativo de 7% na produtividade dessa leguminosa, e isto pode ser explicado pelo fato do Mo ser um componente do complexo enzimático nitrogenase (Fe-proteína e Fe-Mo-proteína).

Resultados diferentes deste foram encontrados por FERREIRA *et al.* (2003) onde o conteúdo de molibdênio encontrado nas sementes do feijoeiro não influenciou estatisticamente a produtividade de grãos. Estes mesmos autores evidenciaram que quando a adubação com molibdênio foi foliar, houve um incremento de 41% na produtividade de feijão em relação à dose zero e isto pode ser explicado pelo efeito do molibdênio na fixação biológica e na atividade da redutase do nitrato. SILVA *et al.* (2006) também não encontraram diferenças significativas na produtividade comparando a adubação nitrogenada e molibdica no feijão.

O C4 mostra que dentre as sementes enriquecidas com Co+Mo existiu diferença, pois a média do T6 foi menor do que a média de T7+T8. Assim, o nível acumulado em T6 pode ser considerado insuficiente para aumentar o rendimento, de acordo com JACOB-NETO & FRANCO (1986) que consideram que o conteúdo mínimo suficiente para o crescimento normal do feijoeiro é de 3,51 μg de Mo semente⁻¹. O resultado verificado para o contraste C4 em relação a N acumulado e rendimento de grãos aparentemente é contraditório, entretanto isto pode ser explicado, de acordo com Hungria *et al.*, (1985) pela maior aproveitamento pela planta do N de origem biológica.

Para o contraste C5 não houve diferença entre T7 e T8, o que é um indicativo de que as quantidades acumuladas no T7 já devam ser suficientes para suprir a demanda de cobalto, molibdênio.

Em relação à utilização de Co ZINATO *et al.*, (2001), não encontraram efeito significativo sobre a produtividade tanto em experimentos a campo como em casa de vegetação, porém estes mesmos autores sugeriram que a falta de resposta ao cobalto pode ter ocorrido devido a não inoculação das sementes uma vez que a função do Co nas leguminosas esta ligada a FBN. O cobalto é um elemento componente da vitamina B₁₂ indispensável no processo de fixação por ser precursora da leghemoglobina.

6.6 CONCLUSÃO

Nas condições em que se deu o presente estudo, a utilização de sementes com diferentes quantidades de Mo acumulado, proporcionou resultados distintos entre os tratamentos com e sem inoculação. Sementes com maior quantidade de Mo acumulado, quando inoculadas resultaram em maiores quantidades de N acumulado nos grãos e também no rendimento de grãos. Estes resultados indicam que a quantidade de Mo encontrada nas sementes podem incrementar o processo de FBN na cultura do feijoeiro.

NITROGÊNIO ACUMULADO E PRODUTIVIDADE DE GRÃOS DE FEIJÃO EM RESPOSTA A INOCULAÇÃO COM RIZÓBIO E FORNECIMENTO de Co e Mo.

RESUMO

Informações sobre a influência de micronutrientes na acumulação de N nos grãos e na produtividade do feijoeiro são relativamente escassas na literatura. O objetivo deste trabalho foi verificar a influência de diferentes quantidades de Mo na semente sobre o teor de N total acumulado nos grãos e na produtividade do feijoeiro. Foram conduzidos experimentos nas safras 2006/2007 e 2007/2008, nos municípios de Lages e Campo Belo do Sul, SC, utilizando-se a variedade IAPAR 81. Na primeira safra produziram-se sementes com diferentes níveis de acúmulo de Mo a serem utilizadas naquela de 2007/2008. Foram utilizados quatro tratamentos, dispostos no delineamento em blocos casualizados, com três repetições, com diferentes níveis de Co e Mo aplicados via foliar, a saber: Testemunha (CoMo 0); 1,5 g ha⁻¹ de Co e 15 g ha⁻¹ de Mo (CoMo 1); 1,5 g ha⁻¹ de Co e 60 g ha⁻¹ de Mo (CoMo 2) e 1,5 g ha⁻¹ de Co e 120 g ha⁻¹ de Mo (CoMo 3). Na Segunda safra os tratamentos foram estruturados conforme o delineamento experimental em blocos casualizados, com três repetições, e consistiram em: 1) CoMo 0, (T1); 2) CoMo 0 com adubação nitrogenada mineral, (T2); 3) CoMo 1, (T3); 4) CoMo 2, (T4); 5) CoMo 3, (T5); 6) CoMo 1 com inoculante, (T6); 7) CoMo 2 com inoculante, (T7); 8) CoMo 3 com inoculante, (T8). Foram analisadas as variáveis produtividade e teor de nitrogênio acumulado nos grãos. Concluiu-se que as quantidades de Mo encontradas nas sementes podem incrementar o processo de fixação biológica de N (FBN) na cultura do feijoeiro

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*. Molibdênio.

ABSTRACT

Informations about the micronutrient influence in the accumulation of N in the grains and in the productivity of common bean are relatively scarce in the literature. The objective of this work was verifying the influence of different rates of Co and Mo in the seeds on the total N accumulated in it and the common bean yield. The research was realized during two growing (2006/2007 and 2007/2008), in Lages and Campo Belo do Sul, Santa Catarina State, using the variety IAPAR 81. The first growing season aimed to produce seeds with different rates of Mo accumulated to be used in the next one (2007/2008). There were used four treatments, design in randomized blocks, with three replicates, with Co and Mo different levels applied by foliar road, knowing: (CoMo 0) Testify Treatment; (CoMo 1) 1,5 g.ha⁻¹ of Co and 15 g.ha⁻¹ of Mo; (CoMo 2) 1,5 g.ha⁻¹ of Co and 60 g.ha⁻¹ of Mo; and (CoMo 3) 1,5 g.ha⁻¹ of Co and 120 g.ha⁻¹ of Mo. Testemunha (CoMo 0); 1,5 g ha⁻¹ de Co e 15 g ha⁻¹ de Mo (CoMo 1); 1,5 g ha⁻¹ de Co e 60 g ha⁻¹ de Mo (CoMo 2) e 1,5 g ha⁻¹ de Co e 120 g ha⁻¹ de Mo (CoMo 3). In the second growing season, the treatments were structured according to the experimental delineation in randomized blocks, with three repetitions, and they consisted in: 1) (T1) control without nitrogen fertilization; 2) (T2) control with nitrogen fertilization; 3) (T3) CoMo – 0 without inoculant; 4) (T4) CoMo – 1 without inoculant; 5) (T5) CoMo – 2 without inoculant; 6) (T6) CoMo – 0 with inoculant; 7) (T7) CoMo – 1 with inoculant; 8) (T8) CoMo – 2 with inoculant. There were analysed the productivity variables and nitrogen tenor accumulated in the grains. Concluded that the quantities of Mo founded in the seeds can develop the biological fixation process of N (FBN) in the common bean culture.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*. Molybdenum.

INTRODUÇÃO

O Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é entre as leguminosas de grãos, uma das espécies mais importantes para a alimentação humana, constituindo-se numa importante fonte de proteínas, vitaminas e minerais (YOKOYAMA & STONE 2000). Apesar dessa importância, a produtividade média nacional da cultura está em torno de 768,9 kg ha⁻¹ (ICEPA, 2004), e, de acordo com YOKOYAMA & STONE (2000), a produção de feijão brasileira ainda é insuficiente para manter o abastecimento da população nacional.

Um dos fatores essenciais ao aumento da produtividade é o manejo correto da adubação, principalmente em relação ao fósforo e ao nitrogênio. O nitrogênio, presente em pequenas quantidades associadas à matéria orgânica tem-se, conforme ARAÚJO (1994), tornado limitante em função da intensificação das explorações agrícolas o que faz com que os teores desse elemento venham decrescendo safra após safra. Embora a adubação nitrogenada seja recomendada, ela é contestada pela baixa relação custo/benefício que apresenta (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Uma forma alternativa de suprir-se o déficit de N é a inoculação das sementes com bactérias do gênero *Rhizobium*, que é uma tecnologia de baixo e pode contribuir para reverter o quadro de queda de produção e produtividade do país (VARGAS & HUNGRIA 1997). Os nutrientes que mais interferem no processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) são o nitrogênio (N), e os micronutrientes cobalto (Co) e molibdênio (Mo). O surgimento de possíveis deficiências nutricionais associadas a estes dois últimos podem ser realizadas diretamente no solo junto à adubação convencional, em aplicação foliar e via tratamento de sementes (MESCEHDE et al., 2004). Deles o molibdênio é o mais escasso no solo e o menos exigido pelas culturas, porém, é de capital importância para as plantas fixadoras de nitrogênio devido ao seu papel no metabolismo das enzimas nitrogenase e nitrato redutase (MALAVOLTA, 1980)

Plantas de feijoeiro originadas de sementes com alto teor de Mo mantiveram a atividade da nitrogenase similar à de plantas que receberam Mo nas raízes (BRODRICK & GILLER, 1991), e o uso de sementes com teores suficientes de Mo, em solos pobres, preveniu o aparecimento de deficiência de Mo até o quarto cultivo consecutivo (BRODRICK *et al.*, 1995). De acordo com JACOB-NETO, (1985) para atingir-se o nível adequado de Mo para a simbiose, a aplicação foliar é mais eficiente do que a aplicação no solo. O cobalto apesar de não ser considerado essencial ao feijoeiro, entretanto, sabe-se que está intimamente ligado ao processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) dada a sua importância para os microorganismos fixadores de N (VIEIRA, 1998). De acordo com OLIVEIRA *et al.* (1996), o Co é indispensável à produção do feijoeiro quando a necessidade em nitrogênio está sendo suprida através da associação simbiótica feijoeiro-bactéria, já que esta última depende do Co para seus mecanismos de fixação. Embora sejam conhecidos os efeitos benéficos do Co nas leguminosas, não existem recomendações precisas de doses do nutriente para o feijoeiro em aplicações foliares.

A aplicação de micronutrientes nas sementes de feijoeiro em associação a inoculação com *Rhizobium*, quando em concentrações elevadas, tem causado grande mortalidade de

células de rizóbio em função de seu efeito salino sobre as bactérias, causando prejuízos a fixação de N_2 . Assim, tornam-se pertinentes estudos sobre o fornecimento destes micronutrientes via foliar, de forma a obterem-se informações referentes ao acúmulo destes elementos nos grãos de feijoeiro e sua relação com eficiência de uso do nitrogênio através do processo de fixação biológica do nitrogênio. Portanto, este trabalho teve como objetivo verificar a influência de diferentes quantidades de Co e Mo acumuladas na semente sobre o teor de N total acumulado nos grãos e a produtividade do feijoeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Conduziram-se experimentos nas safras 2006/07 e 2007/08. O primeiro deles foi localizado no município de Lages - SC, no período de 15/11/2006 à 23/02/2007 em solo classificado como Nitossolo Vermelho distroférico (EMBRAPA, 1999b). Teve por objetivo produzir-se sementes de feijão com diferentes níveis de acúmulo de molibdênio a serem utilizadas no experimento da segunda safra. Foram utilizados quatro tratamentos, dispostos no delineamento em blocos casualizados, com três repetições com diferentes níveis de Co e Mo aplicados via foliar, a saber: Testemunha (CoMo 0); 1,5 g ha⁻¹ de Co e 15 g ha⁻¹ de Mo (CoMo 1); 1,5 g ha⁻¹ de Co e 60 g ha⁻¹ de Mo (CoMo 2) e 1,5 g ha⁻¹ de Co e 120 g ha⁻¹ de Mo (CoMo 3). Após colhidas, as sementes a serem utilizadas na safra 2007/2008 foram armazenadas em câmara fria. Foi determinada a quantidade de Mo acumulada em amostras oriundas de cada tratamento, pelo processo de Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS), com introdução da amostra por nebulização pneumática. Esta análise foi processada no Laboratório de Espectrometria Atômica e Massa da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os teores de Mo obtidos foram: CoMo 0 - 1,0 mg kg⁻¹; CoMo 1 - 2,55 mg Kg⁻¹; CoMo 2 - 2,80 mg Kg⁻¹ e CoMo 3: 6,08 mg Kg⁻¹.

O segundo experimento foi conduzido no município de Campo Belo do Sul - SC, no período de 15/11/2007 à 23/02/2008, em solo classificado como Nitossolo Vermelho distroférico (EMBRAPA, 1999b), em uma área manejada no sistema de semeadura direta. O solo possui valores de pH em água de 4,7, teores de P = 6 mg dm⁻³, de K = 113 mg dm⁻³, de M.O. = 5,3%, de Al = 1,0 cmolc dm⁻³, de Ca = 3,8 cmolc dm⁻³ e de Mg = 3,0 cmolc dm⁻³. Os tratamentos foram estruturados conforme o delineamento experimental em blocos casualizados, com três repetições, e consistiram em: 1) CoMo 0, (T1); 2) CoMo 0 com adubação nitrogenada mineral, (T2); 3) CoMo 1, (T3); 4) CoMo 2, (T4); 5) CoMo 3, (T5); 6) CoMo 1 com inoculante, (T6); 7) CoMo 2 com inoculante, (T7); 8) CoMo 3 com inoculante,

(T8). As parcelas foram constituídas por 5 linhas com 6 metros de comprimento espaçadas entre si por 0,45 metros, sendo considerado como área útil os 5 metros centrais das 3 linhas internas de cada parcela, resultando em 6,75 m².

A adubação foi realizada conforme a recomendação técnica para a cultura do feijoeiro, para produtividade de 2.500 kg ha⁻¹ (COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - RS/SC, 2004). Na adubação de sementeira aplicaram-se em todas as parcelas 80 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 90 kg ha⁻¹ de K₂O, respectivamente nas formas de Superfosfato Triplo e Cloreto de Potássio. Os fertilizantes foram distribuídos mecanicamente no sulco. A inoculação foi efetuada com duas doses de inoculante comercial turfoso contendo a estirpe de *Rhizobium tropici* SEMIA 4080, imediatamente antes da sementeira.

A sementeira foi realizada manualmente, na primeira quinzena de novembro de 2007, colocando-se 13 sementes por metro linear, a uma profundidade média de 3 a 5cm, o que resultou em uma população final média de 250.000 plantas por hectare. A variedade de feijão utilizada no ensaio foi a IAPAR 81.

Durante o ciclo da cultura foram realizados tratos culturais como controle de doenças, insetos e plantas daninhas, quando necessário. A colheita foi efetuada quando 90% das plantas da área útil atingiram ponto de maturação fisiológica. Após a colheita das plantas, avaliou-se o teor de nitrogênio total segundo TEDESCO (1995) acumulado nos grãos e produtividade de grãos.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise da variância utilizando-se o modelo estatístico conforme o delineamento utilizado. A significância do efeito dos tratamentos foi avaliada através de contrastes específicos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de nitrogênio acumulado nos grãos são apresentados na Tabela 1. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias dos tratamentos não inoculados (T3, T4 e T5) e dos inoculados (T6, T7 e T8), com as maiores médias verificadas nos tratamentos inoculados, o que evidencia a eficiência da inoculação no aumento do acúmulo de nitrogênio nas sementes. Este resultado também sugere que a utilização de Mo pode ter ocasionado a melhor eficiência na fixação biológica de nitrogênio com a utilização de estirpes recomendadas, o que não foi observado com as plantas que se desenvolveram com a população nativa de bactérias. Este fato enfatiza a importância da utilização de estirpes recomendadas e adaptadas às condições locais.

Tabela 10 - Nitrogênio acumulado nos grãos de feijão em função da aplicação de nitrogênio, inoculação com rizóbio e diferentes níveis de Co+Mo acumulado na semente. Lages, 2008.

Contraste	Estimativa	Valor de Pr>t
C1 T1 X T3, T4, T5	- 2.8309913	0.7737
C2 T2 X T6, T7, T8	- 13.5966667	0.1809
C3 T3, T4, T5 X T6, T7, T8	- 26.8256753	0.0015
C4 Inoc- T6 X T7,T8	- 10.6066667	0.1426
C5 Inoc- T7 X T8	- 2.6066667	0.5192

T1 testemunha sem adubação nitrogenada mineral; T2 testemunha com adubação nitrogenada mineral; T3 CoMo – 0 sem inoculante; T4 CoMo – 1 sem inoculante; T5 CoMo – 2 sem inoculante; T6 CoMo – 0 com inoculante; T7 CoMo – 1 com inoculante; T8 CoMo – 2 com inoculante;

Coef. Variação = 11,3566

Não houve diferença ($p > 0,05$) entre as médias dos tratamentos T6, T7 e T8. Resultados semelhantes a esse foram encontrados por FERREIRA *et al.* (2003), aonde o conteúdo de molibdênio na semente não afetou os teores de N da matéria seca das folhas. Porém, FERNANDES *et al.* (2005) encontraram resposta positiva à concentração de N na parte aérea com a adubação com molibdênio e nitrogênio.

Os resultados referentes à produtividade podem ser visualizados na Tabela 2. Não houve diferença ($p > 0,05$) entre a testemunha sem nitrogênio mineral (T1) contra os tratamentos não inoculados (T3, T4 e T5). Por outro lado, a média dos tratamentos inoculados foi maior ($p < 0,05$) do que a média do tratamento T2 que recebeu nitrogênio na base e em cobertura. Aqui é importante destacar que além da inoculação existe a diferença de Mo acumulado nas sementes.

A média dos tratamentos não inoculados foi menor ($p < 0,05$) do que a dos inoculados o que, mais uma vez, evidencia que o nível de Mo na semente foi importante para que ocorresse um aumento na produtividade de grãos. Isto pode ter acontecido devido à maior concentração de Mo nas sementes. FERNANDES *et al.*, (2005) encontraram resultados semelhantes obtendo um incremento na produtividade em função das doses de Mo fornecidas. Estes autores relatam que a aplicação de 80 g^{-1} de Mo incrementou em 63% a produção de vagens em relação a obtida sem a aplicação do Mo. Assim sendo os incrementos obtidos neste experimento com a utilização de Mo comprovam que há uma maior assimilação do N e, conseqüentemente, maior produtividade quando se utiliza a adubação mólíbdica.

Tabela 11 - Rendimento de grãos de feijão em função da aplicação de nitrogênio, inoculação com rizóbio e diferentes níveis de Co+Mo acumulado na semente. Lages, 2008.

Contraste	Estimativa	Valor de Pr>t
C1 T1 X T3, T4 e T5 com CoMo e sem inoculante	67.120000	0.7733
C2 T2 X T6, T7 e T8 com CoMo e com inoculante	-545.033333	0.0318
C3 T3, T4 e T5 X T6, T7 e T8	-773.053333	0.0003
C4 Inoc- T6 X (T7,T8)	-393.033333	0.0290
C5 Inoc- T7 X T8	- 65.366667	0.4951

T1 testemunha sem adubação nitrogenada mineral; T2 testemunha com adubação nitrogenada mineral; T3 CoMo – 0 sem inoculante; T4 CoMo – 1 sem inoculante; T5 CoMo – 2 sem inoculante; T6 CoMo – 0 com inoculante; T7 CoMo – 1 com inoculante; T8 CoMo – 2 com inoculante
Coef. Variação = 9,1392

MESCHEDE *et al.* (2005) demonstraram que o tratamento com cobalto e molibdênio via semente promoveu um aumento significativo de 7% na produtividade dessa leguminosa, o que isto pode ser explicado pelo fato do Mo ser um componente do complexo enzimático nitrogenase (Fe-proteína e Fe-Mo-proteína).

No entanto, FERREIRA *et al.* (2003) observaram que o conteúdo de molibdênio encontrado nas sementes do feijoeiro não influenciou a produtividade de grãos. Estes mesmos autores mencionaram que, no caso da adubação foliar com molibdênio, houve um incremento de 41% na produtividade de feijão em relação à dose zero o que, provavelmente, se deve ao efeito do molibdênio na fixação biológica e na atividade da redutase do nitrato. SILVA *et al.* (2006) também não encontraram diferenças significativas na produtividade quando compararam a adubação nitrogenada e molíbdica no feijão.

Dentre as sementes enriquecidas com Co+Mo, a média do menor nível de enriquecimento (T6) foi inferior ($p < 0,05$) à média dos dois maiores (T7, T8). Dessa forma, o nível acumulado em T6 pode ser considerado insuficiente para aumentar o rendimento, de acordo com JACOB-NETO & FRANCO (1986) que reportam como conteúdo mínimo suficiente para o crescimento normal do feijoeiro o valor de $3,51 \mu\text{g}$ de Mo semente⁻¹. Os resultados do contraste C4 (T6 x {T7,T8}) em relação a N acumulado e produtividade de grãos aparentemente é contraditório, entretanto isto pode ser explicado, de acordo com HUNGRIA *et al.*, (1985) pelo maior aproveitamento pela planta do N de origem biológica.

Não houve diferença ($p > 0,05$) entre T7 e T8, o que é um indicativo de que as quantidades acumuladas em T7 sejam suficientes para suprir a demanda de molibdênio.

CONCLUSÃO

A utilização de sementes com diferentes quantidades de Mo acumulado, proporcionou resultados distintos entre os tratamentos com e sem inoculação. Sementes com maior quantidade de Mo acumulado, quando inoculadas, apresentaram maiores quantidades de N acumulado nos grãos e também maior produtividade de grãos. Estes resultados indicam que as quantidades de Mo encontradas nas sementes podem incrementar o processo de FBN na cultura do feijoeiro.

7 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

O bom desempenho da cultura do feijoeiro no processo de FBN é decorrente de fatores intrínsecos e extrínsecos relacionados à planta, bactéria e as características químicas, físicas e biológicas do solo. Entre esses fatores que se destacam temos a promiscuidade do feijoeiro, estirpes nativas com baixa eficiência, quantidade de Co e Mo existente na semente e problemas no uso e conservação do solo.

Os estudos realizados nesta dissertação revelaram que no estado de Santa Catarina há uma grande diversidade rizóbios que podem servir de instrumento para melhorar o processo de FBN, uma vez que, a inoculação de alguns rizóbios em genótipos de feijoeiros comerciais e em genótipos crioulos oriundos do BAF/CAV, proporcionou um maior acúmulo na produção de matéria seca e também na quantidade de N fixado na parte aérea. Além disso, verificou-se que há diferenças entre os genótipos de feijoeiro quanto a quantidade de N acumulada na parte aérea quando utilizado somente uma única fonte de rizóbio. Outro fator relevante no processo de FBN é a quantidade de Mo acumulada na semente uma vez que sementes com maior quantidade de Mo acumulado apresentam maior capacidade de fixar N nos grãos de feijão.

Desta forma, a continuidade dos estudos relacionados a diversidade da planta-bactéria e da utilização de sementes com maior acúmulo de Mo tornam-se indispensáveis para que possibilitem garantir aos produtores novas tecnologias que visem ao aumento na produtividade, bem como na redução dos custos de produção, principalmente os oriundos da adubação nitrogenada. E a alta diversidade encontrada em solo catarinense trás perspectivas ótimas para melhorar a eficiência no processo de fixação biológica de nitrogênio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARGER, N.; BOURS, M.; REVOY, M.R.; LAGUERRE, G. *Rhizobium tropici* nodulates field-grown *Phaseolus vulgaris* in France. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 161 p. 147-156, 1994.

AMARGER, N.; GENIAUX, E.; LAGUERRE, G. *Rhizobium* associated with field-grown *Phaseolus vulgaris*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MICROBIAL ECOLOGY, 7., 1995, Santos. **Abstracts**. São Paulo: SBM, 1995.

AMARGER, N.; MAZURIER, S.I.; GENIAUX, E.; LAGUERRE, G. Indigenous populations of *Rhizobium* nodulating *Phaseolus vulgaris*. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W.E. (Eds.) **New horizons in nitrogen fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p. 593.

ANYANGO, B.; WILSON, K. J.; BEYNON, J.L.; GILLER, K. E. Diversity of rhizobia *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 4015-4021, 1995.

ARAÚJO, R.S. Fixação biológica do nitrogênio em feijão. In: ARAÚJO, R.S.; HUNGRIA, M. (Eds.) **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: Embrapa-CNPAF, 1994. p. 91-120.

BINOTTI, F.F.S.; ARF, O.; JUNIOR, A.R.; FERNANDES, F.A.; SÁ, M.E.; BUZETTI, S. Manejo do solo e da adubação nitrogenada na cultura de feijão de inverno e irrigado. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n.1, p. 121-129, 2007.

BRODRICK, S.J.; AMJEE, F.; KIPE-NOLT, J.A.; et al. Seed analysis as a mean of identifying micronutrient deficiencies of *Phaseolus vulgaris* L. in the tropics. **Tropical Agriculture**, St. Augustine, v.72, n.4, p.277-284, 1995.

BRODRICK, S.J.; GILLER, K.E. Genotypic difference in molybdenum accumulation affects N₂-fixation in tropical *Phaseolus vulgaris* L. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.42, n.243, p.1339-1343, 1991.

CARVALHO, E.G. Efeito do nitrogênio, molibdênio e inoculação das sementes em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) na região de Selvíria - MS. Ilha Solteira, 1994. 54p. Monografia (Graduação) - Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista. COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. Sociedade Brasileira de Ciências do Solo – 10. ed. – Porto Alegre, 2004.

DOURADO NETO, D & FANCELLI, A. L. **Produção de Feijão**. Guaíba: Agropecuária, 2000a. cap.1, p. 23-48: Ecofisiologia e fenologia.

DOURADO NETO, D & FANCELLI, A. L. **Produção de Feijão**. Guaíba: Agropecuária, 2000a. cap.2, p. 49-85: Nutrição, adubação e calagem.

EMBRAPA (Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária). Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Embrapa Solos, Embrapa Informática Agropecuária; organizador Fábio Cesar da Silva. – Brasília: Embrapa Comunicação para transferência de tecnologia, 1999b.

ENDO, R.M. Efeito de inoculação, de nitrogênio mineral e fornecimento de micronutrientes, sobre a cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) de inverno, cultivar Carioca 80. Jaboticabal, 1986. 48p. Dissertação (Dissertação Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

FERNANDES, F. A. ; ARF, Orivaldo ; BINOTTI, Fávio Ferreira da Silva ; Romanini, Airton Júnior ; SÁ, Marco Estácio de ; BUZETTI, S. ; RODRIGUES, R. A. F. . Molibdênio foliar e nitrogênio em feijoeiro cultivado no sistema palntio direto. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 27, p. 7-15, 2005.

FERREIRA, A. C. de B. ; Araújo, G. A. de A. ; CARDOSO, A. A. ; Fontes, P. C. R. ; Vieira, C. . Características agronômicas do feijoeiro em função do molibdênio contido na semente e da sua aplicação via foliar. *Acta Scientiarum, Maringá*, v. 25, n. 01, p. 65-72, 2003.

FETAESC (Federação dos Trabalhadores na Agricultura do Estado de Santa Catarina). **Plano de reordenação sustentável da agricultura familiar em Santa Catarina**. Disponível em: <<http://www.fetaesc.org.br/gtb/2006/plano.pdf>>. Acesso: 08 set. 2007.

HARA, F. A. dos S. & OLIVEIRA, de L.A.. Características fisiológicas e ecológicas de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 40, n. 7, p. 667-672, 2005.

HERRIDGE, D.F.; DANSO, S.K.A. Enhancing crop legume N₂ fixation through selection and breeding. **Plant Soil**, v.174, p.51-82, 1995.

HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P.; VICTORIA, R.L.. Assimilação do nitrogênio pelo feijoeiro. II. Absorção e translocação do N mineral e do N₂ Fixado. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, Campinas, v. 9, p. 201-209, 1985.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; ARAUJO, R.S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. (Eds.) **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p. 189-294.

ICEPA – **Síntese Anual da Agricultura Catarinense**. Florianópolis: Instituto CEPA/SC. 2004

JACOB-NETO, J. Variação estacional, concentração nas sementes e níveis críticos de Mo nos nódulos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Itaguaí: UFRJ, 1985.141p. (Tese de mestrado).

JACOB-NETO, J.; FRANCO, A.A. **Adubação de molibdênio no feijoeiro**. Seropédica: UAPNPBS, 1986. 4p. (UAPNPBS. Comunicado técnico, 01).

JORDAN, D.C. *Rhizobiaceae* Conn 1938. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J.G. (ed.) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore/London: Williams & Wilkins, 1984. p. 235-244.

LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I.; MENEZES, E.W. de Qualidade nutricional. In: ARAUJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J. de O. (Eds.) **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: POTAFOS, 1996. p. 23-56.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo. Revista Agronômica Ceres, 251p. 1980.

MALAVOLTA, E. Nutrição e adubação. **IN: Simpósio Brasileiro de Feijão**. Campinas.1971. Anais. Campinas IAC, p 209-242, 1972.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A.. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba. Associação da potassa e do fosfato, 1989.

MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, E.; MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A.; GRAHAM, P.H.; 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.

MESCHEDE, D. K. ; BRACCINI, Alesandro de Lucca e ; BRACCINI, Maria Do Carmo Lana ; SCAPIM, Carlos Alberto ; SCHUAB, Sandra Regiana Pelegrinello . Rendimento, teor de proteínas nas sementes e características agrônômicas das plantas de soja em resposta a adubação foliar e tratamento de sementes com molibdênio e cobalto. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 26, n. 1, 2004.

MOREIRA, F.M.; SIQUEIRA, J.O.. **Microbiologia e bioquímica do solo**. ed. UFLA, Lavras, MG. 2006, 729 p.

MORGANTE, P.G. Fixação biológica e assimilação de nitrogênio. Disponível em: <<http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp/FisioVegGrad/NetNitro.htm>>. Acesso: 08 mai. 2007.

OLIVEIRA, I.P.; ARAÚJO, R.S.; DUTRA, L.G. Nutrição mineral e fixação biológica de nitrogênio. In. ARAÚJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J. de O. eds., **Cultura do Feijoeiro no Brasil**. Piracicaba: POTAFOS, p. 169-221, 1996.

PEREIRA, P.A.A., BLISS, F.A. Nitrogen fixation and plant growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) at different level of phosphorus availability. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.104, n.1, p.79-84, 1987.

PEREIRA, T. Diversidade genética para o centro de origem e o teor de nutrientes dos grãos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) Lages: UDESC/CAV, 2008.78p. (Dissertação de mestrado).

PÉREZ-RAMÍREZ, N.O.; ROGEL, M.A.; WANG, E.; CASTELLANOS, J.Z; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Seeds of *Phaseolus vulgaris* bean carry *Rhizobium etli*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 26, p. 289-296, 1998.

PIÑERO, D.; MARTINEZ, E.; SELANDER, R.K. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 2825-2832, 1988.

SILVA, T. R. B.; LEMOS, L. B.; TAVARES, C. A. Produtividade e característica tecnológica de grãos em feijoeiro adubado com nitrogênio e molibdênio. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 41, n. 5, p. 739- 745, maio 2006.

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

STRALIOTTO, R.; TEIXEIRA, M.G.; MERCANTE, F.M. **Fixação biológica de nitrogênio**. Disponível em: [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/ Feijao/CultivodoFeijoeiro/fbnitrogenio.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/fbnitrogenio.htm). Acesso em: 03 nov. 2007.

TEDESCO, M.J. et al. Análise de solo, plantas e outros materiais. Porto Alegre: UFRGS

TSAL, S.M.; BONETTI, R.; AGBALA, S.M.; ROSSETO, R. Minimizing the effect of mineral nitrogen on biological nitrogen fixation in common bean by increasing nutrient levels. **Plant and Soil**. The Hague, v. 154p. p.131-138. 1993.

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

VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. IN:

VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M., eds. **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 524p, 1997.

VIEIRA, C. Adubação mineral e calagem. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BORÉM, A. **Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas Gerais**. Viçosa: UFV, 1998, p. 41-42.

VIEIRA, E. H. N.; RAVA, C. A. (Ed.). **Sementes de feijão: produção e tecnologia**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2000. 270 p.

VINCENT, J.M. **A Manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164 p.

YOKOYAMA, L.P. & STONE, L.F. Qualidade, classificação comercial e manejo pós-colheita. YOKOYAMA, L.P.; Aspectos conjunturais da cultura do feijoeiro no período de 1988/89 à 1997/98. ANAIS:VI RENAFAE – Reunião Nacional de Pesquisa do Feijão.

EMBRAPA – CNPAF. Santo Antônio de Goiás – GO. p. 709 – 712. 1999. (resumo expandido).

ZINATO, J. A. P. ; VIEIRA, N. M. B. ; JUNIOR, J.A. ; CARVALHO, A. J. ; ANDRADE, M. J. B.; CARVALHO, J. G. ADUBAÇÃO FOLIAR COM COBALTO NA CULTURA DO FEJJOEIRO NÃO INOCULADO. IN: VIII CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 2005, GOIÂNIA. **VIII CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO. SANTO ANTÔNIO DE GOIÁS : EMBRAPA ARROZ FEIJÃO**, 2005. v. 2. p. 907-910.

ZUPPI, M. ; MENTEN, J.O.M. ; FERREIRA LIMA, L.C.S. ; RABALHO, A.A. ; FRA V.C. . Produtos Fitossanitários Utilizados no Feijoeiro no Brasil: Evolução e Situação Atual. In: **VIII Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão, 2005, Goiânia - GO**. Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão, 8. Anais / CONAFE , 2005. v. 2. p. 1260-1268.