

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MICROBIANA

INOCULAÇÃO E COINOCULAÇÃO SUPLEMENTAR TARDIA COM  
*Rhizobium tropici* e *Azospirillum brasilense* COMO ESTRATÉGIAS PARA  
AUMENTO DA NODULAÇÃO E PRODUTIVIDADE DO FEIJOEIRO COMUM  
(*Phaseolus vulgaris* L.)

LUCAS GABRIEL FERREIRA COELHO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

BRASÍLIA- DF

2021

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MICROBIANA

INOCULAÇÃO E COINOCULAÇÃO SUPLEMENTAR TARDIA COM  
*Rhizobium tropici* e *Azospirillum brasilense* COMO ESTRATÉGIAS PARA  
AUMENTO DA NODULAÇÃO E PRODUTIVIDADE DO FEIJOEIRO COMUM  
(*Phaseolus vulgaris* L.)

LUCAS GABRIEL FERREIRA COELHO

ORIENTADOR: Helson Mario Martins do Vale

COORIENTADOR: Fábio Bueno dos Reis Junior

Dissertação de mestrado  
apresentado ao Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Microbiana,  
Instituto de Ciências Biológicas,  
Universidade de Brasília, sob a orientação  
do Professor Dr. Helson Mario Martins do  
Vale e coorientação do Dr. Fábio Bueno  
dos Reis Junior.

BRASÍLIA- DF

2021

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	v
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT .....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Cultura do feijoeiro no Brasil e no Mundo .....	4
2.2. Nitrogênio e fertilizantes minerais sintéticos: produção, importância e impactos ambientais .....	5
2.3. Visão geral da fixação biológica de nitrogênio em leguminosas.....	7
2.3.1. Fixação biológica de nitrogênio no feijoeiro .....	9
2.3.2. Fatores que afetam a fixação biológica de nitrogênio no feijoeiro	12
2.4. Rizobactérias promotoras do crescimento vegetal.....	16
2.4.1. <i>Azospirillum</i> .....	18
2.4.2. Inoculantes: aspectos gerais .....	19
2.5. Novas tecnologias de inoculação .....	21
2.5.1. Coinoculação.....	21
2.5.2. Inoculação suplementar.....	24
3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES .....	25
4. OBJETIVOS .....	26

4.1. Objetivo geral .....	26
4.2. Objetivos específicos .....	26
5. METODOLOGIA.....	27
5.1. Localização e descrição das áreas de plantio.....	27
5.2. Desenho experimental e implantação dos experimentos .....	31
5.3. Adubação nitrogenada e inoculação suplementar tardia.....	34
5.4. Avaliação da nodulação, componentes de produtividade e colheita.....	35
5.5. Análises estatísticas .....	38
6. RESULTADOS .....	38
6.1. Avaliação da nodulação e promoção de crescimento vegetal do feijoeiro no estágio V4 de desenvolvimento.....	39
6.2. Avaliação da nodulação e promoção de crescimento vegetal do feijoeiro após a inoculação suplementar tardia .....	43
6.3. Componentes de produtividade .....	51
6.4. Produtividade de grãos.....	56
7. DISCUSSÃO.....	63
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	71
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	73

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha mãe (Cidoca) e minhas duas irmãs (Renata e Ludmila), que além de sempre estarem presentes, me dão suporte emocional para enfrentar os desafios do cotidiano. Agradeço por elas sempre me apoiarem na carreira profissional.

Agradeço meu companheiro, Daniel Valencia Cárdenas, que sempre ouviu meus desabafos, que esteve comigo nos dias bons e ruins e que sempre me inspira a seguir a carreira de cientista. Como o bom pesquisador que é, agradeço por ter me ajudado bastante na execução desse trabalho.

Agradeço aos meus amigos Cleisson, Rebeca, Mara, Brenda Silva, Camila, Gabriela, Suelen e minha prima Brennda por me distrair quando a vida fica um pouco mais difícil e por me ouvirem sempre que precisei conversar.

Agradeço minha amiga pessoal e de profissão, Catharine Abreu Bomfim (com dois M), por ter me ajudado em, praticamente, todas as atividades desse mestrado, contando da parte prática até a escrita e análise dos dados. Agradeço por me ensinar, orientar, escutar e suportar minhas reclamações e meus dias ruins, e por ser uma ótima pesquisadora e uma ótima mãe. Agradeço minha amiga Geisianny Augusta Monteiro Moreira por ter me ensinado muitas coisas do mundo da microbiologia desde minha época na iniciação científica. Além de ser uma ótima pessoa e pesquisadora, é uma ótima amiga, que sabe ouvir, aconselhar e puxar a orelha quando precisa.

Agradeço meus amigos professores: Alessandra, Jane, Gabriela, Marcus, Daniel, Valéria, por serem uma grande fonte de inspiração, sempre carinhosos comigo.

Agradeço a equipe do campo experimental (Senhor Alair, Eduardo, Osmar e muitos outros) e ao pesquisador Dr. Rafael Nunes da Embrapa Cerrados, e aos administradores e equipe da Fazenda Saco Grande em Paracatu - MG, em especial aos Srs. Fred Quirino e Vagner Lima. Assim como, as empresas de inoculantes que forneceram os insumos para realização dos experimentos conduzidos nesse trabalho. Sem eles esse projeto não teria sido executado. Agradeço também a equipe do Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Cerrados: Lucas Rolim, Clodoaldo e Maria Inês por me ensinarem muitas das metodologias executadas nesse trabalho e por terem ajudado nas atividades de campo. Agradeço também a Dra. Ieda Mendes, uma pessoa muito inspiradora e uma grande cientista. Agradeço a Vilderete e Vlayrton por

disponibilizar tempo e ajuda no processo de quantificação do nitrogênio foliar e nos grãos.

Agradeço a Embrapa Cerrados, ao CNPQ (Processo n. 426736/2018-4), ao INCT-Microrganismos Promotores do Crescimento de Plantas Visando à Sustentabilidade Agrícola e à Responsabilidade Ambiental (MPCPAgro) (CNPq 465133/2014-2, Fundação Araucária-STI, CAPES) e a CAPES, por viabilizarem a realização desse trabalho.

Agradeço a meus orientadores Helson Mario Martins do Vale e Fábio Bueno dos Reis Junior, por me guiarem durante a execução desse projeto de mestrado e por estarem sempre disponíveis para ensinar. Agradeço por fazerem parte da formação do meu caráter profissional.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Resultados dos ganhos em produtividade (%) em relação a inoculação padrão e ao controle nitrogenado quando coinoculados com as bactérias *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6, em experimentos conduzidos em diferentes regiões do país..... 23
- Tabela 2. Descrição da época e localização dos cultivos, períodos de plantio e colheita, cultivares utilizadas e concentração de rizóbios nativos nos solos, referente aos cinco experimentos conduzidos..... 29
- Tabela 3. Características químicas dos solos nas áreas experimentais I, II, IV e V, coletados na região de Planaltina-DF e na área experimental III, coletadas na região de Paracatu-MG..... 30
- Tabela 4. Descrição dos tratamentos utilizados em todos os experimentos de campo. Os tratamentos consistiram em uma combinação dos inoculantes (a base *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6), adubação nitrogenada e inoculação suplementar (realizada com *R. tropici* e/ou *A. brasilense* no estágio V4 de desenvolvimento). ..... 32
- Tabela 5. Primeira avaliação do número de nódulos (NN), massa seca dos nódulos (MSN) e massa seca da parte aérea (MSPA) realizada no estágio V4 do desenvolvimento do feijoeiro, inoculado e coinoculado com as bactérias *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6, no experimento I conduzido com a cultivar Pérola na safra de inverno do ano de 2019. .... 40
- Tabela 6. Primeira avaliação do número de nódulos (NN), massa seca dos nódulos (MSN) e massa seca da parte aérea (MSPA) realizada no estágio V4 do desenvolvimento do feijoeiro, inoculado e coinoculado com as bactérias *Rhizobium*

<i>tropici</i> CIAT 899 e <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 e Ab-V6, no experimento II conduzido com a cultivar BRS Esteio na safra de inverno no ano de 2019.....	41
Tabela 7. Primeira avaliação do número de nódulos (NN), massa seca dos nódulos (MSN) e massa seca da parte aérea (MSPA) realizada no estágio V4 do desenvolvimento do feijoeiro, inoculado e coinoculado com as bactérias <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 e <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 e Ab-V6, no experimento III conduzido com a cultivar BRS Estilo na safra de inverno no ano de 2019.....	41
Tabela 8. Primeira avaliação do número de nódulos (NN), massa seca dos nódulos (MSN) e massa seca da parte aérea (MSPA) realizada no estágio V4 do desenvolvimento do feijoeiro, inoculado e coinoculado com as bactérias <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 e <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 e Ab-V6, no experimento IV conduzido com a cultivar Pérola na safra das águas 2019/2020. ....	42
Tabela 9. Primeira avaliação do número de nódulos (NN), massa seca dos nódulos (MSN) e massa seca da parte aérea (MSPA) realizada no estágio V4 do desenvolvimento do feijoeiro, inoculado e coinoculado com as bactérias <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 e <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 e Ab-V6, no experimento V conduzido com a cultivar Pérola na safra das águas 2020/2021. ....	42
Tabela 10. Segunda avaliação do número de nódulos (NN), massa seca dos nódulos (MSN) e massa seca da parte aérea (MSPA) e teor total de nitrogênio da parte aérea (NTPA), realizada no estágio R5 do desenvolvimento do feijoeiro, inoculado e coinoculado com as bactérias <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 e <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 e Ab-V6, no experimento I, conduzido com a cultivar Pérola na safra de inverno do ano de 2019.....	47
Tabela 11. Segunda avaliação do número de nódulos (NN), massa seca dos nódulos (MSN) e massa seca da parte aérea (MSPA) e teor total de nitrogênio da parte	

aérea (NTPA), realizada no estágio R5 do desenvolvimento do feijoeiro, inoculado e coinoculado com as bactérias <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 e <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 e Ab-V6, no experimento II, conduzido com a Cultivar BRS Esteio na safra de inverno do ano de 2019. ....	48
Tabela 12. Segunda avaliação do número de nódulos (NN), massa seca dos nódulos (MSN) e massa seca da parte aérea (MSPA) e teor total de nitrogênio da parte aérea (NTPA), realizada no estágio R5 do desenvolvimento do feijoeiro, inoculado e coinoculado com as bactérias <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 e <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 e Ab-V6, no experimento III, conduzido com a Cultivar BRS Estilo na safra de inverno do ano de 2019. ....	49
Tabela 13. Segunda avaliação do número de nódulos (NN), massa seca dos nódulos (MSN) e massa seca da parte aérea (MSPA) e teor total de nitrogênio da parte aérea (NTPA), realizada no estágio R5 do desenvolvimento do feijoeiro, inoculado e coinoculado com as bactérias <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 e <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 e Ab-V6, no experimento IV, conduzido com a Cultivar Pérola na safra das águas 2019/2020. ....	50
Tabela 14. Segunda avaliação do número de nódulos (NN), massa seca dos nódulos (MSN) e massa seca da parte aérea (MSPA) e teor total de nitrogênio da parte aérea (NTPA), realizada no estágio R5 do desenvolvimento do feijoeiro, inoculado e coinoculado com as bactérias <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 e <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 e Ab-V6, no experimento V, conduzido com a Cultivar Pérola na safra das águas 2020/2021. ....	51
Tabela 15. Avaliação dos componentes de produtividade: número de vagem por planta (NV), número de grãos por vagem (NG), massa seca de 100 grãos (M100) e teor	

total de nitrogênio nos grãos (NTG), no experimento I conduzido com a cultivar Pérola na safra de inverno do ano de 2019.....	52
Tabela 16. Avaliação dos componentes de produtividade: número de vagem por planta (NV), número de grãos por vagem (NG), massa seca de 100 grãos (M100) e teor total de nitrogênio nos grãos (NTG), no experimento II conduzido com a cultivar BRS Esteio na safra de inverno do ano de 2019. ....	53
Tabela 17. Avaliação dos componentes de produtividade: número de vagem por planta (NV), número de grãos por vagem (NG), massa seca de 100 grãos (M100) e teor total de nitrogênio nos grãos (NTG), no experimento III conduzido com a cultivar BRS Estilo na safra de inverno do ano de 2019. ....	54
Tabela 18. Avaliação dos componentes de produtividade: número de vagem por planta (NV), número de grãos por vagem (NG), massa seca de 100 grãos (M100) e teor total de nitrogênio nos grãos (NTG), no experimento IV conduzido na safra das águas 2019/2020.....	55
Tabela 19. Avaliação dos componentes de produtividade: número de vagem por planta (NV), número de grãos por vagem (NG), massa seca de 100 grãos (M100) e teor total de nitrogênio nos grãos (NTG), no experimento V conduzido na safra das águas 2020/2021.....	56
Tabela 20. Efeito da inoculação e coinoculação suplementar tardia, com as bactérias <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 e <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 e Ab-V6, na produtividade (kg ha <sup>-1</sup> ) de três cultivares do feijoeiro comum, cultivados em duas regiões distintas nas safras de inverno e safra das águas entre os anos de 2019 e 2021.....	58

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Produção, exportação, importação e uso na agricultura de fertilizantes nitrogenados no Brasil entre os anos de 2010 e 2017. Os dados são provenientes da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (2019)..... 6
- Figura 2. Mecanismos diretos e indiretos da promoção do crescimento vegetal, promovidos por rizobactérias, que auxiliam o crescimento e desenvolvimento vegetal por meio de interações no ambiente da rizosfera. (Figura de autoria própria). ..... 17
- Figura 3. Fotos dos cinco experimentos conduzidos na região de Planaltina-DF e Paracatu-MG. (A) experimento I; (B) experimento II; (C) experimento III; (D) experimento IV; (E) experimento V. As linhas amarelas assinalam os experimentos conduzidos nesse trabalho. .... 28
- Figura 4. Regiões de Planaltina-DF (Embrapa Cerrados) e Paracatu-MG, onde foram conduzidos os experimentos em campo. .... 29
- Figura 5. Temperaturas (°C) e precipitação (mm) nas regiões onde foram conduzidos os cinco experimentos nesse trabalho. .... 31
- Figura 6. Inoculantes comerciais utilizados em todos os cinco experimentos, sendo A) inoculante líquido contendo as bactérias *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6, B) inoculante líquido contendo a bactéria *Rhizobium tropici* CIAT 899 e C) inoculante turfoso contendo a bactéria *Rhizobium tropici* CIAT 899. .... 34
- Figura 7. Inoculação suplementar tardia via foliar aplicada por meio da pulverização a jato entre os estágios V4 e R5 do desenvolvimento do feijoeiro..... 35

- Figura 8. As coletas de plantas para avaliação da nodulação, promoção de crescimento e componentes de produtividade foram realizadas com base na média de seis plantas por parcela, sendo três coletadas na segunda linha e três coletadas na sétima linha. Para o cálculo da produtividade foram colhidas apenas as quatro linhas centrais. 36
- Figura 9. Coleta de plantas para avaliação de nodulação. A) coleta de seis plantas por parcela; B) lavagem das raízes para separação dos nódulos; C) secagem dos nódulos ao ar após a lavagem; D) após a secagem ao ar, os nódulos são armazenados em envelopes para secagem em estufa a 60°C durante 3 dias. .... 37
- Figura 10. Comparação do número de nódulos, antes e após a inoculação suplementar tardia, em todos os cinco experimentos inoculados e coinoculados com as bactérias *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6. Foi utilizado o teste Tukey 5% para avaliar as diferenças estatísticas entre a primeira e a segunda avaliação de nodulação. Os \* representam diferenças significativas entre a nodulação antes (1° nodulação) e após a inoculação suplementar tardia (2° nodulação). ..... 44
- Figura 11. Produtividade de grãos (kg ha<sup>-1</sup>) dos tratamentos que não receberam adubação nitrogenada em cobertura nos cinco experimentos conduzidos na região de Planaltina-DF e Paracatu-MG. A ordem dos tratamentos da esquerda para direita: CA: controle absoluto; Rt: inoculação com *Rhizobium tropici*; Rt+Az: inoculação com *R. tropici* e *Azospirillum brasilense*; Rt+Az+Rt(V4): coinoculação e inoculação suplementar tardia com *R. tropici*; Rt+Az+Az(V4): coinoculação e inoculação suplementar tardia com *A. brasilense*; Rt+Az+Rt+Az(V4); coinoculação e inoculação suplementar tardia com *R. tropici* e *A. brasilense*. Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste Duncan p<0,05 ..... 60

Figura 12. Produtividade de grãos ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) dos tratamentos que receberam adubação nitrogenada em cobertura nos cinco experimentos conduzidos na região de Planaltina-DF e Paracatu-MG. Os tratamentos em ordem da esquerda para direita são: CN 120  $\text{kg ha}^{-1}$ : controle nitrogenado 120  $\text{kg ha}^{-1}$  de N; CN 60  $\text{kg ha}^{-1}$ : controle nitrogenado 60  $\text{kg ha}^{-1}$  de N; Rt + N: inoculação com *Rhizobium tropici* + 60  $\text{kg ha}^{-1}$  de N; Rt+Az + N: inoculação com *R. tropici* e *Azospirillum brasilense* + 60  $\text{kg ha}^{-1}$  de N; Rt+Az+Rt(V4) + N: coinoculação e inoculação suplementar tardia com *R. tropici* + 60  $\text{kg ha}^{-1}$  de N; Rt+Az+Az(V4) + N: coinoculação e inoculação suplementar tardia com *A. brasilense* + 60  $\text{kg ha}^{-1}$  de N; Rt+Az+Rt+Az(V4) + N: coinoculação e inoculação suplementar tardia com *R. tropici* e *A. brasilense* + 60  $\text{kg ha}^{-1}$ . Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste Duncan  $p < 0,05$ . 61

Figura 13. Análise conjunta dos experimentos I, III, IV e V conduzidos com as cultivares Pérola e Estilo pertencentes ao grupo do feijão Carioca, em relação a produtividade dos tratamentos que não receberam adubação nitrogenada em cobertura (A) e tratamentos que foram suplementados com adubação nitrogenada em cobertura (B). Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste Duncan  $p < 0,05$ . 62

## RESUMO

A eficiência da fixação biológica de nitrogênio (FBN) na cultura do feijoeiro é influenciada por diversos fatores, como a população de rizóbios nativos do solo, a senescência precoce dos nódulos e a susceptibilidade da cultura a estresses abióticos e bióticos. Como alternativa, novas estratégias de inoculação, como a coinoculação e inoculação suplementar tardia, têm surgido a fim de aumentar a eficiência da FBN e diminuir o uso de fertilizantes nitrogenados. O objetivo desse trabalho foi avaliar a resposta da inoculação suplementar tardia e da coinoculação, com a bactéria promotora do crescimento vegetal *Azospirillum brasilense*, nos parâmetros de nodulação, no desempenho agrônômico e na produtividade do feijoeiro. Para isso, foram conduzidos cinco experimentos, em diferentes safras e locais, para avaliar esses efeitos em condições de campo. As sementes foram inoculadas ou coinoculadas com as bactérias *R. tropici* CIAT 899 e *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 e, no estágio V4 de desenvolvimento, foram realizadas as inoculações e coinoculações suplementares tardias. Nos estágios V4 e R5 de crescimento foram avaliados o número de nódulos por planta, a massa seca dos nódulos, a massa seca da parte aérea e a concentração total de nitrogênio da parte aérea, assim como, os componentes de rendimento como o número de vagens/planta, número de sementes/vagem, peso de 100 sementes e produtividade (kg grãos ha<sup>-1</sup>). As respostas a inoculação e coinoculação variaram entre os tratamentos, a época de cultivo e a cultivar utilizada para a maioria dos parâmetros avaliados. De maneira geral, a suplementação de nitrogênio em cobertura resultou em maior biomassa da parte aérea, maior concentração de nitrogênio foliar e maior produtividade. Por outro lado, a nodulação se destacou nos tratamentos que não receberam adubação nitrogenada em cobertura, com maior número e massa seca de nódulos nos tratamentos inoculados com *Rhizobium*, coinoculados com *Rhizobium* e *Azospirillum*, e no controle não inoculado. Avaliando os experimentos individualmente, apesar das tendências apresentadas, os tratamentos inoculados e coinoculados, que não foram suplementados com nitrogênio em cobertura, não diferiram do controle não inoculado, indicando que a presença de rizóbios nativos do solo pode estar competindo com as estirpes selecionadas e afetando a eficiência da FBN. Não houve diferença significativa entre os tratamentos em relação aos componentes de produtividade. Quando os quatro experimentos conduzidos com as cultivares do grupo carioca foram analisados em conjunto, na ausência de nitrogênio em cobertura, a coinoculação via semente se

mostrou o melhor tratamento, atingindo produtividade 10% superior a inoculação padrão. A inoculação suplementar tardia, via foliar, com *A. brasilense* apresentou produtividade 7,7% superior a inoculação padrão, mas não se diferiu da coinoculação via semente. Em suma, os resultados apresentados nesse trabalho demonstram que a inoculação e coinoculação suplementar tardia nesses experimentos não se destacaram frente as estratégias de inoculação já estabelecidas para o feijoeiro no Brasil. Ao avaliar os experimentos em conjunto, na ausência de fertilização nitrogenada, a coinoculação via semente demonstrou ser a melhor estratégia de inoculação no feijoeiro.

**PALAVRAS CHAVE:** Fixação biológica de nitrogênio, promoção de crescimento de plantas, *Rhizobium tropici*, *Azospirillum brasilense*.

## ABSTRACT

The efficiency of the biological nitrogen fixation (BNF) in the common bean crop is influenced by several factors such as the population of native rhizobia in the soil, early nodule senescence, and the crop's susceptibility to abiotic and biotic stresses. As an alternative, new inoculation strategies, such as co-inoculation and late supplemental inoculation, have emerged to increase the BNF efficiency and reduce the use of nitrogen fertilizers. This work aimed to evaluate the response of late supplemental inoculation and co-inoculation with the plant growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense*, on common bean nodulation parameters, agronomic performance and grain yield (kg ha<sup>-1</sup>). Five experiments were carried out, in different season crops and locations, to evaluate these effects under field conditions. Seeds were inoculated or co-inoculated with the bacteria *R. tropici* CIAT 899 and *A. brasilense* Ab-V5 and Ab-V6 and, at stage V4 of development, inoculations, and late supplementary co-inoculations were performed. In the growth stages V4 and R5, number of nodules per plant, dry mass of nodules, dry mass of shoots, and total nitrogen concentration of shoots were evaluated, as well as yield components such as number of pods/plant, number of seeds/pod, weight of 100 seeds and grain yield (kg ha<sup>-1</sup>). Inoculation and co-inoculation responses varied between treatments, growing season, and the cultivar used, for most evaluated parameters. Overall, topdressing nitrogen supplementation resulted in higher aboveground biomass, higher shoots nitrogen concentration, and higher productivity. On the other hand, nodulation stood out in treatments that did not receive topdressing nitrogen, with higher number and dry mass of nodules in treatments inoculated with *Rhizobium*, co-inoculated with *Rhizobium* and *Azospirillum*, and in the non-inoculated control. Evaluating the experiments individually, despite the trends presented, the inoculated and co-inoculated treatments that were not supplemented with topdressing nitrogen did not differ from the uninoculated control, indicating that the presence of native soil rhizobia may be competing with the selected strains and affecting the BNF efficiency. There was no significant difference between treatments regarding productivity components. When the four experiments carried out with the cultivars from the carioca group were analyzed together, in the absence of topdressing nitrogen, seed co-inoculation proved to be the best treatment, reaching productivity 10% higher than the standard inoculation. The late supplemental inoculation, via foliar, with *A. brasilense* presented productivity 7.7% higher than the standard inoculation but did not

differ from the inoculation via seed. In summary, the results presented in this work demonstrate that seed co-inoculation is the best inoculation strategy for common beans. Inoculation and late supplemental co-inoculation in these experiments did not stand out when compared with the inoculation strategies already established for common beans in Brazil.

KEY WORDS: Biological nitrogen fixation, plant growth promotion, *Rhizobium tropici*, *Azospirillum* *brasilense*.

## 1. INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das leguminosas mais consumidas no mundo, sendo base alimentar de vários países por possuir uma alta capacidade nutritiva, rica em proteínas, carboidratos e aminoácidos essenciais (COSTA *et al.*, 2006; HAYAT, I. *et al.*, 2014; REZENDE *et al.*, 2018). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de feijão, perdendo apenas para Índia e Myanmar, com uma produção total de 3 milhões de toneladas (FAO, 2019). A produção de feijão no Brasil ocorre em três safras distintas e faz parte do sistema de produção de pequenos, médios e grandes produtores, esses últimos com produções em escala empresarial altamente tecnológica. As regiões que mais produzem são Sul, Sudeste e Centro-Oeste, com destaque para os estados do Paraná, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso (CONAB, 2021).

Pertencente à família Leguminosae, o feijoeiro é capaz de realizar simbiose com bactérias, comumente chamadas de rizóbios, capazes de fixarem o nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>) e disponibilizá-lo na forma de amônia (NH<sub>3</sub>) para as plantas. As bactérias mais eficientes na interação com o feijoeiro pertencem ao gênero *Rhizobium* como *Rhizobium tropici*, *R. etli*, *R. freirei*, *R. phaseoli*, entre outras (DALL'AGNOL *et al.*, 2013; MARTÍNEZ-ROMERO *et al.*, 1991; MERCANTE; OTSUBO; BRITO, 2017; SEGOVIA; YOUNG; MARTINEZ-ROMERO, 1993). Porém, o feijoeiro é considerado uma das leguminosas agrícolas com a menor eficiência no processo de FBN, fixando aproximadamente de 30-130 kg de N ha<sup>-1</sup> (AKTER *et al.*, 2014; MOREIRA, OLIVEIRA, FERREIRA, 2017). Alguns dos motivos que justificam essa baixa eficiência são: baixa especificidade hospedeira, existência de uma população de rizóbios nativos altamente competitiva e com baixa eficiência na fixação de nitrogênio (VARGAS; MENDES; HUNGRIA, 2000; FERREIRA, 2013); senescência precoce dos nódulos antes do período de enchimento de grão, momento em que a demanda por nitrogênio é alta (da SILVA *et al.*, 2019; MICHIELS *et al.*, 1998); susceptibilidade da cultura a estresses bióticos e abióticos como pragas, solos ácidos e altas temperaturas (FERREIRA *et al.*, 2013). Além dessas limitações influenciarem na taxa de FBN, elas também são responsáveis por diminuir a produtividade dessa cultura.

Como alternativa, estirpes de rizóbios competitivas, geneticamente estáveis e tolerantes a solos ácidos e temperaturas altas, têm sido selecionadas, principalmente dentro do gênero *Rhizobium*, para garantir uma melhor eficiência na FBN. Como

resultado, estirpes como *R. tropici* SEMIA 4077 (=CIAT 899) e SEMIA 4088 (= H 12), *R. freirei* SEMIA 4080 (=PRF 81) foram selecionadas e têm sido comercializadas em formulações de inoculantes recomendados para cultura do feijoeiro (BRASIL, 2011). A inoculação dessas bactérias resultou em produtividades variando de 1500 kg ha<sup>-1</sup> até 4000 kg ha<sup>-1</sup> (ANDRAUS; CARDOSO; FERREIRA, 2016; BARROS *et al.*, 2016; HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013; PERES *et al.*, 2016; STEINER; FERREIRA; ZUFFO, 2019).

Apesar disso, a alta demanda do feijoeiro por nitrogênio e a incapacidade da FBN em suprir toda a demanda pelos motivos já citados, faz com que o uso de fertilizantes nitrogenados seja ainda a principal fonte desse nutriente para a cultura, o que garante altos níveis de produção de grãos. Como alternativa à diminuição no uso de fertilizantes nitrogenados, novas estratégias de inoculação têm sido desenvolvidas. Uma delas é a coinoculação da bactéria simbiote do feijoeiro com outras bactérias associativas promotoras do crescimento vegetal. A rizobactéria *Azospirillum brasilense* tem ganhado destaque devido a sua capacidade em produzir reguladores de crescimento vegetal (ácido indolacético, giberilina, citocina, entre outros), que promovem o crescimento radicular e o ganho em biomassa, além de poder proporcionar tolerância a estresses bióticos e abióticos, afetando positivamente plantas mais susceptíveis a estresses como o feijoeiro (FUKAMI *et al.*, 2017, 2018a, 2018b, 2018c; OKUMURA *et al.*, 2013).

O efeito positivo da coinoculação com *Rhizobium tropici* e *Azospirillum brasilense* têm sido demonstrado na cultura do feijoeiro pelo aumento no número e massa seca de nódulos, aumento na biomassa seca de raiz e parte aérea e no rendimento de grãos, em relação a inoculação padrão e plantas que receberam fertilização nitrogenada (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013; PERES *et al.*, 2016; REMANS *et al.*, 2008; STEINER; FERREIRA; ZUFFO, 2019). Além disso, diferentes modos de inoculação (foliar, sulco de cultivo), em diferentes fases de desenvolvimento de culturas como a soja, têm demonstrado ganhos significativos em termos de nodulação e produtividade, em relação a inoculação exclusivamente feita via sementes (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2015a; MORETTI *et al.*, 2018). A inoculação via foliar com *A. brasilense* pode resultar em ganhos de produtividade, que podem estar relacionados com a síntese de reguladores de crescimento vegetal (PUENTE *et al.*, 2018). Esses resultados permitem vislumbrar uma melhor perspectiva na diminuição do

uso de fertilizantes nitrogenados e dos impactos negativos ambientais e econômicos gerados pelo uso excessivo deste.

Diante do exposto acima, esse trabalho tem como objetivo avaliar a inoculação (via semente) e inoculação suplementar tardia (via foliar e linha de plantio) com as bactérias *R. tropici* CIAT 899 e *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 no feijoeiro, a fim de observar seus efeitos na nodulação e na produtividade da cultura.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Cultura do feijoeiro no Brasil e no Mundo

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é a espécie mais cultivada no mundo dentro do gênero *Phaseolus*. Seu centro de origem e de diversidade se encontra na América do Sul e Mesoamérica, mais especificamente na região norte do México e região norte e sul dos Andes, sendo estes os centros de diversidade primária e também dois distintos centros de domesticação do gênero *Phaseolus* (BURLE *et al.*, 2010; DEBOUCK, 1986; GENTRY, 1969). Apesar de não ser o centro de diversidade primário, o Brasil é considerado o centro de diversidade secundário do feijoeiro, não existindo exemplares selvagens em seu território.

Considerado um dos grãos de leguminosas mais consumidos no mundo e uma fonte proteica de baixo custo, o feijão compõe a dieta de diversos países devido, principalmente, a sua alta capacidade nutritiva, sendo o grão rico em proteínas (20%-30%), carboidratos (50%-65%), vitaminas (B9, B1, B2, etc), minerais (boro, ferro, cálcio, magnésio, potássio, molibdênio, entre outros) e uma grande fonte de compostos antioxidantes (COSTA *et al.*, 2006; HAYAT *et al.*, 2014; USDA, 2019). Ao contrário de outros legumes cereais, o feijão possui alta quantidade de aminoácidos essenciais como lisina, que em complementariedade com outros cereais, permite fornecer uma alimentação balanceada (HAYAT, *et al.*, 2014). No Brasil, algumas cultivares do feijoeiro como BRS Ametista, BRS Esteio, BRS Estilo, Pérola, entre outras, possuem teor protéico variando entre 19% a 23% e com altas quantidades de carboidrato (em média 65%) (MELO *et al.*, 2010; PEREIRA, *et al.*, 2014; REZENDE *et al.*, 2018).

A produção de feijão (dry beans) pelo mundo vem aumentando desde o início desse século. A produção mundial e a área de cultivo, entre os anos 2000-2017, aumentaram aproximadamente 43% e 34%, respectivamente, sendo o continente Asiático o maior produtor (45,2%), seguido das Américas (31,2%) e África (20,9%) (FAO, 2019). Os três principais países produtores de feijão são Índia, Myanmar e Brasil com uma produção média de 3,8, 3,2 e 3,0 milhões de toneladas, respectivamente (FAO, 2019).

Como terceiro maior produtor mundial de feijão, o Brasil produz três diferentes tipos de feijão: feijão comum preto, feijão comum cores e feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), sendo o feijão comum preto e cores os mais cultivados. Os

principais estados brasileiros produtores de feijão são Paraná, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso. Nas safras 19/20 e 20/21, a região Sudeste, Centro-Oeste e Sul foram as principais produtoras de feijão comum no Brasil (feijão cores e feijão preto), totalizando uma produção nacional superior a 4 milhões de toneladas (CONAB, 2021).

No Brasil, o feijoeiro é cultivado em três épocas distintas denominadas 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> safra. A primeira safra, também chamada de safra das águas, é colhida entre novembro e março; a segunda safra, também conhecida como safra da seca, onde a cultura é conduzida sob irrigação, é colhida entre abril e julho; e a terceira safra ou safrinha é colhida entre agosto e novembro (POSSE *et al.*, 2010). Geralmente, a produção é maior na safra da seca devido a suscetibilidade do feijoeiro ao excesso de água e a doenças. No entanto, nas safras 19/20 e 20/21, a produção foi maior na 1<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> safra (safra das águas e safrinha, respectivamente) (CONAB, 2021).

## **2.2. Nitrogênio e fertilizantes minerais sintéticos: produção, importância e impactos ambientais**

A produção de fertilizantes foi uma das tecnologias que influenciou o crescimento da população mundial. Estima-se que, graças ao desenvolvimento do processo de Harber-Bosch (produção de amônia a partir do N<sub>2</sub> atmosférico, sob alta pressão e temperatura), a população mundial cresceu aproximadamente 40% (ERISMAN *et al.*, 2008). A disponibilidade de fertilizantes foi responsável pelo aumento de 30%-50% da produtividade mundial, o que possibilitou uma produção agrícola suficiente para sustentar a crescente população e permitir uma melhor segurança alimentar (ERISMAN *et al.*, 2007; 2008). Estimativas apontam que, sem a produção do fertilizante nitrogenado sintético, a população mundial estaria por volta dos quatro bilhões de pessoas (ERISMAN *et al.*, 2008).

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de diversas culturas agrícolas e, conseqüentemente, a demanda por fertilizantes minerais sintéticos no país é crescente, sendo a grande parte desses insumos obtidos por meio de importações (FAO, 2019). De acordo com os dados da FAO (2019), entre os anos de 2015 e 2017, a demanda por fertilizantes na agricultura brasileira aumentou em mais de 1,5 milhões de toneladas (FAO, 2019). Sendo incapaz de produzir toda demanda de fertilizantes, o Brasil importou 3,3 mil toneladas de fertilizantes em 2019, representando um aumento de 25,5% em relação a 2018 (ANDA, 2019) (FIGURA 1).

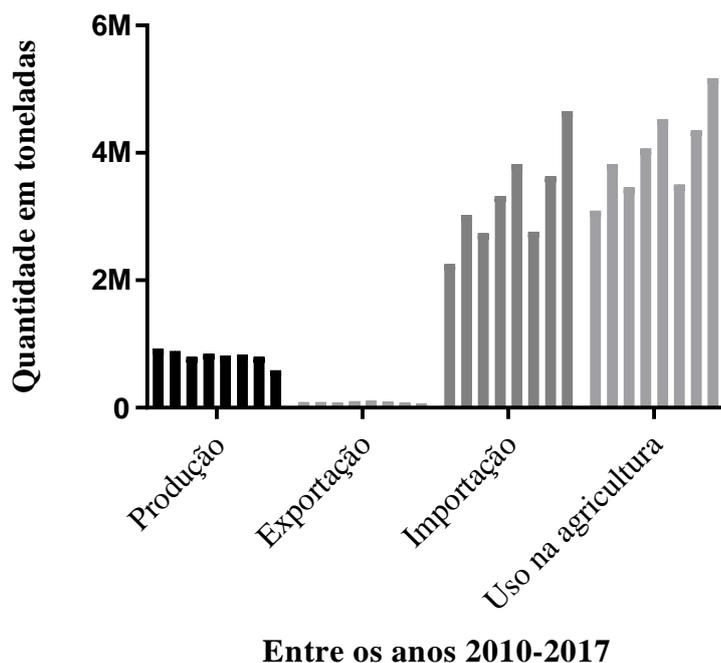


Figura 1. Produção, exportação, importação e uso na agricultura de fertilizantes nitrogenados no Brasil entre os anos de 2010 e 2017. Os dados são provenientes da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (2019).

Por ser uma planta com sistema radicular pequeno, pouco profundo e possuir ciclo de vida curto, a cultura do feijoeiro é muito exigente em nutrientes, principalmente o nitrogênio (N). A maior parte do N absorvido pelo feijoeiro é armazenado nas folhas e, posteriormente ao estágio reprodutivo, as folhas entram em estágio de senescência e inicia-se o processo de translocação de nutrientes para os grãos (SANT'ANA; SANTOS; SILVEIRA, 2011). O maior fornecimento de nitrogênio reflete diretamente no aumento da biomassa seca das folhas e, conseqüentemente, na qualidade nutritiva do grão, evidenciando que esse nutriente é um fator limitante na produtividade dessa cultura (ANDRADE *et al.*, 1998; BARBOSA *et al.*, 2010; FARINELLI; LEMOS, 2010; PEREZ *et al.*, 2013).

Segundo NETTO *et al.* (1971), o nitrogênio é o nutriente mais absorvido e mais translocado, sendo que aproximadamente 30% do N absorvido é transportado nos grãos. A produtividade do feijoeiro está diretamente relacionada com a quantidade de nitrogênio fornecida e o modo como esse nitrogênio é aplicado. Na cultivar Pérola, por exemplo, PEREZ *et al.*, (2013) obtiveram uma maior produtividade e maior exportação de nutrientes (nitrogênio e potássio) para os grãos quando foram aplicados 120 kg/ha de N em cobertura e na pré-semeadura. Em relação ao custo total de produção do feijoeiro,

os fertilizantes são responsáveis por 16% do custo de produção por hectare, sendo o segundo maior gasto depois dos produtos fitossanitários (CONAB, 2021).

Apesar da demanda crescente por fertilizante nitrogenado, 30% a 50% do total de N aplicado é convertido em produção agrícola, sendo que 50% a 70% são perdidos para o meio ambiente (XIAO *et al.*, 2019). O uso excessivo de fertilizantes nitrogenados aumenta a taxa de emissão de compostos como  $N_2O$ ,  $NH_3$  e  $NO$ , o que torna as atividades agrícolas um dos maiores responsáveis pela emissão de gases  $NO_x$  na atmosfera, totalizando aproximadamente 60% das emissões (CIAIS *et al.* 2013; FAO, 2014). A eficiência de assimilação do nitrogênio varia de acordo com o tipo de fertilizante nitrogenado, sendo que nenhum deles possuem uma eficiência de 100%. A ureia, por exemplo, perde cerca de 10%-15% de N por meio da emissão de  $NH_3$  e  $NO$  a atmosfera (ERISMAN *et al.*, 2007).

A baixa eficiência de assimilação do nitrogênio somada ao uso contínuo de fertilizantes ao longo dos anos, resulta em sérias consequências ao meio ambiente. O excesso de nitrogênio sintético pode levar a eutrofização de corpos d'água, acidificação dos ambientes aquáticos e terrestres, formação de chuvas ácidas, emissão de gases do efeito estufa ( $N_2O$ ,  $NH_3$ ), afetar a qualidade da água potável e modificar o ciclo do nitrogênio (ERISMAN *et al.*, 2007; 2008; FENN *et al.*, 2003; SMITH; MCTAGGART; TSURUTA, 1997). A emissão desses gases que contribuem para o efeito estufa variam com o tipo do fertilizante, o clima, condições ambientais locais e com os manejos da cultura (ERISMAN *et al.*, 2007). Portanto, é necessário o desenvolvimento de um sistema de manejo integrado dos nutrientes para manter a produtividade e evitar danos ao meio ambiente.

### **2.3. Visão geral da fixação biológica de nitrogênio em leguminosas**

Plantas da família Fabaceae (ou Leguminosae) do grupo das angiospermas, popularmente conhecida como leguminosas, são conhecidas pela capacidade de interagir, por meio de uma relação de simbiose, com um grupo de bactérias gram-negativas do solo, pertencentes as classes *Alphaproteobacteria* ou *Betaproteobacteria*, nominadas de modo geral como rizóbios (HAAG *et al.*, 2012). Por meio do complexo enzimático nitrogenase, as bactérias diazotróficas (fixadoras de nitrogênio atmosférico) são capazes de reduzir o  $N_2$  atmosférico em amônia ( $NH_3$ ), sendo essa a principal fonte de nitrogênio assimilável pelas plantas. Nessas plantas, o processo de fixação biológica

ocorre em estruturas especializadas denominadas nódulos, onde o hospedeiro fornece proteção e fotoassimilados em troca de fonte assimilável de nitrogênio (FERGUSON *et al.*, 2010; HAAG *et al.*, 2012).

Para que ocorra a formação dos nódulos é necessário que ocorra uma comunicação, por meio de sinais moleculares, entre a planta hospedeira e a bactéria. A planta hospedeira libera compostos flavonoides na rizosfera, que são reconhecidos pelas bactérias por meio de uma proteína intracelular denominada NodD (DEL CERRO *et al.*, 2015b). O tipo de flavonóide excretado irá determinar a especificidade da comunicação com diferentes espécies de bactérias. Após o reconhecimento pelas proteínas NodD, ocorre a indução da transcrição do cassete dos genes de nodulação (genes *Nod*), onde estão os genes NodABC, responsáveis pela síntese dos lipoquitoligosacarídeos (LCOs) (DEL CERRO *et al.*, 2019). Os fatores de nodulação são reconhecidos por receptores encontrados na epiderme das células do pelo radicular, onde se inicia processos bioquímicos, como o influxo de cálcio, que irá modificar a polaridade da membrana da célula, causando uma reorganização do citoesqueleto e encurvamento do pelo radicular, onde os rizóbios permanecerão até a formação do nódulo. O aumento da concentração dos fatores de nodulação leva a uma remodelagem das células do pelo radicular, formando o tubo de infecção e, posteriormente, o primórdio nodular. Os fatores de nodulação estimulam a divisão celular das células do primórdio nodular, que somados com a influência de reguladores do crescimento vegetal como auxina e citosinina, levam ao desenvolvimento dos nódulos (FERGUSON *et al.*, 2010; HAAG *et al.*, 2012).

Diversos fatores podem influenciar a eficiência do processo de nodulação e, por consequência, ter impacto sobre a FBN. Flutuações no pH do solo, disponibilidade de nutrientes e água, temperatura, tipo de solo, estágio vegetativo da planta hospedeira, entre outros, podem afetar o crescimento, a sobrevivência e a fixação de nitrogênio pelas bactérias. O complexo enzimático nitrogenase também pode ser inibido pela alta concentração de oxigênio e pela concentração de nitrogênio disponível no solo (MOHAMMADI *et al.*, 2012). Por inibir a atividade da nitrogenase, o oxigênio é controlado por mecanismos físicos (barreiras estruturais com baixa difusão de oxigênio no nódulo) e mecanismos bioquímicos (expressão da enzima leghemoglobina), que diminui a concentração de oxigênio na zona de fixação de nitrogênio (LUQUEÑO *et al.*, 2008).

A presença dos nódulos nas raízes é regulada por fatores moleculares e ambientais que podem levar a sua senescência ou até inibir sua formação. A planta hospedeira e a bactéria simbiote podem sintetizar compostos que, juntamente com a participação de hormônios como etileno e ácido abscísico, inativam fatores de transcrição responsáveis pela ativação de genes que atuam na formação e desenvolvimento do nódulo. Além dessas moléculas, a formação e senescência dos nódulos são influenciadas pela quantidade de nitrogênio disponível no solo. A presença de nitrato no solo pode induzir a produção de um peptídeo, que também inibe fatores de transcrição que estão relacionados com a ativação de genes responsáveis pela nodulação da raiz (FERGUSON *et al.*, 2010; PUPPO *et al.*, 2005).

### 2.3.1. Fixação biológica de nitrogênio no feijoeiro

Uma importante característica do feijoeiro é a capacidade de realizar simbiose com alguns gêneros do grupo dos rizóbios. As principais espécies descritas como nodulantes e microssimbiontes eficientes do feijoeiro pertencem ao gênero *Rhizobium*, sendo elas: *Rhizobium etli* (SEGOVIA; YOUNG; MARTINEZ-ROMERO, 1993), *R. gallicum* e *R. giardinii* (AMARGER; MACHERET; LAGUERRE, 1997), *R. leguminosarum* (GRANGE *et al.*, 2007) e *R. tropici* (MARTÍNEZ-ROMERO *et al.*, 1991). Todas essas bactérias são capazes de efetuar nodulação e FBN e são encontradas em solos brasileiros, com exceção da espécie *R. gallicum* (AMARGER; MACHERET; LAGUERRE, 1997; GRANGE *et al.*, 2007; VAN BERKUM; BEYENE; EARDLY, 1996). A espécie *R. etli* é a bactéria mais encontrada nos dois centros de diversidade do feijoeiro e, juntamente com a espécie *R. tropici*, são as bactérias simbiotes do feijão mais comuns em solos brasileiros. A nodulação pela espécie *R. etli* é ineficiente, ao contrário da *R. tropici* que é capaz de sobreviver a solos ácidos e em altas temperaturas (GRANGE *et al.*, 2007; MARTÍNEZ-ROMERO *et al.*, 1991).

Além das espécies citadas, outras bactérias do gênero *Rhizobium* tem sido identificadas como simbiotes primárias do feijão como *R. lusitanum* (VALVERDE *et al.*, 2006), *R. multihospitium* (HAN *et al.*, 2008), *R. phaseoli* (RAMÍREZ-BABENA *et al.*, 2008), *R. mesoamericanum* (LÓPEZ-LÓPEZ *et al.*, 2012), *R. leucaenae* (RIBEIRO *et al.*, 2012), *R. ecuadorensis* (RIBEIRO *et al.*, 2015), *R. vallis* (WANG *et al.*, 2011), *R. paranaense* (DALL'AGNOL *et al.*, 2014) e *R. freirei* (DALL'AGNOL *et al.*, 2014), *R. radiobacter*, *R. acidisoli*, *R. pusense*, *R. miluonense* (OLIVEIRA-FRANCESQUINI *et al.*, 2017), *R. aethiopicum* (ASERSE *et al.*, 2017), *R. azibense* (MNASRI *et al.*, 2014),

*R. chutanense* (HUO *et al.*, 2019), *R. esperanzae* (CORDEIRO *et al.*, 2017), *R. hidalgonense* (YAN *et al.*, 2017), sendo as espécies *R. leucaenae*, *R. paranaense* e *R. freirei* encontradas em solos brasileiros.

Todavia, o feijoeiro é capaz de nodular e fixar nitrogênio da atmosfera em taxas variáveis de eficiência, realizando simbiose com bactérias pertencentes a outros gêneros. Por isso, o feijoeiro é considerado um hospedeiro não específico, ou seja, de baixa especificidade hospedeira. Alguns exemplos dessas bactérias são: *Mesorhizobium loti*, *Azorhizobium caulinodans*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Sinorhizobium meliloti*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Paraburkholderia nodosa*, *P. tuberum* e *Cupriavidus necator* (MICHIELS *et al.*, 1998; CARDOSO *et al.*, 2012; DALL'AGNOL *et al.*, 2017). Apesar de, em alguns casos, terem sido isoladas de outras hospedeiras, essas espécies foram capazes de se associarem com o feijão formando nódulos (CARDOSO; HUNGRIA; ANDRADE, 2012; MICHIELS *et al.*, 1998).

Devido ao grande número de bactérias capazes de se associar com o feijoeiro, a cultura é conhecida por ser um hospedeiro promíscuo, sendo essa promiscuidade resultado do reconhecimento de uma grande variedade de fatores de nodulação produzidos por diferentes rizóbios e pela grande variedade de flavonoides, e outros compostos sinalizadores, produzidos pela planta. A promiscuidade aumenta a competição entre a bactéria inoculada e os rizóbios nativos do solo, que reflete na baixa eficiência de fixação de nitrogênio devido a formação de nódulos que não fixam N<sub>2</sub> atmosférico tão eficientemente quanto as estirpes selecionadas para os inoculantes (DEL CERRO *et al.*, 2015a; MICHIELS *et al.*, 1998).

Em experimento realizado por Vargas, Mendes e Hungria (2000) foi observado que em solos onde existe uma população estabelecida de rizóbios, a inoculação com estirpes comerciais não teve nenhum efeito em relação ao número e peso de nódulos, sendo que a população encontrada nos nódulos era composta por 90% de rizóbios nativos. Todos esses rizóbios nativos são potenciais competidores no processo de nodulação, sendo mais adaptados aquele ambiente do que as bactérias comercializadas como inoculante (FERREIRA *et al.*, 2013). Portanto, a eficiência da fixação biológica de nitrogênio pode ser muito afetada, visto que a maioria dos nódulos formados contém rizóbios nativos ineficientes.

Existem três estirpes de bactérias autorizadas para uso em formulações de inoculantes para o feijoeiro no Brasil, sendo elas: *Rhizobium tropici* CIAT 899, *R. tropici* SEMIA 4088 (=H12) e *R. freirei* (PRF81) (BRASIL, 2011). Todas foram selecionadas, em programas de pesquisa da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), pela sua estabilidade de interação e maior eficiência de fixação de nitrogênio em solos brasileiros. A depender da cultivar, a inoculação dessas estirpes no feijoeiro tem resultado em produtividades variáveis, porém significativas, variando de 1250 kg ha<sup>-1</sup> a 4613 kg ha<sup>-1</sup>, igualando ou superando a produtividade em relação ao controle nitrogenado (BARROS *et al.*, 2018; ANDRAUS; CARDOSO; FERREIRA, 2016). Comparadas com outras cultivares, as cultivares BRS Estilo, BRS Agreste, BRS Pontal e Pérola atingiram valores altos em produtividade quando inoculadas com essas bactérias comerciais, o que pode indicar uma interação simbiótica mais eficiente (ANDRAUS; CARDOSO; FERREIRA, 2016). Segundo Moreira *et al.* (2017), quanto maior o teor de N nas folhas derivados da FBN, maior será a produtividade, indicando que uma melhor eficiência de interação simbiótica resulta em produtividades maiores, diminuindo mais de 50% o uso de fertilizantes nitrogenados.

Devido a essa variação na produtividade do feijoeiro, diversos outros trabalhos têm focado na seleção de novas estirpes que apresentam uma melhor eficiência simbiótica, maior competitividade e estabilidade genética para formulação de inoculantes, além da busca por cultivares do feijoeiro que respondem melhor a interação com esses simbiossiontes (ANDRAUS; CARDOSO; FERREIRA, 2016; FONSECA *et al.*, 2013; MERCANTE; OTSUBO; BRITO, 2017; MOREIRA; OLIVEIRA; FERREIRA, 2017). Mercante, Otsubo e Brito (2017) avaliaram 630 isolados do gênero *Rhizobium*, onde identificou três estirpes com potencial de comercialização como inoculante. Moreira, Oliveira e Ferreira (2017) avaliaram 70 isolados pertencentes a espécie *R. tropici* e baseado na nodulação, eficiência de fixação de nitrogênio e incrementos na produtividade, selecionou a estirpe JPrG10A6 com potencial para ser usado em inoculantes comerciais.

A bactéria *R. tropici* CIAT 899 possui outras características importantes para o sucesso da simbiose bactéria/hospedeiro. Além de possuir o maior número de genes *nod* (responsáveis pela síntese e regulação da expressão gênica dos fatores de nodulação), essa bactéria produz uma ampla diversidade de fatores de nodulação. Dos cinco genes *nodD* encontrados em *R. tropici* CIAT 899, pelo menos quatro são responsáveis pelo

processo de nodulação, sendo ativados de diferentes formas, muitas vezes na ausência de flavonoides, e possuindo diferentes funções de acordo com a planta hospedeira e às condições abióticas. A quantidade e a diversidade dos fatores de nodulação produzidos dependem muito do ambiente de crescimento da bactéria (DEL CERRO *et al.*, 2015a, 2015b). Essas características fazem com que a bactéria *R. tropici* CIAT 899 também associe com outros hospedeiros além do feijão.

De acordo com Guasch-Vidal *et al.* (2013), alguns dos genes nodD de *R. tropici* CIAT 899 são expressos quando a bactéria é exposta a condições ácidas e salinas de maneira independente, ou seja, sem a necessidade de reconhecimento dos flavonóides exsudados pelas raízes das plantas. Além dos flavonóides e das condições abióticas, a expressão dos genes nodD na espécie *R. tropici* CIAT 899 pode ser ativada sem a necessidade de ocorrer nenhuma indução por molécula (DEL CERRO *et al.*, 2015a). Portanto, dependendo das condições ambientais, um gene nodD pode regular a expressão de outros genes nodD envolvidos nos processos de nodulação, e também nos processos que envolvem a síntese de AIA e motilidade. Por exemplo, na interação com o feijoeiro, os genes nodD1 e nodD2 são os mais importantes na ativação dos processos de nodulação. Porém, a depender das condições ambientais, os genes nodD3, nodD4 e nodD5 podem estar envolvidos na regulação desses dois principais genes, variando as formas e a diversidade dos fatores de nodulação produzidos (DEL CERRO *et al.*, 2015b, 2015a).

### 2.3.2. Fatores que afetam a fixação biológica de nitrogênio no feijoeiro

Além da baixa especificidade hospedeira do feijoeiro, associada ao grande número de bactérias nativas que podem nodular com essa cultura em nossos solos, no geral, a fixação biológica de nitrogênio no feijoeiro pode ser influenciada por: 1) fatores fisiológicos do hospedeiro; 2) fatores edafoclimáticos; e 3) estresses abióticos e bióticos. Os fatores fisiológicos do hospedeiro que podem influenciar na FBN estão relacionados com o fornecimento de fontes de carbono para as bactérias no nódulo, quantidade relativa de nitrogênio absorvido do solo e época de florescimento da cultivar (GRAHAM, 1981; FERREIRA *et al.*, 2013). Adicionalmente, de acordo com Singh (1992), a nodulação e a eficiência simbiótica da fixação biológica de nitrogênio no feijoeiro é altamente influenciada pela a) falta de interação e especificidade entre a planta e rizóbio, b) pela competição entre bactérias eficientes e ineficientes capazes de

nodular o feijoeiro e c) pela concentração de nitrogênio disponível no solo ou fornecido como fertilizante nitrogenado.

A presença de rizóbios nativos, altamente competitivos, porém com baixa capacidade fixadora, é a principal causa da baixa eficiência da FBN associada ao feijoeiro no Brasil. Como discutido anteriormente, diversos gêneros e espécies de rizóbios são capazes de interagir com o feijoeiro formando nódulos e/ou fixando nitrogênio em taxas variáveis de eficiência (MICHIELS *et al.*, 1998; CARDOSO *et al.*, 2012). A capacidade do feijoeiro se associar com diversos rizóbios é resultado da sua capacidade em reconhecer uma grande variedade de fatores de nodulação produzidos por essas bactérias. Essa promiscuidade aumenta a competição entre a bactéria inoculada e os rizóbios nativos do solo, o que reflete na baixa eficiência de fixação de nitrogênio devido à formação de nódulos que não fixam N<sub>2</sub> atmosférico tão eficientemente quanto os formados pelas estirpes selecionadas e empregadas na fabricação dos inoculantes (MICHIELS *et al.*, 1998; DEL CERRO *et al.*, 2015a).

Os rizóbios nativos podem ser mais adaptados aos ambientes das lavouras do que as bactérias comercializadas como inoculantes (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2003; FERREIRA *et al.*, 2013; BRITO *et al.*, 2015). Por esse motivo, a eficiência da FBN pode ser comprometida, visto que a maioria dos nódulos formados pode conter rizóbios nativos ineficientes. No entanto, é importante salientar que o uso de estirpes selecionadas e cultivares responsivos, associados a boas práticas de inoculação, podem gerar respostas positivas.

Os fatores edafoclimáticos envolvem o tipo de solo, fertilidade do solo, temperatura e acidez do solo. A fertilidade do solo influencia diretamente o desenvolvimento dos nódulos e os processos de fixação biológica, principalmente os nutrientes P, K, S, Mo, Mg, Co, Fe, Mn, entre outros. Além de serem essenciais ao desenvolvimento do hospedeiro, esses macros e micronutrientes estão envolvidos na formação e funcionamento dos nódulos, como cofatores de enzimas ou como parte estrutural das principais enzimas e proteínas envolvidas em todo processo de fixação de nitrogênio, como por exemplo o complexo enzimático dinitrogenase, a enzima nitrato redutase e leghemoglobina (DIVITO; SADRAS, 2014; GRAHAM, 1981; WERIA; YAGHOUB; ALLAHVERDIPOOR, 2013).

A presença de nitrogênio mineral em excesso pode prejudicar o estabelecimento da relação simbiótica do feijoeiro com os rizóbios e diminuir a eficiência da FBN (VARGAS; MENDES; HUNGRIA, 2000). Os efeitos negativos das altas concentrações de nitrogênio no solo estão mais relacionados com a nodulação, diminuindo o número e a massa dos nódulos, principalmente quando o fornecimento de N for superior a 60 kg ha<sup>-1</sup> (VARGAS; MENDES; HUNGRIA, 2000; BRITO *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2016). O estímulo para iniciar o processo de nodulação no feijoeiro é dependente do teor de N mineral no solo e o aumento da disponibilidade desse nutriente pode inibir a formação e o crescimento dos nódulos (STEINER *et al.*, 2019). Em estudo conduzido por Barros *et al.* (2017) foi observado que a adubação nitrogenada com 60 kg N ha<sup>-1</sup> (20 kg ha<sup>-1</sup> na semeadura + 40 kg ha<sup>-1</sup> em cobertura) associada com a inoculação com *R. tropici* não inibiu a nodulação e proporcionou alto rendimento de grão (cerca de 2.500 kg ha<sup>-1</sup>). Esse estudo evidencia que altos rendimentos podem ser obtidos combinando a inoculação com estirpes elite e doses mais baixas de N-fertilizante do que as usualmente empregadas.

Características comuns em solos tropicais, a acidez e a alta temperatura são fatores que podem afetar negativamente a eficiência da FBN. Esses fatores podem inibir o crescimento populacional bacteriano, diminuir a colonização da rizosfera e inibir a formação de nódulos eficientes (FERREIRA *et al.*, 2012; HUNGRIA; FRANCO, 1993). O pH ideal do solo para o crescimento dos rizóbios varia de 6,0 a 7,0, sendo a nodulação comprometida em solos com pH abaixo de 5,5 (BORDELEAU; PRÉVOST, 1994; GRAHAM *et al.*, 1994). Geralmente, a temperatura ótima para os rizóbios realizarem FBN em interação com o feijoeiro varia de 25°C a 30°C (ALEXANDRE; OLIVEIRA, 2013). Porém, estirpes tolerantes a altas temperaturas, selecionadas em solos tropicais para nodular o feijoeiro, demonstraram capacidade de nodulação em temperaturas variando de 35°C a 38°C, além de acumular a mesma quantidade de N nas folhas que o controle nitrogenado (HUNGRIA; FRANCO, 1993; HUNGRIA; FRANCO; SPENT, 1993). Tais características contribuem para o sucesso da inoculação em solos tropicais.

O estresse causado pelo déficit de água e solos salinos afetam tanto o hospedeiro quanto a simbiose com rizóbios. Solos mais agregados, como solos argilosos, possuem poros menores, o que favorece a retenção de água e torna o ambiente mais favorável para crescimento dos rizóbios. Na ausência de água ou em condições de salinidade alta,

a permeabilidade de oxigênio para os nódulos diminui e aumenta a concentração de hormônios relacionados ao estresse como ácido abscísico (GRAHAM, 1981; MOHAMMADI *et al.*, 2012). De acordo com Ramos *et al.* (2003), o estresse hídrico no feijoeiro leva a diminuição na atividade da nitrogenase, danos na membrana dos bacterióides e senescência dos nódulos, o que diminuiu drasticamente a eficiência da FBN.

A senescência precoce dos nódulos no feijoeiro é outro fator que influencia no ganho de produtividade da cultura. A depender da cultivar, o início da senescência no feijoeiro se inicia por volta de 35-40 dias após o plantio, com senescência total após 65-70 dias, onde a planta está na fase entre o florescimento e início do enchimento dos grãos (FERNÁNDEZ-LUQUEÑO *et al.*, 2008; LUQUEÑO *et al.*, 2008; VIKMAN; VESSEY, 1993). Cultivares com ciclo de crescimento diferentes respondem de formas variadas aos processos de nodulação e nos ganhos em produtividade. Segundo Andraus, Cardoso e Ferreira (2016), cultivares de ciclo precoce e semi-precoce, quando inoculadas com estirpes comerciais de *Rhizobium tropici*, mantem nódulos ativos em até três dias a mais que cultivares com ciclo de vida regular. Cultivares com ciclo de crescimento regular, como BRS Estilo e Pérola, atingem o número máximo de nódulos ativos (60%) durante os estágios de desenvolvimento V4 a R5, começando a decrescer no estágio R6 e no estágio R7 de desenvolvimento ocorre a senescência (ANDRAUS; CARDOSO; FERREIRA, 2016).

Os principais processos moleculares e bioquímicos envolvidos no processo de senescência dos nódulos do feijoeiro são: diminuição da expressão gênica dos genes que sintetizam as enzimas glutamina sintetase e uricase, diminuição na expressão de genes envolvidos nos processos de degradação de espécies reativas de oxigênio, degradação da proteína leghemoglobina e aumento da expressão de genes envolvidos na produção de fitohormônios como etileno, ácido abscísico, ambos envolvidos na sinalização dos processos de senescência (da SILVA *et al.*, 2019).

De acordo com Luqueño *et al.* (2008), quanto maior o tempo de permanência dos nódulos ativos nas raízes, maior a produtividade do feijão. Portanto, técnicas que visam aumentar a permanência dos nódulos ou induzir a formação de novos nódulos devem ser estudadas para aumentar a produtividade do feijoeiro.

## 2.4. Rizobactérias promotoras do crescimento vegetal

Rizosfera é toda região do solo influenciada pela atividade biológica das raízes das plantas. É considerada um dos microecossistemas mais diversos do planeta, chegando a possuir 30 mil espécies de procariotos, sendo as bactérias os microrganismos mais abundantes (ALI *et al.*, 2017). A comunidade de microrganismos que vive associada a rizosfera é atraída por compostos excretados pelas plantas, denominados exsudatos. Os exsudatos são agentes quimiotáticos que agregam uma comunidade microbiana hospedeiro-específico (de acordo com os compostos liberados, fase vegetativa e tipo de solo), que podem ou não favorecer o crescimento vegetal (COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010; LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009). As Rizobactérias Promotoras do Crescimento Vegetal (RPCV) são bactérias do solo que, quando associadas as plantas hospedeiras, são capazes de estimular o crescimento e desenvolvimento vegetal (VESSEY, 2003). Essas bactérias podem ser de vida livre ou estarem associadas as raízes das plantas, seja de modo endofítico, epifítico ou por meio de estruturas altamente especializadas denominadas de nódulos.

A promoção do crescimento vegetal pode ser classificada em mecanismos diretos e indiretos. Os mecanismos diretos de promoção de crescimento envolvem a disponibilização de nutrientes (principalmente N, P e K) por meio da FBN, solubilização de nutrientes (principalmente fosfato e potássio) e produção de sideróforos; produção de fitohormônios como ácido indolacético (AIA), giberilina, citocininas, etileno, ácido abscísico, entre outros. Já os mecanismos de promoção de crescimento indiretos envolvem tolerância a estresses bióticos, como tolerância a fitopatógenos, produção de sideróforos, indução de resistência e biocontrole (produção de toxinas, compostos fenólicos, antibióticos e outros compostos inibidores de crescimento); e abióticos que envolvem tolerância ao estresse hídrico e estresse salino, entre outros (COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010; HAYAT, R. *et al.*, 2010; JHA; SARAF, 2015; SINGH, 2015) (FIGURA 2).

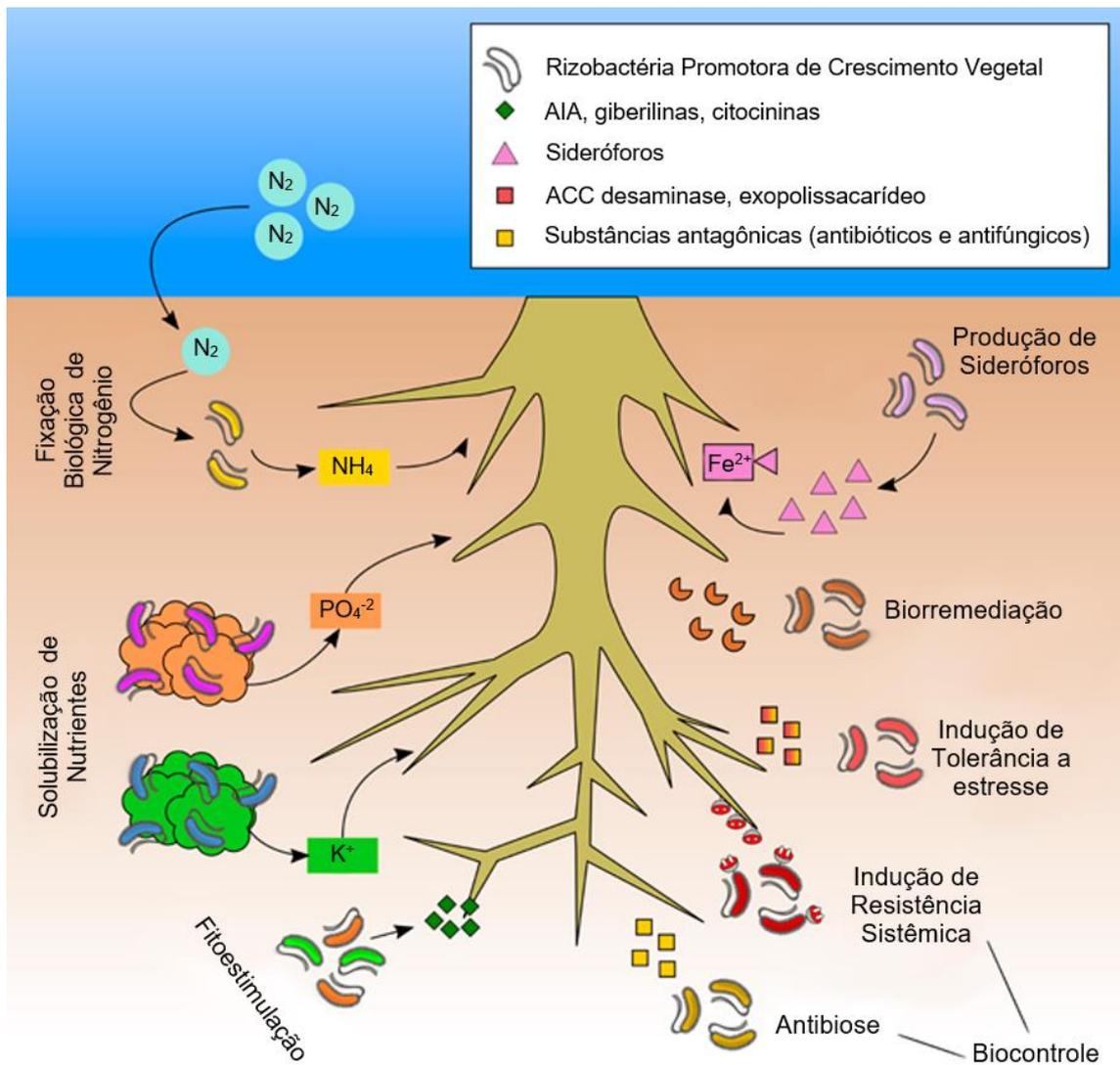


Figura 2. Mecanismos diretos e indiretos da promoção do crescimento vegetal, promovidos por rizobactérias, que auxiliam o crescimento e desenvolvimento vegetal por meio de interações no ambiente da rizosfera. (Figura de autoria própria).

Diversas espécies de RPCV, simbióticas, associativas ou de vida livre, são utilizadas, em formulações de inoculantes, em culturas agrícolas de importância econômica como arroz, cana-de-açúcar, milho, trigo, entre outras. As RPCV pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Glucanoacetobacter*, *Serratia*, *Azospirillum* e *Rhizobium*, são as mais estudadas devido as suas características promotoras do crescimento vegetal como biofertilizantes (solubilização de nutrientes como fósforo, potássio e FBN), biocontrole de fitopatógenos (com destaque para *Pseudomonas* e *Bacillus*) e como importantes reguladores do crescimento vegetal pela síntese de fitohormônios (MEENA *et al.*, 2017; BHATTACHARYYA; JHA, 2012; VEJAN *et al.*, 2016).

As bactérias que nodulam plantas da família Leguminosae, conhecidas como rizóbios, são promotoras de crescimento vegetal e, além da fixação biológica de nitrogênio, podem ser capazes de favorecer o aumento da absorção de nutrientes pela planta, aumentar a tolerância do hospedeiro a doenças (controle biológico), favorecer a germinação e desenvolvimento vegetal, aumentar a tolerância ao estresse hídrico, entre outras (ASERSE *et al.*, 2019; BISWAS; LADHA; DAZZO, 2000; HAFEEZ *et al.*, 2004; KUMAR; DUBEY; MAHESHWARI, 2011).

A inoculação das plantas com microrganismos promotores de crescimento pode promover o crescimento vegetal e aumentar a produtividade das culturas (BHARDWAJ *et al.*, 2014). Além disso, os produtos metabólicos dessas bactérias em associação direta ou não com a planta hospedeira podem agir como biofertilizantes, pesticidas e possuir papel de biorremediação, sendo responsável pela diminuição no uso de fertilizantes e agrotóxicos e, assim, diminuindo os impactos causados pelo uso excessivo desses insumos agrícolas (SINGH, 2015).

#### 2.4.1. *Azospirillum*

Apesar da capacidade de fixação biológica já evidenciada em espécies do gênero *Azospirillum*, suas vantagens vão além disso (KASCHUK & HUNGRIA 2017; FUKAMI, *et al.* 2018a). Essas bactérias têm sido relatadas como importantes promotoras de crescimento vegetal, principalmente pela produção de reguladores de crescimento vegetal. A produção desses fitohormônios varia de acordo com a espécie e com as cepas. Por exemplo, na presença de triptofano os fitohormônios da classe das auxinas como ácido indolacético (AIA), ácido indoláctico (ILA) e indole-3-ethanol (TOL) e o fitohormônio ácido salicílico (AS) foram produzidos por *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 (FUKAMI *et al.*, 2017; MOGHADDAM; EMTIAZI; SALEHI, 2012). De acordo com Fukami *et al.* (2018a), a cepa Ab-V6, comparada com a cepa Ab-V5, produz 220% e 50% a mais de ácido indolacético (AIA) e ácido salicílico (AS), respectivamente. Outras cepas como 42M, 40M, Sp7, Cd, Az39, Yu62 e Sp245, da espécie *A. brasilense*, também produziram compostos indólicos na presença de triptofano, chegando a 41,5 ug/ml de AIA na cepa Yu62 (DI SALVO *et al.*, 2014; MASCIARELLI *et al.*, 2013).

Bactérias do gênero *Azospirillum* são capazes de promover tolerância a estresses abióticos e bióticos como tolerância ao estresse hídrico (CURÁ *et al.*, 2017) e a salino (FUKAMI *et al.* 2018b; FASCIGLIONE *et al.* 2015). Quando submetidas a esses

estresses abióticos, uma série de fatores enzimáticos são ativados na planta, como a produção de enzimas antioxidantes como ascorbato peroxidase (APx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), entre outras. Essas enzimas são produzidas para diminuir os danos causados pelas espécies reativas do oxigênio como hidroxilas (OH<sup>-</sup>), radicais superóxidos (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (FUKAMI *et al.* 2018c). As sínteses dessas enzimas podem ser reguladas por moléculas de sinalização e/ou fitohormônios, produzidos por *Azospirillum* spp., como ácido abscísico (ABA), ácido salicílico e ácido jasmônico, que atuam, direta ou indiretamente, na ativação das vias de defesa, diminuindo os efeitos negativos gerados pelo estresse (ANJUM *et al.* 2011; KUMARI *et al.* 2006; HASANUZZAMAN *et al.* 2014; YADAVA *et al.* 2013; VURUKONDA *et al.* 2016).

Bactérias do gênero *Azospirillum* podem induzir resistência e tolerância sistêmica contra fitopatógenos por meio de modificações nas propriedades bioquímicas e fisiológicas da planta, pelos mesmos mecanismos apresentados para o estresse abiótico, que envolvem a produção de enzimas antioxidantes e a produção de fitohormônios, além de induzir a expressão das proteínas relacionadas com a patogênese (PR), o que permite que as plantas ativem seus mecanismos de defesas rapidamente, diminuindo os efeitos negativos causados pelos fitopatógenos (FUKAMI *et al.* 2018c).

Devido a todas essas características de promoção de crescimento citadas, estirpes de *A. brasilense* foram selecionadas para uso em formulações de inoculantes pela Embrapa Soja, sendo as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 recomendadas para gramíneas como arroz, milho e trigo desde 2011, podendo gerar uma economia de até US\$ 2 bilhões por ano (HUNGRIA, 2011).

#### 2.4.2. *Inoculantes: aspectos gerais*

A produção de inoculantes no Brasil é regida pela Lei nº 6.894, de 16 de dezembro de 1980, que dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes, estimulantes ou biofertilizantes, remineralização e substratos para plantas, destinados a agricultura. A instrução normativa SDA Nº 13 de março de 2011, estabelece as normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados a agricultura, dão garantia da melhor eficiência desses inoculantes para produção agrícola.

Além das normas de produção e comercialização, são necessários alguns requisitos para garantir o sucesso do inoculante no desenvolvimento vegetal. Para isso, algumas características fundamentais são necessárias como: 1) selecionar estirpes que abrangem várias culturas; 2) permitir o crescimento do microrganismo alvo e sobrevivência deste durante o processo de armazenamento e aplicação; 2) garantir o número de células microbianas viáveis em uma boa condição fisiológica por um período de tempo aceitável; e 3) possuir a concentração de células microbianas garantida durante a inoculação no campo, para obter a resposta esperada do inóculo (BASHAN *et al.*, 2014). Além disso, são necessários estudos para entender a dinâmica dos microrganismos na rizosfera e detectar todos os fatores que podem influenciar os processos envolvidos no estímulo do crescimento das plantas e atividade de biocontrole para contornar problemas como a inconsistência na performance dos inoculantes em campo (SANTOS *et al.*, 2011).

Um dos maiores problemas relacionados a eficiência de ação dos inoculantes é o rápido declínio do tamanho populacional das células ativas. Esse declínio está relacionado com fatores bióticos e abióticos como: textura, pH, temperatura e umidade do solo, predação por protozoários e competição por substrato e nichos por bactérias nativas do solo. Esses fatores contribuem com a inibição da colonização do inóculo no ambiente da rizosfera (SANTOS *et al.*, 2011). Segundo Bashan (1998), a formulação do inoculante deve possibilitar o desenvolvimento de um microambiente para evitar o declínio da população da bactéria após a inoculação, sendo a colonização de partículas e agregados do solo um dos principais fatores que garantirão a sobrevivência do inóculo no solo.

No Brasil existem cerca de 110 microrganismos autorizados para produção de inoculantes, sendo 98 rizóbios e 12 Rizobactérias Promotoras do Crescimento Vegetal (RPCV). Os inoculantes contendo bactérias do grupo dos rizóbios são recomendados, de acordo com a espécie, para leguminosas de grãos, leguminosas forrageiras de clima temperado e tropical, leguminosas para adubação verde e leguminosas arbóreas. Já as RPCV são recomendadas para produção de arroz, milho, trigo e eucalipto (MAPA, 2011). Juntamente com o crescimento do número de inoculantes colocados no mercado, a produção e o consumo destes tem aumentado muito desde o ano de 2009, com destaque para inoculantes de soja e feijão. O total de doses vendidas cresceu de 20.220.110 doses em 2009 para 73.461.072 doses em 2018, com destaque para o

aumento de inoculantes formulados para gramíneas a partir do lançamento de diferentes estirpes de *Azospirillum brasilense* pela Embrapa Soja (ANPII, 2019; HUNGRIA, 2011).

## **2.5. Novas tecnologias de inoculação**

Visto que os microrganismos promotores de crescimento vegetal proporcionam grandes benefícios ao desenvolvimento e produção de grandes culturas, diversas alternativas têm surgido a fim de aumentar ainda mais a interação microrganismos-hospedeira para obtenção de ganhos em produtividade e desenvolvimento de práticas mais sustentáveis e menos onerosas. Exemplos de novas técnicas do uso e aplicação de inoculantes são: diferentes modos de inoculação (em sementes, no sulco de plantio, foliar, etc.) (FUKAMI *et al.*, 2016; HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2015a), utilização de mais de um microrganismo promotor de crescimento vegetal (coinoculação) (FUKAMI *et al.*, 2018b; GROPPA; ZAWOZNIK; TOMARO, 1998; HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2015a), inoculação em diferentes fases do desenvolvimento vegetal (inoculação tardia) (MORETTI *et al.*, 2018) e utilização de moléculas do metabolismo secundário envolvidas nos processos de comunicação planta-bactéria (KIDAJ; WIELBO; SKORUPSKA, 2012; MARKS *et al.*, 2013, 2015).

### *2.5.1. Coinoculação*

A ideia de combinar duas ou mais estirpes ou espécies de microrganismos nas práticas de inoculação é baseada na junção de diferentes modos de ação dos microrganismos como FBN, produção de reguladores de crescimento, solubilização de fosfatos e ação de biocontrole, influenciando o desenvolvimento vegetal e refletindo, principalmente, na produtividade das culturas agrícolas (AHEMAD; KIBRET, 2014; SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2019). No feijoeiro, a inoculação convencional de *R. tropici* pode diminuir em até 50% o uso de fertilizante nitrogenado, e quando inoculadas junto com outras bactérias promotoras de crescimento, os ganhos em nodulação, biomassa da parte aérea e raízes, e produtividade são ainda maiores (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2003; STEINER; FERREIRA; ZUFFO, 2019).

A coinoculação no feijoeiro tem resultado em ganhos promissores em produtividade, nodulação e absorção de nutrientes quando inoculados com diferentes microrganismos promotores do crescimento vegetal, principalmente micorrizas (ex. *Glomus intraradices*) e bactérias que habitam a rizosfera (ex. *Bacillus* e *Pseudomonas*),

devido a capacidade desses microrganismos em aumentar a disponibilidade de fosfatos para as plantas e produzir reguladores de crescimento e sideróforos (ARDAKANI *et al.*, 2011; CARDOSO; FERREIRA, 2021; EL-NAHRAWY; OMARA, 2017; STAJKOVIĆ *et al.*, 2011).

No entanto, desde o ano de 2016, bactérias da espécie *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6, têm sido utilizadas como coinoculantes em leguminosas como soja e feijão, combinando uma bactéria simbiote com essas rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013). A coinoculação no feijoeiro com estirpes de *R. tropici* e *A. brasilense* em solos brasileiros resultou em aumentos significativos no desenvolvimento da planta, destacando o aumento da biomassa seca das raízes e da parte aérea e aumento no número de nódulos, em relação ao controle nitrogenado e controle inoculado (BURDMAN; KIGEL; OKON, 1997; SOUZA; FERREIRA, 2017; HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013; PERES *et al.*, 2016; STEINER; FERREIRA; ZUFFO, 2019). Porém, seus efeitos na produtividade do feijoeiro ainda são variáveis, mostrando ganhos que podem chegar até 26% em relação ao controle inoculado apenas com *Rhizobium* (TABELA 1).

Tabela 1. Resultados dos ganhos em produtividade (%) em relação a inoculação padrão e ao controle nitrogenado quando coinoculados com as bactérias *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6, em experimentos conduzidos em diferentes regiões do país.

Cultura	Cultivar	Estado	Microrganismo	Estirpe	Aumento da produtividade em relação ao controle nitrogenado	Aumento da produtividade em relação ao controle inoculado	Referência
Feijão comum	Pérola	Mato Grosso do Sul	<i>Rhizobium tropici</i> e <i>Azospirillum brasilense</i>	CIAT 899 e Ab-V5 e Ab-V6	26,60%	5,57%	Steiner <i>et al.</i> (2019)
	Pérola	Goiás/Minas Gerais	<i>Rhizobium tropici</i> e <i>Azospirillum brasilense</i>	CIAT 899 e Ab-V5/Ab-V6	5%	26%	Souza & Ferreira (2017)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	IPR-Colibri	Paraná	<i>Rhizobium tropici</i> e <i>Azospirillum brasilense</i>	PRF 81 e Ab-V5/Ab-V6	19,60%	14,70%	Hungria <i>et al.</i> (2013)
L.)	Pérola	Mato Grosso do Sul	<i>Rhizobium tropici</i> e <i>Azospirillum brasilense</i>	PRF 81 e Ab-V5/Ab-V6	-9,40%	1,60%	Peres <i>et al.</i> (2016)

O sucesso da coinoculação de bactérias do gênero *Rhizobium* e *Azospirillum* no feijoeiro podem estar relacionados com maior desenvolvimento da raiz (possibilita maior área de absorção de nutrientes e água, e maior área para formação dos nódulos), melhor eficiência de FBN, além de prolongar a exsudação de flavonóides e aumentar a síntese dos fatores de nodulação no feijoeiro (DARDANELLI *et al.*, 2008). Além dos efeitos diretos no desenvolvimento e produtividade do feijoeiro, a coinoculação com outras bactérias capazes de nodular o feijoeiro, como *Bradyrhizobium diazoefficiens* e *B. elkanii*, podem estimular a bactéria *R. tropici* a obter uma maior eficiência no processo de nodulação e fixação de nitrogênio, e ainda estimular a formação precoce dos nódulos no desenvolvimento da cultura (CARVALHO *et al.*, 2020; JESUS *et al.*, 2018).

#### 2.5.2. Inoculação suplementar

A fim de contornar problemas que diminuem a eficiência da FBN pelas bactérias diazotróficas, tem surgido diferentes alternativas de aplicação dos inoculantes, em suas diferentes formas comercializadas (líquidos ou turfosos) e em diferentes fases do ciclo de vida da planta. Um dos grandes destaques tem sido a inoculação via foliar das bactérias *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6. Ganhos em número e massa seca de nódulos, biomassa de raiz e parte aérea e produtividade foram observados no feijoeiro quando inoculados com *R. tropici* CIAT 899 (semente) + *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 (via foliar) no estágio V3/V4 de desenvolvimento, obtendo um aumento de até 26% na produtividade comparado com o controle não inoculado (STEINER; FERREIRA; ZUFFO, 2019).

Em outras culturas como soja, milho e trigo a inoculação tardia via foliar também tem resultado em ganhos significativos em produtividade e nodulação (no caso da soja). A fim de compreender se a inoculação suplementar, em diferentes fases do ciclo de vida da soja, aumentaria a nodulação e a produção de grãos, Moretti *et al.* (2018) mostraram que a inoculação nas fases vegetativas V1, V3, V6 e nas fases reprodutivas R1 e R3, aumentaram o número de nódulos nas raízes e a produção de grãos por hectare, contornando o processo de autoregulação do número de nódulos da planta. Em outros trabalhos, folhas de soja inoculadas com *B. japonicum* E109 nas sementes e inoculação suplementar via spray nas folhas com *A. brasilense* AZ39, no estágio V3 de desenvolvimento, resultou em plantas 12% maiores que o controle, aumento de 31% no tamanho das raízes, maior biomassa seca de raízes e parte aérea,

maior formação de nódulos (principalmente nas raízes secundárias formadas), maior teor de nitrogênio e proteínas nos grãos, maior teor de leghemoglobina e maior produtividade de grãos por hectare (PUENTE *et al.* 2018; 2019). A inoculação foliar suplementar com *A. brasilense* demonstrou aumentar a nodulação em estágios tardios da planta, favorecendo o aumento da qualidade nutritiva dos grãos e aumento na produtividade.

Buscando alternativas de inoculação, Fukami *et al.* (2016) demonstraram diferentes respostas quando as plantas de milho e trigo foram inoculadas com *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 na semente e nos sulcos de plantio durante a semeadura e via spray nas folhas e na superfície do solo (estágio de desenvolvimento V2.5). O resultado apontou que a inoculação via spray nas folhas apresentou melhor desempenho na maioria dos parâmetros avaliados (peso de biomassa seca da parte aérea e das raízes, tamanho da planta, número de perfilhos e acumulação total de N na parte aérea), porém a inoculação nos sulcos de plantio e na superfície do solo também demonstraram resultados positivos em relação ao controle.

Portanto, a coinoculação e inoculação suplementar no feijoeiro se destaca como técnicas promissoras para superar a baixa eficiência de fixação biológica de nitrogênio no feijoeiro, favorecendo o aumento no número de nódulos, o aumento do período de permanência dos nódulos ativos na planta e, como consequência, aumento da produtividade.

### **3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES**

Apesar de realizar simbiose com bactérias fixadoras do nitrogênio atmosférico, a cultura do feijoeiro ainda é dependente da utilização de fertilizantes nitrogenados, pois, geralmente, a alta demanda de nitrogênio exigida pela cultura não é suprida totalmente pela FBN. A baixa eficiência da FBN no feijoeiro está relacionada com a população altamente competitiva de rizóbios nativos do solo, baixo rendimento na fixação biológica de nitrogênio; senescência precoce dos nódulos, que ocorre durante o período de enchimento de grãos; e com a susceptibilidade da cultura aos estresses bióticos e abióticos. O uso de inoculantes com estirpes selecionadas para uma melhor estabilidade de simbiose e maior tolerância a estresses, têm demonstrado resultados promissores. Para aumentar o potencial desses bioinsumos, novas estratégias de inoculação, como coinoculação e inoculação suplementar tardia, combinando bactérias simbiotes e

rizobactérias associativas promotoras do crescimento vegetal, podem resultar em ganhos consideráveis para o desenvolvimento vegetal e o rendimento de produção de grãos.

A hipótese desse trabalho é que a coinoculação e a inoculação suplementar tardia na cultura do feijoeiro com as bactérias *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 irá melhorar os aspectos relacionados a nodulação das plantas e, conseqüentemente, aumentar a eficiência da FBN, garantindo maior produtividade ao feijoeiro.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo geral**

Avaliar o efeito da coinoculação e inoculação suplementar tardia com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e/ou *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 sobre o desempenho agrônômico na cultura do feijoeiro.

### **4.2. Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito da coinoculação e inoculação suplementar tardia na nodulação e ganhos em biomassa, em diferentes cultivares do feijoeiro conduzidas em campo e em safras consecutivas, na estação seca e chuvosa e em diferentes regiões produtoras da cultura.

- Avaliar o efeito da coinoculação e inoculação suplementar tardia na produtividade de diferentes cultivares do feijoeiro conduzidas em campo e em safras consecutivas, na estação seca e chuvosa e em diferentes regiões produtoras da cultura.

## **5. METODOLOGIA**

### **5.1. Localização e descrição das áreas de plantio**

Um total de cinco experimentos foram conduzidos em campo entre os anos de 2019 e 2021 na região Centro-Oeste. Os experimentos I, II e III foram conduzidos sob irrigação na safra de inverno em 2019 (FIGURAS 3A, 3B e 3C, TABELA 2), sendo os experimentos I e II implantados em área experimental da Embrapa Cerrados, localizada na região de Planaltina - Distrito Federal e o experimento III em uma fazenda produtora de feijão (Fazenda Saco Grande) localizada no município de Paracatu - MG (FIGURA 4 e TABELA 2). Os experimentos IV e V, também localizados na área experimental da Embrapa Cerrados (TABELA 2), foram conduzidos na estação chuvosa, na safra das águas em 2019/2020 e 2020/2021 (FIGURAS 3D e 3E).

O número de células de rizóbios capazes de nodular o feijoeiro presentes em cada área experimental e as características de química do solo são apresentados nas TABELAS 2 e 3, respectivamente. Para avaliação química do solo foram coletadas, em cada área experimental, no mínimo 6 subamostras, na profundidade 0-20 cm.

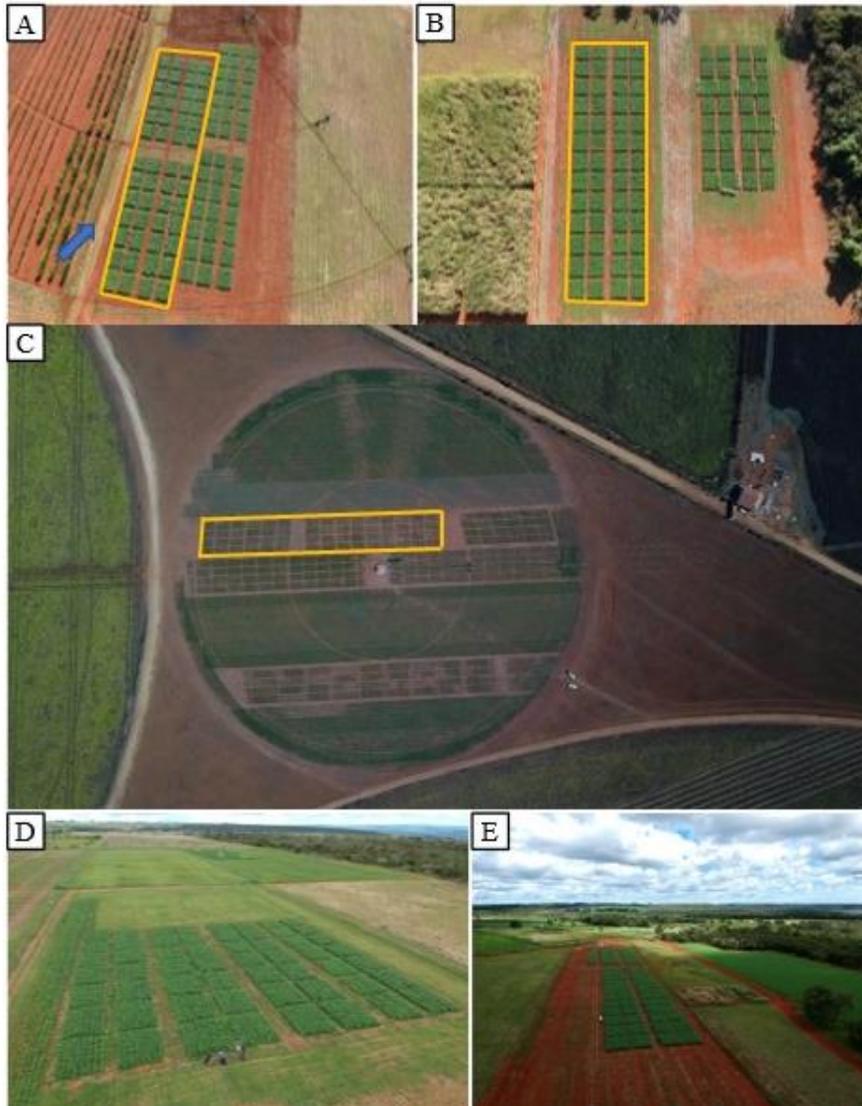


Figura 3. Fotos dos cinco experimentos conduzidos na região de Planaltina-DF e Paracatu-MG. (A) experimento I; (B) experimento II; (C) experimento III; (D) experimento IV; (E) experimento V. As linhas amarelas assinalam os experimentos conduzidos nesse trabalho.

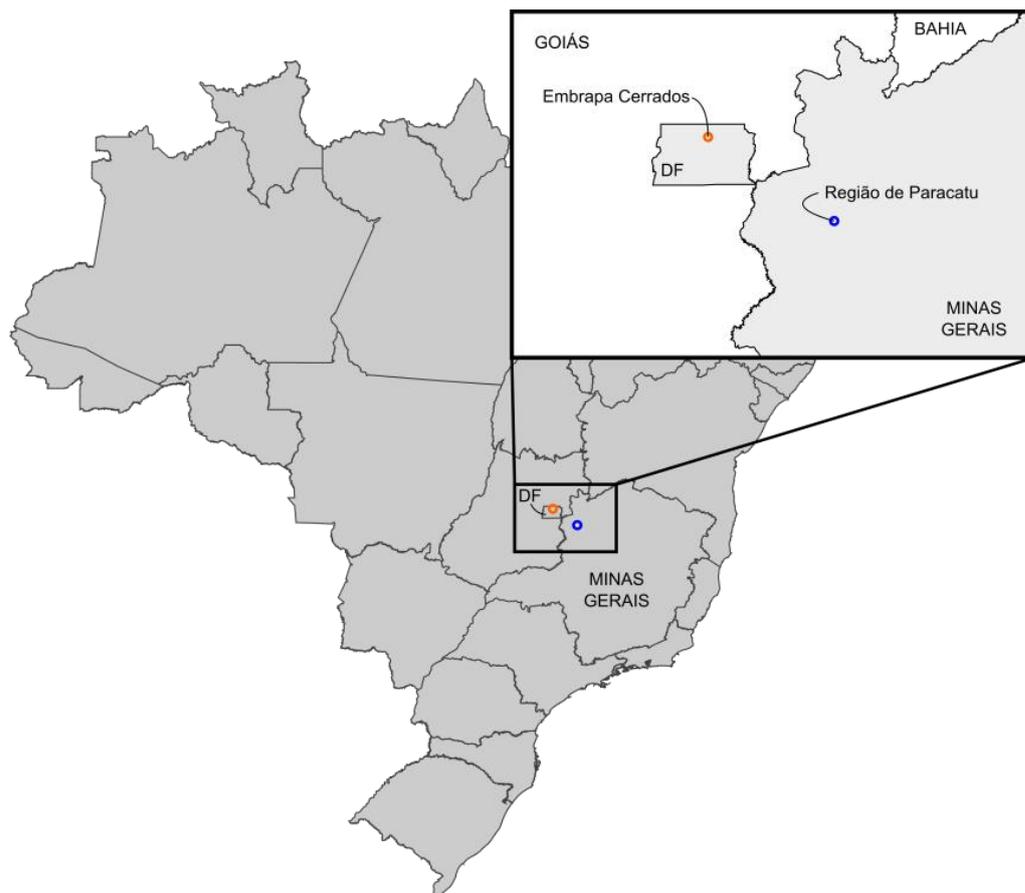


Figura 4. Regiões de Planaltina-DF (Embrapa Cerrados) e Paracatu-MG, onde foram conduzidos os experimentos em campo.

Tabela 2. Descrição da época e localização dos cultivos, períodos de plantio e colheita, cultivares utilizadas e concentração de rizóbios nativos nos solos, referente aos cinco experimentos conduzidos.

Época	Experimento	Cultivar	Região	Plantio	Colheita	Área útil da colheita (m <sup>2</sup> )	Células de rizóbio (UFC g <sup>-1</sup> solo) <sup>1</sup>
Seca	I	Pérola	Embrapa Cerrados	15/05/2019	16/08/2019	8	1,6 x 10 <sup>6</sup>
	II	Esteio	Embrapa Cerrados	22/05/2019	30/08/2019	8	8,4 x 10 <sup>5</sup>
	III	Estilo	Paracatu-MG	04/06/2019	06/09/2019	12	ND*
Chuva	IV	Pérola	Embrapa Cerrados	28/11/2019	27/02/2020	8	ND*
	V	Pérola	Embrapa Cerrados	24/11/2020	24/02/2021	8	2,5 x 10 <sup>3</sup>

<sup>1</sup>Método Número Mais Provável (NMP) (Vicent, 1970);

\*Não Determinado.

Tabela 3. Características químicas dos solos nas áreas experimentais I, II, IV e V, coletados na região de Planaltina-DF e na área experimental III, coletadas na região de Paracatu-MG.

Experimento	pH	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB <sup>1</sup>	CTC <sup>2</sup>	V <sup>3</sup>	MO <sup>4</sup>
	H <sub>2</sub> O	mg L <sup>-1</sup>			mmolc dm <sup>-3</sup>			cmolc dm <sup>-3</sup>		%	%
I	5,8	7,8	112,00	1,80	0,62	0,12	5,12	2,7	7,80	34,50	2,8
II	5,4	15,5	154,75	1,03	0,29	0,47	6,04	1,7	7,76	22,06	2,5
III	5,6	13,5	149,50	2,58	0,84	0,14	5,61	3,8	9,41	40,43	2,8
IV	5,5	18,14	144,16	1,68	0,75	0,12	5,39	2,8	8,18	34,08	2,5
V	5,5	18,4	144,20	1,65	0,75	0,12	5,39	2,8	8,18	34,08	2,5

<sup>1</sup> Soma de bases; <sup>2</sup> Troca catiônica total; <sup>3</sup> Saturação de bases; <sup>4</sup> Matéria orgânica.

O clima das regiões de Planaltina - DF (Embrapa Cerrados) e Paracatu - MG, de acordo com a classificação de Koppen, é do tipo CWh1 e Aw, respectivamente. Ambos caracterizados por possuir verão chuvoso e inverno seco. Por serem situados no Bioma Cerrado, possuem dois períodos bem definidos com estação chuvosa entre os meses de outubro e abril e uma estação seca entre os meses de maio e setembro, com nenhuma ou baixa precipitação (LOPES *et al.*, 2013). A precipitação e temperaturas registradas durante a condução dos experimentos estão apresentados na FIGURA 5.

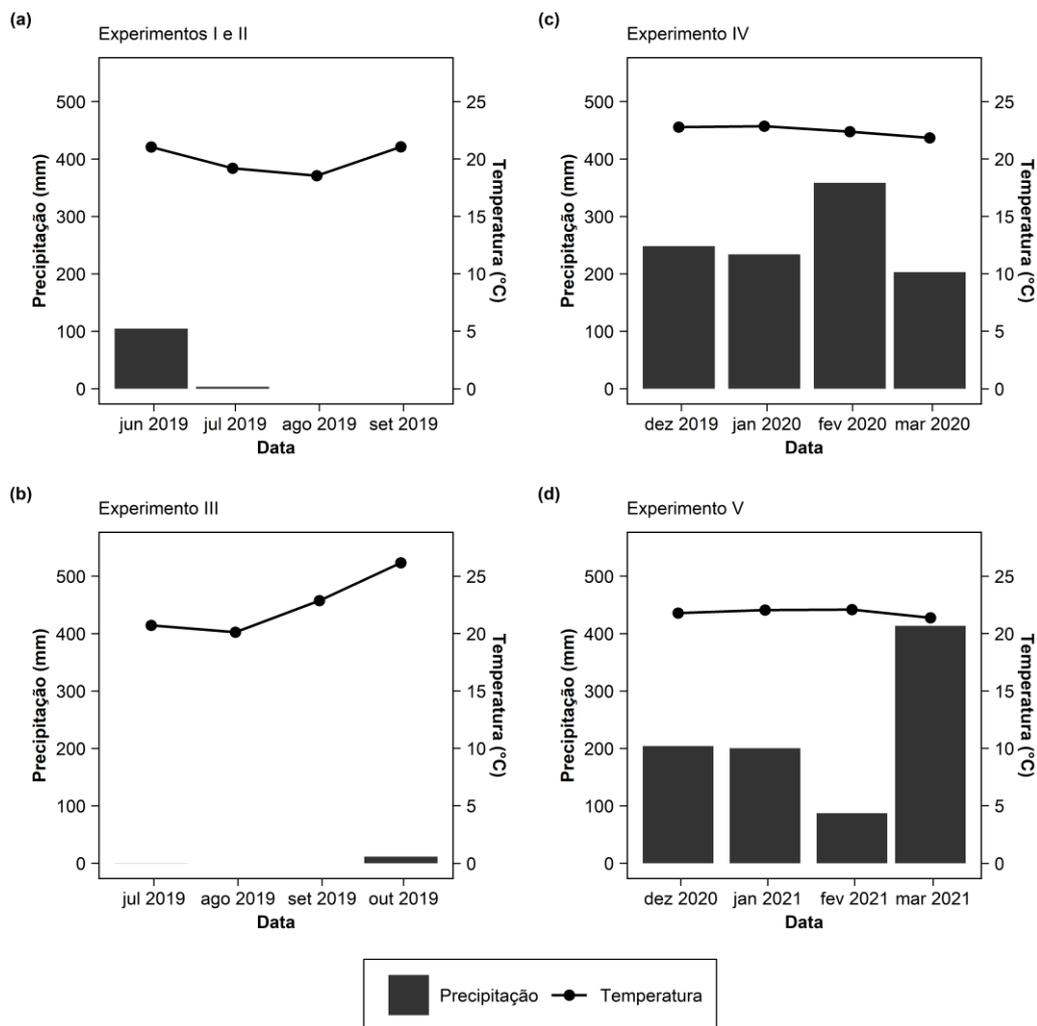


Figura 5. Temperaturas (°C) e precipitação (mm) nas regiões onde foram conduzidos os cinco experimentos nesse trabalho.

## 5.2. Desenho experimental e implantação dos experimentos

Para avaliar o efeito da coinoculação e inoculação suplementar tardia, o delineamento experimental dos cinco experimentos foi baseado em blocos casualizados, com quatro repetições e 13 tratamentos (TABELA 4).

Tabela 4. Descrição dos tratamentos utilizados em todos os experimentos de campo. Os tratamentos consistiram em uma combinação dos inoculantes (a base *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6), adubação nitrogenada e inoculação suplementar (realizada com *R. tropici* e/ou *A. brasilense* no estágio V4 de desenvolvimento).

<b>Sigla</b>	<b>Tratamentos</b>	<b>Vias de inoculação</b>	<b>Adubação Nitrogenada</b>
CA	Controle não inoculado	-	-
CN 120	Controle nitrogenado (100%)	-	120 kg N ha <sup>-1</sup>
CN 60	Controle nitrogenado (50%)	-	60 kg de N ha <sup>-1</sup>
Rt	Inoculação com <i>R. tropici</i>	Semente	-
RtN	Inoculação com <i>R. tropici</i> + N	Semente	60 kg de N ha <sup>-1</sup>
RtAz	Coinoculação com <i>R. tropici</i> e <i>A. brasilense</i>	Semente	-
RtAzN	Coinoculação com <i>R. tropici</i> e <i>A. brasilense</i> + N	Semente	60 kg de N ha <sup>-1</sup>
RtAz + Rt(V4)	Coinoculação com <i>R. tropici</i> e <i>A. brasilense</i> + inoculação suplementar com <i>R. tropici</i>	Semente + sulco de plantio	-
RtAz + Rt(V4)N	Coinoculação com <i>R. tropici</i> e <i>A. brasilense</i> + inoculação suplementar com <i>R. tropici</i> + N	Semente + sulco de plantio	60 kg de N ha <sup>-1</sup>
RtAz + Az(V4)	Coinoculação com <i>R. tropici</i> e <i>A. brasilense</i> + inoculação suplementar com <i>A. brasilense</i>	Semente + foliar	-
RtAz + Az(V4)N	Coinoculação com <i>R. tropici</i> e <i>A. brasilense</i> + inoculação suplementar com <i>A. brasilense</i> + N	Semente + foliar	60 kg de N ha <sup>-1</sup>
RtAz + RtAz(V4)	Coinoculação com <i>R. tropici</i> e <i>A. brasilense</i> + inoculação suplementar com <i>A. brasilense</i> e <i>R. tropici</i>	Semente + sulco de plantio + foliar	-
RtAz + RtAz(V4)N	Coinoculação com <i>R. tropici</i> e <i>A. brasilense</i> + inoculação suplementar com <i>A. brasilense</i> e <i>R. tropici</i> + N	Semente + sulco de plantio + foliar	60 kg de N ha <sup>-1</sup>

Nos cinco experimentos foram utilizados três inoculantes comerciais registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), sendo eles: inoculante sólido turfoso contendo *Rhizobium tropici* CIAT 899 (inoculação via semente) (Figura 6A); inoculante líquido contendo *Rhizobium tropici* CIAT 899 (inoculação via superfície do solo) (FIGURA 6B); inoculante líquido contendo *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 (inoculação via semente e via foliar) (FIGURA 6C). A bactéria *R. tropici* CIAT 899 é uma das bactérias recomendadas para a cultura do feijoeiro, enquanto que as rizobactérias *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 são recomendadas para coinoculação da soja e do feijoeiro desde 2016 (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013).

A inoculação das sementes foi realizada uma hora antes do plantio, com a adição de uma solução açucarada a 25% (sacarose) para facilitar a adesão do inoculante turfoso nas sementes. A dosagem aplicada do inoculante foi realizada de acordo com a qualidade do produto, verificada a partir do método de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Em todos os experimentos a dosagem foi adequada para manter a concentração teórica de  $1,2 \times 10^6$  células por semente para os inoculantes contendo *R. tropici* (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013), e  $1,2 \times 10^5$  células por semente para os inoculantes líquidos contendo bactérias do gênero *Azospirillum* (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013; 2015).

Foram utilizadas as cultivares Pérola, Esteio e Estilo para os experimentos I, II e III, respectivamente, sendo as cultivares Pérola e Estilo pertencente ao grupo de feijão Carioca, enquanto a cultivar Esteio pertence ao grupo dos feijões pretos (TABELA 2). Na estação chuvosa foram conduzidos outros dois experimentos, IV e V, utilizando a cultivar Pérola, durante as safras 19/20 e 20/21, respectivamente (TABELA 2).

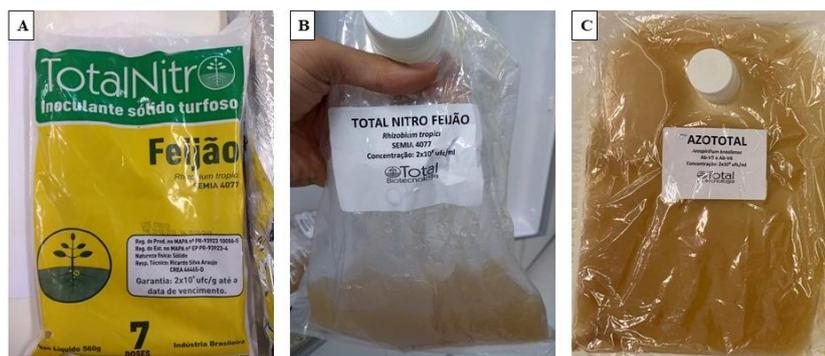


Figura 6. Inoculantes comerciais utilizados em todos os cinco experimentos, sendo A) inoculante líquido contendo as bactérias *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6, B) inoculante líquido contendo a bactéria *Rhizobium tropici* CIAT 899 e C) inoculante turfoso contendo a bactéria *Rhizobium tropici* CIAT 899.

O plantio foi realizado por meio de semeadura direta. Os experimentos que foram conduzidos nas áreas experimentais da Embrapa Cerrados (Planaltina - DF) consistiram em parcelas de 4 m x 5 m, sendo oito linhas por cada parcela, com espaçamento de 50 cm entre linhas e densidade de 15 plantas por metro. O experimento conduzido em Paracatu - MG consistiu em parcelas de 7 m x 5 m, com espaçamento de 50 cm entre linhas e densidade populacional de 15 plantas por metro.

### 5.3. Adubação nitrogenada e inoculação suplementar tardia

A adubação nitrogenada foi realizada com fertilizante a base de ureia nos tratamentos em que houve aplicação do nutriente. A aplicação foi dividida em duas partes, sendo 50% da dose recomendada aplicada 7 dias após a emergência (DAE) e os 50% restantes aplicados em 30 DAE, entre os estágios V4 e R5 de desenvolvimento.

A inoculação suplementar tardia foi realizada por pulverização a jato no sulco do plantio, usando o inoculante líquido, quando inoculada com *R. tropici* CIAT 899, e via foliar quando inoculado com *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6. Em todos os experimentos, a inoculação suplementar foi realizada no estágio de desenvolvimento V4, quando o 3º trifólio estava totalmente expandido (FIGURA 7). A inoculação suplementar tardia realizada por pulverização a jato foi calculada considerando um volume de calda de 150 L ha<sup>-1</sup> (SOUZA; FERREIRA, 2017). Para as inoculações suplementares, as doses de *R. tropici* foram triplicadas e de *A. brasilense* duplicadas, em relação as doses utilizadas no plantio.



Figura 7. Inoculação suplementar tardia via foliar aplicada por meio da pulverização a jato entre os estágios V4 e R5 do desenvolvimento do feijoeiro.

Para o controle da incidência de ervas daninhas, pragas e doenças fúngicas foram aplicados, de acordo com a recomendação fitotécnica, herbicidas, inseticidas e fungicidas durante a condução dos experimentos.

#### **5.4. Avaliação da nodulação, componentes de produtividade e colheita**

A avaliação da nodulação foi realizada em dois momentos distintos do desenvolvimento do feijoeiro, sendo uma coleta realizada antes e outra após a inoculação suplementar tardia. A primeira avaliação foi realizada no estágio V4 de desenvolvimento (aproximadamente 30 dias após a emergência- DAE) e a segunda avaliação foi realizada no estágio R5, aproximadamente 15-20 dias após a inoculação suplementar (aproximadamente 50 DAE). Em cada avaliação, seis plantas de cada parcela foram coletadas, sendo três retiradas da segunda linha e três retiradas da sétima linha (FIGURA 8). Após a coleta, a parte aérea das plantas foi cortada e armazenada em sacos para secagem em estufa a 60 °C durante 72 h. As raízes foram lavadas em água corrente, utilizando peneiras, e posteriormente dispostas em papel jornal para secagem ao ar em temperatura ambiente, por aproximadamente uma hora. Em seguida, os nódulos foram destacados das raízes e armazenados em envelopes, sendo posteriormente secos em estufa a uma temperatura de 60 °C durante 72 h (FIGURA 9).

Em ambas as avaliações foram avaliados o número de nódulos (NN), massa seca dos nódulos (MSN) e massa seca da parte aérea (MSPA). O teor de nitrogênio total da parte aérea (NTPA) foi avaliado apenas na segunda coleta, após a inoculação suplementar tardia.

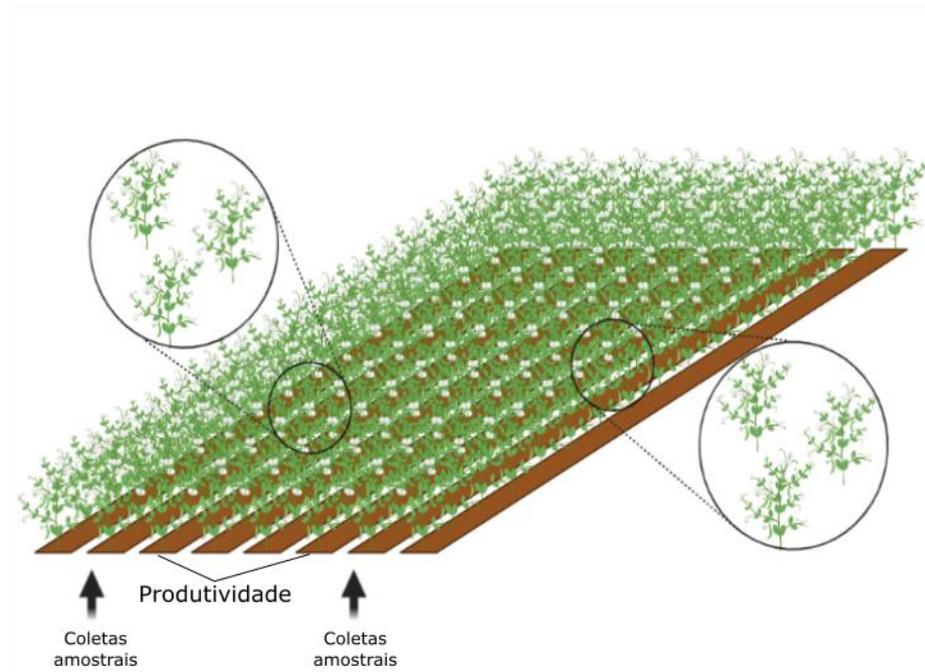


Figura 8. As coletas de plantas para avaliação da nodulação, promoção de crescimento e componentes de produtividade foram realizadas com base na média de seis plantas por parcela, sendo três coletadas na segunda linha e três coletadas na sétima linha. Para o cálculo da produtividade foram colhidas apenas as quatro linhas centrais.



Figura 9. Coleta de plantas para avaliação de nodulação. A) coleta de seis plantas por parcela; B) lavagem das raízes para separação dos nódulos; C) secagem dos nódulos ao ar após a lavagem; D) após a secagem ao ar, os nódulos são armazenados em envelopes para secagem em estufa a 60°C durante 3 dias.

No período de completa maturidade fisiológica foram coletadas seis plantas por parcela para avaliação dos componentes de produtividade. Foi avaliado o número de vagens por planta (NV) e número de grãos por vagem (NG). Para mensurar o número de grãos por vagem foram selecionadas dez vagens aleatoriamente. Ao fim do experimento foram separados grãos para mensuração da massa de 100 grãos (M100) e teor de nitrogênio total nos grãos (NTG). A quantificação de nitrogênio total das folhas e grãos foi realizada por meio da digestão perclórica, pelo método modificado de Berthelot (WOOLEY *et al.*, 1960).

A produtividade de grãos foi estimada a partir da demarcação da área útil da parcela (TABELA 2) que foi acessada a partir da retirada das duas linhas mais externas (bordaduras) e 0,5 metro do início e do fim da parcela, colhendo apenas as 4 linhas mais internas (FIGURA 8). Os grãos de cada parcela foram pesados e o teor de umidade corrigido para 13% para a determinação da produtividade, que foi expressa em kg ha<sup>-1</sup>.

Utilizando o mesmo delineamento experimental especificado anteriormente, foi avaliado a produtividade entre os tratamentos que foram suplementados com nitrogênio em cobertura e entre os tratamentos que não foram suplementados com nitrogênio em

cobertura. Dessa forma, os tratamentos sem adição de N-fertilizante foram: **1)** controle absoluto (não inoculação); **2)** inoculação padrão apenas com *R. tropici*; **3)** coinoculação via semente com *R. tropici* e *A. brasilense*; **4)** coinoculação via semente + inoculação suplementar com *R. tropici* (V4); **5)** coinoculação via semente + inoculação suplementar com *A. brasilense* (V4); **6)** coinoculação via semente + inoculação suplementar (V4).

Em relação aos tratamentos que receberam nitrogênio em cobertura temos: **1)** controle nitrogenado 120 kg ha<sup>-1</sup>; **2)** controle nitrogenado 60 kg ha<sup>-1</sup>; **3)** inoculação padrão apenas com *R. tropici* + N; **4)** coinoculação via semente com *R. tropici* e *A. brasilense* + N; **5)** coinoculação via semente + inoculação suplementar com *R. tropici* (V4) + N; **6)** coinoculação via semente + inoculação suplementar com *A. brasilense* (V4) + N; **7)** coinoculação via semente + inoculação suplementar (V4) + N.

## **5.5. Análises estatísticas**

Os resultados obtidos nos experimentos de campo foram submetidos a testes de normalidade e homogeneidade e em seguida submetidos a análise de variância (ANOVA). As variáveis que apresentaram diferenças significativas no teste F ( $F < 0,05$ ) foram submetidas a análise *post hoc* ao teste Duncan 5%, para identificar as diferenças estatísticas entre os tratamentos. Para avaliação dos experimentos em conjunto, foi realizado o teste f máximo de Hartley, em relação a produtividade, para verificar a homogeneidade dos dados entre os experimentos. Em seguida, os experimentos foram avaliados em conjunto por meio da ANOVA, considerando o local e os tratamentos como fatores. Para avaliação do número de nódulos entre as coletas realizadas no estágio V4 e R5, os dados foram submetidos ao teste ANOVA two-way. A distribuição normal dos dados foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk ( $\alpha = 5\%$ ). As médias que apresentaram distribuição normal foram submetidas ao teste de comparações múltiplas Tukey a 5% de significância. O software R (2019) foi utilizado para todas as análises.

## **6. RESULTADOS**

Por meio do teste F máximo de Hartley foi possível observar que os experimentos são homogêneos ( $F = 2,863$ ). Através do teste ANOVA (Tukey 5%) foi

possível observar diferença estatística entre os experimentos (em relação a produtividade), com destaque para os experimentos I e II, que apresentaram melhor desempenho em produtividade, e o experimento III apresentando a menor produtividade. Por apresentarem diferença entre si, os resultados de cada experimento foram abordados individualmente.

### **6.1. Avaliação da nodulação e promoção de crescimento vegetal do feijoeiro no estágio V4 de desenvolvimento**

Nos experimentos conduzidos na safra de inverno, apenas o experimento I, com a cultivar Pérola, apresentou diferença significativa entre os tratamentos em relação ao número de nódulos (TABELAS 5, 6 e 7). O tratamento inoculado com *R. tropici* CIAT 899 e o controle absoluto apresentaram maior número de nódulos, com uma média de 88 e 87 nódulos por planta, respectivamente, e foram significativamente diferentes de todos os tratamentos que receberam N fertilizante, principalmente em relação ao controle com 120 kg de N ha<sup>-1</sup>, que apresentou a menor nodulação entre os tratamentos (com uma média de 28 nódulos por planta) (TABELA 5).

Para os experimentos conduzidos na safra das águas, apenas no experimento IV foram observadas diferenças significativas em relação ao número de nódulos, onde os tratamentos com inoculação padrão com *Rhizobium* e coinoculação com *Rhizobium* + *Azospirillum* apresentaram 73 e 62 nódulos por planta, respectivamente (TABELA 8). A inoculação apenas com *R. tropici* via semente, sem adubação nitrogenada em cobertura, não diferiu da coinoculação em relação ao NN, mas foi significativamente diferente de todos os outros tratamentos (TABELA 8). O NN no tratamento coinoculado via semente foi estatisticamente superior apenas em relação aos controles nitrogenados (TABELA 8). Não foram observadas diferenças quanto ao NN no experimento conduzido na safra 20/21 (TABELA 9).

Nos experimentos I (safra de inverno 2019) e IV (safra das águas 19/20) foram apresentados maiores valores de massa seca dos nódulos (MSN) nos tratamentos que não receberam adubação nitrogenada em cobertura, com destaque para o controle absoluto e os tratamentos inoculados com *Rhizobium* e coinoculados com *Rhizobium* + *Azospirillum*, significativamente diferentes do controle com 120 kg de N ha<sup>-1</sup> em ambos os experimentos (TABELAS 5 e 8) e do controle com 60 kg de N ha<sup>-1</sup> no experimento V (TABELA 8). No experimento III, conduzido em Paracatu-MG (TABELA 7), o

maior valor de MSN também foi apresentado pelo controle absoluto (113 mg), diferindo-se estatisticamente do controle com 120 kg de N ha<sup>-1</sup>, que apresentou o menor valor de MSN (26 mg). Os experimentos II e V não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos em relação a MSN (TABELAS 6 e 9).

Em relação a massa seca da parte aérea (MSPA), apenas nos experimentos IV e V foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos (TABELAS 8 e 9). No experimento IV, o maior valor de MSPA foi encontrado no controle com 120 kg de N ha<sup>-1</sup> (5,38 g) e, juntamente do controle com 60 kg de N ha<sup>-1</sup> (5,24 g) e o tratamento coinoculado + N (4,90 g) foram estatisticamente diferentes do controle absoluto, que apresentou o menor valor de biomassa aérea (3,60 g) (TABELA 8). No experimento V, os tratamentos que receberam adubação nitrogenada em cobertura atingiram os maiores valores de MSPA, com destaque para o controle com 120 kg de N ha<sup>-1</sup> (TABELA 9). Nos experimentos I, II e III não foram apresentadas diferenças estatísticas entre os tratamentos em relação a MSPA (TABELAS 5, 6 e 7).

Tabela 5. Primeira avaliação do número de nódulos (NN), massa seca dos nódulos (MSN) e massa seca da parte aérea (MSPA) realizada no estágio V4 do desenvolvimento do feijoeiro, inoculado e coinoculado com as bactérias *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6, no experimento I conduzido com a cultivar Pérola na safra de inverno do ano de 2019.

Experimento I- Cultivar Pérola			
Tratamento <sup>1</sup>	NN N°planta <sup>-1</sup>	MSN mg planta <sup>-1</sup>	MSPA g planta <sup>-1</sup>
CA	88 a	162 ab	2,73
CN 120	28 c	25 c	3,58
CN 60	48 bc	82 bc	3,71
Rt	87 a	194 a	3,35
Rt + N	46 bc	87 bc	4,36
Rt + Az	64 ab	153 ab	3,73
Rt + Az + N	51 bc	58 c	3,85
<b>CV (%)</b>	<b>31,08</b>	<b>46,94</b>	<b>23,27</b>

<sup>1</sup>CA: controle absoluto (não inoculado e sem adubação nitrogenada); CN: controle nitrogenado; Rt: inoculação com *Rhizobium tropici*; Az: inoculação com *Azospirillum brasilense*; +N: adubação nitrogenada 60 kg N ha<sup>-1</sup>; CV: coeficiente de variação. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não se diferenciam entre si pelo teste Duncan a 5%. Médias não acompanhadas por letras, não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos F (p<0,05).

Tabela 6. Primeira avaliação do número de nódulos (NN), massa seca dos nódulos (MSN) e massa seca da parte aérea (MSPA) realizada no estágio V4 do desenvolvimento do feijoeiro, inoculado e coinoculado com as bactérias *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6, no experimento II conduzido com a cultivar BRS Esteio na safra de inverno no ano de 2019.

Experimento II- Cultivar BRS Esteio			
Tratamento <sup>1</sup>	NN N°planta <sup>-1</sup>	MSN mg planta <sup>-1</sup>	MSPA g planta <sup>-1</sup>
CA	35	52	2,67
CN 120	11	6	2,94
CN 60	25	26	2,50
Rt	20	55	2,62
Rt + N	32	25	2,78
Rt + Az	31	42	2,98
Rt + Az + N	19	21	3,18
<b>CV (%)</b>	<b>56,28</b>	<b>103,9</b>	<b>16,47</b>

<sup>1</sup>CA: controle absoluto (não inoculado e sem adubação nitrogenada); CN: controle nitrogenado; Rt: inoculação com *Rhizobium tropici*; Az: inoculação com *Azospirillum brasilense*; +N: adubação nitrogenada 60 kg N ha<sup>-1</sup>; CV: coeficiente de variação. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não se diferenciam entre si pelo teste Duncan a 5%. Médias não acompanhadas por letras, não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos F (p<0,05).

Tabela 7. Primeira avaliação do número de nódulos (NN), massa seca dos nódulos (MSN) e massa seca da parte aérea (MSPA) realizada no estágio V4 do desenvolvimento do feijoeiro, inoculado e coinoculado com as bactérias *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6, no experimento III conduzido com a cultivar BRS Estilo na safra de inverno no ano de 2019.

Experimento III- Cultivar BRS Estilo			
Tratamento <sup>1</sup>	NN N°planta <sup>-1</sup>	MSN mg planta <sup>-1</sup>	MSPA g planta <sup>-1</sup>
CA	23	113 a	2,26
CN 120	8	26 c	3,14
CN 60	13	70 ab	2,81
Rt	6	48 bc	2,76
Rt + N	18	77 ab	2,77
Rt + Az	12	78 ab	2,52
Rt + Az + N	10	47 bc	3,38
<b>CV (%)</b>	<b>59,4</b>	<b>41,33</b>	<b>20,96</b>

<sup>1</sup>CA: controle absoluto (não inoculado e sem adubação nitrogenada); CN: controle nitrogenado; Rt: inoculação com *Rhizobium tropici*; Az: inoculação com *Azospirillum brasilense*; +N: adubação nitrogenada 60 kg N ha<sup>-1</sup>; CV: coeficiente de variação. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não se diferenciam entre si pelo teste Duncan a 5%. Médias não acompanhadas por letras, não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos F (p<0,05).

Tabela 8. Primeira avaliação do número de nódulos (NN), massa seca dos nódulos (MSN) e massa seca da parte aérea (MSPA) realizada no estágio V4 do desenvolvimento do feijoeiro, inoculado e coinoculado com as bactérias *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6, no experimento IV conduzido com a cultivar Pérola na safra das águas 2019/2020.

Experimento IV- Cultivar Pérola			
Tratamento <sup>1</sup>	NN N°planta <sup>-1</sup>	MSN mg planta <sup>-1</sup>	MSPA g planta <sup>-1</sup>
CA	43 bc	196 ab	3,63 c
CN 120	23 c	51 d	5,36 a
CN 60	30 c	122 cd	5,25 ab
Rt	73 a	256 a	4,62 abc
Rt + N	43 bc	114 cd	4,50 abc
Rt + Az	62 ab	238 a	4,10 bc
Rt + Az + N	44 bc	148 bc	4,91 ab
<b>CV (%)</b>	<b>25,51</b>	<b>28,48</b>	<b>15,65</b>

<sup>1</sup>CA: controle absoluto (não inoculado e sem adubação nitrogenada); CN: controle nitrogenado; Rt: inoculação com *Rhizobium tropici*; Az: inoculação com *Azospirillum brasilense*; +N: adubação nitrogenada 60 kg N ha<sup>-1</sup>; CV: coeficiente de variação. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não se diferenciam entre si pelo teste Duncan a 5%.

Tabela 9. Primeira avaliação do número de nódulos (NN), massa seca dos nódulos (MSN) e massa seca da parte aérea (MSPA) realizada no estágio V4 do desenvolvimento do feijoeiro, inoculado e coinoculado com as bactérias *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6, no experimento V conduzido com a cultivar Pérola na safra das águas 2020/2021.

Experimento V- Cultivar Pérola			
Tratamento <sup>1</sup>	NN N°planta <sup>-1</sup>	MSN mg planta <sup>-1</sup>	MSPA g planta <sup>-1</sup>
CA	30	92	5,10 c
CN 120	13	28	8,35 a
CN 60	22	62	7,42 ab
Rt	21	54	6,05 bc
Rt + N	22	54	7,66 ab
Rt + Az	28	92	5,90 bc
Rt + Az + N	21	48	7,69 ab
<b>CV (%)</b>	<b>47,33</b>	<b>47,98</b>	<b>16,9</b>

<sup>1</sup>CA: controle absoluto (não inoculado e sem adubação nitrogenada); CN: controle nitrogenado; Rt: inoculação com *Rhizobium tropici*; Az: inoculação com *Azospirillum brasilense*; +N: adubação nitrogenada 60 kg N ha<sup>-1</sup>; CV: coeficiente de variação. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não se diferenciam entre si pelo teste Duncan a 5%. Médias não acompanhadas por letras, não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos F (p<0,05).

## 6.2. Avaliação da nodulação e promoção de crescimento vegetal do feijoeiro após a inoculação suplementar tardia

Em todos os experimentos, observou-se que a inoculação suplementar tardia não resultou no aumento do número de nódulos, quando comparadas com a inoculação padrão e coinoculação via semente (FIGURA 10). Nos experimentos I, IV e V, conduzidos com a cultivar Pérola, o NN foi maior na primeira avaliação de nodulação (aproximadamente 30 dias após a emergência), onde se destacaram os tratamentos inoculados com *Rhizobium* e coinoculados com *Rhizobium* e *Azospirillum*. Após a inoculação suplementar tardia (aproximadamente 50 dias após a emergência) o número de nódulos nesses experimentos diminuiu em todos os tratamentos, quando comparadas com a inoculação padrão e a coinoculação via semente (FIGURA 10). Em contrapartida, nos experimentos II (cultivar Esteio) e III (cultivar Estilo), na segunda avaliação da nodulação, foram observadas maiores quantidades de nódulos em relação a primeira. Apesar da maior quantidade de nódulos ter sido observada na segunda avaliação, a inoculação padrão e a coinoculação foram os tratamentos que apresentaram maior NN e não diferiram estatisticamente dos tratamentos com inoculação suplementar tardia (FIGURA 10).

Dos cinco experimentos conduzidos, apenas no experimento I observou-se diferença significativa entre os tratamentos em relação ao número de nódulos (NN) (TABELAS 10, 11, 12, 13 e 14). Nesse experimento, o tratamento que apresentou maior quantidade de nódulos foi o coinoculado com *Rhizobium* e *Azospirillum* via semente, com aproximadamente 65 nódulos por planta, que foi significativamente diferente de todos os outros tratamentos, com exceção do tratamento da inoculação padrão com *Rhizobium* e o controle absoluto, que apresentaram 50 e 45 nódulos por planta, respectivamente (TABELA 10). O controle com 120 kg de N ha<sup>-1</sup> apresentou o menor NN. Os tratamentos que receberam inoculação suplementar tardia apresentaram menor NN em relação a coinoculação com *Rhizobium* e *Azospirillum*, sem se diferirem estatisticamente da inoculação padrão. O tratamento suplementado com *Rhizobium* via superfície do solo + N em cobertura e o tratamento suplementado com *Azospirillum* via foliar (estágio V4) apresentaram 60% e 49% menos nódulos em relação a inoculação padrão (TABELA 10).

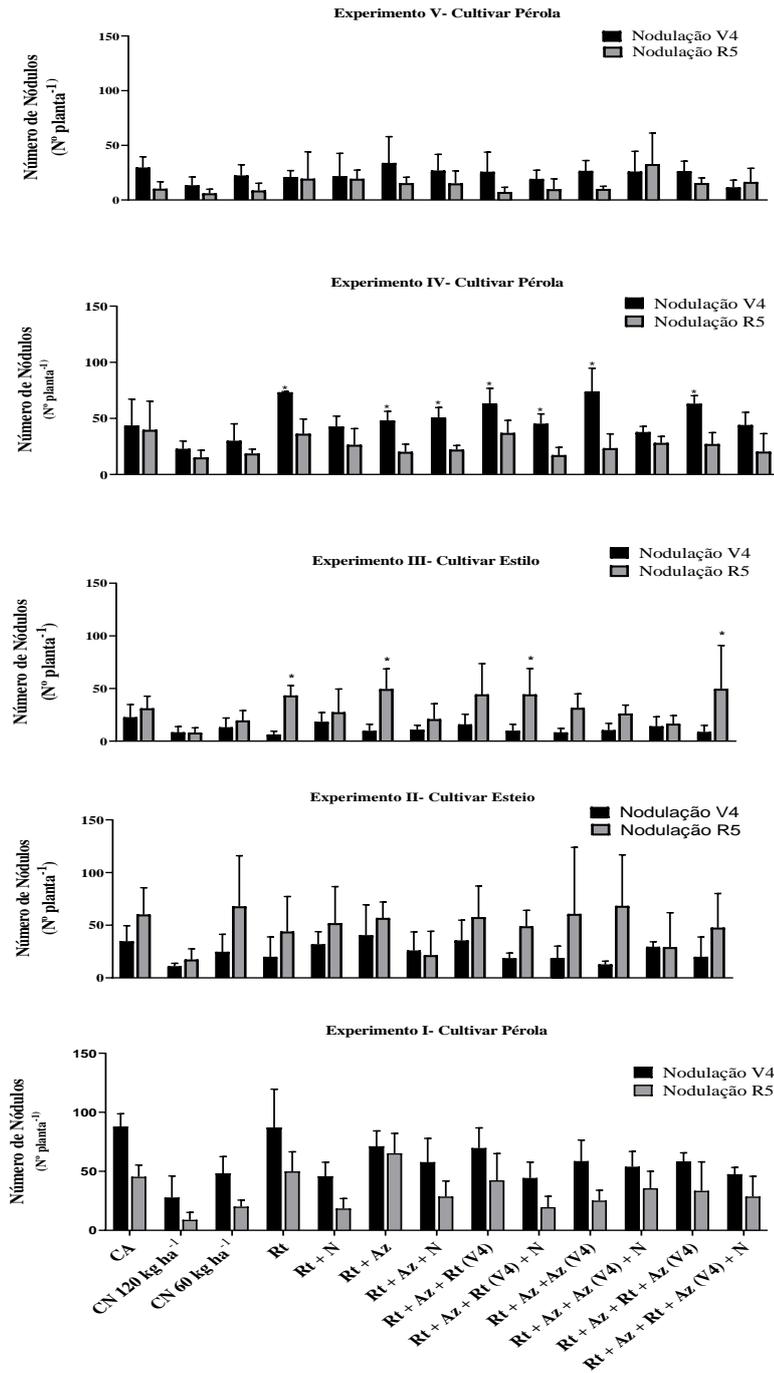


Figura 10. Comparação do número de nódulos, antes e após a inoculação suplementar tardia, em todos os cinco experimentos inoculados e coinoculados com as bactérias *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6. Foi utilizado o teste Tukey 5% para avaliar as diferenças estatísticas entre a primeira e a segunda avaliação de nodulação. Os \* representam diferenças significativas entre a nodulação antes (nodulação V4) e após a inoculação suplementar tardia (nodulação R5).

Em relação a massa seca dos nódulos (MSN), apenas nos experimentos I e III foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos (TABELA 10 e 12). No experimento I, conduzido com a cultivar Pérola, a coinoculação com *Rhizobium* e *Azospirillum* via semente apresentou os maiores valores de MSN e foram significativamente diferentes de todos os outros, com exceção da inoculação padrão com *Rhizobium* (TABELA 10). No experimento III esse mesmo tratamento mostrou o maior valor absoluto para a MSN, mas sem diferenças estatísticas quando comparado aos tratamentos controle absoluto, inoculação padrão, coinoculação nas sementes mais *R. tropici* suplementar e coinoculação nas sementes mais *Rhizobium* e *Azospirillum* suplementar com 60 kg de N ha<sup>-1</sup> (TABELA 12). De maneira geral, assim como na avaliação realizada no estágio V4, os tratamentos que receberam adubação nitrogenada em cobertura apresentaram uma nodulação menor (número e massa seca dos nódulos) quando comparados com os tratamentos apenas inoculados.

No experimento I foram observados maiores valores de massa seca da parte aérea (MSPA) nos tratamentos com 120 kg de N ha<sup>-1</sup>, coinoculação seguida de inoculação suplementar tardia com *Rhizobium* e *Azospirillum* + 60 kg de N ha<sup>-1</sup>, coinoculação mais inoculação suplementar tardia com *Azospirillum* + 60 kg de N ha<sup>-1</sup> e coinoculação via sementes, todos diferindo-se estatisticamente do controle absoluto (TABELA 10). No experimento III, apenas o tratamento controle com 120 kg de N ha<sup>-1</sup> se diferiu estatisticamente do controle absoluto (TABELA 12). No experimento IV, a MSPA foi significativamente maior no tratamento coinoculado seguido de inoculação suplementar tardia com *Rhizobium* e *Azospirillum* + 60 kg de N ha<sup>-1</sup>. Além desse, os tratamentos com 60 kg de N ha<sup>-1</sup>, 120 kg de N ha<sup>-1</sup> e inoculação padrão + 60 kg de N ha<sup>-1</sup>, também apresentaram maior MSPA que o controle absoluto (TABELA 13). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação a MSPA nos experimentos II e V (TABELAS 11 e 14).

No experimento I, foi observado maior concentração de NTPA no tratamento com coinoculação seguido de inoculação suplementar tardia com *Rhizobium* e *Azospirillum* + 60 kg de N ha<sup>-1</sup> em cobertura, com 657 mg de N g<sup>-1</sup> de MSPA, sendo significativamente superior ao controle absoluto (TABELA 10). Nesse experimento, os tratamentos com coinoculação seguido de inoculação suplementar tardia com *Azospirillum* + 60 kg de N ha<sup>-1</sup>, com 120 kg de N ha<sup>-1</sup> e apenas com coinoculação via sementes também apresentaram maiores concentrações de NTPA (TABELA 10). No

experimento III, conduzido com a cultivar Estilo, a concentração de NTPA variou entre os tratamentos, com o controle com 120 kg de N ha<sup>-1</sup> apresentando a maior concentração de NTPA (406 mg de N g<sup>-1</sup> de MSPA) (TABELA 12). Esse tratamento, juntamente com o de inoculação padrão com *R. tropici* + 60 kg de N ha<sup>-1</sup>, foram os únicos que se diferiram do controle absoluto (TABELA 12). No experimento IV, mais uma vez o tratamento com coinoculação seguido de inoculação suplementar tardia com *Rhizobium* e *Azospirillum* + 60 kg de N ha<sup>-1</sup> em cobertura se destacou e juntamente com os tratamentos com *R. tropici* + 60 kg de N ha<sup>-1</sup> e o controle com 60 kg de N ha<sup>-1</sup>, se diferenciou do controle absoluto. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação a NTPA nos experimentos II e V (TABELAS 11 e 14).

Tabela 10. Segunda avaliação do número de nódulos (NN), massa seca dos nódulos (MSN) e massa seca da parte aérea (MSPA) e teor total de nitrogênio da parte aérea (NTPA), realizada no estágio R5 do desenvolvimento do feijoeiro, inoculado e coinoculado com as bactérias *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6, no experimento I, conduzido com a cultivar Pérola na safra de inverno do ano de 2019.

### Experimento I- Cultivar Pérola

Tratamento <sup>1</sup>	NN N°planta <sup>-1</sup>	MSN mg planta <sup>-1</sup>	MSPA g planta <sup>-1</sup>	NTPA mg g <sup>-1</sup>
CA	45 abc	92 bcd	11,60 c	455 c
CN 120	9 f	10 e	16,29 a	656 a
CN 60	20 def	33 de	13,30 abc	512 abc
Rt	50 ab	122 ab	13,40 abc	550 abc
Rt + N	18 ef	28 de	14,33 abc	542 abc
Rt + Az	65 a	157 a	15,16 ab	610 ab
Rt + Az + N	28 bcdef	48 cde	14,49 abc	544 abc
Rt + Az + Rt	42 bcd	100 abc	13,35 abc	515 abc
Rt + Az + Rt (V4) + N	20 def	33 de	13,74 abc	527 abc
Rt + Az + Az (V4)	25 cdef	46 cde	13,38 abc	549 abc
Rt +Az + Az (V4) + N	36 bcde	51 cde	15,31 ab	632 ab
Rt + Az + Rt e Az (V4)	33 bcde	76 bcd	12,20 bc	495 bc
Rt + Az+ Rt e Az (V4) + N	29 bcdef	50 cde	16,25 a	657 a
<b>CV (%)</b>	<b>43,26</b>	<b>59,54</b>	<b>13,31</b>	<b>15,46</b>

<sup>1</sup>CA: controle absoluto (não inoculado e sem adubação nitrogenada); CN: controle nitrogenado; Rt: inoculação com *Rhizobium tropici*; Az: inoculação com *Azospirillum brasilense*; +N: adubação nitrogenada 60 kg N ha<sup>-1</sup>; V4: inoculação suplementar tardia no estágio fenológico V4 do feijoeiro; CV: coeficiente de variação. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não se diferenciam entre si pelo teste Duncan a 5%.

Tabela 11. Segunda avaliação do número de nódulos (NN), massa seca dos nódulos (MSN) e massa seca da parte aérea (MSPA) e teor total de nitrogênio da parte aérea (NTPA), realizada no estágio R5 do desenvolvimento do feijoeiro, inoculado e coinoculado com as bactérias *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6, no experimento II, conduzido com a Cultivar BRS Esteio na safra de inverno do ano de 2019.

**Experimento II- Cultivar BRS Esteio**

Tratamento <sup>1</sup>	NN	MSN	MSPA	NTPA
	N°planta <sup>-1</sup>	mg planta <sup>-1</sup>	g planta <sup>-1</sup>	mg g <sup>-1</sup>
CA	60	104	9,95	371
CN 120	17	45	9,40	364
CN 60	68	85	10,79	430
Rt	44	73	10,50	264
Rt + N	52	60	10,62	413
Rt + Az	57	122	12,70	474
Rt + Az + N	21	42	12,47	465
Rt + Az + Rt	58	97	10,90	437
Rt + Az + Rt (V4) + N	49	90	10,70	411
Rt + Az + Az (V4)	61	111	10,45	400
Rt + Az + Az (V4) + N	68	65	11,29	406
Rt + Az + Rt e Az (V4)	29	48	9,86	321
Rt + Az + Rt e Az (V4) + N	47	68	12,30	455
<b>CV (%)</b>	<b>62,46</b>	<b>64,56</b>	<b>26,76</b>	<b>27,36</b>

<sup>1</sup>CA: controle absoluto (não inoculado e sem adubação nitrogenada); CN: controle nitrogenado; Rt: inoculação com *Rhizobium tropici*; Az: inoculação com *Azospirillum brasilense*; +N: adubação nitrogenada 60 kg N ha<sup>-1</sup>; V4: inoculação suplementar tardia no estágio fenológico V4 do feijoeiro; CV: coeficiente de variação. Médias não acompanhadas por letras, não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos F (p<0,05).

Tabela 12. Segunda avaliação do número de nódulos (NN), massa seca dos nódulos (MSN) e massa seca da parte aérea (MSPA) e teor total de nitrogênio da parte aérea (NTPA), realizada no estágio R5 do desenvolvimento do feijoeiro, inoculado e coinoculado com as bactérias *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6, no experimento III, conduzido com a Cultivar BRS Estilo na safra de inverno do ano de 2019.

**Experimento III- Cultivar BRS Estilo**

Tratamento <sup>1</sup>	NN	MSN	MSPA	NTPA
	N°planta <sup>-1</sup>	mg planta <sup>-1</sup>	g planta <sup>-1</sup>	mg g <sup>-1</sup>
CA	31	222 abc	9,0 bcd	251 cde
CN 120	8	48 d	13,16 a	406 a
CN 60	19	115 cd	9,81 abcd	295 bcd
Rt	43	204 abc	7,01 cd	192 e
Rt + N	27	127 cd	11,36 ab	355 ab
Rt + Az	49	289 a	7,32 cd	219 de
Rt + Az + N	21	128 cd	11,46 ab	317 abc
Rt + Az + Rt	44	250 ab	6,62 d	273 bcde
Rt + Az + Rt (V4) + N	44	138 bcd	11,47 ab	320 abc
Rt + Az + Az (V4)	31	168 bc	8,40 bcd	220 de
Rt + Az + Az (V4) + N	26	130 cd	10,24 abc	312 bcd
Rt + Az + Rt e Az (V4)	16	133 bcd	6,98 cd	217 de
Rt + Az + Rt e Az (V4) + N	50	205 abc	9,68 abcd	305 bcd
<b>CV (%)</b>	63,41	43,3	22,54	20,43

<sup>1</sup>CA: controle absoluto (não inoculado e sem adubação nitrogenada); CN: controle nitrogenado; Rt: inoculação com *Rhizobium tropici*; Az: inoculação com *Azospirillum brasilense*; +N: adubação nitrogenada 60 kg N ha<sup>-1</sup>; V4: inoculação suplementar tardia no estágio fenológico V4 do feijoeiro; CV: coeficiente de variação. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não se diferenciam entre si pelo teste Duncan a 5%. Médias não acompanhadas por letras, não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos F (p<0,05).

Tabela 13. Segunda avaliação do número de nódulos (NN), massa seca dos nódulos (MSN) e massa seca da parte aérea (MSPA) e teor total de nitrogênio da parte aérea (NTPA), realizada no estágio R5 do desenvolvimento do feijoeiro, inoculado e coinoculado com as bactérias *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6, no experimento IV, conduzido com a Cultivar Pérola na safra das águas 2019/2020.

**Experimento IV- Cultivar Pérola**

Tratamento <sup>1</sup>	NN	MSN	MSPA	NTPA
	N°planta <sup>-1</sup>	mg planta <sup>-1</sup>	g planta <sup>-1</sup>	mg g <sup>-1</sup>
CA	40	137	9,45 d	306 c
CN 120	15	42	13,35 abc	406 abc
CN 60	19	50	14,55 ab	422 ab
Rt	40	115	11,68 bcd	371 abc
Rt + N	26	95	13,91 abc	429 ab
Rt + Az	20	77	10,70 cd	313 c
Rt + Az + N	22	58	12,15 bcd	360 bc
Rt + Az + Rt	37	120	11,30 bcd	332 bc
Rt + Az + Rt (V4) + N	17	55	11,56 bcd	334 bc
Rt + Az + Az (V4)	23	104	12,61 bcd	373 abc
Rt + Az + Az (V4) + N	28	83	11,28 bcd	333 bc
Rt + Az + Rt e Az (V4)	27	121	11,13 cd	327 bc
Rt + Az + Rt e Az (V4) + N	20	104	15,90 a	469 a
<b>CV (%)</b>	46,83	48,46	16,08	16,99

<sup>1</sup>CA: controle absoluto (não inoculado e sem adubação nitrogenada); CN: controle nitrogenado; Rt: inoculação com *Rhizobium tropici*; Az: inoculação com *Azospirillum brasilense*; +N: adubação nitrogenada 60 kg N ha<sup>-1</sup>; V4: inoculação suplementar tardia no estágio fenológico V4 do feijoeiro; CV: coeficiente de variação. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não se diferenciam entre si pelo teste Duncan a 5%. Médias não acompanhadas por letras, não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos F (p<0,05).

Tabela 14. Segunda avaliação do número de nódulos (NN), massa seca dos nódulos (MSN) e massa seca da parte aérea (MSPA) e teor total de nitrogênio da parte aérea (NTPA), realizada no estágio R5 do desenvolvimento do feijoeiro, inoculado e coinoculado com as bactérias *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6, no experimento V, conduzido com a Cultivar Pérola na safra das águas 2020/2021.

<b>Experimento V- Cultivar Pérola</b>			
Tratamento <sup>1</sup>	NN	MSN	MSPA
	N°planta <sup>-1</sup>	mg planta <sup>-1</sup>	g planta <sup>-1</sup>
CA	10	16	11,77
CN 120	6	10	13,11
CN 60	8	14	7,87
Rt	19	38	10,66
Rt + N	19	40	9,95
Rt + Az	15	29	9,85
Rt + Az + N	15	31	10,76
Rt + Az + Rt	7	12	8,32
Rt + Az + Rt (V4) + N	10	15	7,76
Rt + Az + Az (V4)	10	20	11,40
Rt + Az + Az (V4) + N	33	27	11,02
Rt + Az + Rt e Az (V4)	15	30	9,58
Rt + Az + Rt e Az (V4) + N	16	25	8,35
<b>CV (%)</b>	<b>82,74</b>	<b>88,09</b>	<b>31,87</b>

<sup>1</sup>CA: controle absoluto (não inoculado e sem adubação nitrogenada); CN: controle nitrogenado; Rt: inoculação com *Rhizobium tropici*; Az: inoculação com *Azospirillum brasilense*; +N: adubação nitrogenada 60 kg N ha<sup>-1</sup>; V4: inoculação suplementar tardia no estágio fenológico V4 do feijoeiro; CV: coeficiente de variação. Médias não acompanhadas por letras, não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos F (p<0,05).

### 6.3. Componentes de produtividade

Nos cinco experimentos conduzidos nesse trabalho, não houve diferenças significativas entre os tratamentos com relação a todos os parâmetros avaliados: número de vagem por planta (NV), número de grãos por vagem (NG), massa seca de 100 grãos (M100) e nitrogênio total do grão (NTG) (TABELAS 15 a 19).

Tabela 15. Avaliação dos componentes de produtividade: número de vagem por planta (NV), número de grãos por vagem (NG), massa seca de 100 grãos (M100) e teor total de nitrogênio nos grãos (NTG), no experimento I conduzido com a cultivar Pérola na safra de inverno do ano de 2019.

**Experimento I- Cultivar Pérola**

Tratamento <sup>1</sup>	NV N° planta <sup>-1</sup>	NG N° vagem <sup>-1</sup>	M100 g	NTG g kg <sup>-1</sup>
CA	14	6	24,81	32,13
CN 120	17	7	26,35	32,58
CN 60	15	7	25,25	33,19
Rt	12	6	24,70	33,95
Rt + N	16	6	25,42	32,16
Rt + Az	17	7	25,57	32,40
Rt + Az + N	16	7	25,94	32,77
Rt + Az + Rt	13	6	24,13	33,38
Rt + Az + Rt (V4) + N	14	7	25,70	32,05
Rt + Az + Az (V4)	17	6	24,59	32,66
Rt + Az + Az (V4) + N	15	7	26,80	33,44
Rt + Az + Rt e Az (V4)	14	7	25,58	32,52
Rt + Az + Rt e Az (V4) + N	18	7	26,24	31,79
<b>CV (%)</b>	<b>17,65</b>	<b>5,42</b>	<b>4,47</b>	<b>4,12</b>

<sup>1</sup>CA: controle absoluto (não inoculado e sem adubação nitrogenada); CN: controle nitrogenado; Rt: inoculação com *Rhizobium tropici*; Az: inoculação com *Azospirillum brasilense*; +N: adubação nitrogenada 60 kg N ha<sup>-1</sup>; V4: inoculação suplementar tardia no estágio fenológico V4 do feijoeiro; CV: coeficiente de variação. Médias não acompanhadas por letras, não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos F (p<0,05).

Tabela 16. Avaliação dos componentes de produtividade: número de vagem por planta (NV), número de grãos por vagem (NG), massa seca de 100 grãos (M100) e teor total de nitrogênio nos grãos (NTG), no experimento II conduzido com a cultivar BRS Esteio na safra de inverno do ano de 2019.

**Experimento II- Cultivar BRS Esteio**

Tratamento <sup>1</sup>	NV N° planta <sup>-1</sup>	NG N° vagem <sup>-1</sup>	M100 g	NTG g kg <sup>-1</sup>
CA	11	7	23,56	32,78
CN 120	14	7	24,85	33,16
CN 60	14	6	24,53	31,14
Rt	12	7	24,08	32,09
Rt + N	12	7	23,76	32,73
Rt + Az	11	7	22,10	31,44
Rt + Az + N	15	7	23,86	32,66
Rt + Az + Rt	13	7	23,44	32,82
Rt + Az + Rt (V4) + N	13	7	24,03	32,89
Rt + Az + Az (V4)	13	7	23,89	34,49
Rt + Az + Az (V4) + N	13	7	23,98	32,35
Rt + Az + Rt e Az (V4)	11	7	23,06	30,86
Rt + Az + Rt e Az (V4) + N	14	7	23,58	33,12
<b>CV (%)</b>	<b>17,83</b>	<b>5,3</b>	<b>4,56</b>	<b>6,08</b>

<sup>1</sup>CA: controle absoluto (não inoculado e sem adubação nitrogenada); CN: controle nitrogenado; Rt: inoculação com *Rhizobium tropici*; Az: inoculação com *Azospirillum brasilense*; +N: adubação nitrogenada 60 kg N ha<sup>-1</sup>; V4: inoculação suplementar tardia no estágio fenológico V4 do feijoeiro; CV: coeficiente de variação. Médias não acompanhadas por letras, não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos F (p<0,05).

Tabela 17. Avaliação dos componentes de produtividade: número de vagem por planta (NV), número de grãos por vagem (NG), massa seca de 100 grãos (M100) e teor total de nitrogênio nos grãos (NTG), no experimento III conduzido com a cultivar BRS Estilo na safra de inverno do ano de 2019.

**Experimento III- Cultivar BRS Estilo**

Tratamento <sup>1</sup>	NV N° planta <sup>-1</sup>	NG N° vagem <sup>-1</sup>	M100 g	NTG g kg <sup>-1</sup>
CA	13	6	25,69	
CN 120	18	5	26,77	
CN 60	15	6	25,37	
Rt	14	6	24,98	
Rt + N	14	6	26,05	
Rt + Az	14	6	25,47	
Rt + Az + N	15	6	26,23	
Rt + Az + Rt	14	6	26,25	
Rt + Az + Rt (V4) + N	16	6	26,04	
Rt + Az + Az (V4)	15	6	25,76	
Rt + Az + Az (V4) + N	18	6	25,12	
Rt + Az + Rt e Az (V4)	17	6	25,58	
Rt + Az + Rt e Az (V4) + N	16	6	26,74	
<b>CV (%)</b>	<b>18,18</b>	<b>4,66</b>	<b>4,07</b>	<b>nd</b>

<sup>1</sup>CA: controle absoluto (não inoculado e sem adubação nitrogenada); CN: controle nitrogenado; Rt: inoculação com *Rhizobium tropici*; Az: inoculação com *Azospirillum brasilense*; +N: adubação nitrogenada 60 kg N ha<sup>-1</sup>; V4: inoculação suplementar tardia no estágio fenológico V4 do feijoeiro; CV: coeficiente de variação; nd: não determinado. Médias não acompanhadas por letras, não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos F (p<0,05).

Tabela 18. Avaliação dos componentes de produtividade: número de vagem por planta (NV), número de grãos por vagem (NG), massa seca de 100 grãos (M100) e teor total de nitrogênio nos grãos (NTG), no experimento IV conduzido na safra das águas 2019/2020.

**Experimento IV- Cultivar Pérola**

Tratamento <sup>1</sup>	NV N° planta <sup>-1</sup>	NG N° vagem <sup>-1</sup>	M100 g	NTG g kg <sup>-1</sup>
CA	10	6	26,94	32,41
CN 120	11	6	27,11	30,47
CN 60	12	6	26,86	29,12
Rt	9	6	26,23	29,65
Rt + N	10	6	26,98	29,54
Rt + Az	9	6	26,75	30,27
Rt + Az + N	12	6	26,47	29,99
Rt + Az + Rt	10	6	26,83	32,30
Rt + Az + Rt (V4) + N	10	6	26,76	29,72
Rt + Az + Az (V4)	10	6	27,11	30,75
Rt + Az + Az (V4) + N	9	6	27,38	30,30
Rt + Az + Rt e Az (V4)	9	6	25,80	29,12
Rt + Az + Rt e Az (V4) + N	12	6	26,55	29,45
<b>CV (%)</b>	<b>15,58</b>	<b>6,14</b>	<b>2,52</b>	<b>6,27</b>

<sup>1</sup>CA: controle absoluto (não inoculado e sem adubação nitrogenada); CN: controle nitrogenado; Rt: inoculação com *Rhizobium tropici*; Az: inoculação com *Azospirillum brasilense*; +N: adubação nitrogenada 60 kg N ha<sup>-1</sup>; V4: inoculação suplementar tardia no estágio fenológico V4 do feijoeiro; CV: coeficiente de variação. Médias não acompanhadas por letras, não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos F (p<0,05).

Tabela 19. Avaliação dos componentes de produtividade: número de vagem por planta (NV), número de grãos por vagem (NG), massa seca de 100 grãos (M100) e teor total de nitrogênio nos grãos (NTG), no experimento V conduzido na safra das águas 2020/2021.

<b>Experimento V- Cultivar Pérola</b>				
Tratamento <sup>1</sup>	NV N° planta <sup>-1</sup>	NG N° vagem <sup>-1</sup>	M100 g	NTG g kg <sup>-1</sup>
CA	9	6	26,74	
CN 120	14	6	27,29	
CN 60	12	6	26,95	
Rt	10	6	26,65	
Rt + N	12	6	26,77	
Rt + Az	10	6	26,70	
Rt + Az + N	12	6	27,27	
Rt + Az + Rt	11	6	27,00	
Rt + Az + Rt (V4) + N	11	6	26,49	
Rt + Az + Az (V4)	10	6	27,19	
Rt + Az + Az (V4) + N	11	6	26,61	
Rt + Az + Rt e Az (V4)	11	6	26,28	
Rt + Az + Rt e Az (V4) + N	12	6	26,90	
<b>CV (%)</b>	<b>18,36</b>	<b>7,08</b>	<b>3,18</b>	<b>nd</b>

<sup>1</sup>CA: controle absoluto (não inoculado e sem adubação nitrogenada); CN: controle nitrogenado; Rt: inoculação com *Rhizobium tropici*; Az: inoculação com *Azospirillum brasilense*; +N: adubação nitrogenada 60 kg N ha<sup>-1</sup>; V4: inoculação suplementar tardia no estágio fenológico V4 do feijoeiro; CV: coeficiente de variação; nd: não determinado. Médias não acompanhadas por letras, não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos F (p<0,05).

#### **6.4. Produtividade de grãos**

De forma geral, avaliando os cinco experimentos em conjunto, os experimentos I e II apresentaram as maiores médias de produtividades (4164.303 kg ha<sup>-1</sup> e 4092.063 kg ha<sup>-1</sup>, respectivamente) e foram significativamente superior aos outros experimentos. O experimento III apresentou a menor média de produtividade (2912.089 kg ha<sup>-1</sup>), sendo estatisticamente inferior a todos os outros experimentos. Dentre os cinco experimentos, o tratamento que mais se destacou foi o CN 120 kg de N ha<sup>-1</sup> (média de produtividade 4292.568 kg ha<sup>-1</sup>) e o controle absoluto apresentou a menor média de produtividade (3316.494 kg ha<sup>-1</sup>).

Em todos os cinco experimentos conduzidos em campo, a produtividade do feijoeiro diferiu estatisticamente entre os tratamentos avaliados. Os tratamentos que foram suplementados com adubação nitrogenada apresentaram melhores desempenhos

em produtividade, que variou de 2800 a mais de 4600 kg de grãos ha<sup>-1</sup> (TABELA 20), sendo, no geral, estatisticamente diferentes dos tratamentos que não receberam adubação nitrogenada em cobertura. Os experimentos I, IV e V, conduzidos com a cultivar Pérola, e o experimento II, conduzido com a cultivar Esteio, todos na área experimental da Embrapa Cerrados, apresentaram produtividade de grãos por hectare semelhantes entre si, atingindo produtividades superiores a 4000 kg ha<sup>-1</sup>. No experimento III, conduzido na região de Paracatu-MG, com a cultivar Estilo, foram observados os menores valores de produtividade, variando de 2390 a 3500 kg grãos ha<sup>-1</sup>.

Os tratamentos com inoculação suplementar tardia e suplementados com 60 kg ha<sup>-1</sup> de N em cobertura não apresentaram diferença estatística com a inoculação padrão e a coinoculação via semente, também suplementados com 60 kg de N ha<sup>-1</sup>. Além disso, todos os tratamentos inoculados, nos quais não foi aplicado fertilizante nitrogenado, apresentaram produtividades inferiores ao controle com 120 kg de N ha<sup>-1</sup>, sendo este tratamento responsável pelos maiores valores absolutos de produtividade em quatro dos cinco experimentos avaliados (TABELA 20). No experimento II, com a cultivar Esteio, apesar de não se observar diferença estatística em relação ao controle com 60 kg de N ha<sup>-1</sup>, o tratamento coinoculado com *Rhizobium* e *Azospirillum* + 60 kg N ha<sup>-1</sup> N apresentou produtividade 10,32% superior (TABELA 20). No experimento V, com a cultivar Pérola, foi o tratamento coinoculado e suplementado com *Azospirillum* (V4) + 60 kg ha<sup>-1</sup> N que apresentou produtividade 8,76% superior ao controle com 60 kg de N ha<sup>-1</sup> (TABELA 20).

De maneira geral, os tratamentos inoculados, sem adubação nitrogenada em cobertura, apresentaram produtividades inferiores quando comparados aos tratamentos suplementados com nitrogênio em cobertura (60 kg ha<sup>-1</sup> N), com produtividade variando de 2300 a mais de 4000 kg de grãos ha<sup>-1</sup>. Nos cinco experimentos conduzidos nesse trabalho, a produtividade dos tratamentos apenas inoculados não diferiu estatisticamente do controle absoluto, e a inoculação suplementar tardia não resultou em produtividades significativamente diferentes da inoculação padrão e da coinoculação via semente (TABELA 20).

Tabela 20. Efeito da inoculação e coinoculação suplementar tardia, com as bactérias *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6, na produtividade (kg ha<sup>-1</sup>) de três cultivares do feijoeiro comum, cultivados em duas regiões distintas nas safras de inverno e safra das águas entre os anos de 2019 e 2021.

	<b>Experimento I- Cultivar Pérola</b>	<b>Experimento II- Cultivar BRS Esteio</b>	<b>Experimento III- Cultivar Estilo</b>	<b>Experimento IV- Cultivar Pérola</b>	<b>Experimento V- Cultivar Pérola</b>
Tratamento <sup>1</sup>	Safra de inverno 2019	Safra de inverno 2019	Safra de inverno 2019	Safra das águas 19/20	Safra das águas 20/21
CA	3520,1 e	3849,1 de	2440,9 de	3436,2 e	3336,3 ef
CN (120 kg ha <sup>-1</sup> N)	4666,4 a	4468,0 abc	3591,8 a	4426,4 a	4310,2 a
CN (60 kg ha <sup>-1</sup> N)	4584,7 a	4346,2 abcd	3354,2 ab	4102,0 b	3762,4 bcde
Rt	3663,5 e	3933,3 de	2390,1 e	3634,7 de	3188,4 f
Rt + N	4292,6 abc	4193,8 bcd	2866,9 bcde	4081,1 b	3898,0 abcd
Rt + Az	3876,8 cde	3876,8 de	2974,7 bcd	3749,9 cde	3721,3 bcde
Rt + Az + N	4267,6 abc	4794,6 a	2932,8 bcde	4046,5 bc	3997,4 abc
Rt + Az + Rt (V4)	3606,0 e	4016,2 cde	2442,7 de	3908,5 bcd	3555,2 cdef
Rt + Az + Rt (V4) +N	4128,3 bcd	4336,3 abcd	3016,2 bc	3930,4 bcd	3830,3 abcde
Rt + Az + Az (V4)	3870,0 cde	3612,7 e	2736,3 cde	3743,6 cde	3610,3 bcdef
Rt + Az + Az (V4) + N	4471,8 ab	4117,4 cde	3193,2 abc	4093,8 b	4092,0 ab
Rt + Az + Rt e Az (V4)	3797,9 de	3953,7 de	2722,1 cde	3473,5 e	3427,6 def
Rt + Az + Rt e Az (V4) +N	4451,1 ab	4637,8 ab	3400,1 abc	4027,3 bc	3865,9 abcd
<b>CV (%)</b>	<b>6,76</b>	<b>7,52</b>	<b>11,71</b>	<b>5,07</b>	<b>8,37</b>

<sup>1</sup>CA: controle absoluto (não inoculado e sem adubação nitrogenada); CN: controle nitrogenado; Rt: inoculação com *Rhizobium tropici*; Az: inoculação com *Azospirillum brasilense*; +N: adubação nitrogenada 60 kg ha<sup>-1</sup>; V4: inoculação suplementar tardia no estágio fenológico V4 do feijoeiro; CV: coeficiente de variação. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não se diferenciam entre si pelo teste Duncan a 5%.

Como mencionado anteriormente, foi possível observar uma nítida diferença de produtividade entre os tratamentos suplementados com nitrogênio e os que não receberam nitrogênio em cobertura. Com base nisso, os tratamentos suplementados e não suplementados com nitrogênio foram avaliados separadamente em relação aos controles nitrogenados e ao controle absoluto, respectivamente (FIGURAS 11 e 12).

Em relação a produtividade dos tratamentos inoculados, sem adubação nitrogenada em cobertura, somente no experimento no IV observou-se diferença estatística entre os tratamentos. Nesse caso, a inoculação suplementar tardia com *Rhizobium* foi o único tratamento a se diferir do controle absoluto, com produtividade 12% superior. Porém, a inoculação suplementar tardia não apresentou diferença estatística em relação a inoculação padrão e a coinoculação via semente (FIGURA 11).

Avaliando os tratamentos inoculados e suplementados com nitrogênio, a inoculação suplementar tardia não diferiu estatisticamente da inoculação padrão e coinoculação via semente em nenhum dos experimentos (FIGURA 12). Apesar disso, no experimento V, a inoculação suplementar tardia com *Azospirillum* + N em cobertura resultou em uma produtividade 11,3% superior ao controle com 60 kg de N ha<sup>-1</sup>.

Através do teste F máximo de Hartley foi possível observar que os cinco experimentos são homogêneos, podendo realizar uma análise conjunta dos experimentos. Com base nisso, os experimentos I, III, IV e V, conduzidos com cultivares do grupo de feijão carioca, foram avaliados em conjunto em relação a produtividade. Nos tratamentos inoculados, sem adubação nitrogenada, a coinoculação via semente apresentou a maior produtividade (em média 3500 kg de grãos ha<sup>-1</sup>), sendo 10% superior a inoculação padrão com *Rhizobium* (FIGURA 13A). A produtividade com a inoculação suplementar tardia com *Azospirillum* também foi superior a inoculação padrão, apresentando um aumento de 7,7% na produtividade de grãos. Em relação aos tratamentos inoculados e suplementados com nitrogênio em cobertura (60 kg de N ha<sup>-1</sup>), a inoculação suplementar tardia não apresentou diferença estatística com a inoculação padrão, com a coinoculação, ou com o controle com 60 kg de N ha<sup>-1</sup> (FIGURA 13B).

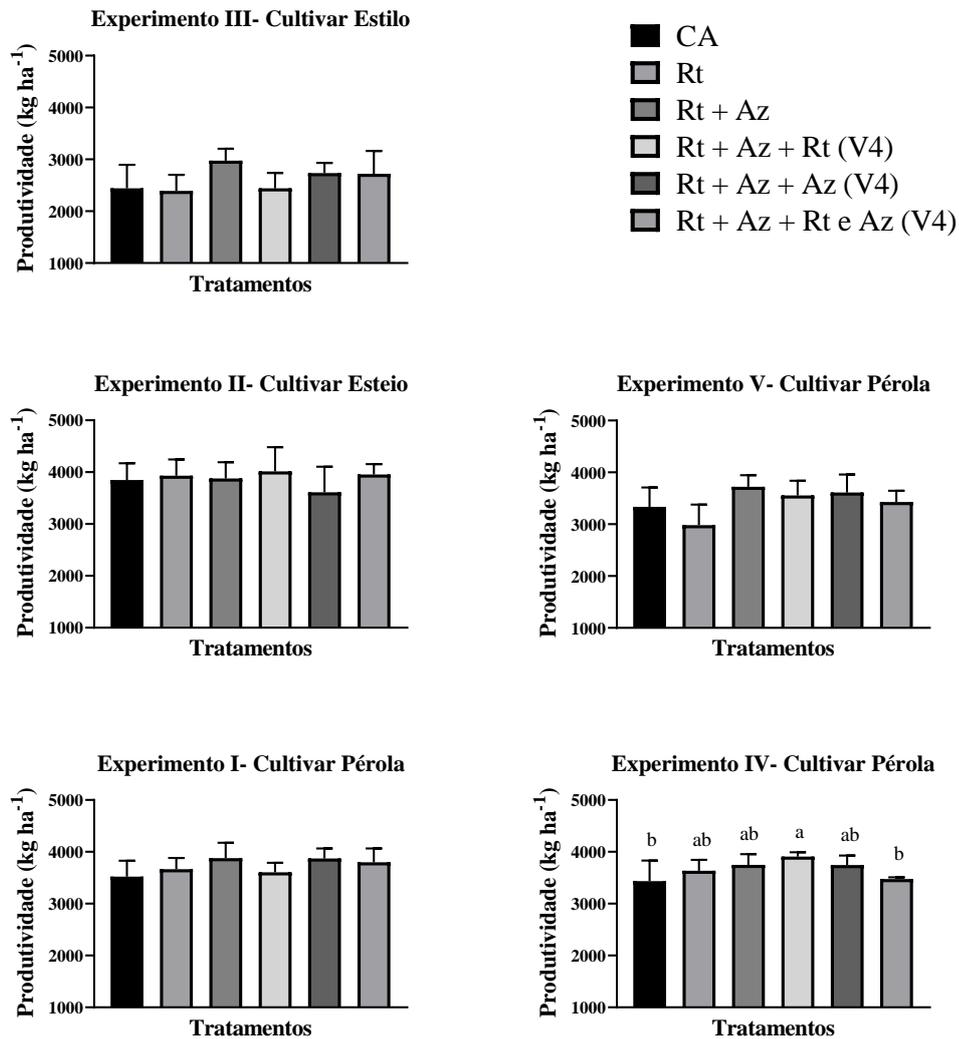


Figura 11. Produtividade de grãos (kg ha<sup>-1</sup>) dos tratamentos que não receberam adubação nitrogenada em cobertura nos cinco experimentos conduzidos na região de Planaltina-DF e Paracatu-MG. A ordem dos tratamentos da esquerda para direita: **CA**: controle absoluto; **Rt**: inoculação com *Rhizobium tropici*; **Rt+Az**: inoculação com *R. tropici* e *Azospirillum brasilense*; **Rt+Az+Rt(V4)**: coinoculação e inoculação suplementar tardia com *R. tropici*; **Rt+Az+Az(V4)**: coinoculação e inoculação suplementar tardia com *A. brasilense*; **Rt+Az+Rt+Az(V4)**: coinoculação e inoculação suplementar tardia com *R. tropici* e *A. brasilense*.

Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste Duncan  $p < 0,05$

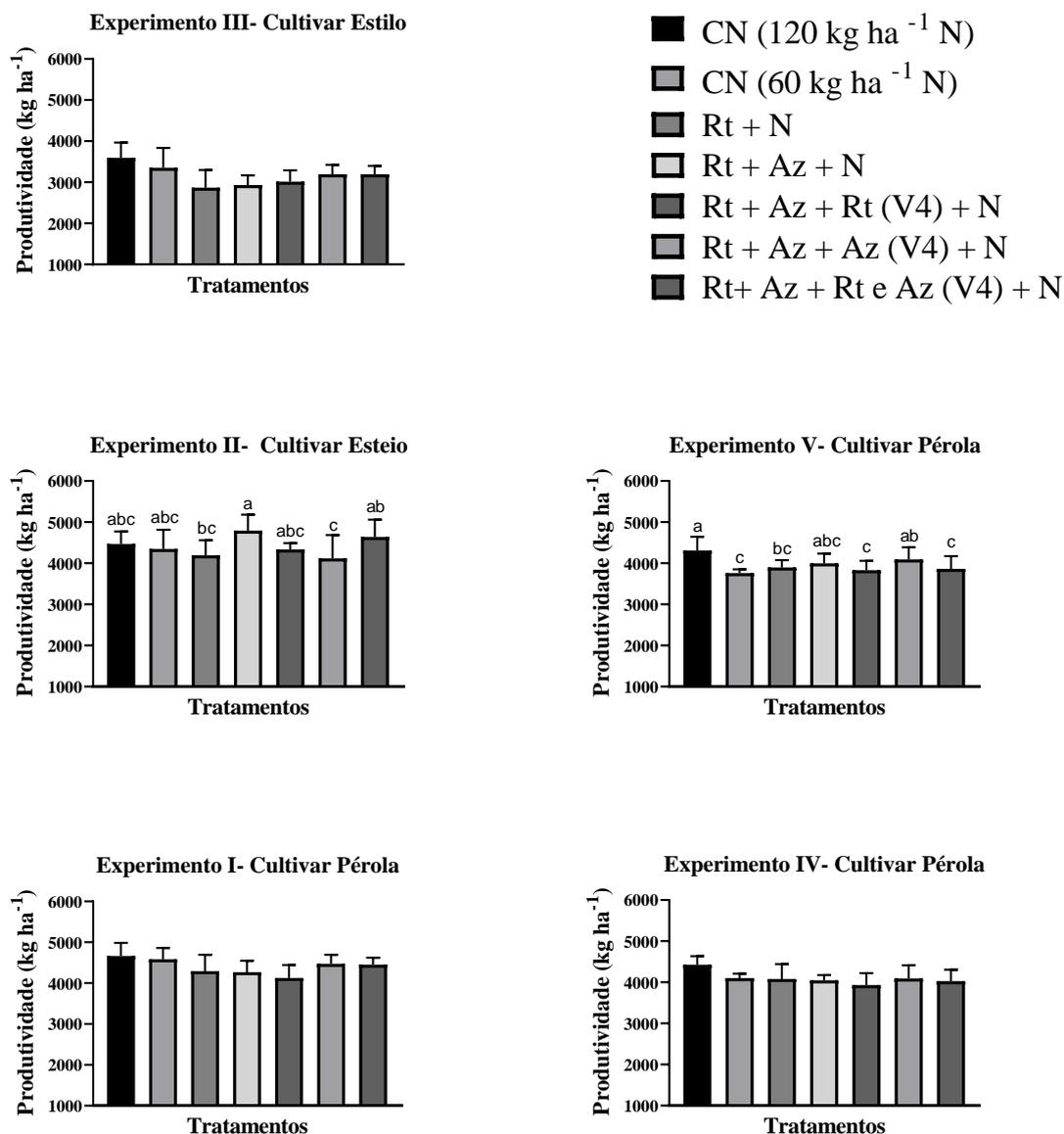


Figura 12. Produtividade de grãos (kg ha<sup>-1</sup>) dos tratamentos que receberam adubação nitrogenada em cobertura nos cinco experimentos conduzidos na região de Planaltina-DF e Paracatu-MG. Os tratamentos em ordem da esquerda para direita são: **CN 120 kg ha<sup>-1</sup>**: controle nitrogenado 120 kg ha<sup>-1</sup> de N; **CN 60 kg ha<sup>-1</sup>**: controle nitrogenado 60 kg ha<sup>-1</sup> de N; **Rt + N**: inoculação com *Rhizobium tropici* + 60 kg ha<sup>-1</sup> de N; **Rt+Az + N**: inoculação com *R. tropici* e *Azospirillum brasilense* + 60 kg ha<sup>-1</sup> de N; **Rt+Az+Rt(V4) + N**: coinoculação e inoculação suplementar tardia com *R. tropici* + 60 kg ha<sup>-1</sup> de N; **Rt+Az+Az(V4) + N**: coinoculação e inoculação suplementar tardia com *A. brasilense* + 60 kg ha<sup>-1</sup> de N; **Rt+Az+Rt+Az(V4) + N**: coinoculação e inoculação suplementar tardia com *R. tropici* e *A. brasilense* + 60 kg ha<sup>-1</sup>. Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste Duncan p<0,05.

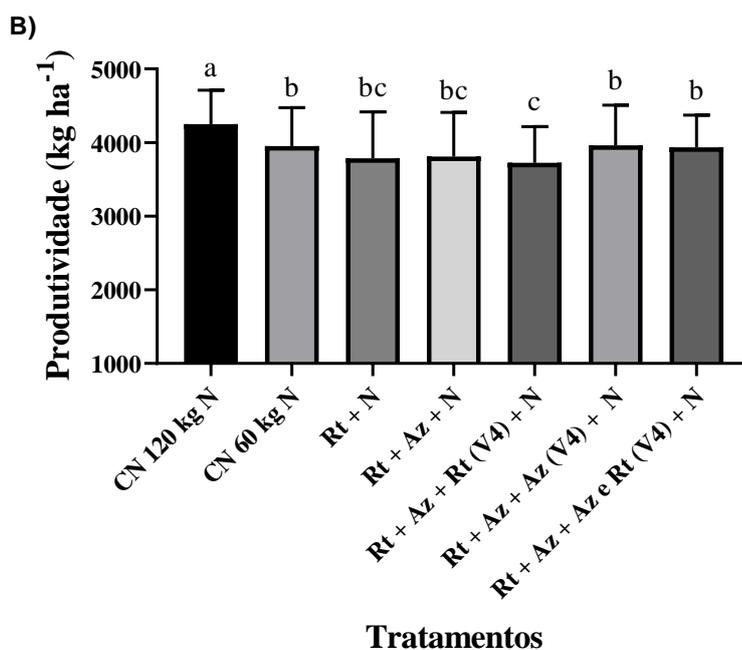
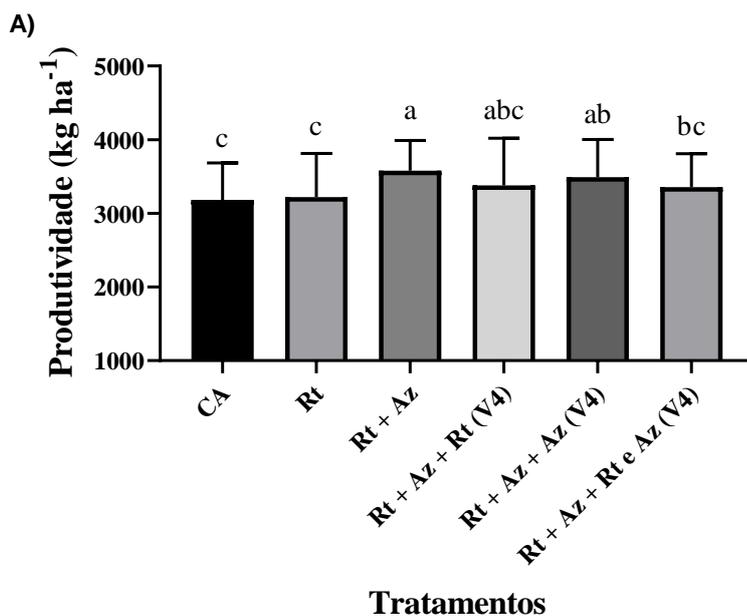


Figura 13. Análise conjunta dos experimentos I, III, IV e V conduzidos com as cultivares Pérola e Estilo pertencentes ao grupo do feijão Carioca, em relação a produtividade dos tratamentos que não receberam adubação nitrogenada em cobertura (A) e tratamentos que foram suplementados com adubação nitrogenada em cobertura (B). Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste Duncan  $p < 0,05$ .

## 7. DISCUSSÃO

Considerando o total da área cultivada e a quantidade de doses de inoculantes vendidas nos últimos anos, a inoculação do feijoeiro no Brasil ainda é muito baixa, com cerca de 5% dos cultivos inoculados com as estirpes de rizóbios selecionadas (ANPII, 2016; CONAB, 2021). Um dos motivos da baixa disseminação da prática de inoculação do feijoeiro no Brasil está relacionada com as variações das respostas nessa cultura, que pode ser influenciada por diversos fatores. Segundo Fageria *et al.* (2014), a nodulação (número e massa seca dos nódulos) e a eficiência simbiótica da fixação biológica de nitrogênio no feijoeiro é altamente influenciada pela a) falta de interação e especificidade entre a planta e rizóbio, b) pela competição entre bactérias eficientes e ineficientes capazes de nodular o feijoeiro e c) pela concentração de nitrogênio disponível no solo ou fornecido como fertilizante nitrogenado (SINGH, 1992), além de fatores abióticos como tipo de solo, precipitação (estresse hídrico) e temperatura (época de cultivo) (BAKHOUM *et al.*, 2016; BARROS *et al.*, 2013; BRITO, *et al.*, 2015; VARGAS; MENDES; HUNGRIA, 2000).

Em todos os experimentos conduzidos no presente trabalho o fornecimento de nitrogênio mineral em cobertura influenciou a resposta da inoculação em relação aos parâmetros avaliados. Na nodulação (número e massa seca dos nódulos), a adubação em cobertura teve efeito negativo, diminuindo o NN e a MSN. Por outro lado, a promoção de crescimento (MSPA, N foliar e produtividade) foi afetada positivamente com o fornecimento de nitrogênio em cobertura. A diminuição ou inibição da nodulação no feijoeiro por meio do fornecimento de N mineral é bastante elucidado na literatura. O estímulo para iniciar o processo de nodulação no feijoeiro é dependente do teor de N mineral no solo e o aumento da disponibilidade desse nutriente pode inibir a formação e o crescimento dos nódulos (STEINER *et al.*, 2019). A nível molecular, o nitrato no solo pode induzir a produção de um peptídeo (peptídeo CLE - induzido pela presença de nitrato) que impede a progressão da formação dos nódulos pelo mecanismo de autorregulação da nodulação na raiz (FERGUSON *et al.*, 2010; PUPPO *et al.*, 2005; REID *et al.*, 2011). Além disso, o aumento da concentração de nitrogênio inibe a atividade enzimática da nitrogênase, afetando diretamente a eficiência da FBN.

Pelegrin *et al.* (2009) demonstraram, por meio de uma análise de regressão, o efeito linear significativo da redução do número e massa seca dos nódulos com o aumento das doses de nitrogênio fornecidas em cobertura, diminuindo até 41% e 79% o

número de nódulos quando suplementados com 40 e 160 kg de N ha<sup>-1</sup>, respectivamente. Além de diminuir a nodulação no feijoeiro, Vargas, Mendes e Hungria (2000) demonstraram que altas quantidades de nitrogênio mineral fornecida durante o cultivo do feijoeiro diminuiu a ocupação dos nódulos de 91% para 17% pela bactéria *R. tropici* CIAT 899. Em contraste, os autores observaram que a ocupação dos nódulos pelas bactérias nativas não foi afetada pela concentração de nitrogênio, indicando que essas podem ter um potencial de maior tolerância as concentrações de N no solo.

Visto que a nodulação e o potencial produtivo do feijoeiro pode ser afetado pela concentração de nitrogênio disponível, inúmeras estratégias de inoculação combinada com pequenas doses de nitrogênio mineral têm sido relatadas (BRITO *et al.*, 2015; HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2003; PELEGRIN *et al.*, 2009; SOARES *et al.*, 2016). Nesse trabalho foi possível observar a inibição da nodulação no tratamento que recebeu a maior dose de nitrogênio por hectare (120 kg de N ha<sup>-1</sup>) e redução da nodulação nos tratamentos que receberam 60 kg de N ha<sup>-1</sup> (30 kg de N ha<sup>-1</sup> aplicados 7 e 30 dias após a emergência), quando comparados com os tratamentos apenas inoculados. As melhores respostas de inoculação em relação a nodulação, produtividade e aspecto econômico, tem sido obtidas com dosagens de nitrogênio mineral inferior a 60 kg de N ha<sup>-1</sup>, principalmente quando fornecido de 15-20 kg de N ha<sup>-1</sup> no momento da semeadura e o restante no início do florescimento (BARROS *et al.*, 2017; HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2003; PELEGRIN *et al.*, 2009; RODRIGO *et al.*, 2017; SOARES *et al.*, 2016). Da mesma forma, Hungria, Campos e Mendes (2003) relataram um decréscimo na nodulação do feijoeiro quando suplementados com 30 kg de N ha<sup>-1</sup> tanto na semeadura quanto no início do florescimento. Isso pode indicar que o período de aplicação e a dosagem do fertilizante utilizada nos experimentos conduzidos nesse trabalho podem ter afetado a nodulação.

Além disso, as cultivares apresentam diferenças na eficiência do uso de nitrogênio mineral fornecido e isso pode afetar diretamente a simbiose entre a estirpe inoculada e o feijoeiro (FAGERIA *et al.*, 2014). A cultivar Pérola é considerada eficiente no uso de nitrogênio, enquanto a cultivar BRS Estilo é moderadamente eficiente, ou seja, essas cultivares responderam melhor ao fornecimento de nitrogênio e tiveram melhores resultados em termos de promoção de crescimento e produtividade quando comparadas com as plantas apenas inoculadas (FAGERIA *et al.*, 2014).

Dentre os cinco experimentos conduzidos nesse trabalho, apenas o tratamento coinoculado via semente (conduzido na estação seca com a cultivar Pérola), sem adubação nitrogenada, apresentou uma relação positiva entre o aumento da nodulação com o aumento da biomassa da parte aérea e da concentração total de nitrogênio foliar, e que foram estatisticamente diferentes do controle não inoculado. Isso pode indicar que, nesse experimento, os rizóbios nativos que, possivelmente, nodularam as plantas do controle não inoculado, não foram capazes de promover o crescimento do feijoeiro em comparação com o tratamento coinoculado com *Rhizobium* e *Azospirillum*, apontando uma melhor eficiência de fixação obtida por essa estratégia de inoculação.

No entanto, na maioria dos experimentos não foi observada diferença estatística entre os tratamentos inoculados (sem adubação nitrogenada) e o controle absoluto, em relação a biomassa seca da parte aérea, a concentração de nitrogênio foliar e a produtividade. Essas variações das respostas da inoculação e coinoculação, em relação aos parâmetros avaliados nos cinco experimentos conduzidos no presente trabalho, podem estar relacionada com a baixa qualidade dos inoculantes utilizados, verificada pelo método de contagem de UFC, que demonstrou concentrações das bactérias até 10 vezes inferior a garantia do fabricante.

No presente trabalho, a contagem pelo método do número mais provável (NMP) demonstrou concentrações de  $1,6 \times 10^6$ ,  $8,4 \times 10^5$  e  $2,5 \times 10^3$  UFC de rizóbios nativos  $g^{-1}$  solo, nos experimentos I, II e V, respectivamente. Provavelmente, esses resultados expliquem a ocorrência de nódulos nos controles absolutos (não inoculados). A presença de uma alta população de rizóbios nativos bem estabelecidos e diversa nos solos brasileiros é uma das grandes limitações do sucesso da inoculação do feijoeiro (VARGAS, MENDES E HUNGRIA, 2000). Em experimentos conduzidos no Distrito Federal (Planaltina-DF), Vargas, Mendes e Hungria. (2000) demonstraram que, em áreas com histórico de cultivo do feijoeiro, a inoculação com estirpes selecionadas não teve efeito em relação aos parâmetros avaliados (número de nódulos, massa seca de nódulos, massa seca da parte aérea e produtividade). Os autores observaram que, mesmo nos tratamentos inoculados, os nódulos estavam majoritariamente ocupados com estirpes nativas (90%).

Apesar dos nódulos presentes nos controles absolutos (não inoculados), esse tratamento apresentou os piores desempenhos na maioria dos parâmetros avaliados, principalmente massa seca da parte aérea (MSPA), concentração de nitrogênio foliar e

produtividade de grãos, não diferindo dos tratamentos inoculados. Isso pode indicar que os nódulos formados podem estar ocupados, majoritariamente, por rizóbios nativos que podem ser pouco eficientes na aquisição de nitrogênio pelo processo de fixação biológica, comprometendo o potencial de FBN no feijoeiro (MICHIELS *et al.*, 1998; CARDOSO *et al.*, 2012; VLASSAK; VANDERLEYDEN; FRANCO, 1996).

Assim como nesse trabalho, a ausência de resposta frente a inoculação com estirpes selecionadas no cultivo do feijoeiro, em solos com alta população de rizóbios nativos, tem sido relatada em outros experimentos conduzidos na região do Cerrado. Em experimentos conduzidos em Goiás e Mato Grosso do Sul, em solos com alta concentração de rizóbios nativos ( $10^5$  e  $10^4$  células por grama de solo), não foi observado diferença significativa em relação ao número e massa de nódulos, teor de nitrogênio foliar e nos grãos, massa seca da parte aérea e produtividade quando inoculados com *R. tropici* CIAT 899 (BRITO *et al.*, 2015b; PELEGRIN *et al.*, 2009). A alta população de rizóbios nativos no solo, aumenta a competição com as estirpes inoculadas e pode diminuir as respostas positivas da inoculação (VARGAS; MENDES; HUNGRIA, 2000). Como demonstraram Vlassak, Vanderleyden e Franco (1996), na ausência ou baixa população de rizóbios nativos do solo, a bactéria *R. tropici* CIAT 899 provou ser a mais competitiva entre as estirpes avaliadas, resultando em até 80% da ocupação dos nódulos. No entanto, na presença de  $10^3$  células de rizóbios nativos por grama de solo, a ocupação dos nódulos pela CIAT 899 diminuiu, indicando uma perda de competitividade em solos com altas populações dessas bactérias.

Para contornar os fatores que afetam a eficiência da FBN no feijoeiro e garantir altos níveis de produtividades de modo sustentável e a baixo custo, estudos recentes têm demonstrado o sucesso ou o potencial de novas estratégias de inoculação propostas para a cultura do feijoeiro. A coinoculação e inoculação suplementar aquela realizada no plantio (em outros estágios de desenvolvimento da cultura) têm resultado em ganhos significativos em produtividade e promoção do crescimento vegetal (SOUZA; FERREIRA, 2017; MORETTI *et al.*, 2018; STEINER; FERREIRA; ZUFFO, 2019).

Nesse trabalho, a avaliação realizada antes e após a inoculação suplementar tardia (aproximadamente 30 e 50 dias após a emergência), demonstrou que a inoculação apenas com *R. tropici* ou coinoculação com *R. tropici* e *A. brasilense*, ambos via semente, foi capaz de promover a maior nodulação entre os tratamentos. Em média, no estágio R5, a coinoculação alcançou número de nódulos 27%, 14% e 37% superior a

inoculação suplementar tardia nas cultivares Pérola, BRS Esteio e BRS Estilo, respectivamente. Em experimentos conduzidos em Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul, a coinoculação do feijoeiro, com as bactérias *R. tropici* CIAT 899 e *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6, promoveu melhor nodulação, alcançando número de nódulos 9% (SOUZA; FERREIRA, 2017) e 43% (STEINER; FERREIRA; ZUFFO, 2019) superior em relação a inoculação padrão (inoculação com *Rhizobium tropici* CIAT 899 via semente). Resultados semelhantes foram obtidos em experimentos conduzidos no estado do Paraná, com as cultivares IPR-Colibri e IAPAR 81, onde a inoculação padrão e a coinoculação resultaram nos melhores resultados de nodulação (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013). Esses resultados reforçam a efetividade da coinoculação com *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 no aumento da nodulação no feijoeiro.

A coinoculação na cultura do feijoeiro já foi avaliada utilizando-se diversos microrganismos promotores do crescimento em conjunto com as bactérias simbióticas, como cianobactérias (*Anabaena cylindrica*) (HORÁCIO *et al.*, 2020), fungos saprófitos e fungos micorrízicos (ABDEL-FATTAH *et al.*, 2016; CARDOSO; FERREIRA, 2021), outros rizóbios (CARVALHO *et al.*, 2020; JESUS *et al.*, 2018), *Pseudomonas* e *Azospirillum* (SOUZA; FERREIRA, 2017; HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013; PASTOR-BUEIS *et al.*, 2021). A coinoculação do feijoeiro e da soja com *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 é recomendada no Brasil desde 2016, tendo demonstrado resultados significativos em nodulação, promoção de crescimento e produtividade (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013, 2015b).

O sucesso do uso da bactéria *A. brasilense* em diversas culturas de importância agrícola (como milho, trigo, arroz, soja, feijão) é associado com seus inúmeros mecanismos que promovem o crescimento vegetal como a capacidade de fixar nitrogênio da atmosfera, alta produção de fitohormônios (como o ácido indolacético-AIA), conferir resistência a estresses abióticos como déficit hídrico e estresse salino, além de induzir resistência sistêmica contra fitopatógenos (CASSÁN *et al.*, 2020; FUKAMI; CEREZINI; HUNGRIA, 2018; RONDINA *et al.*, 2020). A produção dos reguladores de crescimento vegetal como o ácido indolacético (AIA) por *A. brasilense* modifica a arquitetura da raiz, aumenta o desenvolvimento das raízes laterais e pêlos radiculares, o que resulta na absorção de água e nutrientes. Adicionalmente, o aumento

do número de pêlos radiculares e raízes laterais pode aumentar os sítios de nodulação, resultando em maiores quantidade de nódulos por planta (RONDINA *et al.*, 2020).

A inoculação suplementar realizada no estágio V4 não resultou em uma maior nodulação (número e massa seca dos nódulos), promoção de crescimento e produtividade, em relação a inoculação padrão (apenas com *R. tropici*) e coinoculação via semente. Um dos motivos para essa ausência de resposta da inoculação suplementar tardia pode estar relacionado com a autorregulação da nodulação (AON), que geralmente ocorre em leguminosas e regula o número de nódulos formados, principalmente, na coroa da raiz (KINKEMA; SCOTT; GRESSHOFF, 2006; REID *et al.*, 2011). Além de ser regulada pela quantidade de nódulos formados, a AON pode ser suprimida ou ativada com base na disponibilidade de nitrogênio no solo, optando pela fonte de nitrogênio energeticamente mais favorável (KINKEMA; SCOTT; GRESSHOFF, 2006; REID *et al.*, 2011). De acordo com Kassaw, Bridges e Frugoli (2015), a AON foi suprimida quando os nódulos das raízes de *Medicago truncatula* não estavam fornecendo o nitrogênio necessário para o desenvolvimento da planta, contornando, assim, o mecanismo de AON. Em experimento conduzido com soja, Moretti *et al.* (2018) realizaram inoculações adicionais com *Bradyrhizobium* spp. nos estágios V1, V3, V6, R1 e R3 (além da inoculação via semente) e obtiveram aumentos significativos na nodulação das plantas até o estágio R6, indicando que as inoculações suplementares podem ter contornado o processo de AON e permitido o desenvolvimento de novos nódulos funcionais, especialmente durante o enchimento das vagens. No entanto, ao contrário dos resultados obtidos por Moretti *et al.* (2018), a inoculação suplementar tardia proposta nesse trabalho pode não ter sido capaz de “driblar” o sistema de autorregulação da nodulação no feijoeiro e evitar a senescência precoce dos nódulos.

Por ser uma cultura com ciclo de cultivo curto, com rápido início do período reprodutivo, o feijoeiro apresenta um curto período com nódulos ativos, iniciando a senescência dos nódulos no início da floração, período no qual há maior demanda por nitrogênio para o enchimento dos grãos (ANDRAUS; CARDOSO; FERREIRA, 2016; HANSEN *et al.*, 1993; LUQUEÑO *et al.*, 2008). A senescência dos nódulos em culturas de ciclo regular, como as utilizadas nesse trabalho, inicia aproximadamente 45 dias após a emergência (aproximadamente no estágio R5) e culmina na senescência total em aproximadamente 65 dias após emergência (aproximadamente no estágio R7-R8)

(ANDRAUS; CARDOSO; FERREIRA, 2016). A inoculação suplementar tardia no estágio V4 de desenvolvimento pode não ter resultado em respostas positivas porque é justamente no estágio V4 que se encontra a maior porcentagem de nódulos ativos (60%-65% dos nódulos ativos), encaminhando em seguida para o estágio R5, onde ocorre a estabilização na formação dos nódulos (ANDRAUS; CARDOSO; FERREIRA, 2016). Dessa forma, considerando o ciclo curto de crescimento do feijoeiro, a inoculação suplementar no estágio V4 pode ter sido tarde para estimular a formação de novos nódulos.

Essa diferença entre soja e feijoeiro, em relação a resposta da inoculação suplementar tardia possivelmente está relacionada com algumas características específicas de cada cultura. Ao contrário do feijoeiro, a soja não é uma cultura promiscua e possui um maior período com nódulos ativos (estágio V2 a R6), sendo ainda capaz de contornar os mecanismos de autoregulação da nodulação e manter nódulos ativos até o período de formação das vagens (R6) (MORETTI *et al.*, 2018).

Apesar da escassez de informações relacionadas a inoculação suplementar com *Rhizobium*, inoculações com *A. brasilense* via foliar no estágio V2/V3 resultaram em ganhos significativos na nodulação, promoção de crescimento e produtividade no feijoeiro em experimentos conduzidos no Centro-Oeste (SOUZA; FERREIRA, 2017), indicando que inoculações realizadas antes do estágio V4 podem induzir uma resposta positiva das plantas, próximo ao período de maior atividade dos nódulos (V4), podendo gerar melhores respostas em termos de nodulação e produtividade.

Em experimento em campo, conduzido em Santa Catarina com a cultivar IPR Tuiuiú, a coinoculação com *R. tropici* + *A. brasilense* (via semente) + *A. brasilense* via foliar (no período da floração) promoveu aumento de 47% e 58% na biomassa da parte aérea e acúmulo de nitrogênio foliar, respectivamente, em comparação com a coinoculação via semente (FILIPINI *et al.*, 2021). De acordo com Filipini *et al.* (2021), os resultados expressivos na promoção de crescimento e produtividade, quando coinoculados com *R. tropici* e *A. brasilense* + *A. brasilense* via foliar, são devido as características promotoras de crescimento da bactéria *A. brasilense*. Neste trabalho (experimento I), resultados divergentes aos de Filipini *et al.* (2021) foram observados. O número de nódulos do tratamento com inoculação com *A. brasilense* via foliar no estágio V4 foi 62% (25 nódulos por planta) inferior ao número de nódulos do tratamento que recebeu coinoculação via semente (65 nódulos por planta) e não diferiu da inoculação

padrão e coinoculação via semente em relação a biomassa da parte aérea, concentração de N foliar e produtividade.

As cultivares Pérola, BRS Estilo e BRS Esteio (todas de ciclo normal) apresentaram diferenças na maioria dos parâmetros avaliados. A cultivar Pérola apresentou o maior número de nódulos em comparação com as cultivares BRS Esteio e BRS Estilo, porém a cultivar BRS Estilo apresentou maior massa seca de nódulos. Os parâmetros de promoção de crescimento e produtividade também variaram entre as cultivares avaliadas, com destaque para as cultivares Pérola e BRS Esteio. De forma geral, as respostas de inoculação com *Rhizobium* spp. no feijoeiro variam de acordo com o genótipo (cultivar) utilizado (ANDRAUS; CARDOSO; FERREIRA, 2016; FAGERIA *et al.*, 2014; FONSECA *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2015). Fatores inerentes as cultivares como tipo de ciclo de crescimento (precoce, semiprecoce, regular ou tardia) e senescência precoce dos nódulos também influenciam as respostas da inoculação no feijoeiro (ANDRAUS; CARDOSO; FERREIRA, 2016; LUQUEÑO *et al.*, 2008).

Nesse trabalho, a produtividade do feijoeiro se manteve em patamares considerados elevados em todos os experimentos, atingindo até 4400 kg ha<sup>-1</sup>, 4700 kg ha<sup>-1</sup> e 3500 kg ha<sup>-1</sup> para as cultivares Pérola, BRS Esteio e BRS Estilo, respectivamente. Em todos os experimentos foi observado uma nítida diferença em produtividade entre os tratamentos suplementados com nitrogênio (que ultrapassou 4000 kg de grãos ha<sup>-1</sup>) em relação aos tratamentos apenas inoculados (inferior a 4000 kg de grãos ha<sup>-1</sup>). Avaliando os quatro experimentos com as cultivares do grupo Carioca (Pérola e BRS Estilo), entre os tratamentos que não receberam adubação nitrogenada em cobertura, a coinoculação com *R. tropici* e *A. brasilense* via semente alcançou produtividade 10% superior a inoculação padrão, resultando em incremento de 361 kg ha<sup>-1</sup>, ou seis sacas de grãos. O tratamento coinoculado via semente + *A. brasilense* via foliar no estágio V4, foi o único tratamento com inoculação suplementar tardia que se diferenciou da inoculação padrão, com incremento de 270 kg de grãos ha<sup>-1</sup> (FIGURA 13A). No entanto, os tratamentos com inoculação suplementar tardia, no geral, não apresentaram diferença significativa em relação a coinoculação, que é uma prática já recomendada para a cultura do feijoeiro.

O sucesso da coinoculação de *Rhizobium* e *Azospirillum* no feijoeiro foi observada em diversas regiões do Brasil. No estado do Paraná, sul do país, a

coinoculação resultou em produtividade 14,5% superior a inoculação padrão, além de promover melhor nodulação e crescimento vegetal (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013). Na região sul, no estado de Santa Catarina, a coinoculação do feijoeiro apresentou produtividade 77% superior ao controle não inoculado. Em experimentos conduzidos na região do Cerrado, a coinoculação de *R. tropici* e *A. brasilense* garantiu aumento de 26% e 5% em relação a inoculação padrão (apenas com *Rhizobium* sp.) e ao controle nitrogenado (80 kg de N ha<sup>-1</sup>), respectivamente (SOUZA; FERREIRA, 2017). As análises econômicas desses experimentos conduzidos por Souza & Ferreira (2017), demonstraram que a receita líquida da coinoculação no feijoeiro com *Rhizobium tropici* mais três doses de *Azospirillum brasilense*, via foliar nos estágios de desenvolvimento V2/V3, foi 29% e 41% superior à adubação nitrogenada nos estados de Goiás e Minas Gerais, respectivamente (FERREIRA; SILVA; WANDER, 2020). No estado do Mato Grosso do Sul, a coinoculação chegou a atingir produtividade 5% superior em relação a inoculação padrão (PERES *et al.*, 2016; STEINER; FERREIRA; ZUFFO, 2019).

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse trabalho, os efeitos da inoculação suplementar tardia em cultivos na região de Planaltina-DF e Paracatu-MG, conduzidos em safras distintas, não resultou no aumento da nodulação, da promoção de crescimento e da produtividade em comparação com coinoculação via sementes, que já é uma estratégia de inoculação recomendada para o feijoeiro desde 2016. Outros grupos de pesquisa que trabalham com FBN no feijoeiro no Brasil, também tem relatado a ausência de respostas com a inoculação suplementar tardia com *R. tropici*, em relação a nodulação, promoção de crescimento e produtividade (comunicação pessoal). A população de rizóbios nativos, as cultivares escolhidas, a suplementação de nitrogênio em cobertura e a fertilidade do solo podem ter influenciado o estabelecimento da simbiose entre as estirpes inoculadas e o feijoeiro, e contribuído para a variação dos resultados.

Como apresentado, diversos trabalhos relatam a efetividade da coinoculação com *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 na cultura do feijoeiro, resultando em maior nodulação, biomassa de planta, acúmulo de nitrogênio foliar e, principalmente, produtividade. Além da busca por novas estratégias de inoculação, focadas nas estirpes

autorizadas para formulações de inoculantes, novas pesquisas também deveriam focar no melhoramento genético do feijoeiro, vinculado com a seleção de uma melhor interação entre o rizóbio e as plantas. As variações nas respostas da inoculação do feijoeiro nas diferentes regiões do país apontam a necessidade da busca por estirpes regionais, que sejam altamente competitivas com os rizóbios nativos da região e adaptadas as condições edafoclimáticas. A maioria dos trabalhos com experimentos conduzidos na região Centro-Oeste demonstrou uma alta população de rizóbios nativos e, conseqüentemente, resultados variáveis em nodulação, promoção de crescimento e produtividade. Os solos com alta populações de rizóbios nativos podem ser um potencial fonte de estirpes altamente competitivas e resistentes as condições regionais, resultando no aumento da contribuição da FBN na cultura do feijoeiro.

Os resultados deste estudo apontam que ainda é necessário desenvolver novas pesquisas com a inoculação suplementar tardia, avaliando a inoculação em outros estágios de desenvolvimento do feijoeiro, avaliando diferentes doses e testando diferentes cultivares. No mais, avaliar o potencial da inoculação suplementar tardia em áreas experimentais sem histórico de cultivo com feijoeiro e não muito férteis, é uma importante estratégia de estudo, pois elimina fatores que podem comprometer a eficiência da FBN nessa cultura.

Portanto, os resultados observados nos cinco experimentos conduzidos nesse estudo mostram que, sem a fertilização nitrogenada, a coinoculação com *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 via semente é a estratégia de inoculação que resulta no melhor desempenho agrônômico da cultura do feijoeiro, garantindo melhor nodulação, promoção de crescimento e produtividade, estando em concordância com os pesquisas realizadas na região Sul, Sudeste e Centro-Oeste (SOUZA; FERREIRA, 2017; FILIPINI *et al.*, 2021; HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013; PERES *et al.*, 2016; STEINER; FERREIRA; ZUFFO, 2019). Nas condições ideais, o uso de inoculantes na cultura do feijoeiro diminui o custo de produção e os impactos ambientais associados ao uso de fertilizantes químicos, sendo considerado uma técnica mais sustentável e com menor impacto ambiental.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-FATTAH, G. M. *et al.* Application of Mycorrhizal Technology for Improving Yield Production of Common Bean Plants. **International Journal of Applied Sciences and Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 191–197, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3126/ijasbt.v4i2.15103>

AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University - Science**, v. 26, n. 1, p. 1–20, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>

AKTER, Z. *et al.* Biological nitrogen fixation and nifH gene expression in dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Canadian Journal of Plant Science**, v. 94, n. 2, p. 203–212, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.4141/CJPS2013-200>

ALEXANDRE, A.; OLIVEIRA, S. Response to temperature stress in rhizobia. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 219–228, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.702097>

ALI, M. A. *et al.* The Good, the Bad, and the Ugly of Rhizosphere Microbiome. In: KUMAR, Vivek *et al.* (org.). **Probiotics and Plant Health**. Singapore: Springer, 2017. p. 253–290. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-981-10-3473-2>

AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 4, p. 996–1006, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/00207713-47-4-996>

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS PRODUTORES E IMPORTADORES DE INOCULANTES (ANPII). 2018. Disponível em: <<http://www.anpii.org.br/estatisticas/>>. Acessado em: 03 de fevereiro de 2020.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS (ANDA). 2019. Disponível em: <<http://anda.org.br/estatisticas/>>. Acesso em: 03 de fevereiro de 2020.

ANDRADE, M. J. B. *et al.* Influência do nitrogênio, rizóbio e molibdênio sobre o crescimento, nodulação radicular e teores de nutrientes no feijoeiro. **Revista Ceres**, v. 45, n. 257, p. 65-79, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0034->

ANDRAUS, M. P.; CARDOSO, A. A.; FERREIRA, E. P.B. Differences in Nodulation and Grain Yield on Common Bean Cultivars with Different Growth Cycles. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 47, n. 9, p. 1148–1161, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00103624.2016.1166376>

ANJUM, S. A. *et al.* Methyl Jasmonate-Induced Alteration in Lipid Peroxidation, Antioxidative Defence System and Yield in Soybean Under Drought. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 197, n. 4, p. 296–301, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2011.00468.x>

ARDAKANI, M. R. *et al.* Response of Yield and Yield Components of Three Red Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Genotypes to Co-Inoculation with *Glomus intraradices* and *Rhizobium phaseoli*. **American-Eursian Journal of Agriculture & Environmental Science**, v. 11, n. 3, p. 398–405, 2011.

ASERSE, A. A. *et al.* Draft genome sequence of type strain HBR26T and description of *Rhizobium aethiopicum* sp. nov. **Standards in Genomic Sciences**, v. 12, n. 1, p. 1–16, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40793-017-0220-z>

ASERSE, A. A. *et al.* Rhizobial inoculation improves drought tolerance, biomass and grain yields of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soybean (*Glycine max* L.) at Halaba and Boricha in Southern Ethiopia. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 00, n. 00, p. 1–14, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/03650340.2019.1624724>

BAKHOUM, N. *et al.* Senegalia Senegal response to inoculation with rhizobial strains vary in relation to seed provenance and soil type. **Plant and Soil**, v. 398, n. 1–2, p. 181–193, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2655-6>

BARBOSA, G. F. *et al.* Nitrogênio em cobertura e molibdênio foliar no feijoeiro de inverno. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 32, n. 1, p. 117–123, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v32i1.1605>

BARROS, R. L. N. *et al.* Growth and yield of common bean as affected by seed inoculation with rhizobium and nitrogen fertilization. **Experimental Agriculture**, v. 54, n. 1, p. 16–30, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S001447971600065X>

BARROS, R. L. N. *et al.* Interação entre inoculação com rizóbio e adubação nitrogenada de plantio na produtividade do feijoeiro nas épocas da seca e das águas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 4, p. 1443–1450, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n4p1443>

BARROS, R. L. N. *et al.* Interaction of biological nitrogen fixation with sowing nitrogen fertilization on common bean in the two seasons of cultivation in Brazil. **Journal of Plant Nutrition**, [s. l.], v. 41, n. 6, p. 774–781, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/01904167.2018.1426016>

BASHAN, Y. *et al.* Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). **Plant and Soil**, v. 378, n. 1–2, p. 1–33, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>

BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, v. 16, n. 4, p. 729–770, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(98\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(98)00003-2)

BHARDWAJ, D. *et al.* Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-66>

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327–1350, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>

BISWAS, J.C.; LADHA, J.K.; DAZZO, F.B. Rhizobia Inoculation Improves Nutrient Uptake and Growth of Lowland Rice. **Soil Science Society of America Journal**, v. 64, n. 5, p. 1644–1650, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.2136/sssaj2000.6451644x>

BORDELEAU, L. M.; PRÉVOST, D. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. **Plant and soil**, v. 161, p. 115–125, 1994.

BRITO, L. F. *et al.* Resposta do feijoeiro comum à inoculação com rizóbio e suplementação com nitrogênio mineral em dois biomas brasileiros. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 39, p. 981–992, 2015. Disponível em:

<https://doi.org/10.1590/01000683rbcs20140322>

BRITO, L. F. *et al.* Resposta do feijoeiro comum à inoculação com rizóbio e suplementação com nitrogênio mineral em dois biomas Brasileiros. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 4, p. 981–992, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/01000683rbcs20140322>

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). 2011. Insumos agrícolas: Legislações. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacoes>. Acessado em: 14 de junho de 2020.

BURDMAN, S.; KIGEL, J.; OKON, Y. Effects of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of Common Bean (*P. Vulgaris* L.). **Science**, v. 29, n. 516, p. 923–929, 1997.

BURLE, M. L. *et al.* Microsatellite diversity and genetic structure among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces in Brazil, a secondary center of diversity. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 121, n. 5, p. 801–813, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1350-5>

CARDOSO, J. D.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S. Polyphasic approach for the characterization of rhizobial symbionts effective in fixing N<sub>2</sub> with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 5, p. 2035–2049, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3708-2>

CARDOSO, R. M.; FERREIRA, E. P. B. Assessment of Consortia Inoculation Effects on the Agronomical Performance of the Common Bean. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 52, n. 16, p. 1971–1980, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00103624.2021.1908319>

CIAIS, P., SABINE, C., BALA, G., & PETERS, W. (2013). Carbon and Other Biogeochemical Cycles. In T. F. Stocker, D. Qin, G. K. Plattner, M. Tignor, S. K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex, ... P. M. Midgley (Eds.), *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (pp. 465-570). United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press.

CARVALHO, R. H. *et al.* The co-inoculation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*

increases the early nodulation and development of common Beans. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00171-8>

CASSÁN, F. *et al.* Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. **Biology and Fertility of Soils**, v. 56, n. 4, p. 461–479, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01463-y>

NETTO, A. C.; ACCORSI, W. R.; MALAVOLTA, E. Estudos sobre a nutrição mineral do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L., var. roxinho). **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 28, n. 0, p. 257–274, 1971. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0071-12761971000100018>

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). 2021. Custo de produção. Disponível em: <<https://portaldeinformacoes.conab.gov.br/custos-de-producao-dashboard>>. Acesso em: 02 de julho de 2021.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669–678, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>

CORDEIRO, A. B. *et al.* *Rhizobium esperanzae* sp. nov., a N<sub>2</sub>-fixing root symbiont of *Phaseolus vulgaris* from Mexican soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 3937–3945, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002225>

COSTA, G. E. A. *et al.* Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. **Food Chemistry**, v. 94, n. 3, p. 327–330, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.11.020>

CURÁ, J. A. *et al.* Inoculation with *Azospirillum* sp. and *Herbaspirillum* sp. Bacteria Increases the Tolerance of Maize to Drought Stress. **Microorganisms**, v. 5, n. 3, p. 41, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030041>

da SILVA, H. A. P. *et al.* Molecular and biochemical changes of aging-induced nodules senescence in common bean. **Symbiosis**, 2019.

DALL'AGNOL, R. F. *et al.* *Rhizobium freirei* sp. nov., a symbiont of *Phaseolus vulgaris* that is very effective at fixing nitrogen. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. PART 11, p. 4167–4173, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.052928-0>

DALL'AGNOL, R. F. *et al.* *Rhizobium paranaense* sp. nov., An effective N<sub>2</sub>-fixing symbiont of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with broad geographical distribution in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 3222–3229, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.064543-0>

DALL'AGNOL, R. F. *et al.* Genetic diversity of symbiotic *Paraburkholderia* species isolated from nodules of *Mimosa pudica* (L.) and *Phaseolus vulgaris* (L.) grown in soils of the Brazilian Atlantic Forest (Mata Atlântica). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 4, p. 1–15, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femsec/fix027>

DARDANELLI, M. S. *et al.* Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 11, p. 2713–2721, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.06.016>

DE PELEGRIN, R. *et al.* Resposta da cultura do feijoeiro à adubação nitrogenada e à inoculação com rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 1, p. 219–226, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-06832009000100023>

DEBOUCK, D. G. Primary diversification of *Phaseolus* in the Americas: Three centres?. **Plant Genetic Resources Newsletter**, v. 67, p. 2-8, 1986.

DEL CERRO, P. *et al.* Opening the “black box” of nodD3, nodD4 and nodD5 genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT 899. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2015a. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2033-z>

DEL CERRO, P. *et al.* Regulatory nodD1 and nodD2 genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT 899 and their roles in the early stages of molecular signaling and host-legume nodulation. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1–13, 2015b. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1458-8>

DEL CERRO, P. *et al.* The non-flavonoid inducible nodA3 and the flavonoid regulated nodA1 genes of *Rhizobium tropici* CIAT 899 guarantee nod factor production and nodulation of different host legumes. **Plant and Soil**, v. 440, n. 1–2, p. 185–200, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04073-2>

DI SALVO, L. P. *et al.* Physiological and biochemical characterization of *Azospirillum brasilense* strains commonly used as plant growth-promoting rhizobacteria. **Journal of Basic Microbiology** v. 54, n. 12, p. 1310–1321, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jobm.201400135>

DIVITO, G. A.; SADRAS, V. O. How do phosphorus, potassium and sulphur affect plant growth and biological nitrogen fixation in crop and pasture legumes? A meta-analysis. **Field Crops Research**, v. 156, p. 161–171, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2013.11.004>

EL-NAHRAWY, S.; OMARA, A. Effectiveness of Co-inoculation with *Pseudomonas koreensis* and Rhizobia on Growth, Nodulation and Yield of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Microbiology Research Journal International**, v. 21, n. 6, p. 1–16, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.9734/mrji/2017/37422>

ERISMAN, J. W. *et al.* Reduced nitrogen in ecology and the environment. **Environmental Pollution**, v. 150, n. 1, p. 140–149, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.06.033>

ERISMAN, J. W. *et al.* How a century of ammonia synthesis changed the world. **Nature Geoscience**, v. 1, n. 10, p. 636–639, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ngeo325>

FAGERIA, N. K. *et al.* Dry Matter, Grain Yield, and Yield Components of Dry Bean as Influenced by Nitrogen Fertilization and Rhizobia. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 45, n. 1, p. 111–125, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00103624.2013.848877>

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (Org.) 2019. FAOSTAT. Fertilizer by Nutriente. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RFN>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2020.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Climate, Energy and Tenure Division, FAO. Disponível em: <<http://www.fao.org/publications/card/en/c/cf02ec83-b364-57ae-bcff-cc285d1d4b1a/>>.

Acesso em: [02 de fevereiro de 2020](#).

FARINELLI, R.; LEMOS, L. B. Produtividade, eficiência agronômica, características nutricionais e tecnológicas do feijão adubado com nitrogênio em plantio direto e convencional. **Bragantia**, v. 69, n. 1, p. 165–172, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0006-87052010000100021>

FASCIGLIONE, G. *et al.* *Azospirillum* inoculation effects on growth, product quality and storage life of lettuce plants grown under salt stress. **Scientia Horticulturae**, v. 195, p. 154–162, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.015>

FENN, M. E. *et al.* Ecological Effects of Nitrogen Deposition in the Western United States. **BioScience**, v. 53, n. 4, p. 404, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2003\)053\[0404:eeondi\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2003)053[0404:eeondi]2.0.co;2)

FERGUSON, B. J. *et al.* Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, n. 1, p. 61–76, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00899.x>

FERNÁNDEZ-LUQUEÑO, F. *et al.* Micro-morphology of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodules undergoing senescence. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 4, p. 545–552, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11738-008-0153-7>

FERREIRA, E.P.B.; SILVA, O. F.; WANDER, A. E. Economia da coinoculação de rizóbio e azospirilo em feijão-comum irrigado em produção comercial e familiar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB)*, v. 55, 2020. DOI: 10.1590/S1678-3921.pab2020.v55.01532.

FERREIRA, E. P. B. *et al.* Contribuições para melhoria da eficiência da fixação biológica de nitrogênio no feijoeiro comum no Brasil. In: ARAÚJO, A. P. *et al.* (eds.).

**Tópicos em Ciências do Solo.** Viçosa-Mg: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2013. Cap. 7, p. 380.

FERREIRA, P. A. A. *et al.* Efficient nitrogen-fixing *Rhizobium* strains isolated from amazonian soils are highly tolerant to acidity and aluminium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 1947–1959, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0997-7>

FILIPINI, L. D. *et al.* Application of *Azospirillum* on seeds and leaves, associated with *Rhizobium* inoculation, increases growth and yield of common bean. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 3, p. 1033–1038, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02092-7>

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

FUKAMI, J. *et al.* Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0171-y>

FUKAMI, J. *et al.* Antioxidant activity and induction of mechanisms of resistance to stresses related to the inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Archives of Microbiology**, v. 200, n. 8, p. 1191–1203, 2018a. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1535-x>

FUKAMI, J. *et al.* Co-inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium tropici* as a strategy to mitigate salinity stress. **Functional Plant Biology**, [s. l.], v. 45, n. 3, p. 328–339, 2018b. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/FP17167>

FUKAMI, J. *et al.* Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. **AMB Express** v. 7, n. 1, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0453-7>

FUKAMI, J.; CEREZINI, P.; HUNGRIA, M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018c. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>

GENTRY, H. S.. Origin of the Common Bean , *Phaseolus vulgaris*. **Economic Botany**, v. 23, n. 1, p. 55–69, 1969. Disponível em: <https://doi.org/http://www.jstor.org/stable/4253014>

GRAHAM, P. H. *et al.* Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 198–207, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/m94-033>

GRAHAM, P. H. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: A review. **Field Crops Research**, v. 4, n. C, p. 93–112, 1981. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(81\)90060-5](https://doi.org/10.1016/0378-4290(81)90060-5)

GRANGE, L. *et al.* New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 4, p. 867–876, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.10.008>

GROPPIA, M. D.; ZAWOZNIK, M. S.; TOMARO, M. L. Effect of co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* on soybean plants. **European Journal of Soil Biology**, v. 34, n. 2, p. 75–80, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1164-5563\(99\)90004-3](https://doi.org/10.1016/S1164-5563(99)90004-3)

HAAG, A. F. *et al.* Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*- legume symbiosis . **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1574-6976.2012.12003>

HAFEEZ, F. Y. *et al.* Rhizobial inoculation improves seedling emergence, nutrient uptake and growth of cotton. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 44, n. 6, p. 617–622, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/EA03074>

HAN, T. X. *et al.* *Rhizobium multihospitium* sp. nov., isolated from multiple legume species native of Xinjiang, China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 7, p. 1693–1699, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65568-0>

HANSEN, A. P. *et al.* Respiration and nitrogen fixation of hydroponically cultured *Phaseolus vulgaris* L. cv. OAC Rico and a supernodulating mutant. **Planta**, v.

189, n. 4, p. 546–556, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/bf00198218>

HASANUZZAMAN, M. *et al.* Exogenous salicylic acid alleviates salt stress-induced oxidative damage in *Brassica napus* by enhancing the antioxidant defense and glyoxalase systems. **Australian Journal of Crop Science**, v. 8, n. 4, p. 631–639, 2014.

HAYAT, I. *et al.* Nutritional and Health Perspectives of Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): An Overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 5, p. 580–592, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.596639>

HAYAT, R. *et al.* Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. **Annals of Microbiology**, [s. l.], v. 60, n. 4, p. 579–598, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0117-1>

HORÁCIO, E. H. *et al.* Co-inoculation of rhizobia, azospirilla and cyanobacteria for increasing common bean production. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, n. 5, p. 2015–2028, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2020v41n5Sup1p2015>

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina- PR, 2011.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Soils**, v. 39, n. 2, p. 88–93, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00374-003-0682-6>

HUNGRIA, M.; FRANCO, A. A. Effects of high temperature on nodulation and nitrogen fixation by *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, v. 149, n. 1, p. 95–102, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00010766>

HUNGRIA, M.; FRANCO, A. A.; SPRENT, J. I. New sources of high-temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, v. 149, n. 1, p. 103–109, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00010767>

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Alternative methods of soybean inoculation to overcome adverse conditions at sowing. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, n. 23, p. 2329–2338, 2015a. Disponível em: <https://doi.org/10.5897/ajar2014.8687>

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: Strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, n. 7, p. 791–801, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0771-5>

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Soybean Seed Co-Inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: A New Biotechnological Tool to Improve Yield and Sustainability. **American Journal of Plant Sciences**, v. 06, n. 06, p. 811–817, 2015b. Disponível em: <https://doi.org/10.4236/ajps.2015.66087>

HUO, Y. *et al.* *Rhizobium chutanense* sp. nov., isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* in China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 2049–2056, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003430>

JESUS, E. C. *et al.* Co-inoculation of *Bradyrhizobium* stimulates the symbiosis efficiency of *Rhizobium* with common bean. **Plant and Soil**, v. 425, n. 1–2, p. 201–215, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3541-1>

JHA, C. K.; SARAF, M. Plant Growth Promoting Rhizobacteria. **Agricultural Research and Development**, v. 5, n. 2, p. 108–119, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12045-013-0038-y>

KASSAW, T.; BRIDGES, W.; FRUGOLI, J. Multiple Autoregulation of Nodulation (AON) Signals Identified through Split Root Analysis of *Medicago truncatula* sunn and *rtn1* Mutants. **Plants**, v. 4, n. 2, p. 209–224, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants4020209>

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M. Diversity and Importance of Diazotrophic Bacteria to Agricultural Sustainability in the tropics. *In: DIVERSITY AND BENEFITS OF MICROORGANISMS FROM THE TROPICS*. 2017. p. 1–439. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-55804-2>

KIDAJ, D.; WIELBO, J.; SKORUPSKA, A. Nod factors stimulate seed germination and promote growth and nodulation of pea and vetch under competitive conditions. **Microbiological Research**, v. 167, n. 3, p. 144–150, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.06.001>

KUMAR, H.; DUBEY, R. C.; MAHESHWARI, D. K. Effect of plant growth promoting rhizobia on seed germination, growth promotion and suppression of Fusarium wilt of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). **Crop Protection**, v. 30, n. 11, p. 1396–1403, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.05.001>

KUMARI, G. J. *et al.* Jasmonic acid induced changes in protein pattern , antioxidative enzyme activities and peroxidase isozymes in peanut seedlings. **Biologia Plantarum**, v. 50, n. 2, p. 219–226, 2006.

LOPES, A. C. L. *et al.* Interpretation of Microbial Soil Indicators as a Function of Crop Yield and Organic Carbon. **Soil Science Society of America Journal**, v. 77, n. 2, p. 461–472, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.2136/sssaj2012.0191>

LÓPEZ-LÓPEZ, A. *et al.* *Rhizobium grahamii* sp. nov., from nodules of Dalea leporina, leucaena leucocephala and clitoria ternatea, and *Rhizobium mesoamericanum* sp. nov., from nodules of *Phaseolus vulgaris*, siratro, cowpea and mimosa pudica. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 2264–2271, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.033555-0>

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 541–556, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>

LUQUEÑO, F. F. *et al.* Nodule senescence and biomass components in common bean cultivars. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 31, n. 3, p. 195–201, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.35196/rfm.2008.3.195>

MARKS, B. B. *et al.* Biotechnological potential of rhizobial metabolites to enhance the performance of *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* inoculants with soybean and maize. **AMB Express**, v. 3, p. 1–10, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-21>

MARKS, B. B. *et al.* Maize growth promotion by inoculation with *Azospirillum brasilense* and metabolites of *Rhizobium tropici* enriched on lipo-chitooligosaccharides (LCOs). **AMB Express**, v. 5, n. 1, p. 1–11, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0154-z>

MARTÍNEZ-ROMERO, E *et al.* *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International journal of**

**systematic bacteriology**, v. 41, n. 3, p. 417–426, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/00207713-41-3-417>

MASCIARELLI, O. *et al.* Alternative mechanism for the evaluation of indole-3-acetic acid (IAA) production by *Azospirillum brasilense* strains and its effects on the germination and growth of maize seedlings. **Journal of Microbiology** v. 51, n. 5, p. 590–597, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12275-013-3136-3>

MEENA, V. S. *et al.* Plant beneficial rhizospheric microorganism (PBRM) strategies to improve nutrients use efficiency: A review. **Ecological Engineering**, v. 107, p. 8–32, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.06.058>

MOGHADDAM, M. J. M.; EMTIAZI, G.; SALEHI, Z. Enhanced auxin production by *Azospirillum* pure cultures from plant root exudates. **Journal of Agricultural Science and Technology** v. 14, n. 5, p. 985–994, 2012.

MELO, L. C. *et al.* BRS Estilo - common bean cultivar with carioca grain, upright growth and high yield potential. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 377–379, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1984-70332010000400015>

MERCANTE, F. M.; OTSUBO, A. A.; BRITO, O. R. New native rhizobia strains for inoculation of common bean in the Brazilian savanna. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 41, p. 1–11, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/18069657rbcS20150120>

MICHIELS, J. *et al.* *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 26, n. 3, p. 193–205, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(98\)00035-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(98)00035-X)

MNASRI, B. *et al.* *Rhizobium azibense* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium isolated from root-nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. PART 5, p. 1501–1506, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijS.0.058651-0>

MOHAMMADI, K. *et al.* Effective factors on biological nitrogen fixation. **African Journal of Agricultural Research**, v. 7, n. 12, p. 1782–1788, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.5897/ajarx11.034>

MOREIRA, L. P.; OLIVEIRA, A. P. S.; FERREIRA, E. P. B. Nodulation, contribution of biological N<sub>2</sub> fixation, and productivity of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculated with rhizobia isolates. **Australian Journal of Crop Science**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 644–651, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.21475/ajcs.17.11.06.p310>

MORETTI, L. G. *et al.* Can additional inoculations increase soybean nodulation and grain yield?. **Agronomy Journal**, v. 110, n. 2, p. 715-721, 2018. ISSN 14350645. Disponível em: <https://doi.org/10.2134/agronj2017.09.0540>

OKUMURA, R. S. *et al.* *Azospirillum*: A new and efficient alternative to biological nitrogen fixation in grasses. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 11, n. 1, p. 1142–1146, 2013.

OLIVEIRA-FRANCESQUINI, J. P. *et al.* Differential colonization by bioprospected rhizobial bacteria associated with common bean in different cropping systems. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 63, n. 8, p. 682–689, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0784>

PASTOR-BUEIS, R. *et al.* Yield response of common bean to co-inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas* endophytes and microscopic evidence of different colonised spaces inside the nodule. **European Journal of Agronomy**, v. 122, n. September 2020, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eja.2020.126187>

PELEGRIN, R. de *et al.* Resposta da cultura do feijoeiro à adubação nitrogenada e à inoculação com rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 219–226, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-06832009000100023>

PEREIRA, H. S. *et al.* BRS Esteio - cultivar de feijoeiro comum com grãos pretos, alto potencial produtivo e resistência à antracnose. **Embrapa Arroz e Feijão**, p. 4, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

PEREIRA, H. S. *et al.* Common bean elite lines cultivated under nitrogen fertilization and inoculation with *Rhizobium tropici*. **Ciência Rural**, v. 45, n. 12, p. 2168–2173, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20141135>

PERES, A. R. *et al.* Co-inoculation of *Rhizobium tropici* and *Azospirillum brasilense* in common beans grown under two irrigation depths. **Revista Ceres**, v. 63, n. 2, p. 198–207, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0034->

PEREZ, A. A. G. *et al.* Extração e exportação de nutrientes pelo feijoeiro adubado com nitrogênio, em diferentes tempos de implantação do sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 37, n. 5, p. 1276–1287, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-06832013000500017>

POSSE, S. C. P. *et al.* **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro comum na região central-brasileira: 2009-2011**. Vitória- ES: 2010.

PUENTE, M. L. *et al.* Improvement of soybean grain nutritional quality under foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* strain Az39. **Symbiosis**, v. 77, n. 1, p. 41–47, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13199-018-0568-x>

PUENTE, M. L. *et al.* The benefits of foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* in soybean are explained by an auxin signaling model. **Symbiosis**, v. 76, n. 1, p. 41–49, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13199-017-0536-x>

PUPPO, A. *et al.* Legume nodule senescence: Roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. **New Phytologist**, v. 165, n. 3, p. 683–701, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01285.x>

RAMÍREZ-BABENA, M. H. *et al.* Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 11, p. 2484–2490, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65621-0>

RAMOS, G. M. L. *et al.* Effect of water stress on nitrogen fixation and nodule structure of common bean. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 339–347, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2003000300002>

REID, D. E. *et al.* Molecular mechanisms controlling legume autoregulation of nodulation. **Annals of Botany**, v. 108, n. 5, p. 789–795, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/aob/mcr205>

REMANS, R. *et al.* Effect of *Rhizobium-Azospirillum* coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across

different environments in Cuba. **Plant and Soil**, v. 312, n. 1–2, p. 25–37, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9606-4>

REZENDE, A. A. *et al.* Nutritional and protein quality of dry brazilian beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Science and Technology**, v. 38, n. 3, p. 421–427, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-457x.05917>

RIBEIRO, R. A. *et al.* Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1179–1184, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.032912-0>

RIBEIRO, R. A. *et al.* *Rhizobium ecuadorensis* sp. nov., an indigenous N<sub>2</sub>-fixing symbiont of the ecuadorian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genetic pool. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 3162–3169, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000392>

RODRIGO, L. N. B. *et al.* Interaction of biological nitrogen fixation and fertilization: Effects on growth and yield of common bean in the dry season. **African Journal of Agricultural Research**, [s. l.], v. 12, n. 32, p. 2555–2565, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.5897/ajar2017.12487>

RONDINA, A. B. L. *et al.* Changes in root morphological traits in soybean co-inoculated with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* or treated with *A. brasilense* exudates. **Biology and Fertility of Soils**, v. 56, n. 4, p. 537–549, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01453-0>

SANT'ANA, E. V. P.; SANTOS, A. B.; SILVEIRA, P. M. Eficiência de uso de nitrogênio em cobertura pelo feijoeiro irrigado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, n. 5, p. 458–462, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1415-43662011000500004>

SANTOS, M. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Microbial inoculants: reviewing the past , discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. **AMB Express**, v. 9, n. 205, p. 1–22, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>

SANTOS, S. N. *et al.* Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Constraints in Bioformulation, Commercialization, and Future Strategies. *In*: PLANT GROWTH

AND HEALTH PROMOTING BACTERIA, v. 18, p. 251–272, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-13612-2>

SEGOVIA, L.; YOUNG, J. P.W.; MARTINEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, n. 2, p. 374–377, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/00207713-43-2-374>

SINGH, G. G. S. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 07, n. 02, p. 96–102, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000188>

SMITH, K. A.; MCTAGGART, I. P.; TSURUTA, H. Emissions of N<sub>2</sub>O and NO associated with nitrogen fertilization in intensive agriculture, and the potential for mitigation . **Soil Use and Management**, v. 13, n. s4, p. 296–304, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1475-2743.1997.tb00601.x>

SINGH, S. P. 1992. Common bean improvement in the tropics. *Plant Breeding Reviews* 10:199–269.

SOARES, B. L. *et al.* Agronomic and economic efficiency of Common-Bean inoculation with Rhizobia and mineral nitrogen fertilization. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 40, p. 1–13, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/18069657rbc20150235>

SOUZA, J. E. B.; FERREIRA, E. P. B. Improving sustainability of common bean production systems by co-inoculating rhizobia and azospirilla. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 237, p. 250–257, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.12.040>

STAJKOVIĆ, O. *et al.* Improvement of common bean growth by co-inoculation with *Rhizobium* and plant growth-promoting bacteria. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 16, n. 1, p. 5919–5926, 2011.

STEINER, F.; FERREIRA, H. C. P.; ZUFFO, A. M. Can co-inoculation of *Rhizobium tropici* and *Azospirillum brasilense* increase common bean nodulation and grain yield? **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 1, p. 81–98, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n1p81>

UNITED STATES. UNITED STATE DEPARTMENT OF AGRICULTURE-  
AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE. (Org.). **FoodData Central**. 2019.  
Disponível em: <<https://fdc.nal.usda.gov/>>. Acesso em: 27 jan. 2020.

VALVERDE, A. *et al.* *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 11, p. 2631–2637, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64402-0>

VAN BERKUM, P.; BEYENE, D.; EARDLY, B. D. Phylogenetic relationships among *Rhizobium* species nodulating the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 1, p. 240–244, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/00207713-46-1-240>

VARGAS, M. A.T.; MENDES, I. C.; HUNGRIA, M. Response of field-grown bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Rhizobium* inoculation and nitrogen fertilization in two cerrado soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 32, n. 3, p. 228–233, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s003740000240>

VEJAN, P. *et al.* Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability-A review. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 1–17, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules21050573>

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, n. 2, p. 571–586, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1026037216893>

VICENT, J. (1970). **Manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Blackwell Scientific Publication.

VIKMAN, P. Å.; VESSEY, J. K. Ontogenetic changes in root nodule subpopulations of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): III. Nodule formation, growth and degradation. **Journal of Experimental Botany**, v. 44, n. 3, p. 579–586, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jxb/44.3.579>

VLASSAK, K.; VANDERLEYDEN, J.; FRANCO, A. Competition and persistence of *Rhizobium tropici* and *Rhizobium etli* in tropical soil during successive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultures. **Biology and Fertility of Soils**, v. 21, p. 61–68, 1996.

VURUKONDA, S. S. K. P. *et al.* Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, v. 184, p. 13–24, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.003>

WANG, F. *et al.* *Rhizobium vallis* sp. nov., isolated from nodules of three leguminous species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 11, p. 2582–2588, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.026484-0>

WERIA, W.; YAGHOUB, R.; ALLAHVERDIPOOR, K. H. Role of Some of Mineral Nutrients in Biological Nitrogen Fixation. **Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences**, v. 2, n. 4, p. 77–84, 2013.

XIAO, J. *et al.* Defining the ecological efficiency of nitrogen use in the context of nitrogen cycling. **Ecological Indicators**, v. 107, September, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105493>

YADAVA, P.; KAUR, P.; SINGH, I. Exogenous application of ascorbic acid alleviates oxidative stress in maize. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 4, p. 339–343, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40502-014-0057-z>

YAN, J. *et al.* *Rhizobium hidalgonense* sp. nov., a nodule endophytic bacterium of *Phaseolus vulgaris* in acid soil. **Archives of Microbiology**, v. 199, n. 1, p. 97–104, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1281-x>