



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Engenharia – Campus de Ilha Solteira

DAIENE CAMILA DIAS CHAVES CORSINI

INOCULAÇÃO DE SEMENTES COM *Azospirillum brasilense* E *Rhizobium tropici* E ADUBAÇÃO NITROGENADA EM COBERTURA EM FEIJOEIRO DE INVERNO IRRIGADO EM SISTEMA PLANTIO DIRETO

Engenheira Agrônoma

Ilha Solteira

2014

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**INOCULAÇÃO DE SEMENTES COM *Azospirillum brasilense* E *Rhizobium tropici* E
ADUBAÇÃO NITROGENADA EM COBERTURA EM FEIJOEIRO DE INVERNO
IRRIGADO EM SISTEMA PLANTIO DIRETO**

DAIENE CAMILA DIAS CHAVES CORSINI

Engenheira Agrônoma

Prof. Dr. Orivaldo Arf
Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia – UNESP, Campus de Ilha Solteira, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Especialidade: Sistemas de Produção.

Ilha Solteira

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

C826i Corsini, Daiene Camila Dias Chaves .
Inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* e *Rhizobium Tropici* e adubação nitrogenada em cobertura em feijoeiro de inverno irrigado em sistema plantio direto / Daiene Camila Dias Chaves Corsini. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2014
77 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Especialidade: Sistemas de Produção, 2014

Orientador: Orivaldo Arf
Inclui bibliografia

1. *Phaseolus Vulgaris* L. 2. Bactérias diazotróficas. 3. Coinoculação.
4. Conservação do solo.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ILHA SOLTEIRA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* e *Rhizobium tropici* e adubação nitrogenada em cobertura em feijoeiro de inverno irrigado em sistema plantio direto

AUTORA: DAIENE CAMILA DIAS CHAVES CORSINI

ORIENTADOR: Prof. Dr. ORIVALDO ARF

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA ,
Área: SISTEMAS DE PRODUÇÃO, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ORIVALDO ARF

Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Profa. Dra. ANA MARIA RODRIGUES CASSIOLATO

Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Prof. Dr. ROGERIO PERES SORATTO

Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu

Data da realização: 28 de fevereiro de 2014.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

DAIENE CAMILA DIAS CHAVES CORSINI – Filha de Valdecir Chaves e Sueli Dias, nasceu em 30 de junho de 1988 na cidade de Ilha Solteira, estado de São Paulo, Brasil, onde cursou o ensino fundamental e ensino médio. Em fevereiro de 2012 obteve o título de Engenheira Agrônoma pela Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (UNESP-FEIS). Determinada a continuar os estudos na mesma Universidade em que se graduou, iniciou em março de 2012 o curso de Mestrado em Agronomia – Sistemas de Produção, vinculado ao Programa de Pós Graduação da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, concluindo-o em março de 2014.

Aos meus avós, Rosalina e Manoel , Deniza (*in memorian*) e Joaquim.

Aos meus queridos pais, Valdecir e Sueli, e meus sogros Mario e Tereza.

Obrigada pelo apoio incontestável e dedicação em todos os momentos de minha vida.

Agradeço por todo incentivo.

Ao meu esposo Mario Junior pelo amor, cuidado e total apoio em minhas escolhas.

À minha filha Laura, que mesmo ainda dentro do meu ventre é motivo de inspiração e

incentivo para alcançar e vencer novos desafios.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Senhor Deus, não apenas por esse conquista, mas por todos os momentos que me fizeram chegar até aqui. Pelo fôlego de vida, pela família e amigos, por todos aqueles que passaram em minha vida e me ajudaram a crescer. Pelas dificuldades, derrotas e vitórias. Por guiar meus passos, por me guardar em cada instante da minha caminhada. Pelos milagres que pude ver e viver, e por aqueles que fizestes em oculto. Por me sustentar nos momentos de dor, dúvidas e medo; por me perdoar inúmeras vezes, pelo sim e pelo não às minhas orações.

Obrigado Senhor por tamanha conquista e pelas bênçãos que certamente virão, por Sua fidelidade, mesmo quando passo dias sem Te dizer obrigada. Por me amar primeiro e por Sua grande misericórdia que me alcança todos os dias. Te agradeço Pai.

À Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (SP), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FEIS/UNESP, pela oportunidade concedida da realização do curso de Engenharia Agrônômica e agora, por mais uma conquista pessoal e profissional, a obtenção do título de Mestre em Agronomia pelo Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Sistemas de Produção) da mesma universidade.

Ao professor Dr. Orivaldo Arf, por acreditar em mim, pela paciência já há alguns anos orientando nos trabalhos acadêmicos, por me mostrar o caminho da ciência, fazer parte da minha vida nos momentos bons e ruins, pelo exemplo de pessoa e profissional o qual sempre fará parte da minha vida, um agradecimento especial.

Aos professores que fazem parte do programa de Sistemas de Produção da UNESP/FEIS, pela amizade, dedicação e contribuição a minha formação acadêmica, em especial: Dr. Ricardo A. F. Rodrigues, Dr. Edson Lazarini, Dra. Ana Maria R. Cassiolato, Dr. Marcos Eustáquio de Sá, Dr. Salatier Buzetti e Dra Maria Aparecida Anselmo Tarsitano.

Aos funcionários dos departamentos DFTASE e DEFERS e da Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão (FEPE) da FEIS/UNESP, pelo exemplo de simplicidade e amizade e pelos esforços perante a realização deste trabalho, em especial: Alvino, Manoel, Diego e Leandro.

Aos bibliotecários da FEIS/UNESP, pela dedicação e atenção concedida.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação da FEIS/UNESP.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação AGRISUS – Agricultura Sustentável, pelas bolsas de estudo concedidas.

Aos meus amigos Amanda, Ariani, Douglas, Eder, Edson, Flávia, Gustavo, José Portugal, Marcelo, Michelle, Raíssa e Wellma, pela ajuda na condução desse estudo e de vários outros experimentos.

Aos meus pais, avós, tios e primos, pelo carinho, amor e dedicação.

Ao meu sogro Mario e minha sogra Tereza, os quais também considero como meus pais, pela amizade, carinho, amor e companheirismo.

Ao meu esposo e amigo Mario Junior pelo amor e incentivo e por muitas vezes renunciar aos seus próprios sonhos para realizar os meus, e minha filha Laura, que mesmo ainda em meu ventre é a conquista mais linda em minha vida, vocês são motivos pelos quais tenho forças para lutar.

A todas as pessoas que de uma maneira ou outra, contribuíram no desenvolvimento deste trabalho, e que mesmo não mencionados neste agradecimento sabem da sua importância em algum momento da minha vida.

Muito obrigada!

Ilha Solteira, São Paulo,

Fevereiro de 2014.

Daiene Camila Dias Chaves Corsini

“Eu irei adiante de ti, endireitarei os caminhos tortuosos, quebrarei as portas de bronze e despedaçarei as trancas de ferro; dar-te-ei os tesouros escondidos e as riquezas encobertas, para que saibas que eu sou o Senhor, o Deus de Israel, que te chama pelo teu nome”

(Bíblia Sagrada, Isaías 45: 2-3)

RESUMO

Devido ao elevado custo da adubação nitrogenada e a pouca utilização da inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio na cultura do feijão, considerada ineficiente quando comparada à outras leguminosas, tecnologias que otimizem a utilização do *Rhizobium* nessa cultura é fundamental para a busca de uma produção sustentável. A utilização de bactérias do gênero *Azospirillum* em conjunto com o *Rhizobium* potencializa a nodulação no feijoeiro, e conseqüentemente a resposta da cultura à fixação biológica. A necessidade da utilização e a dose da adubação nitrogenada concomitantemente à inoculação de sementes, e o desempenho desses fatores em sistema plantio direto também é incerto. Com base nisso, o trabalho foi desenvolvido em área experimental da UNESP - Ilha Solteira, localizada no município de Selvíria (MS) e no Campus de Agronomia da UNESP – Ilha Solteira, com o objetivo de verificar o desenvolvimento e a produtividade do feijoeiro com inoculação de sementes (T1 – inoculação ausente, T2 – *Azospirillum brasilense*, T3 – *Rhizobium tropici*, T4 - *Azospirillum brasilense* + *Rhizobium tropici*) e doses de nitrogênio em cobertura (0, 30, 60, 90 e 120 kg ha⁻¹) Utilizou-se o delineamento experimental em blocos casualizados dispostos em um esquema fatorial 4x5, com 4 repetições no experimento em campo e 3 repetições no experimento em laboratório. Concluiu-se que: a coinoculação com *A. brasilense* + *R. tropici* proporcionou às plantas de feijão maior massa de sistema radicular e aumentou o número de vagens; a massa da parte aérea aumentou até a dose de 86 kg ha⁻¹ de N em 2012; as maiores doses de nitrogênio mineral em cobertura diminuiu o número e a massa de nódulos; a produtividade em 2012 foi influenciada linearmente pelas doses de N, e em 2013 a inoculação com *A. brasilense* proporcionou a maior produtividade de grãos de feijão.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* L. Bactérias diazotróficas. Coinoculação. Conservação do solo.

ABSTRACT

Due to the high cost of nitrogen fertilization and the limited use of inoculation with nitrogen-fixing bacteria in common bean, considered inefficient compared to other legumes, technologies that optimize the use of *Rhizobium* in this culture are fundamental to the pursuit of sustainable production. The use of bacteria of the genus *Azospirillum* together with *Rhizobium* may potentiate the nodulation in bean and consequently the crop response to the biological fixation of atmospheric nitrogen. Based on this, the study was conducted in the experimental area, UNESP – Ilha Solteira, located in Selvíria (MS) and the Campus of Agronomy UNESP – Ilha Solteira, aiming to verify the development and productivity of bean inoculated with seeds (T1 - no inoculation, T2 - *Azospirillum brasilense*, T3 - *Rhizobium tropici*, T4 - *Azospirillum brasilense* + *Rhizobium tropici*) and doses of nitrogen (0, 30, 60, 90 and 120 kg ha⁻¹) was used to experimental design was randomized blocks arranged in a 4x5 factorial scheme with four replications in a field experiment and 3 replications in laboratory experiment. It was concluded that: a coinoculação with *A. brasilense* + *R. tropici* bean plants greater mass of roots and increased the number of pods and the mass of shoots increased up to a dose of 86 kg ha⁻¹ N in 2012, the highest doses of mineral nitrogen topdressing reduced the number and nodule mass; productivity in 2012 was influenced linearly by N, and in 2013 the inoculation with *A. brasilense* provided the highest yield of common beans.

Keywords: *Phaseolus vulgaris* L. Diazotrophs. Coinoculation. Soil conservation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Dados de temperatura do ar máxima e mínima e precipitação pluvial em 2012. Selvíria, MS, Brasil, 2012 e 2013.....	33
Figura 2-	Dados de temperatura do ar máxima e mínima e precipitação pluvial em 2013. Selvíria, MS, Brasil, 2012 e 2013.....	34
Figura 3-	Matéria seca do milho cultivado anteriormente ao feijão de inverno no sistema plantio direto. Selvíria, MS, Brasil, 2012 e 2013.....	43
Figura 4-	N acumulado no milho cultivado anteriormente ao feijão de inverno no sistema plantio direto. Selvíria, MS, 2012 e 2013.....	43
Figura 5-	Secagem das sementes de feijão inoculadas. Selvíria (MS), 2012 e 2013.....	69
Figura 6 -	Semeadura do feijão de inverno em sistema plantio direto com restos vegetais de milho. Selvíria (MS), 2012 e 2013.....	69
Figura 7 -	Planta de feijão aos 21 DAE dias após a emergência, adubação nitrogenada. Selvíria (MS), 2012 e 2013.....	70
Figura 8 -	Visão geral das parcelas de feijão em florescimento pleno. Selvíria (MS), 2012 e 2013.....	70
Figura 9 -	Avaliação de índice de clorofila foliar em feijão em florescimento pleno. Selvíria (MS), 2012 e 2013.....	71
Figura 10-	Colheita de feijão de inverno irrigado em sistema plantio direto. Selvíria (MS), 2012 e 2013.....	71
Figura 11-	Emergência de plantas de feijão em vaso. Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.....	72
Figura 12-	Desenvolvimento das plantas de feijão cultivadas em vaso. Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.....	72
Figura 13-	Aspecto geral de um bloco do experimento em vaso. Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.....	73
Figura 14-	Acondicionamento do solo para análise de quantificação de <i>Azospirillum</i> e separação de nódulos e sistema radicular. Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.....	73
Figura 15-	Peneiramento do solo para análise de quantificação de <i>Azospirillum</i> e separação de nódulos e sistema radicular. Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.....	74
Figura 16-	Lavagem do solo para análise de quantificação de <i>Azospirillum</i> e separação de nódulos e sistema radicular. Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.....	74

Figura 17- Breve secagem do sistema radicular para separação e contagem de nódulos. Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.....	75
Figura 18- Sistema radicular e nódulos separados. Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.....	75
Figura 19- Secagem em estufa do sistema radicular de feijão e nódulos para obtenção da massa seca. Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.....	76
Figura 20- Diluição e dispersão do solo usado como substrato no vaso para o cultivo de feijão para análise de quantificação de <i>Azospirillum</i> . Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.....	76
Figura 21- Diluição em série do solo usado como substrato no vaso para o cultivo de feijão para análise de quantificação de <i>Azospirillum</i> . Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.....	77
Figura 22- Inoculação do meio de cultura Nfb com o solo usado como substrato no vaso para o cultivo de feijão para análise de quantificação de <i>Azospirillum</i> . Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.....	77
Figura 23- Incubação do meio de cultura Nfb com o solo usado como substrato no vaso para o cultivo de feijão para análise de quantificação de <i>Azospirillum</i> . Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.....	78
Figura 24- Película e coloração azulada indicando a presença de <i>Azospirillum</i> . Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Análise química do solo da área experimental na camada de 0,00 a 0,20 m e 0,20 a 0,40 m em 2012. Selvíria, MS, Brasil, 2012 e 2013.....	31
Tabela 2-	Descrição dos tratamentos estudados no experimento em 2012 e 2013. Selvíria, MS, Brasil, 2012 e 2013.....	31
Tabela 3-	Valores médios da população inicial de plantas de feijão (plantas ha ⁻¹), população final de plantas de feijão (plantas ha ⁻¹) e massa seca de plantas de feijão (g planta ⁻¹) em feijoeiro de inverno irrigado por aspersão em sistema plantio direto. Selvíria (MS), 2012 e 2013.....	45
Tabela 4-	Valores médios do índice de clorofila foliar, proteína bruta, teor de nitrogênio foliar e teor de fósforo foliar em feijoeiro de inverno irrigado por aspersão em sistema plantio direto. Selvíria (MS), 2012 e 2013.....	46
Tabela 5-	Desdobramento da interação de inoculação de sementes entre doses de nitrogênio no ICF no feijoeiro de inverno cultivado irrigado por aspersão em sistema plantio direto em 2012. Selvíria (MS).....	46
Tabela 6-	Desdobramento da interação de inoculação de sementes entre doses de nitrogênio no teor de N foliar no feijoeiro de inverno cultivado irrigado por aspersão em sistema plantio direto em 2012. Selvíria (MS).....	47
Tabela 7-	Valores médios do teor de potássio foliar, teor de cálcio foliar, teor de magnésio foliar e teor de enxofre foliar em feijoeiro de inverno irrigado por aspersão em sistema plantio direto. Selvíria (MS), 2012 e 2013.....	48
Tabela 8-	Valores médios do número de vagens por planta, número de grãos por vagem e massa de cem grãos em feijoeiro de inverno irrigado por aspersão em sistema plantio direto. Selvíria (MS), 2012 e 2013.....	49
Tabela 9-	Desdobramento da interação de inoculação de sementes entre doses de nitrogênio no número de vagens no feijoeiro de inverno cultivado irrigado por aspersão em sistema plantio direto em 2012. Selvíria (MS).....	50
Tabela 10-	Valores médios do teor de N nos grãos, proteína bruta nos grãos e produtividade de grãos em feijoeiro de inverno irrigado por aspersão em sistema plantio direto. Selvíria (MS), Brasil, 2012 e 2013.....	51
Tabela 11-	Valores médios da massa da matéria seca final do milho (MSFM), massa da matéria residual do feijão (MRF) e massa da matéria seca residual total (MSRT) na área cultivada com feijão de inverno irrigado por aspersão em sistema plantio direto. Selvíria (MS), 2013.....	52
Tabela 12-	Valores médios do índice de clorofila foliar (ICF), teor de nitrogênio foliar (N) e teor de proteína bruta (PB), em feijoeiro de inverno cultivado em vaso. Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.....	53

Tabela 13- Desdobramento da interação de inoculação de sementes entre doses de nitrogênio no teor de N no feijoeiro de inverno cultivado em vaso em 2013. Ilha Solteira (SP).....	54
Tabela 14- Desdobramento da interação de inoculação de sementes entre doses de nitrogênio no percentual de PB no feijoeiro de inverno cultivado em vaso em 2013. Ilha Solteira (SP).....	54
Tabela 15- Valores médios do teor de fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) em feijoeiro de inverno cultivado em vaso. Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.....	55
Tabela 16- Desdobramento da interação de inoculação de sementes entre doses de nitrogênio no teor de K foliar no feijoeiro de inverno cultivado em vaso em 2013. Ilha Solteira (SP).....	56
Tabela 17- Desdobramento da interação de inoculação de sementes entre doses de nitrogênio no teor de Ca no feijoeiro de inverno cultivado em vaso em 2013. Ilha Solteira (SP).....	56
Tabela 18- Valores médios do teor de magnésio foliar (Mg), teor de enxofre foliar (S), massa da parte aérea (MPA) e massa do sistema radicular (MSR) em feijoeiro de inverno cultivado em vaso. Ilha Solteira (SP) 2012 e 2013.....	57
Tabela 19- Valores médios do número de nódulos por planta (N NOD), massa de nódulos por planta (M NOD) e número mais provável de bactérias diazotróficas associativas (NMP) em feijoeiro de inverno cultivado em vaso. Ilha Solteira (SP) 2012 e 2013.....	58

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	18
1. REVISÃO DE LITERATURA	21
1.1.Importância da cultura do feijão	21
1.2.Nitrogênio	21
1.3.Sistema Plantio Direto	23
1.4.Bactérias Promotoras do desenvolvimento de plantas	24
1.5.Fixação biológica do Nitrogênio - <i>Rhizobium</i>	26
2. MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1.Experimento em campo	30
3.1.1.Área experimental	30
3.1.2.Caracterização do solo	31
3.1.3.Tratamento e delineamento experimental	32
3.1.4.Implantação do experimento	33
3.1.5.Dados climáticos	34
3.1.6.Avaliações fitotécnicas	37
3.1.7.Análise estatística dos dados	37
2.2.Experimento em vaso	37
3.2.1.Área experimental	37
3.2.2.Caracterização do solo	37
3.2.3.Tratamento e delineamento experimental	38
3.2.4.Implantação do experimento	38
3.2.6.Avaliações microbiológicas e fitotécnicas	39
3.2.7.Análise estatística dos dados	41
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
3.1.Experimento em campo	42
4.1.1.Massa da matéria seca do milho (MMSM) e teor de N total acumulado na MMSM	42
4.1.2.Características agronômicas do feijão	44
3.2.Experimento em vaso	52

4. CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS	61
APÊNDICE A - FOTOS DO EXPERIMENTO	69

1 INTRODUÇÃO

Antes de seu caráter econômico, o feijão representa um alimento de alto significado social (SANT'ANA et al., 2011), constituindo juntamente com o arroz, a base da alimentação da população brasileira (BASSAN et al., 2001). O feijoeiro-comum, *Phaseolus vulgaris* L, é cultivado por pequenos e grandes produtores, em diversificados sistemas de produção e em todas as regiões brasileiras, representando uma fonte de renda para os mesmos (VALADÃO et al., 2009). Assim, a utilização e adaptação dessa cultura em um sistema de cultivo agrícola, como o plantio direto (SPD), que visa a sustentabilidade na produção, desperta interesse crescente tanto dos pesquisadores como dos produtores.

No SPD, talvez ocorra a necessidade de utilizar doses elevadas de N em função da velocidade na taxa de decomposição e da relação C/N da palha, esta ação reflete no processo de imobilização do N, promovendo competição dos microrganismos com o feijoeiro, principalmente nos estádios iniciais de desenvolvimento da planta, sendo o N o nutriente mais absorvido e extraído, limitando assim a produtividade da cultura (LEMOS et al., 2008)

O feijoeiro é uma planta bastante exigente em nutrientes e, em razão do ciclo curto, necessita de que os mesmos estejam prontamente disponíveis nos momentos de maior demanda para não limitar a produtividade de grãos (SILVA; SILVEIRA, 2000).

Sendo assim, o uso de fertilizante nitrogenado é uma prática comum e responsável por elevar os custos da produção agrícola, e que pode gerar danos ao ambiente, uma vez que parte do total aplicado é geralmente perdido (CHAVARRIA; MELLO, 2011). Segundo Reis Junior et al. (2011), a eficiência de utilização dos fertilizantes nitrogenados é em média 50%, devido

à ação da lixiviação, volatilização de amônia, desnitrificação, erosão e imobilização microbiana.

No entanto, o feijoeiro, sendo uma leguminosa, apresenta condições de se beneficiar da associação simbiótica com bactérias do gênero *Rhizobium* (BASSAN et al., 2001), capazes de fixar o N atmosférico e fornecê-lo à cultura; é um mecanismo biológico capaz de substituir, pelo menos parcialmente, a adubação nitrogenada, resultando em diminuição dos custos com adubação com esse nutriente (HUNGRIA et al., 1997).

Muitos autores, porém, enfatizam que a utilização desta prática deve ser feita com cautela, uma vez que doses em excesso, tanto na semeadura como em cobertura, podem causar diminuição na eficiência simbiótica (FERREIRA et al., 2000; VENTURINI et al., 2002).

De acordo com Rosolem (1987), pequenas quantidades de N aplicadas ao solo permitem aumento no crescimento dos nódulos e maior fixação do nitrogênio, porém níveis muito baixos de nitrato no solo podem ser limitantes à atividade simbiótica. A adição de elevadas quantidades de N afeta inicialmente o número e o peso de nódulos, mas não inibe o seu desenvolvimento e a fixação simbiótica de N (RUSCHEL; RUSCHEL, 1975; RUSCHEL;SAITO, 1977). O insucesso da resposta à inoculação da cultura do feijão quando comparada à outras leguminosas, como por exemplo a soja, leva à pouca utilização dessa técnica. Esse desempenho insatisfatório é devido à fatores genéticos e ambientais e ao processo de nodulação, considerado lento (CHAVERRA; GRAHAM, 1992; SCHRODER, 1992).

Como alternativa, a utilização de *Azospirillum* spp. juntamente com *Rhizobium* spp. pode melhorar o desempenho do *Rhizobium* spp. na inoculação do feijoeiro. Na literatura existem vários trabalhos confirmando que o *Azospirillum* spp. produz fitohormônios que estimulam o crescimento das raízes de diversas espécies de plantas (BURDMAN et al., 1996; HUNGRIA, 2011), e ainda, pode fixar N e disponibilizá-lo ao feijoeiro. As respostas positivas da inoculação com *Azospirillum* spp. e *Rhizobium* spp., em relação ao desenvolvimento e crescimento das plantas, podem ser atribuídas à nodulação precoce, ao aumento no número de nódulos e melhora geral no desenvolvimento do sistema radicular (VOLPI; KAPULNIK, 1994).

A inoculação a campo com bactérias do gênero *Azospirillum* spp. além da fixação biológica do N, promove ganhos em produtividade e no aumento da superfície da absorção das raízes da planta, decorrente das modificações morfológicas do sistema radicular, alterando o número de radículas e o diâmetro médio das raízes laterais (IKEDA, 2010).

A utilização de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), para o aumento da produção agrícola, será provavelmente uma das táticas mais importantes para a atualidade no mundo (FIGUEIREDO et al., 2010). A demanda para a diminuição da dependência de fertilizantes químicos e a necessidade do desenvolvimento de uma agricultura sustentável são cada vez mais requeridas por pesquisadores e produtores (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Com os dados disponíveis na literatura, é possível que a utilização da inoculação de sementes com *Azospirillum* e *Rhizobium* possa ser benéfica para o feijoeiro. Entretanto é interessante verificar também o efeito dessa prática envolvendo a aplicação de nitrogênio em cobertura com a finalidade de complementar o fornecimento desse nutriente para as plantas, objetivando aumento na produtividade de grãos.

Diante do exposto, propôs-se o presente estudo para avaliar o efeito da inoculação de *Rhizobium tropici* e *Azospirillum brasilense*, isolados e em conjunto, e possíveis interações com a adubação nitrogenada em cobertura, no desenvolvimento e produtividade do feijoeiro de inverno irrigado por aspersão, em SPD.

Foram testadas as seguintes hipóteses: o *A. brasilense* pode fixar N e estimular o desenvolvimento do sistema radicular do feijoeiro proporcionando aumento no número de nódulos de *R. tropici* e, assim, melhorar o fornecimento de N do ar atmosférico para a cultura do feijão; com a fixação simbiótica de N pela associação com *R. tropici* as doses de N mineral aplicadas no feijoeiro em cobertura, como complementação, podem ser menores.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA DA CULTURA DO FEIJÃO

A cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) constitui-se numa das mais importantes explorações agrícolas do Brasil, não só pela área cultivada e pelo valor da produção, assim como também por ser considerada a principal fonte de proteínas das camadas de menor poder aquisitivo (SORATTO, 2002). Tendo em vista a importância que a cultura do feijão tem no âmbito nacional, faz-se necessário o conhecimento sobre as práticas de adubação adotadas por produtores, já que além da fertilidade normal dos solos brasileiros, a adubação e a irrigação exercem papéis importantes, uma vez que podem contribuir para o aumento da produtividade e para o desenvolvimento da cultura (OLIVEIRA, 2002).

A partir da década de 1980, o feijoeiro passou a ser cultivado também na época de inverno (período seco), sob irrigação, atraindo médios e grandes produtores, geralmente usuários de melhor tecnologia (BINOTTI et al., 2007).

Em pesquisas realizadas por Soratto (2002), concluiu-se que o feijão irrigado apresentou maior produtividade, quando cultivado em solo preparado com grade pesada, análise confirmada por Arf et al. (2002). No entanto, vários autores já observaram que a produtividade do feijoeiro foi maior sob SPD; provavelmente devido à melhoria nos atributos

físicos do solo proporcionada pelas culturas de cobertura nesse sistema de manejo (BINOTTI, 2004).

De acordo com Stone e Moreira (2000), a palhada na superfície do solo altera a relação solo-água, pois previne a evaporação reduzindo, assim, a taxa de evapotranspiração das culturas, e propicia aumento do intervalo entre irrigações, o que diminui a frequência do uso desta tecnologia. De acordo com Perez et al. (2008) para a obtenção de altas produtividades de grãos, é importante o emprego de tecnologias apropriadas, atualmente, vem se destacando o sistema plantio direto como uma das formas mais eficientes para melhorar as condições químicas, físicas e biológicas do solo.

2.2 NITROGÊNIO

É o nutriente mais exigido pelo feijoeiro e o seu manejo adequado representa uma das principais dificuldades da cultura do feijoeiro, visto que a aplicação de doses excessivas de N, além de aumentar o custo econômico, pode promover sérios riscos ao ambiente, e a sua utilização em quantidade insuficiente pode limitar o seu potencial produtivo, mesmo que outros fatores de produção sejam otimizados (SANTOS et al., 2003).

As leguminosas em especial, requerem uma grande quantidade de nitrogênio, principalmente as anuais produtoras de grãos, em função do ciclo curto de cultivo e dos altos teores deste elemento retirados pelos grãos por ocasião da maturação. Cerca de trinta e cinco quilos de nitrogênio são exportados em cada tonelada de grãos produzida (OLIVEIRA et al., 1996). As principais fontes de nitrogênio para a cultura do feijoeiro são: o solo, através da decomposição da matéria orgânica e das rochas; a aplicação de adubos nitrogenados e a fixação biológica de nitrogênio atmosférico, através da associação do feijoeiro com as bactérias do grupo dos rizóbios, entretanto, a planta não é capaz de absorver N em quantidades significativas por meio da fixação biológica (FAGERIA; BALIGAR, 2005).

Romanini Junior et al. (2007) concluíram que a adubação nitrogenada em cobertura aumenta linearmente a produtividade de grãos do feijoeiro cultivado em sistema plantio direto no período de inverno. Para Bordin et al. (2003), a quantidade de N a ser empregada na adubação do feijoeiro pode estar condicionada ao tipo de planta de cobertura (gramínea ou leguminosa) que se cultiva na área, em SPD.

E de acordo com Valério et al. (2003) o N nem sempre responde como o esperado para a cultura em plantio direto na palha, sendo um nutriente de respostas variadas e de

considerada dificuldade para se determinar a dose que corresponda com máxima produtividade.

Além disso, como o N é um nutriente que se perde facilmente por lixiviação, volatilização e desnitrificação, o seu manejo adequado é tido como um dos mais difíceis. Dessa forma, técnicas de manejo que possibilitem a maximização de absorção de nitrogênio pelo feijoeiro são de extrema importância, devido ao alto custo dos fertilizantes nitrogenados e as perdas de N por lixiviação, que podem representar riscos ao ambiente pela contaminação de mananciais de água (SANTOS et al., 2008).

2.3 SISTEMA PLANTIO DIRETO

O manejo do solo pelo conjunto de diferentes práticas associadas visa manter as características físicas, químicas e biológicas do solo, proporcionando obtenção de altas produtividades por tempo ilimitado.

Nas regiões tropicais e subtropicais, a diminuição do potencial produtivo dos solos agrícolas tem sido atribuída, principalmente, aos processos de erosão e decomposição da matéria orgânica do solo (SÁ et al., 2001 citado por BAYER et al., 2004). Os sistemas de manejo do solo afetam suas características físicas e químicas, interferindo assim no desenvolvimento e na produtividade das culturas.

O sistema de cultivo convencional se caracteriza pelo revolvimento do solo mediante aração e gradagem, o que leva a pulverização da camada arável do solo e a uma compactação da camada subsuperficial (ROCHA et al., 2008).

Segundo a Federação Brasileira de Plantio Direto na Palha – FEBRAPDP (2014) atualmente, SPD é largamente utilizado em diversas regiões do Brasil, abrangendo na safra de 2011/12 uma área de aproximadamente 31 milhões de hectares. A principal dificuldade encontrada em tais áreas se refere à manutenção da palhada sobre a superfície do solo, dadas às estações bem definidas, com precipitação concentrada na primavera/verão, dificultando a produção de fitomassa na entressafra, e com altas temperaturas acelerando a decomposição da palhada (CASSIA et al., 2008).

De acordo com Chrisóstomo et al. (2006) o solo é componente essencial de agroecossistemas e deve ser encarado como uma *commoditie* ambiental, de modo que sua capacidade produtiva e sua qualidade devem ser mantidas e/ou melhoradas. Suas propriedades físicas, químicas e biológicas; bem como processos relacionados a elas, devem ser preservados de maneira que o solo seja capaz de prover meio para o crescimento das plantas;

de regular a distribuição da água no ambiente e de servir como um tampão ambiental na formação, atenuação e degradação de produtos danosos ao ambiente (SANTANA; BAHIA FILHO, 1998; SCHOENHOLTZ et al., 2000; citado por CHRISÓSTOMO et al., 2006). O aporte contínuo de resíduos vegetais na superfície do solo e, por consequência, de carbono e de nitrogênio, contribuem significativamente para a melhoria da qualidade do solo; a recuperação do teor de matéria orgânica do solo pode ser obtida pelo uso de sistemas conservacionistas de produção agrícola, que reduzem o revolvimento do solo e pela adoção de sistemas de rotação de culturas com alto aporte de resíduos ao solo.

Segundo Andrioli et al. (2008) a produção de fitomassa é imprescindível para o sistema, pois protege o solo da erosão, contribui para melhoria da fertilidade, aumenta a infiltração e disponibilidade de água para as plantas, minimizando os impactos ao ambiente. Teixeira et al. (2008) completam dizendo que o sucesso na implantação e no estabelecimento do SPD está fortemente relacionado com a alta produção de fitomassa nos sistemas de rotação, sem a qual os objetivos e vantagens dessa forma de cultivo não são alcançados.

Atualmente a utilização do sistema plantio direto se tornou uma ferramenta sustentável para conservação do solo e recursos hídricos nos países de clima tropical (GITTI, 2012).

2.4 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS

As bactérias do gênero *Azospirillum* tiveram destaque mundialmente a partir da década de 1970, com a descoberta pela pesquisadora da Embrapa, Dra. Johanna Döbereiner (1924-2000), da capacidade de fixação biológica do N dessas bactérias quando em associação com gramíneas (HUNGRIA et al., 2011).

As bactérias promotoras de crescimento de plantas correspondem a um grupo de microrganismos benéficos às plantas, devido à capacidade de colonizar a superfície das raízes, rizosfera, filosfera e tecidos internos das plantas (DAVISON, 1988; KLOEPPER et al., 1989).

Segundo Huergo et al. (2008) estas bactérias podem estimular o crescimento das plantas por vários fatores, sendo a capacidade de fixação de N a mais importante. Além disso há também o aumento na atividade da redutase do nitrato quando crescem endofiticamente nas plantas (CASSÁN et al., 2008); produção de hormônios como auxinas, citocininas (TIEN et al., 1979), giberilinas (BOTTINI et al., 1989), etileno (STRZELCZYK et al., 1994) e uma variedade de outras moléculas; solubilização de fosfato (RODRIGUEZ et al., 2004).

Provavelmente, pelo maior crescimento radicular e melhor nutrição das plantas, há também vários relatos de maior tolerância a agentes patogênicos de plantas (CORREA et al., 2008).

O maior desenvolvimento das raízes pela inoculação com *Azospirillum* spp. pode implicar em vários outros efeitos já relatados, como incrementos na absorção da água e minerais, maior tolerância a estresses como salinidade e seca, resultando em plantas mais vigorosas e produtivas (HUNGRIA, 2011).

O maior desenvolvimento do sistema radicular do feijoeiro em decorrência da inoculação de *Azospirillum* spp. foi constatado por German et al. (2000) que obtiveram aumento em 95 e 66% do comprimento e peso fresco de raízes, em relação ao tratamento sem inoculação.

Além das pesquisas conduzidas estritamente com o rizóbio para aumentar sua competitividade intrínseca, outros estudos avaliaram o efeito da interação entre o rizóbio e outros microrganismos (BÁRBARO et al., 2008). Nesse contexto, pesquisadores conseguiram incrementar a colonização e a nodulação de soja, por meio da coinoculação de *B. japonicum* com bactérias do gênero *Bacillus*, produtoras de antibióticos

Outros relatos demonstram efeitos positivos na nodulação pela coinoculação de rizóbio com outras espécies de bactérias. Esta contribuição foi relacionada com a produção de fito-hormônios, pectinase ou sinais moleculares, em *Bacillus cereus*, *Azospirillum* spp., *Agrobacterium* e outras espécies de microrganismos (BÁRBARO et al., 2008).

A utilização das bactérias do gênero *Azospirillum*, principalmente a da espécie *A. brasilense* como inoculante é realizada em diversas culturas como: cereais, algodão, tomate, banana, cana-de-açúcar, café e forrageiras. Existem porém vários trabalhos confirmando que bactérias desse gênero produzem fitohormônios que estimulam o crescimento das raízes de diversas espécies de plantas (BURDMAN et al., 1996; HUNGRIA, 2011) e ainda pode fixar N e disponibilizá-lo ao feijoeiro (GITTI et al., 2012).

A coinoculação da soja, utilizando *Azospirillum brasilense* juntamente com *Bradyrhizobium* spp. tem sido preconizada tanto na Argentina como na África do Sul (BÁRBARO et al., 2008). Os mesmos autores ainda relataram que a inoculação mista de leguminosas com bactérias simbióticas e assimbióticas, consiste na utilização de combinações de diferentes microrganismos, aos quais produzem efeito sinérgico na qual se superam os resultados produtivos obtidos com os mesmos, quando utilizados de forma isolada.

A coinoculação do *Azospirillum* spp. com o *Rhizobium* spp. pode melhorar a eficiência da fixação biológica de nitrogênio no feijoeiro (REMANS et al., 2008; YADEGARI et al., 2010), pois na presença do *Azospirillum* spp., obteve-se nodulação precoce, aumento no

número de nódulos e melhora geral no desenvolvimento do sistema radicular (VOLPIN; KAPULNIK, 1994), condições favoráveis para melhor atuação de *Rhizobium* spp., e consequente fornecimento adequado de N pela FBN.

2.5 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO – RHIZOBIUM

As leguminosas, em especial, requerem uma grande quantidade de N, principalmente as anuais produtoras de grãos, em função do ciclo curto de cultivo e dos altos teores deste elemento retirados pelos grãos por ocasião da maturação. Cerca de trinta e cinco quilos de N são exportados em cada tonelada de grãos produzida (OLIVEIRA et al., 1996). As principais fontes de N para a cultura do feijoeiro são: o solo, pela decomposição da matéria orgânica e das rochas; a aplicação de adubos nitrogenados e a fixação biológica de N atmosférico, pela associação do feijoeiro com as bactérias do grupo dos rizóbios.

As condições de alta temperatura e umidade aceleram o processo da decomposição da matéria orgânica dos solos brasileiros, liberando rapidamente o nitrogênio e ocasionando posterior perda no perfil do solo, pela lixiviação e, na forma gasosa, devida a desnitrificação. Portanto, os solos tropicais caracterizam-se pelos baixos teores de nitrogênio, e deve ser repostos devido aos ciclos de cultivo (EMPRESA BRASILEIRA E PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2012)

A fixação biológica de N é considerada, assim como a fotossíntese, um dos processos biológicos mais importantes (EMBRAPA, 2012), consiste na redução do nitrogênio atmosférico, N_2 , que está indisponível para as plantas, a NH_4 , uma forma que as plantas conseguem absorver e, posteriormente, utilizar em seu metabolismo. Essas bactérias são denominadas diazotróficas, e possuem essa capacidade de fixação do N, devido a uma enzima conhecida como nitrogenase, responsável pela redução do nitrogênio atmosférico.

A bactéria e a planta possuem metabolismo complementares, e cada um estimula o outro a produzir substâncias específicas (KERBAUY, 2008) para que a associação aconteça. A simbiose é caracterizada pela formação dos nódulos (estruturas hipertróficas nas raízes), onde a formação de um simples nódulo é resultante de um processo complexo, envolvendo diversos estádios (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001): a) pré-infecção (reconhecimento dos simbioses – planta e bactéria - e interação entre superfícies da bactéria e da planta), b)

infecção da planta pela bactéria e formação do nódulo, e c) funcionamento do nódulo, i.e., fixação de nitrogênio. (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Para que haja o reconhecimento inicial dos simbiontes é realizado através de moléculas exsudadas pelo hospedeiro (desde a germinação e no decorrer do desenvolvimento da planta) que ativam os genes de nodulação da bactéria (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Antes da infecção o rizóbio necessita multiplicar-se próximo à superfície da raiz antes de ocorrer sua adesão à raiz e penetração nesta; dessa forma, após o rizóbio ter se multiplicado, aumentando sua população o suficiente, ocorre sua adesão à superfície da raiz; com a adesão da bactéria ao pelo radicular (KERBAUY, 2008), enzimas produzidas pelas bactérias degradam parte da parede celular, que sofre uma invaginação, iniciando a produção de uma estrutura semelhante a um tubo chamada corrente de infecção ou tubo de infecção (KERBAUY, 2008).

As células microbianas se multiplicam no interior do nódulo, após atingir a região cortical, o rizóbio passa para o interior das células corticais, adaptando-se a nova função de fixação do nitrogênio, sendo, nesse estágio, denominado bacterióide.

As células da planta respondem a infecção, onde genes do hospedeiro especificamente expressos durante a formação (infecção e desenvolvimento) e funcionamento dos nódulos são chamados de “genes de nodulinas” e se dividem em duas classes: os “genes precoces” e “os genes tardios”, respectivamente, aqueles envolvidos na infecção e formação do nódulo e os envolvidos no funcionamento do nódulo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A expressão desses genes, por sua vez, leva a produção de nodulinas, proteínas vegetais que se acumulam especificamente nos nódulos e tem funções específicas no processo de FBN (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A leg-hemoglobina é a nodulina mais conhecida e esta envolvida no último passo do estabelecimento da simbiose, ou seja, a fixação biológica de nitrogênio. A leg-hemoglobina tem a importante função de transportar oxigênio em taxas suficientes para o metabolismo aeróbio dos bacterióides, sem excessos que possa inibir a atividade da nitrogenase (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Essa proteína confere uma cor avermelhada ao interior dos nódulos radiculares, e é utilizada para verificar se o nódulo está ativo ou não, ou seja, se está ocorrendo a fixação biológica de nitrogênio.

Como em toda simbiose, esse processo acontece em duas vias, onde a planta fornece parte dos fotossintatos para a bactéria, onde serão utilizadas: força redutora e ATP para o sistema nitrogenase; e ATP e esqueletos de carbono para o crescimento das células microbianas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), e a bactéria fornece o composto nitrogenado

para a planta, a fim de produzir aminoácidos e outras substâncias orgânicas que contêm nitrogênio (RAVEN et al., 2001).

A associação entre planta e bactéria apresenta grande importância do ponto de vista econômico e ecológico, podendo dispensar total ou parcialmente o uso de fertilizantes nitrogenados industriais, e com isso viabiliza o cultivo das espécies reduzindo os custos com esse insumo (BARBERI et al., 1998). O feijoeiro beneficia-se dessa associação simbiótica, o que contribui para economia devido a redução no uso de fertilizantes nitrogenados.

As bactérias que se associam com o feijoeiro são denominadas genericamente de rizóbio, porém existem várias espécies, com diferentes graus de eficiência na competição, infecção, nodulação, multiplicação e fixação biológica do nitrogênio nas plantas de feijão.

Tem-se como modelo de associação muito bem sucedida a da soja com a bactéria do gênero *Bradyrhizobium*, essa simbiose é altamente eficiente, e a adubação nitrogenada nas lavouras de soja no Brasil são raramente efetuadas, trata-se de uma espécie altamente competitiva às bactérias nativas, e adaptada às condições ambientais e a planta hospedeira (soja). Com isso, efeitos semelhantes são esperados nas lavouras de feijão, e os resultados e avanços obtidos na inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio nessa cultura são menosprezados.

É importante salientar que o fornecimento de N para essa cultura devido a FBN é altamente significativo, suficiente para garantir as produtividades esperadas sem a utilização ou com a diminuição considerável do N mineral no feijoeiro inoculado. Desde que a inoculação e a condução da cultura seja realizada como recomendada pelos pesquisadores.

Nos primeiros estudos sobre FBN foram descritos efeitos inibitórios do nitrogênio mineral em diversas etapas do processo simbiótico (FRED; GRAUL, 1916). O excesso de N-mineral reduz, drasticamente, a nodulação das leguminosas, porque a nodulação ocorre em resposta às demandas nutricionais da planta; na presença de N- mineral tais demandas são reduzidas, não havendo, portanto, estímulo à nodulação (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), no controle da produção de flavonóides pela planta e na adesão da bactéria às raízes, além de influenciar o processo de infecção, desenvolvimento nodular e atividade da nitrogenase (STREETER, 1988).

Porém o feijoeiro não é considerado um hospedeiro eficiente para a FBN, uma dose inicial de N pode melhorar o crescimento das plantas, apresentando efeito sinérgico e permitindo produtividades economicamente atraentes (TSAI et al., 1993). Em solos com maiores teores de matéria orgânica, que liberam o nitrogênio lentamente, a planta é capaz de se beneficiar da simbiose com o rizóbio e complementar a sua necessidade aproveitando o N

disponível. Porém na presença de N prontamente disponível, é necessário cautela na quantidade de fertilizante mineral a ser aplicada.

Mesmo que a inoculação não seja suficiente para suprir todo o nitrogênio requerido pela planta, e com a realização de adubações nitrogenadas em cobertura, a eliminação ou redução na adubação na semeadura já representa economia a ser considerada (EMBRAPA, 2012), visto que a demanda para a diminuição da dependência de fertilizantes químicos e a necessidade de desenvolvimento da agricultura sustentável é requerida por pesquisadores e produtores (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 EXPERIMENTO EM CAMPO

3.1.1 Área experimental

O trabalho foi instalado em área experimental pertencente à Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP, localizada no município de Selvíria (MS), apresentando como coordenadas geográficas 51° 22' de longitude Oeste de Greenwich e 20° 22' de latitude Sul, com altitude de 335 metros. A precipitação média anual é de 1370mm, a temperatura média anual é de 23,5°C e a umidade relativa do ar está entre 70 e 80% (média anual). O experimento foi instalado em área anteriormente ocupada com a cultura do milho.

3.1.2 Caracterização do solo

O solo do local é do tipo LATOSSOLO VERMELHO Distrófico típico argiloso, A moderado, hipodistrófico, álico, caulínico, férrico, compactado, muito profundo, moderadamente ácido (EMBRAPA, 2006).

As características químicas do solo foram determinadas antes da instalação do experimento, nas camadas de 0,00 a 0,20 m e 0,20 a 0,40 m, seguindo a metodologia proposta por Raij e Quaggio (1983) cujas características encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1- Análise química do solo da área experimental na camada de 0,00 a 0,20 m e 0,20 a 0,40 m em 2012. Selvíria, MS, Brasil, 2012 e 2013.

Camada (cm)	Macronutrientes e resultados complementares											m	V
	P ⁽¹⁾ -mg dm ⁻³ -	S ⁽²⁾ g dm ⁻³	MO g dm ⁻³	pH CaCl ₂	K -----mmol _c dm ⁻³ -----	Ca	Mg	H+Al	Al	SB	CTC		
0-20	10	8	18	5,1	2,8	25	13	21	1	41	66	2	62
20-40	7	33	12	4,8	1,6	14	9	18	1	28	45	4	61

⁽¹⁾ Método da Resina; ⁽²⁾ SO₄⁻¹.

3.1.3 Tratamentos e delineamento experimental

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados disposto em um esquema fatorial 4x5 com 4 repetições. Os tratamentos foram constituídos pela inoculação ou não de sementes (T₁ – ausente de inoculação, T₂ – *Azospirillum brasilense*, T₃ – *Rhizobium tropici*, T₄ - *Azospirillum brasilense* + *Rhizobium tropici*) e por cinco doses de nitrogênio (0, 30, 60, 90 e 120 kg ha⁻¹). As parcelas foram constituídas por 5 linhas de 5 metros de comprimento, sendo consideradas como área útil as 3 linhas centrais, desprezando-se 0,5 metros, em ambas as extremidades de cada linha.

Tabela 2- Descrição dos tratamentos estudados no experimento em 2012 e 2013. Selvíria, MS, Brasil, 2012 e 2013.

T	IS	DN (kg ha ⁻¹)	T	IS	DN (kg ha ⁻¹)
1	<i>A. brasilense</i>	0	11	<i>A. brasilense</i> + <i>R. tropici</i>	0
2	<i>A. brasilense</i>	30	12	<i>A. brasilense</i> + <i>R. tropici</i>	30
3	<i>A. brasilense</i>	60	13	<i>A. brasilense</i> + <i>R. tropici</i>	60
4	<i>A. brasilense</i>	90	14	<i>A. brasilense</i> + <i>R. tropici</i>	90
5	<i>A. brasilense</i>	120	15	<i>A. brasilense</i> + <i>R. tropici</i>	120
6	<i>R. tropici</i>	0	16	Ausente de inoculação	0
7	<i>R. tropici</i>	30	17	Ausente de inoculação	30
8	<i>R. tropici</i>	60	18	Ausente de inoculação	60
9	<i>R. tropici</i>	90	19	Ausente de inoculação	90
10	<i>R. tropici</i>	120	20	Ausente de inoculação	120

Legenda: T – tratamentos; IS – inoculação de sementes; DN – doses de nitrogênio.

3.1.4 Implantação do experimento

Antes da semeadura do feijão foram coletadas amostras para obtenção da produção de massa seca de plantas de milho cultivado, anteriormente ao feijão, por meio de amostragens aleatórias em oito pontos da área experimental, utilizando um quadrado com $0,25\text{m}^2$ de área nos dois anos agrícolas. As amostras foram colocadas para secagem, em estufa de circulação forçada de ar a temperatura de $65\text{ }^\circ\text{C}$, posteriormente foi realizada a pesagem e os dados transformados em kg ha^{-1} .

Foi utilizada a cultivar Pérola que apresenta plantas do tipo II/III e grãos do tipo carioca que é recomendada para a região. A inoculação de semente foi realizada com as doses recomendadas de *A. brasilense* (200 g do inoculante para cada 25 kg de semente) e de *R. tropici* (200 g do inoculante para cada 25 kg de semente), tanto para os tratamentos com as bactérias isoladas como para a utilização destas em conjunto, para facilitar a adesão do inoculante nas sementes foi utilizada solução açucarada 10%. As estirpes utilizadas para a inoculação de *A. brasilense* foram AbV₅ e AbV₆ com 2×10^8 Ufc (unidades formadoras de colônia)/g e para *R. tropici* SEMIA 4080 2×10^8 Ufc/g, ambos inoculantes turfosos, obtidas de produtos comerciais registrados no Ministério da Agricultura e Pecuária. A inoculação das sementes foi realizada à sombra e após uma breve secagem (para evitar danos às sementes) foi feita a semeadura.

A semeadura foi realizada em 03/05/2012 no primeiro ano de estudo e 14/05/2013 no segundo ano de estudo, com espaçamento de 0,50m entrelinhas e 12 plantas/m. Não foi realizado nenhum tratamento fitossanitário de sementes. A adubação de semeadura foi realizada com 250 kg ha^{-1} de 04-30-10. A emergência ocorreu no dia 09/05/2012 e 20/05/2013.

A adubação nitrogenada foi realizada 21 DAE (dias após a emergência) em 2012 e 2013 conforme os tratamentos descritos anteriormente, depositada em filetes ao lado da linha de plantas e incorporado com irrigação, tendo a ureia como fonte. O florescimento pleno ocorreu aos 42 DAE em 2012 e aos 41 DAE em 2013. A colheita foi realizada aos 93 DAE em 2012 e em 2013 aos 90 DAE.

O controle de pragas e de doenças, assim como de plantas daninhas, foi realizado com produtos específicos e registrados para a cultura, de acordo com a necessidade da lavoura. No ano de 2013 houve um severo ataque de *Helicoverpa armigera*, o que gerou maiores cuidados com a lavoura.

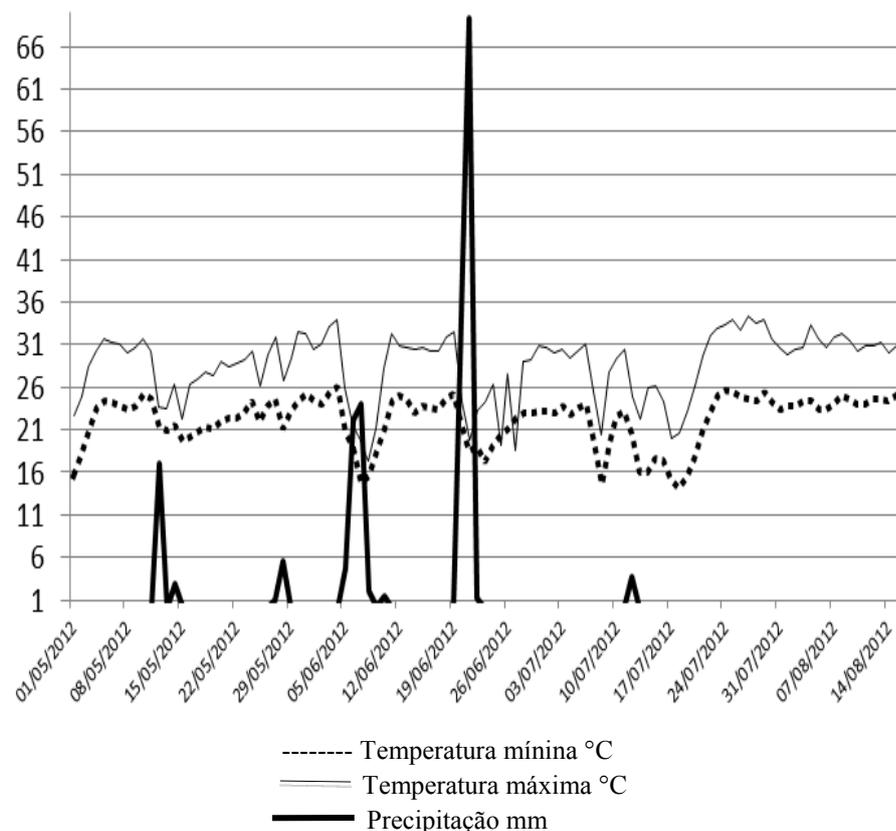
3.1.5 Dados climáticos

O clima predominante da região, conforme classificação de Koppen, é do tipo Aw, definido como tropical úmido com estação chuvosa no verão e seca no inverno. A precipitação pluvial média anual é de 1.330 mm, com temperatura média anual de aproximadamente 25 °C e umidade relativa do ar média anual de 66% (CENTURION, 1982).

Os dados de temperatura do ar máxima e mínima e precipitação pluvial do primeiro ano de estudo (01 de maio de 2012 a 15 de agosto de 2012) constam na Figura 1. O total de precipitação pluvial registrado no período experimental foi de 186,5 mm.

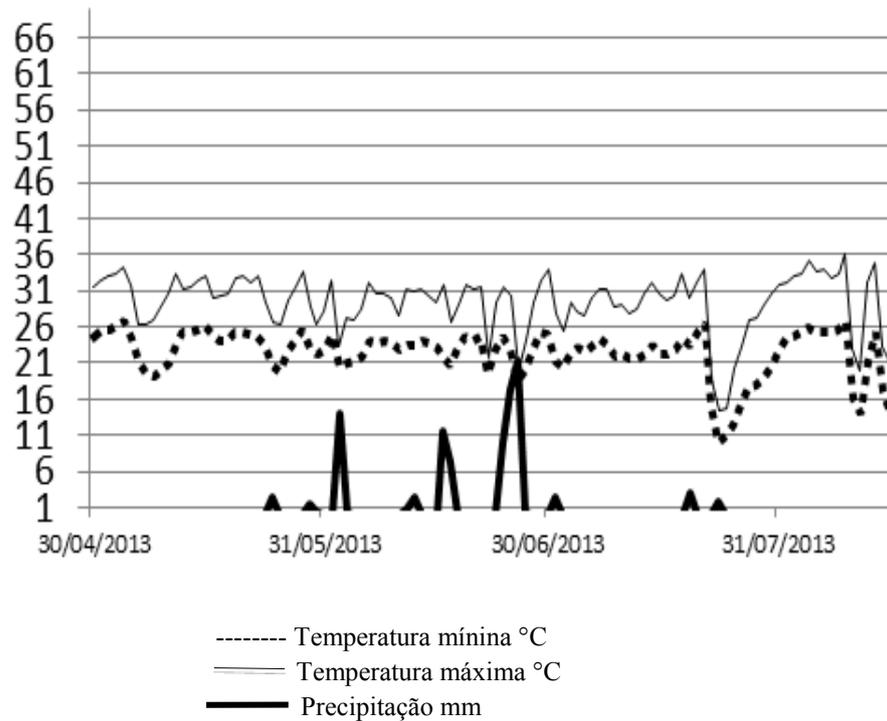
Os dados de temperatura do ar máxima e mínima e precipitação pluvial do segundo ano de estudo (30 de maio de 2013 a 15 de agosto de 2013) constam na Figura 2. O total de precipitação pluvial registrado no período experimental foi de 96,6 mm. Os dados climáticos foram coletados em Estação Meteorológica, localizada a aproximadamente 700 m da área experimental.

Figura 1- Os dados de temperatura do ar máxima e mínima e precipitação pluvial em 2012. Selvíria, MS, Brasil, 2012 e 2013.



Fonte: elaboração da própria autora.

Figura 2- Os dados de temperatura do ar máxima e mínima e precipitação pluvial em 2013. Selvíria, MS, Brasil, 2012 e 2013.



Fonte: elaboração da própria autora.

3.1.6 Avaliações fitotécnicas

Durante o período anterior a semeadura nos dois anos de estudo (2012 e 2013) foram mensuradas no resíduo vegetal do milho a matéria seca e o teores de N total acumulado. Quanto ao feijão, as características agrônômicas, os componentes de produção e em 2013 a massa do resíduo vegetal do milho e massa de plantas de feijão deixados na área após colheita da cultura.

3.1.6.1 Milho

a) Massa da matéria seca do milho (MSM)

Foi determinada após a passagem do desintegrador mecânico, os restos vegetais foram coletados, utilizando-se um quadrado de 0,50 m de lado e área de 0,25 m², em dois pontos por parcela; essas amostras foram acondicionadas em sacos de papel, devidamente identificadas e levadas para o laboratório para secagem em estufa de ventilação forçada à temperatura de 65 °C até ponto de equilíbrio constante, fazendo-se a quantificação e extrapolando em kg ha⁻¹.

b) Teor e quantidade de N acumulado na palhada do milho

Foi determinado o teor de N (g kg^{-1}) do resíduo do milho, conforme metodologia proposta por Malavolta et al. (1997). Pelo produto do teor de nutriente e os valores extrapolados da MSM (kg ha^{-1}), obteve-se o N total acumulado pelo milho.

3.1.6.2 Características agronômicas do feijão

a) População de plantas

Aos 8 dias após a emergência das plantas e durante a colheita foi avaliado, em duas linhas, na área útil das parcelas, o número de plantas com o objetivo de se calcular a população inicial e a população final de plantas ha^{-1} .

b) Índice de clorofila foliar

A estimativa do índice de clorofila foliar foi realizada em condições de campo na fase de desenvolvimento R_6 (florescimento), com a utilização de clorofilômetro portátil marca ClorofiLOG®, modelo CFL 1030 (Falker Automação Agrícola®), que por meio de sensores, analisa três faixas de frequência de luz e através de relações de absorção de diferentes frequências, fornece medições dos teores das clorofilas a, b e total (a+b), expressas em unidades dimensionais chamadas ICF (Índice de Clorofila Foliar) (FALKER, 2008). Cada medição foi realizada no terceiro trifólio contando do ápice para a base, sendo obtidas 4 medições por parcela, em quatro plantas e com os dados obtidos destas medições obteve-se a média por parcela.

c) Massa de matéria seca de plantas

Na ocasião do florescimento pleno das plantas, foram coletadas 10 plantas em local pré-determinado na área útil, acondicionadas em sacos de papel, devidamente identificadas e levadas ao laboratório e submetidas à secagem em estufa de ventilação forçada à temperatura média de 60-70 °C até atingir massa em equilíbrio. Posteriormente as amostras foram pesadas e os valores convertidos em g planta^{-1} .

d) Teor de macronutrientes foliar

As folhas das plantas coletadas para avaliação anterior, na fase de desenvolvimento R_6 (florescimento), foram moídas em moinho tipo Wiley submetidas à digestão sulfúrica e nitroperclórica, conforme metodologia proposta por (MALAVOLTA et al., 1997).

e) Componentes da produção

Foram coletadas, por ocasião da colheita, 10 plantas na área útil das parcelas para a avaliação de: número de vagens por planta: foi determinado pela relação entre o número total de vagens/número de plantas; número médio de grãos por vagem: foi calculado pela relação entre o número total de grãos/número total de vagens; massa de 100 grãos: foi obtido pela coleta ao acaso e pesagem de 2 amostras de 100 grãos por parcela (13 % base úmida);

f) Produtividade de grãos

As plantas da área útil de cada parcela foram arrancadas e deixadas para secagem a pleno sol. Após a secagem, as mesmas foram submetidas a trilha mecânica, os grãos foram pesados e os dados transformados em kg ha^{-1} (13 % base úmida).

g) Ciclo

Foi avaliado o número de dias transcorridos entre a emergência e a colheita.

h) Nitrogênio dos grãos

Após a colheita, os grãos foram moídos em moinho tipo Wiley para em seguida submetidos à digestão sulfúrica, conforme metodologia proposta por MALAVOLTA et al., (1997).

i) Massa da matéria seca final do milho (MSFM)

Após a colheita do feijão em 2013 foi realizada a avaliação da produção de massa da matéria seca final do milho, por meio de amostragens utilizando-se um quadrado de arame com $0,25\text{m}^2$ de área. A coleta do material vegetal foi feita de maneira aleatória nas entrelinhas da cultura do feijão em quatro pontos de cada parcela. Após a secagem, em estufa de circulação forçada de ar a temperatura de $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, foi realizada a pesagem e os dados transformados em kg ha^{-1} .

j) Massa da matéria seca dos resíduos das plantas de feijão (MRF)

Após a colheita das 10 plantas para análise de componentes de produção do feijão foi realizada em 2013 a avaliação da produção de massa da matéria seca, por meio da separação das plantas e das vagens (sem os grãos retirados para outras análises), para simular a massa deixada no local após a colheita do feijão. Após a secagem, em estufa de circulação forçada

de ar a temperatura de 65 °C, foi realizada a pesagem e os dados transformados em kg ha⁻¹ utilizando a população final.

k) Massa da matéria seca residual total (MSRT)

Foi obtido a partir da soma da massa da matéria seca final da cobertura vegetal e da massa da matéria seca dos resíduos das plantas de feijão.

3.1.7 Análise estatística dos dados

Os dados foram submetidos ao teste F da análise de variância. Quando constatada diferença significativa, procedeu-se a comparação das médias dos tratamentos com inoculação pelo teste de Tukey, adotando-se o nível de 5% e 1% de probabilidade ($p < 0,05$) e ($p, 0,01$), de acordo com Pimentel Gomes e Garcia (2002). E o efeito das doses de nitrogênio foi analisado por regressão polinomial, ajustando-se modelos de equações lineares e quadráticas significativas pelo teste F ($p < 0,01$ e $p < 0,05$).

3.2. EXPERIMENTO EM VASO

O experimento em vaso foi desenvolvido com a finalidade auxiliar nas análises da massa do sistema radicular, contagem de nódulos e quantificação de bactérias promotoras de crescimento e assim produzir dados para melhor embasamento dos resultados obtidos em campo.

3.2.1 Área experimental

O experimento foi desenvolvido em vaso em condições não controladas, em Ilha Solteira, Estado de São Paulo, Brasil com coordenadas geográficas 51°20'33" longitude oeste e 20°25'58" latitude sul, e altitude de aproximadamente 335 metros.

Foram utilizados vasos com capacidade de 10 litros de solo, com 3 repetições.

3.2.2 Caracterização do solo

Como substrato foi utilizado o solo da camada arável de área experimental do experimento em campo descrito anteriormente, tendo o milho como cultura anterior. O solo

do local é do tipo LATOSSOLO VERMELHO Distrófico típico argiloso, A moderado, hipodistrófico, álico, caulínítico, férrico, compactado, muito profundo, moderadamente ácido (EMBRAPA, 2006). A precipitação média anual é de 1370 mm, a temperatura média anual é de 23,5 °C e a umidade relativa do ar está entre 70 e 80% (média anual).

3.2.3 Tratamentos e delineamento experimental

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados disposto em um esquema fatorial 4x5, com 3 repetições. Os tratamentos foram constituídos pela inoculação ou não de sementes de feijão (T1 – ausente de inoculação, T2 – *A. brasilense*, T3 – *R. tropici*, T4 – *A. brasilense* + *R. tropici*) e por cinco doses de nitrogênio (0, 30, 60, 90 e 120 kg ha⁻¹). As parcelas foram constituídas por um vaso cultivado com 5 plantas e, posteriormente, desbastadas para o total de 3 plantas por vaso.

3.2.4 Implantação do experimento

Para a simulação da situação do experimento em campo, após a mensuração da massa da matéria seca do milho (cultura anterior ao feijão), foi colocado sobre o substrato do vaso massa correspondente à área do vaso.

Foi utilizada a cultivar Pérola, que apresenta plantas do tipo II/III e grãos do tipo carioca, que é recomendada para a região Noroeste Paulista. A inoculação de semente foi realizada com as doses recomendadas de *A. brasilense* (200 g do inoculante para cada 25 kg de semente) e de *R. tropici* (200 g do inoculante para cada 25 kg de semente), tanto para os tratamentos com as bactérias isoladas como para a utilização destas em conjunto, para facilitar a adesão do inoculante nas sementes foi utilizada solução açucarada 10%. As estirpes utilizadas para a inoculação de *A. brasilense* foram AbV₅ e AbV₆ com 2x10⁸ Ufc (unidades formadoras de colônia)/g e para *R. tropici* SEMIA 4080 2x10⁸ Ufc/g, ambos inoculantes turfosos, obtidas de produtos comerciais registrados no Ministério da Agricultura e Pecuária. A inoculação das sementes foi realizada à sombra e após uma breve secagem (para evitar danos às sementes) foi feita a semeadura manual nos vasos.

A semeadura foi realizada em 21/05/2012 e 18/05/2013; não houve tratamento fitossanitário nas sementes. A adubação de semeadura foi feita com 250 kg ha⁻¹ de 04-30-10 considerando um espaçamento de 0,50 m em campo, sendo que para o vaso os valores foram convertidos através do diâmetro do vaso (0,25 m), para os dois anos de estudo. A emergência

das plantas ocorreu no dia 27/05/2012 e 23/05/2013. O controle de pragas e de doenças, assim como de plantas daninhas, foi realizado com produtos específicos e registrados para a cultura, de acordo com a necessidade das plantas.

A adubação nitrogenada foi realizada 21 DAE em 2012 e 2013 conforme os tratamentos descritos anteriormente, depositado em linha e incorporado com irrigação, tendo a ureia como fonte. O florescimento pleno ocorreu aos 47 DAE em 2012 e aos 46 DAE em 2013, as coletas das plantas para análise de ICF, da massa de parte aérea, teor de N foliar, massa do sistema radicular, número de nódulos, massa de nódulos e NMP - número mais provável de bactérias diazotróficas associativas foram realizadas nos mesmos dias.

A suplementação hídrica foi realizada por meio de irrigação.

3.2.5 Avaliações microbiológicas e fitotécnicas

Durante o período de desenvolvimento e florescimento da cultura, foram realizadas as seguintes avaliações:

a) Índice de clorofila foliar

A estimativa do índice de clorofila foliar foi realizada na fase de desenvolvimento R₆ (florescimento), com a utilização de clorofilômetro portátil marca ClorofiLOG[®], modelo CFL 1030 (Falker Automação Agrícola[®]) que fornece medições dos teores das clorofilas *a*, *b* e total (*a+b*), expressas em unidades dimensionais chamadas ICF (Índice de Clorofila Foliar) (FALKER, 2008). Cada medição foi realizada no terceiro trifólio contando do ápice para a base, sendo obtidas 3 medições por parcela (vaso), em três plantas e com os dados obtidos destas medições obteve-se a média por parcela (vaso).

b) Massa seca de parte aérea e raízes

Foi determinada através da separação da parte aérea e raízes das plantas dos vasos na ocasião de florescimento pleno das plantas. O sistema radicular foi separado pela lavagem do solo e separação dos nódulos. As partes das plantas foram acondicionadas em sacos de papel, devidamente identificadas e levadas ao laboratório e submetidas à secagem em estufa de ventilação forçada à temperatura média de 60-70° C até atingir massa em equilíbrio. Posteriormente as amostras foram pesadas e os valores convertidos em g por planta.

c) Teor de macronutrientes foliar

Todas as folhas das plantas coletadas para avaliação anterior, na fase de desenvolvimento R₆ (florescimento), foram moídas em moinho tipo Wiley em seguida submetidas à digestão sulfúrica e nitroperclórica, conforme metodologia proposta por Malavolta et al. (1997).

d) Número de nódulos

O solo foi coletado no vaso contemplando todo o volume de solo presente no mesmo, na fase de desenvolvimento R₆ (florescimento). Após a separação e lavagem do sistema radicular, o número de nódulos foi determinado através da contagem de nódulos presentes nas raízes de 3 plantas de feijoeiro e feita a média dessa contagem.

e) Massa de nódulos

Após a contagem de nódulos, os mesmos foram secados em estufa com ventilação forçada a 65 °C, até atingir massa constante, após será obtido a massa de nódulos.

f) Quantificação de bactérias endofíticas diazotróficas: *Azospirillum* spp.

As amostras para a avaliação de quantificação de bactérias endofíticas diazotróficas - *Azospirillum* spp, foram acondicionadas em câmara fria, com umidade relativa do ar à 20% e temperatura de 10 °C para conservação das mesmas.

A estimativa do número de bactérias do gênero *Azospirillum* spp. em associação com o solo da rizosfera de plantas de feijão foi determinada pelo método descrito por Döbereiner et al. (1995) na fase de desenvolvimento R₆ (florescimento). Foi utilizado o meio de cultura NFb, que é semi-seletivo para o isolamento de *Azospirillum* sp. Amostras de solo foram diluídas em solução salina 0,85%, agitadas em agitador horizontal e diluídas serialmente, de 10⁻² até 10⁻⁷. Foram retiradas alíquotas diluídas e inoculadas nos frascos com meio de cultura. Os frascos foram incubados a 30 °C e após 5 dias o crescimento bacteriano foi avaliado verificando-se o aparecimento de película característica. O número populacional foi obtido com o uso da tabela de Mc Crady, tomando-se por base o número de frascos positivos.

3.2.6 Análise estatística dos dados

Os dados foram submetidos ao teste F da análise de variância. Quando constatada diferença significativa, procedeu-se a comparação das médias dos tratamentos com inoculação pelo teste de Tukey, adotando-se o nível de 5% e 1% de probabilidade ($p < 0,05$) e ($p < 0,01$), de acordo com (PIMENTEL; GOMES; GARCIA, 2002). E o efeito das doses de nitrogênio foi analisado por regressão polinomial, ajustando-se modelos de equações lineares e quadráticas significativas pelo teste F ($p < 0,01$ e $p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

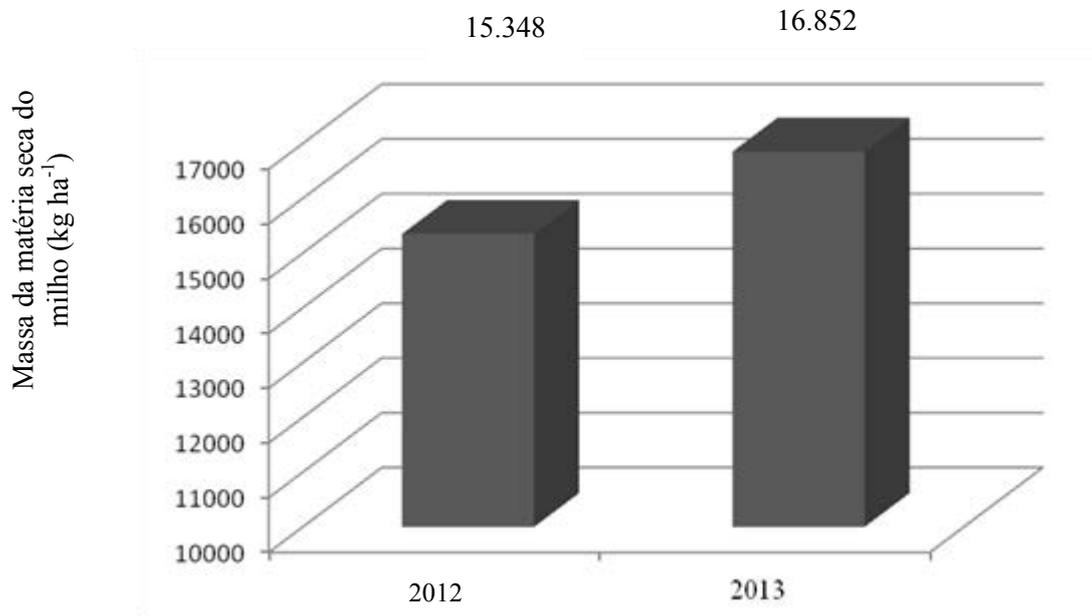
4.1 EXPERIMENTO EM CAMPO

4.1.1 Massa da matéria seca do milho (MMSM) e teor de N total acumulado na MMSM

O milho cultivado anteriormente ao feijão de inverno proporcionou ao sistema plantio direto uma massa de matéria seca de 15.348 kg ha⁻¹ em 2012 e 16.852 kg ha⁻¹ em 2013 (Figura 2).

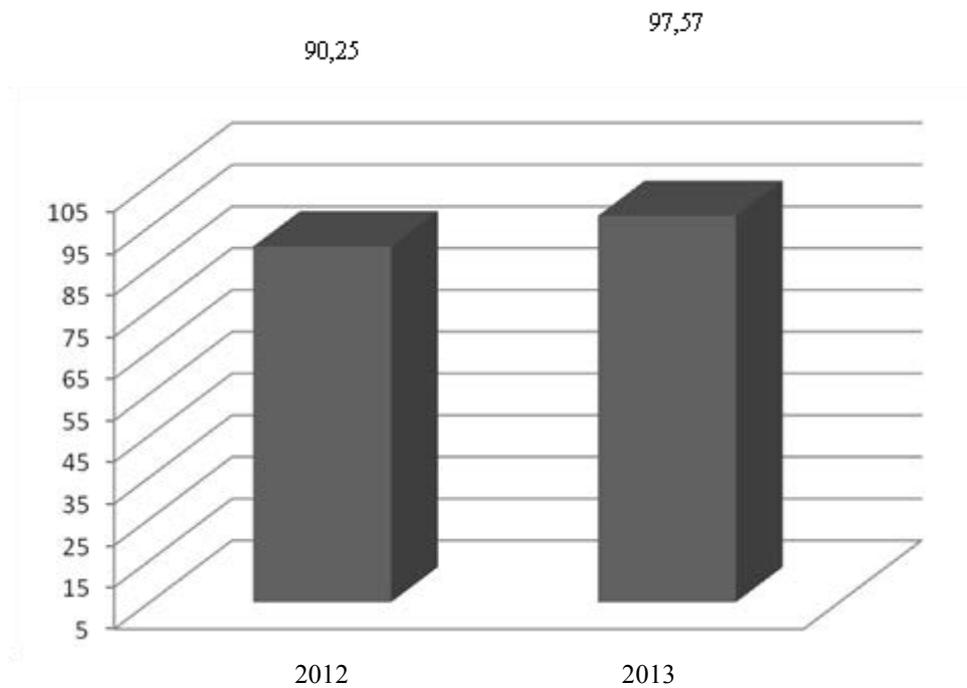
Para a quantidade de N acumulado na massa seca do milho, em 2012 obteve-se 90,25 kg ha⁻¹ de N e em 2013 97,57 kg ha⁻¹ de N (Figura 3).

Figura 3- Massa da matéria seca do milho cultivado anteriormente ao feijão de inverno no sistema plantio direto. Selvíria, MS, 2012 e 2013.



Fonte: elaboração da própria autora.

Figura 4- N acumulado no milho cultivado anteriormente ao feijão de inverno no sistema plantio direto. Selvíria, MS, 2012 e 2013.



Fonte: elaboração do própria autora.

4.1.2 Características agronômicas do feijão

Os valores médios da população inicial de plantas de feijão estão apresentados na Tabela 3, nos anos de 2012 e 2013 os maiores valores foram observados no tratamento ausente de inoculação (333.333 plantas ha⁻¹ em 2012 e 330.000 plantas ha⁻¹ em 2013) em detrimento dos demais tratamentos. Isso ocorreu possivelmente devido à distribuição das sementes inoculadas por metro, dificultada devido a camada de turfa presente nas sementes com as bactérias, refletindo assim na densidade dos tratamentos com *A. brasilense* (246.667 plantas ha⁻¹ em 2012 e 248.333 plantas ha⁻¹ em 2013), *R. tropici* (253.333 plantas ha⁻¹ em 2012 e 256.666 plantas ha⁻¹ em 2013) e *A. brasilense* + *R. tropici* (253.333 plantas ha⁻¹ em 2012 e 258.333 plantas ha⁻¹ em 2013).

Para a população inicial em ambos os anos no tratamento com doses de nitrogênio observa-se a igualdade dos valores médios, pois essa avaliação foi realizada antes da adubação nitrogenada em cobertura, o que não influenciou, portanto, nos valores obtidos (Tabela 3).

Os resultados obtidos para a população final em 2012 manteve o mesmo comportamento da população inicial desse mesmo ano, onde o tratamento ausente de inoculação teve a maior população final em relação aos outros tratamentos. Já para 2013 o tratamento ausente de inoculação teve a menor população final em comparação ao com *Azospirillum brasilense* e *Azospirillum brasilense* + *Rhizobium tropici*, nesse ano houve um severo ataque de *Helicoverpa armigera* o que pode ter influenciado na diminuição da população final de plantas de feijão (Tabela 3). As doses de nitrogênio não influenciaram na população final de plantas nos dois anos de estudo (Tabela 3), diferentemente de Arf et al. (2011) que trabalhando com fontes e doses de N, observaram redução linear na população do feijoeiro de inverno no sistema plantio direto.

Tabela 3- Valores médios da população inicial de plantas de feijão (plantas ha⁻¹), população final de plantas de feijão (plantas ha⁻¹) e massa seca de plantas de feijão (g planta⁻¹) em feijoeiro de inverno irrigado por aspersão em sistema plantio direto. Selvíria (MS), 2012 e 2013.

Tratamentos	População inicial		População final		MSP	
	(plantas ha ⁻¹)		(plantas ha ⁻¹)		(g planta ⁻¹)	
Inoculação	2012	2013	2012	2013	2012	2013
Ausente	333.333a	330.000a	226.200a	150.1500b	8,86	7,86
<i>A. brasilense</i>	246.667b	248.333b	158.200b	169.750a	10,27	7,88
<i>R. tropici</i>	253.333b	256.666b	174.800b	160.125ab	9,23	7,90
A + R	253.333b	258.333b	171.400b	165.000a	10,75	7,56
DMS	16.086	12.198	26.083	12.755	-	-
Doses de N	2012	2013	2012	2013	2012	2013
0	271.667	273.333	193.750	161.563	8,97	7,21
30	271.667	273.333	173.875	159.687	9,84	6,83
60	271.667	273.333	186.500	162.031	10,73	7,82
90	271.667	273.333	176.750	162.343	9,66	8,32
120	271.667	273.333	182.375	161.093	9,68	8,81
Teste F						
Inoculação	91,8*	135,826*	18,367**	5,815*	1,668 ^{ns}	0,119 ^{ns}
Doses N	0,000 ^{ns}	0,000 ^{ns}	1,027 ^{ns}	0,074 ^{ns}	0,682 ^{ns}	2,359 ^{ns}
Inoc x Doses N	0,000 ^{ns}	0,000 ^{ns}	0,661 ^{ns}	1,046 ^{ns}	0,410 ^{ns}	0,907 ^{ns}
CV %	7,08	5,34	17,08	9,46	31,21	23,24

* e**, significativo a 5% e a 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente; ns = não significativo; DMS = diferença mínima significativa; CV = coeficiente de variação.). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey.

O índice de clorofila foliar (ICF) das plantas de feijão, não foi influenciado pela inoculação de sementes em 2012. Já as doses de nitrogênio em cobertura influenciaram de maneira linear o índice de clorofila foliar do feijoeiro (Tabela 4).

Em 2013 houve interação entre a inoculação de sementes e doses de nitrogênio para o índice de clorofila foliar e o desdobramento encontra-se na Tabela 5, onde nota-se na dose 0 que a inoculação de sementes com *R. tropici* proporcionou às plantas de feijão maior ICF (36,23) em comparação a inoculação com *Azospirillum brasilense* (28,15).

Para a dose de 120 kg ha⁻¹, o ICF na ausência de inoculação foi menor (33,30) quando comparado aos outros tratamentos (*A. brasilense*: 44,62; *R. tropici*: 42,85; *A. brasilense* + *R. tropici*: 46,13).

Quanto ao desdobramento de doses de N dentro de inoculação, a ausência de inoculação influenciou de maneira quadrática aumentando o ICF nas plantas de feijão até a dose de 69,49 kg ha⁻¹ de N em cobertura. A inoculação com *A. brasilense* e *R. tropici* influenciaram o ICF de maneira linear positiva, ou seja, quanto maior a dose de N aplicado em cobertura maior o ICF nas plantas de feijão, devido o N ser constituinte da molécula de

clorofila, geralmente existe alta correlação entre o seu teor e a clorofila nas folhas do feijoeiro (SORATTO et al, 2004). Para a coinoculação de sementes com *A. brasilense* + *R. tropici* os dados se ajustaram a uma equação quadrática.

Tabela 4- Valores médios do índice de clorofila foliar, proteína bruta, teor de nitrogênio foliar e teor de fósforo foliar em feijoeiro de inverno irrigado por aspersão em sistema plantio direto. Selvíria (MS), 2012 e 2013.

Tratamentos	ICF		PB		Teor de N foliar		Teor de P foliar	
	----- (g planta ⁻¹) -----							
Inoculação	2012	2013	2012	2013	2012	2013	2012	2013
Ausente	42,05	35,55	43,95	15,14	47,17	24,22	5,58	5,69
<i>A. brasilense</i>	44,22	36,57	30,05	14,86	48,07	23,78	6,16	5,34
<i>R. tropici</i>	45,18	37,86	31,67	15,56	50,67	24,89	6,48	5,18
A + R	45,61	37,46	31,46	15,19	50,34	24,44	6,24	5,62
DMS	-	-	-	-	-	-	-	-
Doses de N	2012	2013	2012	2013	2012	2013	2012	2013
0	40,80 ⁽¹⁾	32,47	31,17	14,62	49,88	23,39	6,80	5,76
30	41,34	33,08	35,18	15,38	49,02	24,77	5,97	5,26
60	45,11	37,23	34,71	16,67	48,33	26,67	5,45	6,04
90	45,28	39,80	34,19	14,10	47,48	22,56	5,79	4,95
120	48,78	41,73	36,16	15,18	50,60	24,28	6,57	5,28
Teste F								
Inoculação	1,975 ^{ns}	1,881 ^{ns}	87,709 ^{ns}	0,355 ^{ns}	2,855 ^{ns}	0,366 ^{ns}	0,958 ^{ns}	0,538 ^{ns}
Doses N	6,684 ^{**}	23,501 ^{**}	5,905 ^{ns}	3,225 ^{ns}	1,181 ^{ns}	3,296 ^{ns}	1,649 ^{ns}	1,463 ^{ns}
Inoc x Doses N	0,344 ^{ns}	4,357 ^{**}	6,340 ^{ns}	1,526 ^{ns}	0,854 [*]	1,561 ^{ns}	0,866 ^{ns}	1,136 ^{ns}
CV %	11,42	7,88	9,04	12,27	9,24	12,20	28,52	22,90

⁽¹⁾ $y = 0,066310x + 40,284250$ ($R^2=0,93$) * e ** significativo a 5% e a 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente; ns = não significativo; DMS = diferença mínima significativa; CV = coeficiente de variação.

Tabela 5- Desdobramento da interação de inoculação de sementes entre doses de nitrogênio no ICF no feijoeiro de inverno cultivado irrigado por aspersão em sistema plantio direto em 2013. Selvíria (MS).

Inoculação	Doses de nitrogênio (kg ha ⁻¹)				
	0	30	60	90	120
ICF					
Ausente ⁽¹⁾	32,08ab	32,28	40,33	39,73	33,30b
<i>A. brasilense</i> ⁽²⁾	28,15b	34,10	34,98	41,00	44,62a
<i>R. tropici</i> ⁽³⁾	36,23a	34,95	37,03	38,23	42,85a
A + R ⁽⁴⁾	33,42ab	30,97	36,55	40,25	46,13a
DMS	Inoculação dentro de doses de nitrogênio – 6,36				

⁽¹⁾ $y = -0,001739x^2 + 0,241675x + 30,439048$ ($R^2 = 0,65$); ⁽²⁾ $y = 0,132778x + 28,603333$ ($R^2 = 0,97$); ⁽³⁾ $y = 0,055056x + 34,55667$ ($R^2 = 0,74$); ⁽⁴⁾ $y = 0,001173x^2 - 0,025071x + 32,631905$ ($R^2 = 0,96$). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Para o teor de N foliar (Tabela 4) houve interação entre a inoculação de sementes e doses de N, nas doses de 30, 60, 90 e 120 kg ha⁻¹ a ausência de inoculação proporcionou às

plantas de feijão maior teor de N em relação aos demais tratamentos (Tabela 6). Já para inoculação dentro de doses, no tratamento ausente de inoculação os dados se ajustaram a uma equação quadrática, aumentando o teor de N foliar até a dose de 81,33 kg ha⁻¹ (Tabela 6).

Os teores de PB e P foliar não foram influenciados pela inoculação de sementes e pelas doses de N nos dois anos de estudo

Tabela 6- Desdobramento da interação de inoculação de sementes entre doses de nitrogênio no teor de N foliar no feijoeiro de inverno cultivado irrigado por aspersão em sistema plantio direto em 2012. Selvíria (MS).

Inoculação	Doses de nitrogênio (kg ha ⁻¹)				
	0	30	60	90	120
	Teor de N foliar (g kg ⁻¹)				
Ausente ⁽¹⁾	30,94	48,42a	48,04a	44,01a	48,32a
<i>A. brasilense</i>	30,67	28,91b	28,83b	30,02b	31,80b
<i>R. tropici</i>	31,29	33,31b	30,46b	31,02b	32,27b
A + R	31,80	30,10b	31,51b	31,72b	32,21b
DMS	Inoculação dentro de doses de nitrogênio – 5,79				

⁽¹⁾ $y = -0,002375x^2 + 0,386319x + 33,597214$; Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O teor de K foliar nos dois anos de estudo e teor de Ca foliar no feijoeiro em 2012 não foram influenciados pela inoculação de sementes e pelas doses de N em cobertura (Tabela 7). Em 2013 os valores médios do teor de Ca foliar, para doses de N, se ajustaram a uma equação quadrática, aumentando o teor de Ca até a dose de 71,32 kg ha⁻¹.

Nos dois anos de estudo o teor de Mg foliar no feijoeiro não foi influenciado pela inoculação de sementes, já para as doses de N os dados se ajustaram a equações quadráticas, onde em 2012 houve aumento do teor de Mg foliar até a dose de 102,53 kg ha⁻¹ e em 2013 até a dose de 79,81 kg ha⁻¹ (Tabela 7).

A adubação com N aumenta a massa do sistema radicular (Tabela 18) e assim beneficiou a absorção de alguns nutrientes, N (Tabela 6), Ca (Tabela 7) e Mg (Tabela 7).

O teor de S foliar do feijão não foi influenciado tanto pela inoculação de sementes quanto para doses de N aplicado em cobertura em 2012 e 2013 (Tabela 7).

Tabela 7- Valores médios do teor de potássio, cálcio, magnésio e enxofre foliar em feijoeiro de inverno irrigado por aspersão em sistema plantio direto. Selvíria (MS), 2012 e 2013

Tratamentos	Teor de K foliar		Teor de Ca foliar		Teor de Mg foliar		Teor de S foliar	
	------(g kg ⁻¹)-----							
Inoculação	2012	2013	2012	2013	2012	2013	2012	2013
Ausente	22,85	24,47	17,02	16,60	5,87	6,74	3,01	2,57
<i>A. brasilense</i>	22,30	23,73	18,04	16,95	5,92	6,03	3,41	2,98
<i>R. tropici</i>	22,93	23,71	17,04	17,61	5,89	6,25	3,10	2,60
A + R	23,55	28,95	17,90	16,82	5,92	6,14	3,26	2,78
DMS	-	-	-	-	-	-	-	-
Doses de N	2012	2013	2012	2013	2012	2013	2012	2013
0	22,91	24,61	17,10	14,73 ⁽¹⁾	5,69 ⁽²⁾	5,24 ⁽³⁾	3,25	3,04
30	23,22	24,93	17,28	16,87	5,90	6,22	3,09	2,55
60	22,63	27,41	17,62	18,96	5,94	6,84	3,06	2,50
90	22,53	24,65	17,07	17,74	5,97	6,69	3,23	2,61
120	23,25	24,47	18,43	16,69	6,01	6,45	3,34	2,97
Teste F								
Inoculação	1,410 ^{ns}	2,126 ^{ns}	0,976 ^{ns}	0,449 ^{ns}	0,320 ^{ns}	1,527 ^{ns}	2,699 ^{ns}	1,291 ^{ns}
Doses N	0,469 ^{ns}	0,412 ^{ns}	0,840 ^{ns}	4,578 ^{**}	7,875 ^{**}	4,931 ^{**}	0,942 ^{ns}	1,802 ^{ns}
Inoc x Doses N	1,011 ^{ns}	0,563 ^{ns}	0,464 ^{ns}	0,892 ^{ns}	0,546 ^{ns}	0,503 ^{ns}	0,490 ^{ns}	1,900 ^{ns}
CV %	8,41	26,51	14,08	14,81	2,98	19,64	15,24	23,87

⁽¹⁾ $y = -0,000769x^2 + 0,108258x + 14,655667$ ($R^2 = 0,93$); ⁽²⁾ $y = -0,000027x^2 + 0,005537x + 5,712107$ ($R^2 = 0,95$); ⁽³⁾ $y = -0,000253x^2 + 0,040037x + 5,253286$ ($R^2 = 0,99$). * e ** significativo a 5% e a 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente; ns = não significativo; DMS = diferença mínima significativa; CV = coeficiente de variação.

Analisando a inoculação de sementes em 2012 (Tabela 8) pode-se observar que a coinoculação de *A. brasilense* com *R. tropici* proporcionou às plantas de feijão maior número de vagens (12,22) quando comparado à testemunha (9,24). Fato que pode ser explicado pela ação conjunta das bactérias diazotróficas, que podem proporcionar às plantas de feijão melhor desenvolvimento tanto do sistema radicular como da parte aérea, que mesmo não sendo diferente estatisticamente (Tabela 18), apresentou valores médios numericamente superiores no tratamento com *A. brasilense* + *R. tropici*, levando assim ao aumento de botões florais e consequentemente de vagens. Em 2013, os dados de número de vagens por planta não apresentaram diferença quando inoculados ou não inoculados, essa homogeneidade dos valores médios pode ter ocorrido devido ao ataque severo de *H. armigera* que ocorreu na área, essa praga além de consumir folhas tem o hábito de se alimentar também de botões florais, o que provavelmente influenciou os dados obtidos nas avaliações do estudo em 2013.

Tabela 8- Valores médios do número de vagens por planta, número de grãos por vagem e massa de cem grãos em feijoeiro de inverno irrigado por aspersão em sistema plantio direto. Selvíria (MS), 2012 e 2013.

Tratamentos	Número de vagens (planta ⁻¹)		Número de grãos (vagem ⁻¹)		Massa de 100 grãos (g)	
	2012	2013	2012	2013	2012	2013
Inoculação						
Ausente	9,24b	9,83	5,55	5,00	28,95	28,44
<i>A. brasilense</i>	11,01ab	10,06	6,19	4,90	29,19	28,21
<i>R. tropici</i>	10,39ab	9,09	5,22	4,86	28,87	28,80
A + R	12,22a	9,37	5,52	5,07	29,25	28,04
DMS	2,33	-	0,82	-	-	-
Doses de N	2012	2013	2012	2013	2012	2013
0	9,97	8,12	5,10	5,20	28,21 ¹	28,35
30	10,70	9,69	5,29	5,06	29,79	27,89
60	11,22	10,06	5,91	4,84	29,24	28,96
90	11,63	9,64	5,20	4,81	29,20	28,23
120	10,04	10,41	6,60	4,89	28,87	28,43
Teste F						
Inoculação	3,968*	0,533 ^{ns}	3,408*	0,343 ^{ns}	0,318 ^{ns}	1,323 ^{ns}
Doses N	1,084 ^{ns}	1,728 ^{ns}	6,609**	0,808 ^{ns}	3,026*	1,478 ^{ns}
Inoc X Doses N	0,785 ^{ns}	1,503 ^{ns}	1,982*	1,401 ^{ns}	1,172 ^{ns}	1,663 ^{ns}
CV %	26,03	27,80	17,48	14,79	4,60	4,53

⁽¹⁾ $y = -0,000263x^2 + 0,034055x + 28,441429$ ($R^2 = 0,62$); * e ** significativo a 5% e a 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente; ns = não significativo; DMS = diferença mínima significativa; CV = coeficiente de variação. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Em 2012, para número de grãos por vagem, houve interação entre a inoculação de sementes e doses de N e o desdobramento está apresentado na Tabela 9. Analisando dose dentro de inoculação de sementes, para a dose de 30 kg ha⁻¹ a inoculação com *A. brasilense* proporcionou maior número de grãos por vagem (6,62) quando comparado ao tratamento com a inoculação com *R. tropici* (4,49). Para inoculação de sementes dentro de doses, verifica-se que na ausência de inoculação os dados se ajustaram a uma equação linear positiva, onde o aumento da dose de N refletiu no aumento do número de grãos por vagem, o que difere de resultados obtidos por outros autores, onde a adição doses de N não influenciaram nessa característica, por ser uma característica varietal pouco influenciada pela adubação (SORATTO et al, 2004; CRUSCIOL et al., 2007; GOMES et al., 2008; MOREIRA et al., 2013). Para o tratamento com *R. tropici* os dados se ajustaram a uma equação quadrática, aumentando o número de grãos por vagem até a dose 40,36 kg ha⁻¹ de N em cobertura. O número de grãos por vagem, em 2013, não foi influenciado tanto pela inoculação de sementes quanto para doses de N (Tabela 8). Discordando também de Alvarez et al. (2005) que no ano de 2000 avaliando doses de N (0, 25, 50, 75, 100 e 125 kg ha⁻¹) aplicadas sob duas fontes (nitrate de amônio e ureia) em cobertura em feijoeiro cultivado sob sistema plantio direto

irrigado no período de inverno para o estado do Mato Grosso do Sul, verificaram que decresceram linearmente o número de grãos por vagem quando aplicado menores doses de N em cobertura.

Em 2012 e 2013 para massa de 100 grãos de feijão não houve diferença significativa para inoculação de sementes, já em 2012 as doses de N influenciaram de maneira quadrática os dados, aumentando a massa de 100 grãos do feijoeiro até a dose de 64,74 kg de N ha⁻¹, discordando de Moreira et al. (2013) que avaliando o desempenho agrônômico do feijoeiro irrigado após a adição de doses de nitrogênio na semeadura e em cobertura, na região Norte do Estado de Minas Gerais não observaram diferença na massa de 100 grãos. Porém no estudo em 2013 as doses não influenciaram na massa de 100 grãos, ratificando que essa é a característica que apresenta menor variação de acordo com as alterações do meio. Segundo Soratto et al. (2004) a aplicação de N não causa grande variação na massa de 100 grãos.

Tabela 9- Desdobramento da interação de inoculação de sementes entre doses de nitrogênio no número de grãos por vagem no feijoeiro de inverno cultivado irrigado por aspersão em sistema plantio direto em 2012. Selvíria (MS).

Inoculação	Doses de nitrogênio (kg ha ⁻¹)				
	0	30	60	90	120
	Número de grãos por vagem				
Ausente ⁽¹⁾	4,50	4,83ab	5,16	6,07	7,19
<i>A. brasilense</i>	6,00	6,62a	6,96	5,26	6,11
<i>R. tropici</i> ⁽²⁾	4,95	4,49b	5,29	4,47	6,93
A + R	4,96	5,23ab	6,25	5,00	6,17
DMS	Inoculação dentro de doses de nitrogênio – 1,84				

⁽¹⁾ $y = 0,022067x + 4,225500$ ($R^2 = 0,92$); ⁽²⁾ $y = 0,000336x^2 - 0,027120x + 5,039429$ ($R^2 = 0,69$). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O teor de N nos grãos não apresentou diferença significativa em 2012, tanto para inoculação de sementes quanto para doses de N (Tabela 10). Em 2013 a inoculação de sementes com *A. brasilense* proporcionou aos grãos de feijão maior teor de N (26,38 g kg⁻¹) quando comparada a inoculação com *R. tropici* (23,27 g kg⁻¹) (Tabela 10). Os dados de proteína bruta apresentaram o mesmo comportamento do teor de N, não havendo diferença significativa em 2012, tanto para inoculação de sementes quanto para doses de N. Em 2013 a inoculação de sementes com *A. brasilense* (16,49) proporcionou aos grãos de feijão maior teor de PB quando comparada a inoculação com *R. tropici* (14,55) (Tabela 10).

Tabela 10- Valores médios do teor de N nos grãos, proteína bruta nos grãos e produtividade de grãos em feijoeiro de inverno irrigado por aspersão em sistema plantio direto. Selvíria (MS), 2012 e 2013.

Tratamentos	Teor de N nos grãos		PB nos grãos		Produtividade de grãos	
	-----(g kg^{-1})-----				(kg ha^{-1})	
Inoculação	2012	2013	2012	2013	2012	2013
Ausente	25,15	25,00ab	15,72	15,63ab	3.122	1.553b
<i>A. brasilense</i>	24,48	26,38a	15,30	16,49a	3.096	1.881a
<i>R. tropici</i>	23,43	23,27b	14,65	14,55b	3.171	1.444b
A + R	24,30	24,39ab	15,19	15,24ab	3.196	1.511b
DMS	-	2,90	-	1,81	-	223
Doses de N	2012	2013	2012	2013	2012	2013
0	24,50	23,85	15,32	14,90	2.788 ⁽¹⁾	1.549
30	25,67	26,28	16,04	16,42	2.971	1.583
60	24,70	23,20	15,44	14,50	3.323	1.604
90	23,59	25,51	14,75	15,94	3.370	1.673
120	23,24	24,97	14,52	15,61	3.278	1.577
Teste F						
Inoculação	0,380 ^{ns}	2,789*	0,381 ^{ns}	2,787*	0,295 ^{ns}	10,634**
Doses N	0,561 ^{ns}	2,070 ^{ns}	0,562 ^{ns}	2,066 ^{ns}	7,423**	0,490 ^{ns}
Inoc x Doses N	1,197 ^{ns}	2,406 ^{ns}	1,198 ^{ns}	2,407 ^{ns}	1,389 ^{ns}	1,260 ^{ns}
CV %	21,09	13,99	21,09	13,99	11,85	16,70

⁽¹⁾ $y = -0,067931x^2 + 12,750472x + 2747,862232$ ($R^2 = 0,94$); *e** significativo a 5% e a 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente; ns = não significativo; DMS = diferença mínima significativa; CV = coeficiente de variação. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Para produtividade de grãos em 2012 não houve diferença significativa para a inoculação de sementes e para doses de N, os dados se ajustaram a uma equação quadrática, aumentando a produtividade de grãos até a dose de 93,85 kg de N ha^{-1} (Tabela 1), diferindo de Moreira et al. (2013), que obtiveram a maior produtividade de grãos na dose de 120 kg ha^{-1} de nitrogênio.

Em 2013 as sementes de feijão inoculadas com *A. brasilense* proporcionaram a obtenção de maior produtividade de grãos (1881 kg ha^{-1}) em relação aos demais tratamentos, inoculação ausente (1.553 kg ha^{-1}), *R. tropici* (1.444 kg ha^{-1}) e *A. brasilense* + *R. tropici* (1.511 kg ha^{-1}) (Tabela 10). Os valores médios em 2013 foram menores que em 2012, isso pode ser explicado pelo ataque de *H. armigera* que prejudicou o desenvolvimento e produtividade das plantas de feijão nesse ano de estudo.

Na Tabela 11 estão apresentados Valores médios da massa da matéria seca final do milho (MSFM), massa da matéria residual do feijão (MRF) e massa da matéria seca residual total (MSRT) na área cultivada com feijão de inverno irrigado por aspersão em sistema plantio direto em 2013.

A inoculação de sementes e doses de N não influenciaram na MSFM e na MSRT, porém para MRF o tratamento sem inoculação levou as plantas de feijão a ter maior massa residual quando comparado ao *R. tropici*.

Tabela 11- Valores médios da massa da matéria seca final do milho (MSFM), massa da matéria residual do feijão (MRF) e massa da matéria seca residual total (MSRT) na área cultivada com feijão de inverno irrigado por aspersão em sistema plantio direto. Selvíria (MS), 2013.

Tratamentos	MSFM	MRF	MSRT
	(kg ha ⁻¹)		
Inoculação			
-----2013-----			
Ausente	1.986	2.679a	4.665
<i>A. brasilense</i>	2.155	2.128ab	4.283
<i>R. tropici</i>	2.249	1.631b	3.879
A + R	2.061	1.880ab	3.941
DMS	-	927	-
Doses de N			
0	2.457	1.816	4.272
30	1.935	2.452	4.387
60	1.989	2.151	4.139
90	1.947	1.968	3.915
120	2.236	2.011	4.248
Teste F			
Inoculação	0,428 ^{ns}	3,363 [*]	1,728 ^{ns}
Doses N	1,369 ^{ns}	0,771 ^{ns}	0,335 ^{ns}
Inoc x Doses N	1,164 ^{ns}	0,551 ^{ns}	1,325 ^{ns}
CV %	31,94	45,52	25,44

* ** significativo a 5% e a 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente; ns = não significativo; DMS = diferença mínima significativa; CV = coeficiente de variação. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey.

4.2 EXPERIMENTO EM VASO

A inoculação de sementes com bactérias diazotróficas para melhorar a eficiência da fixação biológica de nitrogênio e as doses de N em cobertura para ajuste de uma quantidade adequada para o desenvolvimento do feijoeiro com a utilização de bactérias diazotróficas, não influenciou o teor de clorofila nos dois anos de estudo (2012 e 2013), bem como o teor de nitrogênio e o teor de proteína bruta no primeiro ano de estudo (2012) (Tabela 12). Silva et al. (2009), verificando os efeitos da inoculação com *R. tropici* associado a adição de exsudatos de sementes de *Mimosa flocculosa* na cultura do feijão em sucessão aos cultivos de soja e

milho em campo. Também não verificaram diferença entre os tratamentos (testemunha, *R. tropici*, *R. tropici* + *M. flocculosa*) no teor de nitrogênio na planta de feijão.

Tabela 12- Valores médios do índice de clorofila foliar (ICF), teor de nitrogênio foliar (N) e teor de proteína bruta (PB), em feijoeiro de inverno cultivado em vaso. Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.

Tratamentos	ICF		Teor de N foliar		Teor de PB foliar	
	-----(g kg^{-1})-----					
Inoculação	2012	2013	2012	2013	2012	2013
Ausente	38,25	39,11	36,38	23,60	22,66	14,75
<i>A. brasilense</i>	38,88	39,49	38,15	24,00	23,98	14,63
<i>R. tropici</i>	37,65	38,93	36,72	24,21	22,95	15,13
A + R	38,05	37,32	38,98	24,66	24,36	15,33
DMS	-	-	-	-	-	-
Doses de N	2012	2013	2012	2013	2012	2013
0	40,38	40,99	38,97	25,59	24,35	15,58
30	38,41	39,10	36,70	25,09	22,94	15,68
60	36,24	36,72	37,42	24,41	23,89	15,17
90	36,79	37,28	37,01	22,70	23,30	14,14
120	39,21	39,47	37,70	22,79	23,46	14,22
Teste F						
Inoculação	0,133 ^{ns}	0,747 ^{ns}	0,689 ^{ns}	0,896 ^{ns}	0,803 ^{ns}	1,177 ^{ns}
Doses N	1,167 ^{ns}	1,947 ^{ns}	0,285 ^{ns}	6,506 ^{**}	0,267 ^{ns}	4,775 ^{**}
Inoc x Doses N	0,615 ^{ns}	0,970 ^{ns}	1,107 ^{ns}	2,422 [*]	1,165 ^{ns}	1,933 [*]
CV %	14,32	11,08	15,12	7,43	14,94	7,76

* e ** significativo a 5% e a 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente; ns = não significativo; DMS = diferença mínima significativa; CV = coeficiente de variação.

No ano de 2013 para o teor de nitrogênio houve interação da inoculação de sementes e doses de nitrogênio (Tabela 13). Considerando a inoculação de sementes dentro de doses de nitrogênio, observa-se que na dose de 90 kg ha^{-1} a inoculação conjunta de *A. brasilense* + *R. tropici* proporcionou maiores teores de N no feijoeiro (25,01 g planta^{-1}) quando comparado ao tratamento apenas com *A. brasilense* (21,02 g planta^{-1}). Analisando doses de nitrogênio dentro de inoculação de sementes, para o ausente de inoculação e para o tratamento com *Azospirillum brasilense* os dados se ajustaram a uma equação linear negativa (Tabela 13).

Tabela 13- Desdobramento da interação de inoculação de sementes entre doses de nitrogênio no teor de N no feijoeiro de inverno cultivado em vaso em 2013. Ilha Solteira (SP).

Inoculação	Doses de nitrogênio (kg ha ⁻¹)				
	0	30	60	90	120
Teor de N foliar (g kg ⁻¹)					
Ausente ⁽¹⁾	24,06	24,45	25,81	22,07ab	21,63
<i>A. brasilense</i> ⁽²⁾	27,24	26,58	22,82	21,02b	22,33
<i>R. tropici</i>	24,57	26,58	24,01	22,71ab	23,17
A + R	26,48	22,75	25,01	25,01a	24,02
DMS	Inoculação dentro de doses de nitrogênio – 3,46				

⁽¹⁾ $y = -0,024111x + 25,050667$ ($R^2 = 0,44$); ⁽²⁾ $y = -0,051222x + 27,070667$ ($R^2 = 0,78$). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para o teor de proteína bruta no ano de 2013 (Tabela 12), houve interação entre a inoculação de sementes e doses de nitrogênio (Tabela 14), sendo a inoculação conjunta de *A. brasilense* + *R. tropici* proporcionou maiores teores de proteína bruta foliar no feijoeiro (15,63) quando comparado ao tratamento apenas com *A. brasilense* (12,98) para a dose de 90 kg ha⁻¹. Analisando doses de nitrogênio dentro de inoculação de sementes, na ausência de inoculação e no tratamento com *A. brasilense* os dados se ajustaram a uma equação linear negativa, com ponto de máximo de 41,47 kg ha⁻¹ na ausência de inoculação e para o tratamento com *A. brasilense* de 19,52 kg ha⁻¹.

Os resultados obtidos tanto no teor de N foliar quanto no teor de proteína bruta podem ter ocorrido, pois o N mineral quando aplicado em quantidades elevadas pode inibir a fixação biológica de N atmosférico pelas bactérias diazotróficas que por sua vez podem utilizar o N mineral aplicado para a nutrição da planta em seu metabolismo, competindo assim com o feijoeiro por esse nutriente, refletindo também no percentual de proteína bruta na planta.

Tabela 14- Desdobramento da interação de inoculação de sementes entre doses de nitrogênio no teor de proteína bruta no feijoeiro de inverno cultivado em vaso em 2013. Ilha Solteira (SP).

Inoculação	Doses de nitrogênio (kg ha ⁻¹)				
	0	30	60	90	120
Teor de proteína bruta (g kg ⁻¹)					
Ausente ⁽¹⁾	15,03	15,28	16,13	13,78ab	13,52
<i>A. brasilense</i> ⁽²⁾	15,36	16,61	14,26	12,98b	13,96
<i>R. tropici</i>	15,36	16,61	15,01	14,19ab	14,48
A + R	16,55	14,22	15,30	15,63a	14,95
DMS	Inoculação dentro de doses de nitrogênio – 2,25				

⁽¹⁾ $y = -0,015122x + 15,655333$ ($R^2 = 0,44$); ⁽²⁾ $y = -0,021444x + 15,920667$ ($R^2 = 0,53$). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na Tabela 15 estão apresentados os valores médios do teor fósforo foliar em feijoeiro de inverno cultivado em vaso, para os anos de 2012 e 2013 não houve efeito significativo tanto para os tratamentos com a inoculação de sementes como para doses de nitrogênio. Os valores médios de potássio em 2012 se ajustaram a uma equação linear negativa (Tabela 15), em 2013 houve interação entre a inoculação de sementes e doses de nitrogênio, o desdobramento encontra-se na Tabela 16, onde se pode observar que para a inoculação de sementes dentro de doses de nitrogênio na dose 60 kg ha⁻¹ o tratamento com *A. brasilense* proporcionou ao feijoeiro maiores teores de potássio (31,28 kg ha⁻¹) em comparação ao tratamento com *R. tropici* (22,07 kg ha⁻¹) e ausente de inoculação (18,59 kg ha⁻¹).

Para doses dentro de inoculação, no tratamento com *A. brasilense* os dados se ajustaram a uma equação quadrática, aumentando o teor de K até a dose de 64,37 kg ha⁻¹.

Tabela 15- Valores médios do teor de fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) em feijoeiro de inverno cultivado em vaso. Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.

Tratamentos	Teor de P foliar		Teor de K foliar		Teor de Ca foliar	
	----- (g kg ⁻¹) -----					
Inoculação	2012	2013	2012	2013	2012	2013
Ausente	3,69	4,56	17,10	19,60	12,44	19,53
<i>A. brasilense</i>	3,83	4,83	16,67	22,78	12,14	24,01
<i>R. tropici</i>	3,74	4,98	16,97	20,58	13,59	20,72
A + R	3,94	4,98	17,53	21,82	12,83	21,46
DMS	-	-	-	-	-	-
Doses de N	2012	2013	2012	2013	2012	2013
0	4,24	4,66	19,79 ⁽¹⁾	20,28	14,07	19,46
30	3,68	4,94	17,13	21,40	12,47	20,80
60	3,65	4,98	17,71	24,28	12,41	23,85
90	3,87	4,88	16,46	19,67	12,51	21,35
120	3,55	4,73	15,50	20,34	12,29	21,71
Teste F						
Inoculação	0,288 ^{ns}	0,833 ^{ns}	1,08 ^{ns}	1,955 ^{ns}	1,498 ^{ns}	4,374 ^{**}
Doses N	1,381 ^{ns}	0,331 ^{ns}	7,147 ^{**}	2,702 [*]	1,686 ^{ns}	2,483 ^{ns}
Inoc x Doses N	0,291 ^{ns}	0,732 ^{ns}	0,917 ^{ns}	2,038 [*]	1,376 ^{ns}	1,741 [*]
CV %	21,17	17,37	12,04	12,04	15,53	16,39

⁽¹⁾ $y = -0,030833x + 19,166667$ ($R^2 = 0,83$); * e ** significativo a 5% e a 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente; ns = não significativo; DMS = diferença mínima significativa; CV = coeficiente de variação. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para os teores de cálcio foliar (Tabela 15) não houve diferença significativa no experimento desenvolvido em 2012, já em 2013 houve interação entre a inoculação de sementes e doses de nitrogênio. Considerando o desdobramento (Tabela 17), nota-se que na

dose de 60 kg ha⁻¹ o tratamento com *A. brasilense* proporcionou maiores valores de teor de cálcio (32,63g planta⁻¹) em detrimento aos outros tratamentos (Inoculação ausente: 19,10; *R. tropici*: 19,91; *A. brasilense* + *R. tropici*: 23,76 g planta⁻¹). Quanto ao desdobramento de doses dentro de inoculação, a inoculação de sementes com *A. brasilense* influenciou de maneira quadrática aumentando o teor de cálcio nas plantas de feijão até a dose de 63,6 kg ha⁻¹ de N em cobertura.

Tabela 16- Desdobramento da interação de inoculação de sementes entre doses de nitrogênio no teor de K foliar no feijoeiro de inverno cultivado em vaso em 2013. Ilha Solteira (SP).

Inoculação	Doses de nitrogênio (kg ha ⁻¹)				
	0	30	60	90	120
	Teor de K foliar (g kg ⁻¹)				
Ausente	17,86	19,32	18,59b	19,54	22,70
<i>A. brasilense</i> ⁽¹⁾	19,40	21,67	31,28a	18,81	22,77
<i>R. tropici</i>	22,92	19,21	22,07b	20,64	18,04
A + R	20,97	25,41	25,19ab	19,69	17,86
DMS	Inoculação dentro de doses de nitrogênio – 7,47				

⁽¹⁾y= -0,001484x² + 0,191051x + 19,335905 (R²= 0,26). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 17- Desdobramento da interação de inoculação de sementes entre doses de nitrogênio no teor de Ca no feijoeiro de inverno cultivado em vaso em 2013. Ilha Solteira (SP).

Inoculação	Doses de nitrogênio (kg ha ⁻¹)				
	0	30	60	90	120
	Teor de Ca foliar (g kg ⁻¹)				
Ausente	16,94	19,87	19,10b	20,97	20,75
<i>A. brasilense</i> ⁽¹⁾	20,09	23,06	32,63a	21,30	22,99
<i>R. tropici</i>	19,84	20,06	19,91b	20,75	23,06
A + R	20,97	20,20	23,76b	22,37	20,02
DMS	Inoculação dentro de doses de nitrogênio – 6,79				

⁽¹⁾y= -0,001861x² + 0,236810 x + 19,858190 (R²= 0,42). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A inoculação de sementes influenciou o teor de magnésio nas plantas de feijão no experimento realizado em 2012 (Tabela 18), onde a inoculação de *Azospirillum brasilense* + *Rhizobium tropici* proporcionou as plantas de feijão maiores teores de magnésio em relação ao tratamento ausente de inoculação. A coinoculação com bactérias diazotróficas, por proporcionar um possível aumento no sistema radicular, pode melhorar a absorção de

nutrientes pelo feijoeiro, explicando assim os resultados obtidos com nesse estudo para os teores de magnésio foliar. Para as doses de N, os dados se ajustaram a uma equação quadrática, com o ponto de máximo no teor de Mg foliar sendo alcançado com a aplicação de 86 kg ha⁻¹ de N.

As doses de N em cobertura influenciaram os teores de enxofre das plantas de feijão de maneira linear negativa em 2013 (Tabela 18). Analisando a MPA, em 2012, nota-se que os dados ajustaram-se a uma equação quadrática as doses de nitrogênio em cobertura, aumentando a MPA até a dose de 85,80 kg ha⁻¹.

O aumento da massa da parte aérea com a adição de maiores doses de N, pode explicar os resultados obtidos no teor de N foliar (Tabela 13), teor de P foliar (Tabela 15), teor de S foliar (Tabela 18), isso ocorreu devido ao efeito diluição, visto que esses dois últimos nutrientes participam do metabolismo do N.

Tabela 18- Valores médios do teor de magnésio foliar (Mg), teor de enxofre foliar (S), massa da parte aérea (MPA) e massa do sistema radicular (MSR) em feijoeiro de inverno cultivado em vaso. Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.

Tratamentos	Teor de Mg foliar		Teor de S foliar		MPA ^(a)		MSR ^(a)	
	----- (g kg ⁻¹) -----				----- (g planta ⁻¹) -----			
Inoculação	2012	2013	2012	2013	2012	2013	2012	2013
Ausente	4,16b	4,21	2,00	2,89	18,37	22,87	2,18ab	1,49
<i>A. brasilense</i>	4,27ab	2,83	2,31	2,76	13,95	23,28	2,22ab	1,78
<i>R. tropici</i>	4,39ab	2,69	2,13	2,94	12,58	26,14	1,83b	1,72
A + R	4,58a	2,74	2,59	2,81	16,48	29,07	2,61a	2,47
DMS	0,41	-	-	-	-	-	0,64	-
Doses de N	2012	2013	2012	2013	2012	2013	2012	2013
0	4,04 ⁽¹⁾	2,60	2,44	2,99 ⁽²⁾	8,98 ⁽³⁾	21,17	1,25 ⁽⁴⁾	1,98
30	4,13	2,66	2,46	3,10	12,65	30,03	1,93	1,79
60	4,48	4,65	2,19	3,03	18,00	26,20	2,19	1,71
90	4,73	2,80	2,15	2,64	20,73	24,53	2,50	2,05
120	4,37	2,82	2,06	2,50	16,37	24,78	3,21	1,79
Teste F								
Inoculação	2,727*	1,054 ^{ns}	1,988 ^{ns}	0,585 ^{ns}	1,940 ^{ns}	0,429 ^{ns}	3,310**	1,309 ^{ns}
Doses N	5,18**	1,151 ^{ns}	0,791 ^{ns}	5,139**	7,233**	0,433 ^{ns}	15,864*	0,122 ^{ns}
Inoc x DosesN	1,454 ^{ns}	1,015 ^{ns}	1,018 ^{ns}	1,102 ^{ns}	1,050 ^{ns}	0,719 ^{ns}	1,331 ^{ns}	1,133 ^{ns}
CV %	9,64	9,43	31,42	14,11	18,13	26,47	9,78	19,00

⁽¹⁾y = -0,000079x² - 0,013640x + 3,956905 (R²=0,76); ⁽²⁾y = -0,004767x + 3,137500 (R² = 0,73); ⁽³⁾y = -0,001482x² + 0,253966x + 8,108810 (R² = 0,91); ⁽⁴⁾y = 0,014978x + 1,315167 (R² = 0,97); * e ** significativo a 5% e a 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente; ns = não significativo; DMS = diferença mínima significativa; CV = coeficiente de variação ^(a)A análise se refere aos dados transformados em (x + 1)^{0,5}. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Para a MSR das plantas de feijão no cultivo de 2012 (Tabela 18), verifica-se que a inoculação de sementes com *A. brasilense* + *R. tropici* proporcionou maior massa do sistema radicular das plantas de feijão (2,61 g planta⁻¹) em detrimento ao tratamento com *R. tropici*. A presença do *A. brasilense* contribui para o aumento do sistema radicular, seja pela fixação de nitrogênio atmosférico, ou pela produção de fitohormônios que levaram ao aumento dessa parte da planta, devido ao aumento de radículas e/ou diâmetro das raízes (BURDMAN et al., 1996; DARDANELLI et al., 2008).

As doses de N em 2012 influenciaram de maneira linear positiva a massa do sistema radicular, pois o N proporciona crescimento do sistema radicular (Tabela 18) beneficiando a absorção de alguns nutrientes.

O número de nódulos por planta de feijão, nos dois anos de estudo, não foram influenciados pela inoculação de sementes (Tabela 19), isso pode ter ocorrido devido a presença de estirpes nativas de *Rhizobium* spp. no solo utilizado para o cultivo do feijoeiro, visto que o *R. tropici* tem baixa eficiência na competitividade com rizóbios nativos (CASSINI; FRANCO, 2006).

Tabela 19- Valores médios do número de nódulos por planta (N NOD), massa de nódulos por planta (M NOD) e número mais provável de bactérias diazotróficas associativas (NMP) em feijoeiro de inverno cultivado em vaso. Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.

Tratamentos	N NOD (planta ⁻¹)		M NOD (g planta ⁻¹)		NMP (10 ⁷ n° cel. g pl ⁻¹)	
	2012	2013	2012	2013	2012	2013
Inoculação						
Ausente	380,7	113,29	0,793	0,217	10,16	7,86
<i>A. brasilense</i>	374,4	114,16	0,717	0,231	10,81	11,27
<i>R. tropici</i>	330,4	97,08	0,616	0,231	9,04	7,99
A + R	438,7	103,97	0,681	0,228	9,35	8,97
DMS	-	-	-	-	-	-
Doses de N	2012	2013	2012	2013	2012	2013
0	440,1 ⁽¹⁾	123,07 ⁽²⁾	0,923 ⁽³⁾	0,240	7,42	11,02
30	562,2	149,01	1,106	0,288	8,85	7,93
60	412,6	100,70	0,736	0,204	11,01	10,42
90	322,4	117,75	0,452	0,229	10,20	8,22
120	167,9	45,10	0,292	0,173	11,70	7,53
Teste F						
Inoculação	1,670 ^{ns}	0,416 ^{ns}	2,024 ^{ns}	0,020 ^{ns}	0,118 ^{ns}	0,924 ^{ns}
Doses N	16,284*	2,853**	38,137 ^{ns}	0,626 ^{ns}	0,922 ^{ns}	0,838 ^{ns}
Inoc x Doses N	0,610 ^{ns}	1,396 ^{ns}	0,529 ^{ns}	0,968 ^{ns}	1,312 ^{ns}	1,054 ^{ns}
CV %	18,16	42,96	5,58	7,78	28,41	28,28

⁽¹⁾ $y = -0,039192x^2 + 2,08896x + 467,361905$ ($R^2 = 0,92$); ⁽²⁾ $y = -0,623972x + 144,563333$ ($R^2 = 0,58$); ⁽³⁾ $y = -0,000048x^2 - 0,000685x + 0,999571$ ($R^2 = 0,89$); * e **, significativo a 5% e a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey, respectivamente; ns = não significativo; DMS = diferença mínima significativa; CV = coeficiente de variação.

As doses de N aplicadas em cobertura no feijoeiro influenciaram de maneira quadrática o número de nódulos, no experimento em 2012, aumentando tal variável até a dose de 26,7 kg ha⁻¹ de N (Tabela 19) e linear negativa em 2013. Para a massa de nódulos os dados se ajustaram a uma equação quadrática em 2012, ou seja, a adição elevada de quantidades de nitrogênio afeta o número e o peso de nódulos (RUSCHEL; RUSCHEL, 1975; RUSCHEL; SAITO, 1977).

O número mais provável de bactérias diazotróficas associativas no solo não foi influenciado pela inoculação de sementes de feijão e pelas doses de nitrogênio aplicadas em cobertura. Isso pode ter ocorrido pois o gênero *Azospirillum* spp. é nativo do solo, e a análise de quantificação de bactérias diazotróficas associativas permite a identificação até o gênero *Azospirillum* podendo então ter quantificado essas bactérias nativas.

5 CONCLUSÕES

A coinoculação com *A. brasilense* + *R. tropici* proporcionou às plantas de feijão maior massa de sistema radicular e aumentou o número de vagens. A massa da parte aérea aumentou até a dose de 86 kg ha⁻¹ de N em 2012. As maiores doses de nitrogênio mineral em cobertura diminuiu o número e a massa de nódulos.

A produtividade em 2012 foi influenciada linearmente pelas doses de N, e em 2013 a inoculação com *A. brasilense* proporcionou a maior produtividade de grãos de feijão.

REFERENCIAS

- ANDRIOLI, I.; BEUTLER, A. N.; CENTURION, J. F.; ANDRIOLI, F. F.; COUTINHO, E. L. M. Produção de milho em plantio direto com adubação nitrogenada e cobertura do solo na pré-safra. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 1691-1698, 2008.
- ALVAREZ, A. C. C.; ARF, O.; ALVAREZ, R. C. F.; PEREIRA, J. C. R. Resposta do feijoeiro à aplicação de doses e fontes de nitrogênio em cobertura no sistema de plantio direto. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 27, n. 1, p. 69-75, 2005.
- ARF, M. V. F. BUZETTI, S.; ARF, O.; KAPPES, C.; FERREIRA, J. P.; GITTI, D. C.; YAMAMOTO, C. J. T. Fontes e épocas de aplicação de nitrogênio em feijoeiro de inverno sob sistema plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 41, n. 3, p.430-438, 2011.
- ARF, O. et al. Manejo do solo, adubação e lâminas de água em feijoeiro cultivado no período de inverno. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO,7., 2002, Viçosa - MG. **Resumos...** Viçosa: UFV, 2002, p. 619-622.
- BÁRBARO, I. M.; BRANCALIÃO, S. R.; TICELLI, M.; MIGUEL, F. B.; SILVA, J. A. A. **Técnica alternativa:** co-inoculação de soja com *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* visando incremento e produtividade. [S. l.: s.n.]2008. Disponível em: <www.infobibos.com/Artigos/2008_4/coinoculação/index.htm>. Acessado em: 15 nov. 2013.
- BARBERI, A.; CARNEIRO, M. A. C.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J.O. Nodulação em leguminosas florestais em viveiros no sul de Minas Gerais. **Revista Cerne**, Lavras, v. 4, n. 1, p. 145-153, 1998.
- BASSAN, D. A. Z.; ARF, O.; BUZETTI, S.; CARVALHO, M. A. C.; SANTOS, N. C. B.; SÁ, M. E. Inoculação de sementes e aplicação de nitrogênio e molibdênio na cultura do feijão de inverno: Produção e qualidade fisiológica de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina v. 23, n. 1, p.76-83, 2001.
- BAYER, C.; MARTI-NETO, L.; MIELNICZUK, J. & PAVINATO, A. Armazenamento de carbono em frações lábeis da matéria orgânica de um Latossolo Vermelho sob plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 4, p. 677-683, 2004.
- BINOTTI, F. F. S.; ROMANINI JUNIOR, A.; ARF, O. COSTA, R. S. S.; SÁ, M. E. Época de aplicação e fontes de nitrogênio em cobertura, na cultura do feijão em sistema plantio direto. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO, 26; REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 10; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO,8; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 5; 2004, Lages **Anais...** Lages: UDESC/SBCS, 2004 1CD-ROM.
- BINOTTI, F. F. S.; ARF, O.; ROMANINI JUNIOR, A.; FERNANDES, F. A.; SÁ, M. E.; BUZETTI, S. Manejo do solo e da adubação nitrogenada na cultura de feijão de inverno e irrigado. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 1, p. 121-129, 2007.

- BORDIN, L.; FARINELLI, R.; GUIDO, F. Sucessão de cultivo de feijão-arroz com doses de adubação nitrogenada após adubação verde, em semeadura direta. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 3, p. 417-428, 2003.
- BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R. Identification of gibberelins A1, A3, and iso-A3 in cultures of *A. lipoferum*. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 90, n. 1, p. 45-47, 1989.
- BURDMAN, S.; VOLPIN, H.; KIGEL, J.; KAPULNIK, Y.; OKON, Y. Promotion of nod Gene Inducers and Nodulation in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) Roots inoculated with *Azospirillum brasiliense* Cd. Applied and environmental microbiology, **American Society for Microbiology**, Washington, v. 62, n. 8- 18, p. 3030 – 3033, 1996.
- CASSÁN, F.; SGROY, V.; PERRIG, D.; MASCIARELLI, O.; LUNA, V. Producción de fitohormonas por *Azospirillum* sp. aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal. In: CASSÁN, F. D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.). **Azospirillum sp.**: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 61-86.
- CASSIA, M. T.; TEIXEIRA, C. M.; CARVALHO, G. J.; SILVA, C. A.; ANDRADE, M. J. B. Nutrição mineral do feijoeiro sob influencia de nitrogênio e palhadas de milho solteiro e consorciado com crotalária. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 9., 2008. Campinas. **Resumos...** Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 2008. p.1602-1605.
- CASSINI, S. T. A.; FRANCO, M. C. Fixação biológica de nitrogênio: microbiologia, fatores ambientais e genéticos. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. (Ed). **Feijão**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. P.143-170.
- CARDOSO, E. D.; BINOTTI, F. F. S.; NOGUEIRA, D. C.; HAGA, K. I.; SÁ, M. E.; ARF, O. Inoculação e manejo do nitrogênio em feijoeiro no sistema plantio direto – III. qualidade química de sementes. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 9., 2008, Campinas. **Resumos...** Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 2008. p.1451-1454.
- CARVALHO, M.A.C.; ARF, O.; SÁ, M.E.; BUZETTI, S.; SANTOS, N.C.B.; BASSAN, D.A. Z. Produtividade e qualidade de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) sob influência de parcelamentos e fontes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, n. 3, p. 617-624, 2001.
- CENTURION, J. F. Balanço hídrico da região de Ilha Solteira. **Científica**, Jaboticabal, v. 10, n. 1, p. 57-61, 1982.
- CHAVARRIA, G.; MELLO, N. Bactérias do gênero *Azospirillum* e sua relação com gramíneas. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, v. 125, 2011. Disponível em: <http://www.plantiodireto.com.br/?body=cont_int&id=1075>. Acessado em: 10 jan 2013.
- CHAVERRA, M. H; GRAHAM, P.H. Cultivar variation in traits affecting early nodulation of common bean. **Crop Science**, Madison, v. 32, n.6, p.1432–1436. 1992.

CHRISÓSTOMO, I. G.; LANNA, A. C.; GODOY, S. G.; ROSA, J. R.; DIDONET, A. D. N total e C orgânico do solo em transição para a produção orgânica de arroz de terras altas (*Oriza sativa* L.) no cerrado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CADEIA PRODUTIVA DE ARROZ, 2; REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE ARROZ – RENAPA, 8., 2006, Brasília, 2006. **Anais...** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006. 1CD-ROM. ISSN 1678-9644

DARDANELLI, M. S.; CÓRDOBA, F.; ESPUNY, R.; CARVAJAL, M. A. R.; DIAZ, M. E. S.; SERRANO, A. M. G.; OKON, Y. MEGIAS, M. Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 40, n. 11, p. 2713–2721. 2008.

DAVISON, J. Plant beneficial bacteria. **Bio/Technology**, New York, v. 6, p. 282-286, 1988.

DOBEREINER, J; BALDANI, J. I; BALDANI, V. L. D. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília: EMBRAPA, SPI, 1995. 60 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solo**. 2. ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006. 306 p.
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Fixação Biológica de Nitrogenio (FBN)**. Brasília: EMBRAPA, 2012. Disponível em: <www.agrosustentavel.com.br/downloads/fbn.pdf>. Acessado em: 10 jan 2014.

FALKER AUTOMAÇÃO AGRÍCOLA. **Manual do medidor eletrônico de teor de clorofila (ClorofiLOG / CFL 1030)**. Porto Alegre: Falker Automação Agrícola, 2008. 33 p.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C. Enhancing nitrogen use efficiency in crop plants. **Advances in Agronomy**, Newark, v. 88, n. 4, p. 97-185, 2005.

FEDERAÇÃO BRASILEIRA DE PLANTIO DIRETO NA PALHA. **Expansão da área cultivada em plantio direto no Brasil de 1992/93 a 2011/2012**. Paraná: Foz do Iguaçu, 2012. Disponível em: <www.febrapdp.org.br>. Acessado em: 9 jan 2014.

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

FIGUEIREDO, M. V. B.; SOBRAL, J. K.; STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO J. M. Bactérias promotoras do crescimento de plantas: estratégia para uma agricultura sustentável. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; OLIVEIRA, J. P.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P. (Ed.). **Biotechnology aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. 2010. 761 p.

FRED, E. B.; GRAUL, E. J. The effect of soluble nitrogenous salts on nodule formation. **Journal of the American society of Agronomy**, Madison, v. 8, n. 5, p. 316-328, 1916.

GERMAN, M. A.; BURDMAN, S.; OKON, Y. KIGEL, J. Effects of *Azospirillum brasilense* on root morphology of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under different water regimes. **Biology and Fertility of Soil**, Berlin, v. 32, n. 3, p. 259-264, 2000.

GITTI, D. C.; ARF, O.; KANEKO, F. H.; RODRIGUES, R. A. F.; BUZETTI, S.; PORTUGAL, J. R.; CORSINI, D. C. D. C. Inoculação de *Azospirillum brasilense* em cultivares de feijões cultivados no inverno. **Revista Agrarian**, Dourados, v. 5, n. 15, p. 36-46, 2012.

GITTI, D. C. **Coberturas vegetais, doses de nitrogênio e inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* em arroz de terras altas no sistema plantio direto**. 2012. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2012.

GOMES JÚNIOR, F. G.; SÁ, M. E.; VALÉRIO FILHO, W. V. Nitrogênio no feijoeiro em sistema de plantio direto sobre gramíneas. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 30, n. 3, p. 387-395, 2008.

HUERGO, L. F.; MONTEIRO, R. A.; BONATTO, A. C.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; CRUZ, L. M.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F. D.; GARCIA DE SALAMONE, I. ***Azospirillum sp.*: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**: Asociación Argentina de Microbiología, , 2008. p. 17-35.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; COLOZZI-FILHO, A.; BALOTA, E.L. Interação entre microrganismos do solo, feijoeiro e milho em monocultura e consórcio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 8, p. 807-818. 1997.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36 p. – (Embrapa Soja, 325). Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/download/doc325.pdf>>. Acessado em: 9 jan 2012.

IKEDA, A. C. **Caracterização morfofisiológica e genética de bactérias Endofíticas isoladas de raízes de diferentes genótipos de milho (*Zea mays* L.)**. 2010. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

KANEKO, F. H.; ARF, O.; GITTI, D. C.; ARF, M. A.; FERREIRA, J. P.; BUZETTI, S. Mecanismos de abertura de sulcos, inoculação e adubação nitrogenada em feijoeiro em sistema plantio direto. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 1, p. 125-133. 2010.

KLOEPPER, J.W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R.M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 7, n. 2, p. 39-43, 1989.

LEMOES, L. B.; FERREIRA, D. C. FARINELLI, R. Desempenho agrônomo, nutricional e tecnológico de cultivares de feijoeiro adubados com nitrogênio em cobertura no sistema de plantio direto. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 9., 2008, Campinas. **Anais...** Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 2008. p. 1400-1403.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319 p.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

MOREIRA, G. B. L.; PEGORARO, R. F.; VIEIRA, N. M. B.; BORGES, I. KONDO, M. K. Desempenho agrônomico do feijoeiro com doses de nitrogênio em semeadura e cobertura. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 17, n. 8, p. 818–823, 2013.

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

OLIVEIRA, T. K.; CARVALHO, G. J.; MORAES, R. N. S. Plantas de cobertura e seus efeitos sobre o feijoeiro em plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 8, p. 1079-1087, 2002.

PEREZ, A. A. G.; SORATTO, R. P.; MAZATTO, N. P. Nitrogênio na semeadura e em cobertura para o feijoeiro em sistema plantio direto recém-implantado. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 9., 2008, Campinas. **Resumos...** Campinas: Instituto Agrônomico de Campinas, 2008. p. 1443-1446.

PIMENTEL GOMES, F.; GARCIA, C. H. **Estatística aplicada a experimentos agrônomicos e florestais**: exposição com exemplos e orientações para uso de aplicativos. Piracicaba: FEALQ, 2002. 309 p.

RAIJ, B. van; QUAGGIO, J. A. **Métodos de análises de solo para fins de fertilidade**. Campinas: IAC, 1983. p. 1-31. (Boletim Técnico, 81).

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. A composição molecular das células vegetais. In: RAVEN, P. H.; EVER, T. R. F.; EICHHORN, S. E. (Org.). **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 17-39.

REIS JÚNIOR, F.B.; MENDES, I.C.; REIS, V.M. et al. Fixação biológica de nitrogênio: uma revolução na agricultura. In: FALEIRO, F.G.; ANDRADE, S.R.M.; REIS JÚNIOR, F.B. (Ed.) **Biotecnologia**: estado da arte e aplicações na agropecuária. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011. p. 247-281.

REMANS, R.; RAMAEKERS, L.; SCHELKENS, S.; HERNANDEZ, G.; GARCIA, A.; REYES, J.L.; MENDEZ, N.; TOSCANO, V.; MULLING, M.; GALVES, L.; VANDERLEYDEN, J. Effect of *Rhizobium*–*Azospirillum* coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. **Plant Soil**, Crawley, v. 312, p. 25-37, 2008.

ROCHA, P. R. R.; ARAÚJO, G. A. A.; CARNEIRO, J. E. S.; CECON, P. R.; LIMA, T. C. Efeito da adubação molibdica na cultura do feijão nos sistemas de plantio direto e convencional. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 9., 2008, Campinas. **Resumos...** Campinas: Instituto Agrônomico de Campinas, 2008. p. 1320-1323.

RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, Wuppertal, v. 91, n. 11, p. 552-555, 2004.

- ROMANINI JUNIOR, A.; ARF, O.; BINOTTI, F. F. S.; SÁ, M. E.; BUZETTI, S.; FERNANDES, F. A. Avaliação da inoculação de rizóbio e adubação nitrogenada no desenvolvimento do feijoeiro, sob sistema plantio direto. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 4, p. 74-82, 2007.
- ROSOLEM, C. A. **Nutrição e adubação do feijoeiro**. Piracicaba: Potafós, 1987. 91 p. (Boletim Técnico, 8).
- RUSCHEL, A.P.; RUSCHEL, R. Avaliação da fixação simbiótica de nitrogênio em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.10, n.1, p.11-17, 1975.
- RUSCHEL, A. P.; SAITO, S. M. T. Efeito da inoculação de *Rhizobium*, nitrogênio e matéria orgânica na fixação simbiótica de nitrogênio em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.1, n.1, p. 21-24, 1977.
- 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 Ambiental**, Campina Grande, v.15, n. 5, p. 458 -461, 2011.
- SANTOS, A. B.; FAGERIA, N. K.; SILVA, O. F.; MELO, M. L. B. Resposta do feijoeiro ao manejo de nitrogênio em várzeas tropicais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 11, p. 1265-1271, 2003.
- SANTOS, H. P.; SPERA, S. T.; TOMM, G. O.; KOCHANN, R. A.; ÁVILA, A. Efeito de sistemas de manejo de solo e de rotação de culturas na fertilidade do solo, após vinte anos. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 2, p. 441-454, 2008.
- SILVA, C. C. DA; SILVEIRA, P. M. da. Influência de sistemas agrícolas na resposta do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) irrigado à adubação nitrogenada em cobertura. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 30, n. 1, p. 86-96, 2000.
- SILVA, E. F.; MARCHETTI, M. E.; SOUZA, L. C. F.; MERCANTE, F. M.; RODRIGUES, E. T.; VITORINO, A.C.T. Inoculação do feijoeiro com *Rhizobium tropici* associada a exsudato de *Mimosa flocculosa* com diferentes doses de nitrogênio. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 3, p 443-451, 2009.
- STRALIOTTO, R.; TEIXEIRA, M. G.; MERCANTE, F. M. Fixação biológica de nitrogênio na cultura do feijoeiro. In: AIDAR, H. (Ed.). **Cultivo do feijoeiro**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2003. (Sistemas de Produção, 2002).
- SORATTO, R. P. **Resposta do feijoeiro ao preparo do solo, manejo da água e parcelamento da adubação nitrogenada**. 2002. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2002.
- SORATTO, R. P.; CARVALHO, M. A. C.; ARF, O. Teor de clorofila e produtividade do feijoeiro em razão da adubação nitrogenada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 9, p. 895- 901, 2004.

STONE, L. F.; MOREIRA, J. A. A. Efeitos de sistemas de preparo do solo no uso da água e na produtividade do feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 4, p. 835-841, 2000.

STRALIOTTO, R. **A importância da inoculação com rizóbio na cultura do feijoeiro**. Seropédica: Embrapa, CNPAB, 2002. 6 p. Disponível em: <http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/artigos/fbml_inocula_feijoeiro.html>. Acesso em: 4 nov. 2013.

STRZELCZYK, E.; KAMPER, M.; LI, C. Cytocinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. **Microbiological Research**, Jena, v. 149, p. 55-60, 1994.

TEIXEIRA, C. M.; CARVALHO, G. J.; ANDRADE, M. J. B.; SILVA, C. A.; BOTREL, E. P. Nitrogênio e palhadas de milheto solteiro e consorciado com feijão-de-porco, no plantio direto do feijoeiro. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 9., 2008, Campinas. **Resumos....** Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 2008. p.1511-1514.

TIEN, T.M.; GASKINS, M.H.; HUBBELL, D.H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 37, n. 5, p. 1016-1024, 1979.

TSAI, S. M.; BONETTI, R.; AGBALA, S. M.; ROSSETO, R. Minimizing the effect of mineral nitrogen on biological nitrogen in common bean by increasing nutrient levels. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.152, n. 1, p.131-138, 1993.

VALADÃO, F. C. A.; JAKELAITIS, A.; CONUS, L. A.; BORCHARTT, L.; OLIVEIRA, A. A.; VALADÃO JUNIOR, D. D. Inoculação das sementes e adubações nitrogenada e molíbdica do feijoeiro-comum, em Rolim de Moura, RO. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 4, p 741 – 748, 2009.

VALÉRIO, C. R.; ANDRADE, M. J. B. de.; FERREIRA, D. F.; P. M. de. REZENDE. Resposta do feijoeiro comum a doses de nitrogênio no plantio e em cobertura. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, p.1560-1568, dez., 2003. Edição Especial.

VENTURINI, S. F.; ANTONIOLLI, Z. I.; VENTURINI, E. F.; GIRACCA, E. M. N. **Efeito da inoculação com *Rhizobium* e aplicação de nitrogênio em cobertura na cultura do feijoeiro**. Santa Maria: UFSM, 2002. 4 p.

VOLPIN, H.; KAPULNIK, Y. Interaction of *Azospirillum* with beneficial soil microorganisms. In: OKON, Y (Ed.), **Azospirillum/plant associations**. Boca Raton: CRC, 1994. p. 111-118.

YADEGARI, M.; RAHMANI, H.A.; NOORMOHAMMADI, G.; AYNEBAND, A. Plant growth promoting rhizobacteria increase growth, yield and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 33, n. 12, p. 1733-1743, 2010.

APÊNDICE A – FOTOS DO EXPERIMENTO

Experimento em campo

Figura 5- Secagem das sementes de feijão inoculadas. Selvíria (MS), 2012 e 2013.



Fonte: elaboração da própria autora.

Figura 6- Semeadura do feijão de inverno em sistema plantio direto com restos vegetais de milho. Selvíria (MS), 2012 e 2013.



Fonte: elaboração da própria autora.

Figura 7- 21 DAE dias após a emergência, adubação nitrogenada. Selvíria (MS), 2012 e 2013.



Fonte: elaboração da própria autora.

Figura 8- Visão geral das parcelas de feijão em florescimento pleno. Selvíria (MS), 2012 e 2013.



Fonte: elaboração da própria autora.

Figura 9- Avaliação de índice de clorofila foliar em feijão em florescimento pleno. Selvíria (MS), 2012 e 2013.



Fonte: elaboração da própria autora.

Figura 10- Colheita de feijão de inverno irrigado em sistema plantio direto. Selvíria (MS), 2012 e 2013.



Fonte: elaboração da própria autora.

Experimento em vaso

Figura 11- Emergência de plantas de feijão em vaso. Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.



Fonte: elaboração da própria autora.

Figura 12- Desenvolvimento das plantas de feijão cultivadas em vaso. Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.



Fonte: elaboração da própria autora.

Figura 13- Aspecto geral de um bloco do experimento em vaso. Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.



Fonte: elaboração da própria autora.

Figura 14- Acondicionamento do solo para análise de quantificação de *Azospirillum* e separação de nódulos e sistema radicular. Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.



Fonte: elaboração da própria autora.

Figura 15- Peneiramento do solo para análise de quantificação de *Azospirillum* e separação de nódulos e sistema radicular. Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.



Fonte: elaboração da própria autora.

Figura 16 - Lavagem do solo para análise de quantificação de *Azospirillum* e separação de nódulos e sistema radicular. Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.



Fonte: elaboração da própria autora.

Figura 17 - Breve secagem do sistema radicular para separação e contagem de nódulos. Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.



Fonte: elaboração da própria autora.

Figura 18 - Sistema radicular e nódulos separados. Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.



Fonte: elaboração da própria autora.

Figura 19 - Secagem em estufa do sistema radicular de feijão e nódulos para obtenção da massa seca. Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.



Fonte: elaboração da própria autora.

Figura 20 - Diluição e dispersão do solo usado como substrato no vaso para o cultivo de feijão para análise de quantificação de *Azospirillum*. Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.



Fonte: elaboração da própria autora.

Figura 21 - Diluição em série do solo usado como substrato no vaso para o cultivo de feijão para análise de quantificação de *Azospirillum*. Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.



Fonte: elaboração da própria autora.

Figura 22- Inoculação do meio de cultura Nfb com o solo usado como substrato no vaso para o cultivo de feijão para análise de quantificação de *Azospirillum*. Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.



Fonte: elaboração da própria autora.

Figura 23 - Incubação do meio de cultura Nfb com o solo usado como substrato no vaso para o cultivo de feijão para análise de quantificação de *Azospirillum*. Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.



Fonte: elaboração da própria autora.

Figura 24 - Película e coloração azulada indicando a presença de *Azospirillum*. Ilha Solteira (SP), 2012 e 2013.



Fonte: elaboração da própria autora.