

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

BRAULY MARTINS ROCHA

**ESTRATÉGIAS PARA MAXIMIZAR A AQUISIÇÃO DE NITROGÊNIO
PELO FEIJÃO-COMUM: COINOCULAÇÃO DE *Rhizobium tropici* E
Azospirillum brasilense E USO DE MOLIBDÊNIO**

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2020**

BRAULY MARTINS ROCHA

**ESTRATÉGIAS PARA MAXIMIZAR A AQUISIÇÃO DE NITROGÊNIO
PELO FEIJÃO-COMUM: COINOCULAÇÃO DE *Rhizobium tropici* E
Azospirillum brasilense E USO DE MOLIBDÊNIO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: José Eustáquio de Souza Carneiro

Coorientadores: Rogério Faria Vieira
Marcos Rogério Tótola

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2020**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

R672e
2020

Rocha, Brauly Martins, 1988-
Estratégias para maximizar a aquisição de nitrogênio pelo feijão-
comum : coinoculação de *Rhizobium tropici* e *Azospirillum brasilense* e uso
de molibdênio / Brauly Martins Rocha. - Viçosa, MG, 2020.
40 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: José Eustáquio de Souza Carneiro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Phaseolus vulgaris*. 2. Feijão - Adubos e fertilizantes. 3. Rizóbio.
4. *Azospirillum*. 5. Molibdênio. 6. Plantas - Nutrição. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Agronomia. Programa de Pós-
Graduação em Fitotecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 635.652

BRAULY MARTINS ROCHA

ESTRATÉGIAS PARA MAXIMIZAR A AQUISIÇÃO DE NITROGÊNIO
PELO FEIJÃO-COMUM: COINOCULAÇÃO DE *Rhizobium tropici* E
Azospirillum brasilense E USO DE MOLIBDÊNIO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 22 de outubro de 2020.

Assentimento:



Brauly Martins Rocha
Autor



José Eustáquio de Souza Carneiro
Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus, arquiteto do mundo, por ter iluminado meus passos durante minha caminhada.

A meus pais Romeu e Isabel, em especial à minha mãe pela luta, dedicação e amor incondicional.

A meu tio Antonio Clarete pelo acompanhamento, amor e ensinamentos nos anos iniciais de vida.

A meus irmãos Bruno e Raynara pelo amor e carinho que têm comigo.

Ao professor José Eustáquio de Souza Carneiro pela orientação, amizade, apoio e ensinamentos durante o curso.

Ao Dr. Rogério Faria Vieira, que me acompanhou durante a maior parte do curso, por sua dedicação a mim, amizade e ensinamentos, a quem me inspiro como profissional a ser seguido.

Ao professor Marcos Rogério Tótola, pela coorientação, apoio, amizade e receptividade no laboratório de Biotecnologia e Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA).

Ao professor André Narvaes pela amizade e grande apoio para que eu pudesse realizar o curso.

Ao professor Héder Braum pela disponibilidade e ajuda nas análises estatísticas.

Ao professor Jakson Leite e ao Dr. Trazilbo José pela disponibilidade para participar da banca.

Aos amigos do Laboratório de Fitopatologia da EPAMIG, Ari Flávio, Lucas Vieira, Otniel Mendes, Renan Lima, Adalgisa Prado, Tatiani Cravo, Luan Rodrigues, Ícaro Ramiro, Rodrigo Cardoso, Paôla Mírian, Pablo Teixeira e Genaina Souza, pela amizade, companheirismo e ajuda nos experimentos.

Aos amigos do Laboratório do LBBMA, Fernanda Freitas, Gustavo Sampaio, Bruna Leão, Michelle Fernandes, Sílvia Cristina, Nathalia Rezende, Mateus Tomas, Leonardo Lopes, Max Lenine, Tatiane Siqueira, Tiago Lage, Edmo Rodrigues, Marcela Camacho, Luana Ventura, Péricles Fernandes, Isabella Rocha e Flora Costa pela amizade, convivência e cooperação.

Aos amigos do Programa Feijão, João Victor, Micheli Possobom, José Dique, Naine do Vale, Michel Henriques, Leonardo Corrêa, Natalia Machado, Adriel Silva, Lisandra Moura, Vinícius Lopes, Fabíola Santos, Felipe Salvador, Andréia Caetano, Igor Gomes, Vinícius Carneiro, Jussara Mencialha, Tiago Souza, Pedro Carneiro,

Deyson Tiago, Gilberto Pereira, José Pereira, Gabriela Santos, Tatiane Freitas, Ana Laura e Isabela Miranda pela amizade e convivência.

Aos funcionários e pesquisadores da EPAMIG, especialmente, Canuto, Reginaldo, José Castro, Geraldo e Sadaki.

Ao Rubens Munhoz, responsável técnico da empresa NITRO1000, pela disponibilidade e envio dos inoculantes.

Aos funcionários da Horta Nova e do Laboratório de Nutrição da de Plantas da UFV, Adriano, Roberto, Alex, Anderson, Reginaldo, Ademir, Itamar e Edmaldo.

À Universidade Federal de Viçosa e ao IF Sudeste MG – Campus Rio Pomba pela oportunidade de realização do curso.

Aos colegas do Técnicos Administrativos em Educação IF Sudeste MG – Campus Rio Pomba, Manoel Tadeu, André Marcos, Sebastião Amóglia, Fagner José, José Victor, Francisco Rodrigues e aos professores do nosso departamento pelo grande apoio durante esses anos de curso.

Aos demais amigos que me ajudaram, direta ou indiretamente, para que eu conseguisse dar esse grande passo e conquistasse o título de Doutor em Fitotecnia.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Nascido em 22 de abril de 1988, na cidade de Rio Pomba (MG), cursou o 1º e 2º grau na Escola Estadual São José e na Escola Estadual Professor Borges de Moraes e se formou em Técnico em Zootecnia, área profissional de Agropecuária, pelo Centro Federal de Educação Tecnológica de Rio Pomba (CEFET – RP). Graduiu-se em Tecnologia em Agroecologia pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais – Campus Rio Pomba (IF Sudeste MG – Campus Rio Pomba) no ano de 2010. Concluiu o curso de Pós-graduação em Agricultura Orgânica, nível de mestrado profissional, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no ano de 2013. Em 2015, concluiu o curso Bacharel em Agroecologia pelo IF Sudeste MG – Campus Rio Pomba. Ocupa desde 2008, após aprovação em concurso público, o cargo de Técnico em Agropecuária no IF Sudeste MG – Campus Rio Pomba no Departamento de Agricultura e Ambiente, sendo responsável técnico pelo Laboratório de Microbiologia dos Solos desde o ano de 2015.

RESUMO

ROCHA, Brauly Martins, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2020. **Estratégias para maximizar a aquisição de nitrogênio pelo feijão-comum: coinoculação de *Rhizobium tropici* e *Azospirillum brasilense* e uso de molibdênio.** Orientador: José Eustáquio de Souza Carneiro. Coorientadores: Rogério Faria Vieira e Marcos Rogério Tótola.

Na literatura não há estudos sobre a associação da adubação molíbdica (Mo) com a coinoculação de *Rhizobium* spp. e *Azospirillum* spp. Nosso objetivo foi testar se há incremento de produtividade no feijão-comum quando se coinocula estirpes de *Rhizobium tropici* e *Azospirillum brasilense* associadas com adubação molíbdica. Foram conduzidos dois experimentos de campo na safra outono-inverno. Os experimentos foram instalados em Oratórios e Viçosa, Minas Gerais, em sistema de plantio convencional, e com uma adubação básica no sulco de 80 kg ha⁻¹ de P₂O₅ na forma de superfosfato simples e 40 kg ha⁻¹ de K₂O na forma de cloreto de potássio. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com cinco repetições e cinco tratamentos: 1) controle (sem fertilizantes contendo N e Mo e sem microrganismo); 2) nitrogênio (20 kg ha⁻¹ no plantio + 60 kg ha⁻¹ em cobertura); 3) adubação recomendada para a Zona da Mata (20 kg ha⁻¹ de N no plantio + 90 g ha⁻¹ de Mo pulverizado sobre as plantas no estágio de desenvolvimento V4); 4) NP + Mo + inoculação das sementes com estirpes de *R. tropici* (CIAT 899 e SEMIA 4088) (NP + Mo + Riz); 5) NP + Mo + Riz + inoculação das sementes com estirpes de *A. brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6). Os seguintes contrastes foram testados: 1 vs. 2-5 (para avaliar a deficiência de N no solo); 2, 3 vs. 4, 5 (para avaliar os efeitos da coinoculação de *R. tropici* + *A. brasilense*); 2 vs. 3 (para avaliar o efeito da adubação atualmente recomendada para a Zona da Mata em relação ao geralmente recomendado para o feijão); 4 vs. 5 (para avaliar os efeitos do *A. brasilense* + *R. tropici* em relação ao uso isolado de *R. tropici* quando se usa Mo). No experimento de Oratórios, alguns contrastes tiveram efeito significativo sobre leitura de SPAD, razão parte aérea/ raiz e massa de 100 grãos. A significância do contraste 2,3 vs. 4,5 indica que na ausência dos microrganismos as plantas apresentaram maior média de leitura de SPAD. O Mo aumentou a razão parte aérea/ raiz, conforme significância do contraste 2 vs. 3. O N aumentou a massa de 100 grãos conforme indica a significância do contraste 1 vs. 2-5. A significância do contraste 4 vs. 5 indica que a coinoculação de *R. tropici* + *A. brasilense* causou aumento na massa de grãos em relação à inoculação com apenas *R. tropici*. Nesse experimento a coinoculação de *R. tropici* + *A. brasilense*

associada à adubação molíbdica não influenciou a produtividade das plantas. No experimento de Viçosa, os contrastes tiveram efeito significativo sobre o teor de N na folha, massa de parte aérea seca, razão parte aérea/ raiz, número de nódulos, massa de nódulos secos e massa de 100 grãos. As plantas originadas da adubação com o N aplicado no plantio mais o Mo aplicado em V4 apresentaram menor teor de N nas folhas que as plantas que receberam N no plantio + N em cobertura conforme indica a significância do contraste 2 vs. 3. A significância do contraste 1 vs. 2-5 sobre a massa de parte aérea seca indica que aquelas que só receberam P + K no plantio (controle) tiveram massa menor que as que receberam adubação extra. Além disso, a ausência do N (plantio e/ ou cobertura) diminuiu a razão parte aérea/ raiz (1 vs. 2-5). A significância dos contrastes 2,3 vs. 4,5 e 4 vs. 5 indicam que os microrganismos, especialmente o *R. tropici*, aumentaram o número e a massa de nódulos. A coinoculação de *R. tropici* x *A. brasilense* associada à adubação molíbdica também não influenciou a produtividade do feijão. Trabalhos são necessários em solos com deficiência de N para melhor avaliar os efeitos da coinoculação em associação com Mo.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* L. Rizóbio. Azospirillum. Nutrição molíbdica.

ABSTRACT

ROCHA, Brauly Martins, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2020. **Strategies to maximize nitrogen acquisition by common beans: *Rhizobium tropici* and *Azospirillum brasilense* coinoculation and use of molybdenum.** Adviser: José Eustáquio de Souza Carneiro. Co-advisers: Rogério Faria Vieira and Marcos Rogério Tótoia.

There are no studies in the literature on the association of molybdc fertilization (Mo) with the co-inoculation of *Rhizobium* spp. and *Azospirillum* spp. Our objective was to test whether there is an increase in productivity in beans when co-inoculating strains of *Rhizobium tropici* and *Azospirillum brasilense* associated with molybdc fertilization. Two field experiments were carried out in the autumn-winter season. The experiments were installed in Oratórios and Viçosa, Minas Gerais, under a conventional planting system, and with basic fertilization in the furrow of 80 kg ha⁻¹ of P₂O₅ in the form of simple superphosphate and 40 kg ha⁻¹ of K₂O in the form of chloride potassium. The experimental design was in randomized blocks, with five replications and five treatments: 1) control (without fertilizers containing N and Mo and without microorganism); 2) nitrogen (20 kg ha⁻¹ in planting + 60 kg ha⁻¹ in cover) (NP + NC); 3) recommended fertilization for Zona da Mata (20 kg ha⁻¹ of N at planting + 90 g ha⁻¹ of Mo sprayed on plants in the V4 development stage); 4) NP + Mo + seed inoculation with *R. tropici* strains (CIAT 899 and SEMIA 4088) (NP + Mo + Riz); 5) NP + Mo + Riz + inoculation with *A. brasilense* strains (Ab-V5 and Ab-V6) (NP + Mo + Riz + Azos). The following contrasts were tested: 1 vs. 2-5 (to assess soil N deficiency); 2, 3 vs. 4, 5 (to evaluate the effects of co-inoculation of *R. tropici* + *A. brasilense*); 2 vs. 3 (to assess the effect of fertilization currently recommended for Zona da Mata in relation to that generally recommended for beans); 4 vs. 5 (to evaluate the effects of *A. brasilense* + *R. tropici* in relation to the isolated use of *R. tropici* when using Mo). In the Oratórios experiment, some contrasts had a significant effect on SPAD reading, shoot to root ratio and mass of 100 grains. The significance of the contrast 2,3 vs. 4,5 indicates that in the absence of microorganisms the plants had a higher average reading SPAD. Mo increased the shoot to root ratio, as the significance of contrast 2 vs. 3. The N increased the mass of 100 grains as indicated by the significance of contrast 1 vs. 2-5. The significance of the 4 vs. 5 contrast indicates that the co inoculation of *R. tropici* + *A. brasilense* caused an increase in the grains mass in relation to inoculation with only *R. tropici*. In this experiment, the co-inoculation of *R. tropici* + *A. brasilense* associated

with molybdc fertilization did not influence plant productivity. In the Viçosa experiment, the contrasts had a significant effect on the N content in the leaf, shoot dry matter, shoot to root ratio, mass dry nodules, number nodules and mass of 100 grains. Plants originating from fertilization with N applied at planting plus Mo applied at V4 had a lower leaf N content than plants that received N at planting + N in coverage as indicated by the significance of contrast 2 vs. 3. Significance of contract 1 vs. 2-5 on shoot dry matter indicates that those that only received P + K at planting (control) had a lower mass than those that received extra fertilization. In addition, the absence of N (planting and/ or cover) decreased the shoot to root ratio (1 vs. 2-5). The significance of the contrasts 2,3 vs. 4,5 and 4 vs. 5 indicate that microorganisms, especially *R. tropici*, increased the number and mass of the nodules. Co-inoculation of *R. tropici* x *A. brasilense* associated with molybdc fertilization also did not influence bean yield. More work is needed on soils with N deficiency to better assess the effects of co-coagulation in association with Mo.

Keywords: *Phaseolus vulgaris* L. Rhizobia. Azospirillum. Molybdc nutrition.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	Feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	13
2.2	Nitrogênio no Feijão.....	13
2.3	Fixação Biológica de N no Feijão.....	15
2.4	Coinoculação <i>R. tropici</i> x <i>A. brasilense</i>	16
2.5	Molibdênio (Mo).....	17
2.6	Outras Considerações.....	18
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1	Análise Estatística.....	23
4	RESULTADOS.....	24
4.1	Experimento de Oratórios.....	24
4.2	Experimento de Viçosa.....	24
5	DISCUSSÃO.....	27
6	CONCLUSÕES.....	30
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
8	APÊNDICE.....	39

1 INTRODUÇÃO

O feijão-comum ou feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das leguminosa de grãos mais consumidas no mundo. Essa leguminosa fornece proteínas, fibras alimentares, amido e minerais como potássio, tiamina, vitamina B6 e ácido fólico a preços acessíveis, que beneficiam principalmente os mais pobres. No Brasil, o feijão é a leguminosa granífera mais cultivada e consumida.

A produção nacional do feijão foi estimada em 2018 em 2,2 milhões de toneladas com média de produtividade de 1500 kg ha⁻¹ (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2019), aquém dos 5000 kg ha⁻¹ já alcançados com o feijão irrigado no Brasil. Dentre os principais fatores responsáveis pela baixa produtividade do feijão no Brasil destaca-se o baixo nível tecnológico utilizado por muitos agricultores e o cultivo em solos de baixa fertilidade, especialmente pobres em nitrogênio (N) (MERCANTE et al., 1999; PELEGRIN et al., 2009).

O N é um dos nutrientes mais caros nas adubações realizadas no feijão (SINGH, 2005); e o feijão é capaz de fixar N atmosférico em associação com bactérias diazotróficas do grupo dos rizóbios, num processo simbiótico que resulta na Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN), e assim gerar economia no uso de fertilizantes nitrogenados. No entanto, o feijão possui acentuada variabilidade na Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN). Em condições experimentais, dependendo do genótipo de feijão e condições edafoclimáticas, a percentagem de N derivado da atmosfera (%Ndfa) é em média 40% e pode chegar até 73%, que representa um faixa de eficiência baixa se comparada a soja, que pode variar de 68% a 95% Ndfa (HERRIGE et al., 2008).

A baixa eficiência da FBN no feijão pode ser resultado do melhoramento baseado em fertilizantes nitrogenados, elevada população nativa de rizóbio no solo muito competitiva e pouco eficiente, e alta suscetibilidade a doenças e estresses (GRAHAM, 1981; HUNGRIA; VARGAS, 2000). A variabilidade de respostas do feijão à FBN (HUNGRIA et al., 1997) pode ter influenciado a pouca procura por inoculante para feijão. Segundo dados da Associação dos Produtores e Importadores de Inoculantes (ANPII), 0,4% dos inoculantes vendidos pelas empresas filiadas são destinados produção de feijão, enquanto a maior fração, 87%, para a produção de soja (ANPII, 2018).

Apesar da baixa procura pelo inoculante de feijão, estudos com inoculação dessa espécie mostraram ganhos significativos de produtividade de 906 kg ha⁻¹ e 437 kg ha⁻¹ em relação ao controle (rizóbios nativos) (HUNGRIA et al., 2003; 2000). Além disso, outras possibilidades, como a associação de N no plantio e inoculação vêm sendo

estudadas no feijão (PELEGRIN et al., 2009; Figueiredo et al., 2016; Soares et al., 2016). Pelegrin et al. (2009) verificaram que 20 kg ha⁻¹ de N no plantio e inoculação de *R. tropici* possibilitou produtividade de grãos de mais de 3000 kg ha⁻¹, equivalentes à aplicação de até 160 kg ha⁻¹ de N na forma de ureia.

Atualmente tem sido preconizado no feijão o uso da coinoculação ou inoculação combinada de rizóbios e bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), como as dos gêneros *Bacillus* e *Azospirillum* (CAMACHO et al, 2001; HUNGRIA et al., 2013a; SOUZA; FERREIRA, 2017). As BPCP estão ligadas à produção de fitormônios vegetais, que têm potencial para estimular crescimento radicular, e assim ampliar os locais de infecção pelas estirpes de rizóbio (CASSÁN et al. 2009). Estudos com coinoculação de *R. tropici* e *Azospirillum brasilense* demonstraram potenciais aumentos de rendimentos de grãos de 19% e 26%, respectivamente, em relação à inoculação apenas com *R. tropici* (HUNGRIA et al., 2013a; SOUZA; FERREIRA, 2017).

O Mo é integrante da enzima nitrogenase, fundamental para a FBN pelo rizóbio nos nódulos das raízes, e da enzima nitrato redutase, essencial para o aproveitamento do NO₃⁻ absorvido pela planta. Na Zona da Mata mineira, a pulverização de solução de Mo nas folhas do feijão tem sido usada como alternativa à adubação de cobertura com N (AMANE et al., 1999; VIEIRA et al., 1992; VIEIRA et al., 2005). Os rendimentos dos feijões adubados com N (20-25 kg ha⁻¹), K e P na semeadura, mais pulverização com Mo, podem aumentar a produtividade em 200%, quando comparados com os rendimentos das plantas não fertilizadas com Mo ou N (AMANE et. al., 1999; BERGER et., 1996; PESSOA et al., 2000; VIEIRA et., 1992).

Embora o uso da coinoculação de *Rhizobium* spp. e *Azospirillum* spp. venha sendo estimulada nas lavouras de feijão e a adubação com Mo seja prática comum nos cultivos de feijão em Minas Gerais, não sabemos qual o potencial de ganho no rendimento do feijão quando estas práticas são aplicadas num mesmo ciclo produtivo. Logo, nosso objetivo foi testar a se há incremento de produtividade no feijão quando se coinoculam estirpes de *R. tropici* e *A. brasilense* associadas com adubação molíbdica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.)

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é o feijão mais consumido no mundo. No Brasil, essa leguminosa tem grande importância socioeconômica, por causa da sua rica composição nutricional e por ser fonte barata de nutrientes, principalmente para populações de baixa renda. O feijão-comum também é importante fonte de renda de pequenos, médios e grandes produtores. No Brasil, o feijão é produzido em três safras: a primeira (“feijão das águas”) é semeada entre os meses de agosto a dezembro, a segunda (“feijão da seca”), de janeiro a abril e a terceira (feijão de inverno), irrigada, semeada entre os meses de maio a julho (MOURA; BRITO, 2015).

Em 2018, a produção nacional de feijão foi estimada em 2,2 milhões de toneladas com produtividade média de 1500 kg ha⁻¹ (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2019). Essa produtividade é 40% menor que a média de produtividade da safra de outono-inverno e 50% maior que a média de produtividade da safra da seca (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2019). Essa variação de produtividade em torno da média pode ser ainda mais acentuada, para mais ou para menos, dependendo do nível tecnológico do produtor e das condições edafoclimáticas.

Dentre os principais fatores responsáveis pela baixa produtividade do feijão no Brasil destaca-se o baixo nível técnico utilizado por muitos produtores e o cultivo em solos de baixa fertilidade, especialmente nos pobres em N (MERCANTE et al., 1999; PELEGRIN et al., 2009). O uso de tecnologias agrícolas como fertilização baseada em análise de solo; utilização racional de irrigação; práticas do manejo integrado de pragas e doenças; e sementes certificadas podem melhorar a produtividade e os lucros, com redução de impactos ambientais.

Ademais também é importante que a pesquisa disponibilize outras possibilidades de manejo agrícola que aumentem a gama de técnicas disponíveis para o manejo em diferentes agroecossistemas. Licker et al. (2010) destacam a importância da pesquisa em práticas agrícolas alternativas que podem levar à obtenção de alto rendimento, às quais não impactem o ecossistema, essencial para sociedades que dependem dele.

2.2 Nitrogênio no Feijão

O N é o nutriente mais absorvido pelo feijão, seguido por potássio, cálcio, enxofre, magnésio e fósforo (HAAG ET al., 1967; COBRA NETO et al., 1971), e o que

mais influencia o crescimento da cultura (NASCENTE et al., 2017). Esse nutriente faz parte de biomoléculas fundamentais das células vegetais como aminoácidos, proteínas, nucleotídeos e componentes celulares (p. ex. clorofilas, membranas e vários hormônios vegetais).

O N total absorvido durante o ciclo de vida da cultura é obtido principalmente de duas fontes: da fixação biológica de N_2 atmosférico (FBN) e do solo (da adubação nitrogenada ou da mineralização da matéria orgânica). Na FBN, o feijão se associa com bactérias do grupo dos rizóbios e forma em suas raízes estruturas especializadas, os nódulos radiculares, onde os rizóbios – por intermédio da enzima nitrogenase – convertem o N atmosférico (N_2) em amônia (NH_3), que é prontamente assimilável pelas plantas.

No solo, via mineralização da matéria orgânica ou da adubação, o feijão absorve N nas formas de amônio (NH_4^+) e/ ou nitrato (NO_3^-). Esta última é a forma predominante em solos aerados (KROUK et al., 2010). A lixiviação do nitrato e a mineralização da matéria orgânica alteram constantemente os teores de N disponível para as plantas. Adicionalmente, pode ocorrer redução do N no solo por desnitrificação ou em decorrência de imobilização por microrganismos (RAIJ, 2017).

Em Minas Gerais, recomendam-se de 20 a 40 kg ha⁻¹ de N no plantio do feijão e 20 a 60 kg ha⁻¹ de N em cobertura, dependendo do nível tecnológico do produtor (RIBEIRO et al., 1999). Em razão da dinâmica do N no solo, a resposta da planta à adubação nitrogenada pode ser variável. Mas os resultados de pesquisas indicam que em 61% das vezes há aumento de produtividade (VIEIRA, 2006).

Dependendo da fonte nitrogenada utilizada as perdas podem ocorrer por lixiviação na forma de nitrato e escoamento superficial, provocado por águas de chuva e, ou irrigação (PELEGRIN, et al., 2009). Além disso, quando N é aplicado na forma de ureia [$CO(NH_2)_2$] na superfície do solo e sem incorporação, podem ocorrer perdas de N por volatilização de NH_3 (LARA-CABEZAS et al., 1997; SANGOI et al., 2003; ROCHESTE et al., 2009).

O preço dos adubos nitrogenados depende da sua cotação internacional e do valor do dólar (SOUZA et al. 2020), pois mais de 80% dos fertilizantes nitrogenados consumidos no Brasil são importados (ANDA, 2017). O adubo nitrogenado aumenta o custo de produção do agricultor e é fonte de poluição ambiental, o que justificativa para o investimento na pesquisa com FBN no cultivo do feijão.

2.3 Fixação Biológica de N no Feijão

O feijão é considerado um fixador pobre de N, com alta variabilidade no processo simbiótico. Em condições experimentais, dependendo do genótipo de feijão e condições edafoclimáticas, a percentagem de N derivado da atmosfera (%Ndfa) obtido pela cultura é em média 40% e pode chegar até 73%, enquanto que na soja é em média 68%, podendo chegar a 95% Ndfa (HERRIGE et al., 2008). As limitações da simbiose do feijão com bactérias diazotróficas podem ser consequências do melhoramento baseado em fertilizantes nitrogenados; população nativa de rizóbio no solo altamente competitiva e pouco eficaz; e alta suscetibilidade a doenças e estresses ambientais (GRAHAM, 1981; HUNGRIA; VARGAS, 2000).

Além disso, até 1994 no Brasil, as estirpes utilizadas no inoculante comercial eram geneticamente mais instáveis, como as estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. Essas estirpes são mais propensas à ocorrência de rearranjos genômicos que alteram o plasmídeo simbiótico, com perdas dos genes *nif*, bem como capacidade de nodulação (SOBERON-CHAVES et al., 1986). Isso pôde ser constatado pela perda de eficiência na FBN de três estirpes: C-05-0 (CENA), a V-23 (Embrapa-CPAC) e a SEMIA 4064 (=UMR 1135 ou URGs 196, Universidade de Minnesota, EUA), classificadas na época como *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (HUNGRIA et al., 1997). O reconhecimento de que a espécie *R. tropici* (MARTINEZ-ROMERO et al., 1991) apresentava maior estabilidade genética, maior eficiência no processo de FBN, maior competitividade com rizóbios nativos nos solos brasileiros e com tolerância a temperaturas altas direcionou a pesquisa para seleção de estirpes dessa espécie.

Nas últimas décadas, a Embrapa Soja, a Embrapa Cerrados e o Instituto Agrônomo do Paraná conduziram um programa de seleção de rizóbios para a cultura do feijão (HUNGRIA et al., 2013b). Desses trabalhos resultaram duas estirpes, SEMIA 4080 (=PRF 81), identificada como *R. tropici* [posteriormente reclassificada como *R. freirei* sp. nov. (DALL'AGNOL et al., 2013)] e SEMIA 4088 (=H12), que pertence à espécie *R. tropici*. Essas duas estirpes, juntamente com SEMIA 4077 (=CIAT 899), pertencente à espécie *R. tropici*, são as três estirpes autorizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o uso em inoculantes comerciais no Brasil na cultura do feijão (BRASIL, 2011).

O estudo de Hungria et al. (2000) mostrou que a inoculação do feijão com a estirpe SEMIA 4080 aumentou a produtividade até 906 kg ha⁻¹ em relação ao controle (rizóbios nativos). No estudo de HUNGRIA et al. (2003), a inoculação do feijão com a estirpe de SEMIA 4088 em seis ensaios promoveu aumento médio de produtividade de

437 kg ha⁻¹ em relação ao controle (rizóbios nativos). Em ambos os trabalhos, os tratamentos inoculados e o controle não receberam N.

Apesar de estudos indicarem que o feijão pode se beneficiar da FBN, os estudos com uso de inoculação rizobiana em campo ainda dão respostas inconsistentes (RAPOSEIRAS et al., 2006; SOUZA et al., 2011; VALADÃO et al., 2009).

Para otimizar a simbiose do feijão com as estirpes autorizadas pelo MAPA e alcançar maiores produtividades, tem-se trabalhado com a possibilidade de se associar inoculação e N no plantio (PELEGRIN et al., 2009; FIGUEIREDO et al., 2016; SOARES et al., 2016). Resultados de Pelegrin et al. (2009) sugerem que 20 kg ha⁻¹ de N no plantio e inoculação de SEMIA 4077 possibilitou produtividade de grãos da cultura do feijão de mais de 3000 kg ha⁻¹, equivalentes à aplicação de até 160 kg ha⁻¹ de N na forma de ureia. Porém, ainda são escassas informações sobre ensaios de inoculação e complementação com fertilizantes nitrogenados sintéticos, inclusive avaliando cultivares feijão mais modernas com elevados níveis de produção (FERREIRA et al., 2013) em distintos agroecossistemas.

Além disso, existem alternativas que podem melhorar o processo simbiótico, podendo amenizar estresses abióticos do feijão e aumentar a produtividade. Por exemplo, a associação entre *Rhizobium* e bactérias promotoras de crescimento como as do gênero *Azospirillum* pode ser estratégia para aumentar os rendimentos do feijão no Brasil (HUNGRIA et al. 2013b).

2.4 Coinoculação *R. tropici* x *A. brasilense*

As bactérias do gênero *Azospirillum* são microrganismos associativos e promotores de crescimento de plantas que atuam principalmente em duas vertentes: a fixação biológica de nitrogênio, pois possuem a enzima nitrogenase, capaz de converter N₂ em NH₃ (BODDEY et al. 1986); e a produção de fitormônios, tais como auxinas (TIEN et al. 1979; SPAEPEN et al., 2008; MASCIARELLI et al., 2013), giberelinas, citocininas (TIEN et al. 1979; PERRING et al., 2007; GÓMES et al., 2015), que estimulam principalmente o melhor desenvolvimento da raiz e o posterior aumento na taxa de absorção de água (OKON; KAPULNIK, 1986), podendo resultar em maiores produtividades em campo (HUNGRIA et al., 2010).

Okon e Labandera-Gonzales (1994) revisaram trabalhos de 20 anos com inoculação de *Azospirillum* spp. em campo e constataram aumentos significativos de produtividade da ordem de 5-30% em 60-70% dos relatórios.

No Brasil, duas estirpes, Ab-V5 e Ab-V6, ambas da espécie *A. brasilense*, estão entre as autorizadas pelo MAPA para utilização nos inoculantes comerciais de milho e trigo (BRASIL, 2011). Essas estirpes foram testadas e selecionadas pela Embrapa Soja e Universidade Federal do Paraná, que tinham como critério de seleção maior sobrevivência no solo, maior promoção de crescimento das plantas e maior adaptabilidade às tecnologias utilizadas nas culturas do milho e do trigo (HUNGRIA et al. 2011).

O estudo de Hungria et al., 2010, com seis experimentos, mostrou que as estirpes de Ab-V5 e Ab-V6, inoculadas nas sementes, aumentaram o rendimento médio de grãos do milho em 30 e 28%, respectivamente, em relação ao controle sem inoculação. Nesse mesmo estudo, porém com a cultura do sorgo, em quatro experimentos, essas estirpes inoculadas aumentaram o rendimento médio de grãos em 16% (Ab-V5) e 18% (Ab-V6) em relação ao controle sem inoculação.

Existe a possibilidade de realizar inoculação de cultivos agrícolas com bactérias do gênero *Azospirillum* conjuntamente às do gênero *Rhizobium* em leguminosas como o feijão. Essa prática é denominada coinoculação, mas também pode ser denominada inoculação combinada ou consórcio de bactérias. No passado, efeitos positivos foram relatados em várias leguminosas (SARIG et al., 1986; YAHALOM et al., 1987; ITZIGSOHN et al., 1993), incluindo o feijão (Burdman et al., 1997).

No Brasil, estudos de Hungria et al. (2013a) e Souza e Ferreira (2017) com coinoculação de *R. tropici* e *A. brasilense* mostraram potencial de ganhos em rendimentos de grãos próximos a 19% e 26%, respectivamente, em relação à inoculação apenas com *R. tropici*. Nessa ótica o efeito de *R. tropici* é potencializado pela produção de hormônios vegetais de *A. brasilense*, os quais estimulam o crescimento radicular, com posterior ampliação dos locais de infecção para as estirpes de rizóbios (CASSÁN et al. 2009).

No entanto para que essa interação se estabeleça o *status* nutricional da planta deve ser observado. Logo, a nutrição com micronutrientes é extremamente importante.

2.5 Molibdênio (Mo)

Íons molibdênio (Mo^{4+} até Mo^{6+}) são constituintes de várias enzimas, tais como nitrato redutase, nitrogenase, xantina desidrogenase, aldeído oxidase e sulfeto oxidase (TAIZ et al., 2017). Com exceção da nitrogenase bacteriana – constituinte do cofator FeMo – o Mo é parte integrante de um complexo orgânico de pterina chamado cofator do molibdênio (Moco). Moco liga-se a enzimas que requerem molibdênio encontradas

na maioria dos sistemas biológicos, incluindo plantas, animais e procariontes (MENDEL, 2002; WILLIAMS; FRAUSTO DA SILVA, 2002).

Xantina desidrogenase, nitrato redutase e nitrogenase são importantes na nutrição nitrogenada em vegetais superiores, como o feijão. Xantina desidrogenase e nitrato redutase atuam na redução e assimilação do nitrato pelas plantas (MENDEL, 2002).

O fornecimento de Mo em sistemas de cultivo pode ser viabilizado de várias formas: via foliar (AMANE et al., 1999; VIEIRA et al., 1992; VIEIRA et al., 2005); via revestimento de sementes (ASCHER; GRAHAM, 1994; MAJDA et al., 2019; ROBERTS, 1948; SCOTT et al., 1985; SCOTT; BLAIR, 1988; SFREDO et al., 1996; SILCOCK; SMITH, 1982); e via solo, misturado ao adubo de plantio (ABREU et al., 2007). Configura-se ainda opção, o enriquecimento da cultura com o elemento químico na produção das sementes, com pulverizações foliares de doses maiores de Mo (ALMEIDA et al., 2013; PACHECO et al., 2012; VIEIRA et al., 2005; VIEIRA et al., 2011).

Na Zona da Mata mineira a pulverização Mo nas folhas tem sido usada como alternativa à adubação de cobertura com N (AMANE et al., 1999; VIEIRA et al., 1992; VIEIRA et al., 2005). Os rendimentos das plantas de feijão adubadas com N no plantio (20-25 kg ha⁻¹), K e P na semeadura, mais pulverização foliar de Mo, podem ser 200% maiores, quando comparados com os rendimentos das plantas não fertilizadas com Mo ou N (AMANE et al., 1999; BERGER et al., 1996; PESSOA et al., 2000; VIEIRA et al., 1992).

Nessa região a dose mais eficiente de Mo pulverizado sobre o feijão aos 25 dias após a emergência varia entre 70 a 100 g ha⁻¹, dependendo da adubação nitrogenada; quanto mais N menor a dose de Mo. Vieira et al. (1998a, b), verificaram que o Mo utilizado aos 25 DAE aumentou significativamente a atividade da enzima nitrogenase nos nódulos de cepas nativas e prolongou o período de alta atividade da enzima nitrato redutase, com consequente aumento da produtividade.

2.6. Outras Considerações

Ao fim desse referencial teórico é necessário destacar, que apesar dos insucessos do passado com a FBN do feijão, ainda existem muitas lacunas para serem completadas no estudo da interação, feijão – *Rhizobium* spp., e que também pode envolver a inoculação combinada de outros microrganismos como *Azospirillum* spp. Além disso essa simbiose engloba todo um status nutricional (por exemplo a nutrição com

molibdênio) para que a simbiose seja maximizada, podendo resultar em economia de fertilizantes nitrogenados e diminuição de custos. Nesse contexto concordamos com Herridge et al. (2008) que afirmam que aliado ao aumento da eficiência de fertilizantes nitrogenados para a sustentabilidade a longo prazo do planeta, um objetivo igualmente importante poderia ser a exploração e utilização mais eficaz do N fixado biologicamente em sistemas agrícolas. Eles também enfatizam que isso no mínimo, completaria o uso de fertilizantes nitrogenados e aliviaria a pressão, de longo prazo para a expansão da produção.

No entanto, foi relatado um declínio na dependência agrícola do nitrogênio biológico e no uso de inoculantes rizobianos (GRAHAM; VANCE, 2000). Nas últimas décadas, avanços foram alcançados, principalmente na compreensão da diversidade de bactérias fixadoras de N₂. Contudo o uso desses microrganismos para melhorar a sustentabilidade agrícola ainda é pouco explorado, tendo em vista o seu grande potencial (KASCHUK; HUNGRIA, 2017).

Nesse enfoque, é extremamente importante a continuidade de trabalhos que enfatizem a maximização da aquisição de N biológico pelos cultivos agrícolas, como o feijão.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Dois experimentos de campo com a cultivar “Ouro Vermelho” de feijão foram conduzidos na safra de outono-inverno. Os experimentos foram instalados nos municípios de Oratórios (492 de altitude, 20° 25' 51" de latitude S e 42° 48' 21" de longitude O) e Viçosa (648 m de altitude, 20° 45' 14" de latitude S e 42° 52' 55" de longitude O). Ambos os municípios estão localizados na região da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais.

Segundo a classificação de Köppen, o clima das duas regiões é do tipo *Cwa*, ou seja, clima tropical de altitude, com o verão quente e úmido e inverno frio e seco (VIANELLO; ALVES, 2012). Os solos dessas áreas são classificados como Argissolo Vermelho-Amarelo Distrófico. O solo de Oratórios foi cultivado mais de 20 anos com milho (*Zea mays* L.) silagem ou pousio no verão e feijão no outono-inverno. O solo de Viçosa foi utilizado para cultivo de olerícolas até 2010 e posteriormente cultivado com milho grão entre 2011 e 2018.

Antes da semeadura, a camada de solo de 0 a 0,20m foi amostrada, e os resultados da análise granulométrica e da fertilidade do solo estão na Tabela 1.

Tabela 1: Características químicas e físicas nas camadas de 0-20 cm nos locais e safras dos experimentos.

Características dos solos ⁽¹⁾	Oratórios	Viçosa
pH (H ₂ O)	6,3	5,1
P, mg dm ⁻³	69,6	77,1
K, mg dm ⁻³	127	187
Al, cmol _c dm ⁻³	0,0	0,2
Ca, cmol _c dm ⁻³	2,8	3,5
Mg, cmol _c dm ⁻³	1,2	0,8
Saturação de bases (%)	77,0	45,0
H + Al, cmol _c dm ⁻³	1,32	5,78
Matéria orgânica, dag kg ⁻¹	2,6	3,6
Zn, mg dm ⁻³	9,0	21,1
Fe, mg dm ⁻³	66,1	23,4
Mn, mg dm ⁻³	100,9	102,0
Cu, mg dm ⁻³	1,8	2,1
B, mg dm ⁻³	0,4	0,3
Argila, g.kg ⁻¹	310	530
Silte, g.kg ⁻¹	330	330
Areia, g.kg ⁻¹	140	140

¹ P, K, Zn, Fe, Mn e Cu foram extraídos com Mehlich 1; Al, Ca e Mg foram extraídos com KCl 1 mol L⁻¹; Matéria orgânica: Oxidação: Na₂Cr₂O₇ 4N + H₂SO₄ 10N; Saturação de bases = [(K + Ca + Mg)/ CTC (T)] × 100, onde CTC (T) = K + Ca + Mg + acidez total a pH 7,0 (H + Al); H + Al foram extraídos com acetato de cálcio 0,5 mol L⁻¹ a pH 7,0. B foi extraído com água quente; Argila, silte e areia foram determinados pelo método da pipeta (Embrapa, 1997).

Os experimentos foram instalados em sistema de plantio convencional, com uma aração e uma gradagem, semeadura manual e adubação básica no sulco de 80 kg ha⁻¹ de P₂O₅ na forma de superfosfato simples e 40 kg ha⁻¹ de K₂O na forma de cloreto de potássio.

Foram avaliados os seguintes tratamentos:

- 1) controle (sem fertilizantes contendo N e Mo e sem microrganismo);
- 2) nitrogênio (20 kg ha⁻¹ no plantio + 60 kg ha⁻¹ em cobertura) (NP + NC) (Carneiro et al., 2014);
- 3) adubação recomendada para a Zona da Mata (20 kg de N de no plantio + 90 g de Mo ha⁻¹ em pulverizado sobre plantas no estágio de desenvolvimento V4) (NP + Mo) (Carneiro et al., 2014);
- 4) NP + Mo + inoculação das sementes com estirpes de *R. tropici* (CIAT 899 e SEMIA 4088) (NP + Mo + Riz);
- 5) NP + Mo + Riz + inoculação com estirpes de *A. brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6) (NP + Mo + Riz + Azos).

Nos tratamentos 2-5, o N, na forma de ureia (45% de N), foi aplicado no sulco de plantio e/ ou próximo às fileiras das plantas (cobertura). No tratamento 2, a adubação nitrogenada de cobertura foi realizada no estágio de desenvolvimento V4 do feijão. O Mo, na forma de molibdato de sódio (39%), foi diluído em água e pulverizado na folhagem de plantas no estágio V4. Foram usados dois inoculantes líquidos (marca comercial NITRO1000): Nitro1000 Feijão, contendo as estirpes de *R. tropici*, e Nitro1000 Gramíneas, contendo as estirpes de *A. brasilense*. Os dois inoculantes foram empregados na base de 200 mL de inoculante para 25 kg de semente, garantindo-se as concentrações mínimas de 10^9 células mL⁻¹ para *R. tropici* e 10^8 células mL⁻¹ de *A. brasilense*. A proporção mL de inoculante/ kg de semente correspondeu a duas doses de cada microrganismo, que objetivaram fornecer, estimadas, $2,4 \times 10^6$ células/ semente de *R. tropici* e $1,6 \times 10^5$ células/ semente de *A. brasilense*.

A unidade experimental (parcela) foi composta por 4 linhas de 6 m de comprimento, espaçadas de 0,5 m. A área útil onde foram tomados os dados foi de 6,0 m². A densidade de semeadura foi 15 sementes por metro, na profundidade de 3 a 4 cm.

Os tratamentos culturais (manejo integrado de plantas daninhas, pragas e doenças foram os recomendados para a cultura (CARNEIRO et al., 2014). Foi utilizada irrigação por aspersão convencional para complementar as chuvas. Quando houve ausência de chuvas no período de plantio, as parcelas foram irrigadas em intervalos de 2 dias, desde a semeadura até a emergência das plântulas. Posteriormente, as plantas foram irrigadas uma vez por semana com aproximadamente 40 mm (até a floração) ou 50 mm (desde a floração até a maturidade) de água.

No estágio R6 (50% das plantas com pelo menos uma flor aberta) foram coletadas seis plantas por parcela (1,5 m finais das duas linhas centrais) (3 plantas/ linha). As plantas foram coletadas com o auxílio de uma pá reta, e separadas em raiz e parte aérea por corte próximo à base do caule. A parte aérea e a raiz foram colocadas em sacos e levadas para o laboratório. A raiz foi lavada sobre peneira de malha 10 (abertura de 2 mm). Em seguida os nódulos catados na peneira e separados da raiz foram juntados. A parte aérea, raiz e os nódulos foram secos em estufa a 65 °C e pesados. A partir desses dados foram calculados a massa média do nódulo seco, calculada através da divisão da massa de nódulos secos pelo número de nódulos; e a razão parte aérea/ raiz, calculada através da divisão da massa de parte aérea seca pela massa de raiz seca.

Em R6, os 4,5 metros iniciais das duas linhas centrais foram usados para as leituras de SPAD (Soil Plant Analysis Development) com um clorofilômetro digital, modelo SPAD 502DL, marca Minolta. Em cada parcela, foram feitas leituras em 10

plantas. Em cada planta, a leitura foi realizada em cada folíolo de folha trifoliolada jovem e expandida, entre 9 e 10 horas da manhã. Logo, em cada parcela anotou-se a média da leitura de 30 folíolos. Esses folíolos foram coletados, acondicionadas em sacos de papel e secos em estufa com circulação de ar à temperatura de 60-70 °C até atingirem peso constante para determinar o teor de N na folha. O teor (%) de N na folha foi determinado empregando-se o método de destilação de Kjeldahl (HILDEBRAND, 1976). Para tanto, amostras de parte aérea foram moídas utilizando-se moinho tipo Willey.

Posteriormente, com mesmo protocolo da primeira leitura de SPAD, mais duas leituras de SPAD foram realizadas, porém sem coleta dos folíolos, em intervalos de sete dias após a primeira coleta, também em R6.

A colheita dos grãos foi realizada no estágio R9. Nos 4,5 metros iniciais de cada parcela (duas linhas centrais) foram determinados o rendimento de grãos e a massa de 100 grãos.

3.1 Análise Estatística

As comparações envolvendo os tratamentos foram feitas por meio de contrastes ortogonais originados de desdobramentos de quatro graus de liberdade. A significância dos contrastes com um grau de liberdade foi testada pelo teste F contra o quadrado médio do resíduo obtido na análise de variância. Em Viçosa o número e a massa de nódulos foram transformados para $(x + 0,5)^{0,5}$ antes de serem submetidos à análise de variância, e, logo após, convertidos em dados originais para facilitar a compreensão. O contraste 1 teve por objetivo verificar se havia deficiência de N no solo. O contraste 2 avaliou o efeito da coinoculação de *R. tropici* + *A. brasilense*. O contraste 3 avaliou a eficiência da adubação atualmente recomendada para a Zona da Mata (20 kg ha⁻¹ de N + 90 g ha⁻¹ de MO) em relação ao tratamento com adubação nitrogenada (20 kg ha⁻¹ de N + 60 kg ha⁻¹ de N) geralmente empregado no Brasil. O contraste 4 avaliou o efeito do *A. brasilense* como um reforço ao uso de *R. tropici* e molibdênio.

4 RESULTADOS

4.1 Experimento de Oratórios

Em Oratórios, os contrastes não tiveram efeito significativo sobre massa de parte aérea seca, massa de raiz seca, número de nódulos, massa de nódulos secos, leitura de SPAD 1 e 2, teor de N na folha e produtividade.

A produtividade média foi 1703 kg ha⁻¹ (CV = 25%) e as médias de massa de parte aérea seca, massa de raiz seca, massa de nódulos secos e número de nódulos, massa média do nódulo seco, leitura de SPAD 1 e SPAD 2, teor de N na folha foram respectivamente, 4,5 g/ planta (CV = 17%), 0,40 g/ planta (CV = 17%), 61,6 mg/ planta (CV = 39%), 42 nódulos/ planta (CV = 35%), 1,39 mg/ nódulo (CV = 36,5%), 40,84 (CV = 2,5%), 42,66 (CV = 3,1%), 4,27 dag kg⁻¹ (CV = 11%).

Os contrastes tiveram efeito significativo sobre leitura de SPAD 3, razão parte aérea/ raiz e massa de 100 grãos (Tabela 2). A significância do contraste 2,3 vs. 4,5 indica que na ausência dos microrganismos as plantas apresentaram maior média de leitura de SPAD 3. O Mo na folha aumentou a razão parte aérea/ raiz, conforme significância do contraste 2 vs. 3.

O N aumentou a massa de 100 grãos conforme indica a significância do contraste 1 vs. 2-4. A significância do contraste 4 vs. 5 indica que a coinoculação de *R. tropici* + *A. brasilense* causou aumento na massa da semente em relação à inoculação com *R. tropici*.

4.2 Experimento de Viçosa

Em Viçosa, os contrastes não tiveram efeito significativo sobre a massa de raiz seca, leitura de SPAD e produtividade. A produtividade média foi 3702 kg ha⁻¹ (CV = 14%) e as médias de massa de raiz seca, leituras de SPAD 1, SPAD 2, SPAD 3 e massa média do nódulo foram, respectivamente 0,63 g/ planta (CV = 19%), 32,9 (CV = 4 %), 39,0 (CV = 5,2%), 35,7 (CV = 4,4%), 1,49 mg/ nódulo (CV = 34%).

Os contrastes tiveram efeito significativo sobre o teor de N na folha, massa de parte aérea, razão parte aérea/ raiz, massa de nódulos secos, número de nódulos, e massa de 100 grãos (Tabela 3).

Os teores de N nas folhas dos feijões variaram de 3,8 a 4,2 dag kg⁻¹. As plantas originadas da adubação com o N aplicado no plantio mais o Mo aplicado em V4 apresentaram menor teor de N na folha que as plantas que receberam N no plantio + N em cobertura conforme indica a significância do contraste 2 vs. 3 (Tabela 3). A

significância do contraste 1 vs. 2-5 sobre a massa de parte aérea seca indica que aquelas que só receberam P + K no plantio (controle) tiveram massa menor que as que receberam adubação extra. Além disso, a ausência do N (plantio e/ ou cobertura) diminuiu a razão parte aérea/ raiz (1 vs. 2-5).

O número de nódulos (entre 11 e 49) foi bem inferior ao verificado no experimento de Oratórios (entre 33 e 47). A significância dos contrastes 2,3 vs. 4,5 e 4 vs. 5 indicam que os microrganismos, especialmente o *R. tropici*, aumentaram o número e a massa de nódulos. E a adição de *A. brasilense* reduziu a nodulação em relação à inoculação com *R. tropici*, apenas (contraste 4 vs. 5).

O aumento do número de nódulos do tratamento NP + Mo + Riz em relação ao controle (sem N, Mo e microrganismos) foi de 188%, o que indica que a inoculação com *R. tropici* foi, provavelmente, eficiente. No entanto, esse aumento na nodulação devido ao *R. tropici* e ao aumento da massa da parte aérea devido à adubação nitrogenada (plantio + cobertura) não tiveram reflexo na produtividade (média = 3702 kg ha⁻¹, CV = 14%), embora um dos componentes da produtividade, massa de 100 grãos, tenha sido mais alta com os microrganismos (contraste 2,3 vs. 4,5).

Tabela 2. Médias e significância dos contrastes ortogonais de leitura de SPAD 3, massa de parte aérea seca, razão parte aérea/ raiz, massa de 100 grãos do feijão cv “Ouro Vermelho”, em Oratórios (2017).

Tratamentos ¹	Leitura de SPAD 3	Massa de parte aérea seca (g/ planta)	Razão parte aérea/ raiz	Massa de 100 grãos (g)
1. Controle (sem N, Mo e microrganismos)	42,80	4,58	11,50	17,1
2. NP + NC	43,54	4,33	10,64	18,4
3. NP + Mo	45,12	5,32	12,52	18,2
4. NP + Mo + Riz	43,22	4,37	11,24	17,1
5. NP + Mo + Riz + Azos	42,36	4,15	10,56	18,6
Contraste			p valor	
1 vs. 2, 3, 4	0,36	0,92	0,70	0,044
2,3 vs. 4,5	0,05	0,13	0,27	0,289
2 vs. 3	0,14	0,06	0,04	0,705
4 vs. 5	0,41	0,65	0,43	0,015

¹NP: Nitrogênio no plantio; NC: Nitrogênio em cobertura; Mo: Molibdênio; Riz: *R. tropici*; Azos: *A. brasilense*.

Tabela 3. Médias e significância dos contrastes ortogonais de N total, massa de parte aérea seca, razão parte aérea/ raiz, número de nódulos, massa de nódulos secos e massa de 100 grãos do feijão cv “Ouro Vermelho”, em Viçosa (2018)

Tratamentos ¹	N na folha (dag kg ⁻¹)	Massa da parte aérea seca (g/ planta)	Razão parte aérea/ raiz	Número de nódulos/ planta	Massa de nódulos secos (mg/ planta)	Massa de 100 grãos (g)
1. Controle (sem N, Mo e microrganismos)	3,8	8,0	13,93	17	20,5	25,1
2. NP + NC	4,2	10,2	16,47	14	10,3	24,6
3. NP + Mo	3,8	10,2	15,54	12	15,6	25,0
4. NP + Mo + Riz	4,0	9,9	14,19	49	45,7	25,9
5. NP + Mo + Riz + Azos	3,9	8,7	15,73	18	17,9	25,8
Contraste			p valor			
1 vs. 2, 3, 4, 5	0,164	0,023	0,03	0,237	0,148	0,539
2,3 vs. 4,5	0,566	0,174	0,10	<0,001	0,002	0,008
2 vs. 3	0,039	0,991	0,29	0,573	0,584	0,346
4 vs. 5	0,816	0,180	0,09	0,004	0,002	0,840

¹NP: Nitrogênio no plantio; NC: Nitrogênio em cobertura; Mo: Molibdênio; Riz: *R. tropici*; Azos: *A. brasilense*.

5. DISCUSSÃO

A coinoculação com *R. tropici* e *A. brasilense* associada à pulverização foliar com Mo não influenciou a produtividade das plantas em Oratórios e Viçosa. A falta de significância para a produtividade possivelmente esteve relacionada com a boa nutrição nitrogenada dos feijões em todos os tratamentos em relação ao controle (contraste 1 vs. 2-5). Os teores de N nas folhas, entre 4,0 e 4,6 dag kg⁻¹ em Oratórios e entre 3,8 e 4,2 dag kg⁻¹ em Viçosa sugerem que as plantas foram bem supridas em N. Esses valores são normais de plantas que não tem deficiência nesse nutriente (MALAVOLTA et al., 1997). As respostas ao uso de fertilizante nitrogenado variam com o ano, devido a variações de clima e do uso anterior do solo (RAIJ, 2017). Em Viçosa, a inoculação com *R. tropici* aumentou a nodulação, enquanto a coinoculação de *R. tropici* + *A. brasilense* diminuiu essa nodulação (contrastes 2,3 vs. 4,5 e 4 vs. 5), quando utilizamos a cultivar “Ouro Vermelho”.

Nos dois experimentos, a não significância do contraste 1 vs. 2-5 em relação ao N na folha e à produtividade indica que as plantas podem ter absorvido suficiente N do solo. As leguminosas necessitam de mais carbono para fixar N atmosférico do que para absorver N do solo (PATE; LAYZELL, 1979; KASKUT et al., 2009) e o nitrato do solo inibe a FBN (GEORGE; SINGLETON, 1992). Logo, é possível que a boa disponibilidade N no solo tenha reduzido a assimilação de N derivado da FBN.

Em relação à razão parte aérea/ raiz, em Oratórios, a maior razão parte aérea/ raiz para o tratamento NP + Mo em relação ao tratamento NP+NC (contraste 2 vs. 3) indica que o molibdênio, possivelmente promoveu um melhor uso do nitrogênio do solo (redução do nitrato) e da FBN (estimulação de estipes nativas) (VIEIRA et al., 1998a, b), resultando em um aumento crescimento da parte aérea em relação às raízes. Esse resultado é reforçado pela significância marginal (5-10%) desse mesmo contraste para massa de parte aérea seca (Tabela 2). Já em Viçosa, a ausência de N no plantio reduziu a razão parte aérea/ raiz e a massa de parte aérea seca (contraste 1 vs. 2-5).

Apesar da falta de significância dos contrastes sobre a produtividade, alguns contrastes tiveram efeito significativo sobre massa de 100 grãos em Oratórios e Viçosa. Em Oratórios, as plantas coinoculadas com *R. tropici* + *A. brasilense* apresentaram maior massa de 100 grãos em relação às plantas inoculadas apenas com *R. tropici* (contraste 4 vs. 5). Em Viçosa, as plantas que receberam os microrganismos apresentaram maior massa de 100 sementes, quando comparadas às plantas que não receberam esses microrganismos (contraste 2,3 vs. 4,5).

Esse resultado indica que além de melhorar nutrição nitrogenada de leguminosas, *R. tropici* e *A. brasilense* podem ter aumentado a síntese de fitormônios. *Rhizobium* sp. pode sintetizar ácido indolacético (CASSÁN et al., 2009; COATTI et al., 2015), um tipo de auxina. *Azospirillum* sp. pode sintetizar auxinas (SPAEPEN et al., 2008; MASCIARELLI et al., 2013), giberelinas, citocininas, etileno (PERRING et al., 2007; GÓMES et al., 2015) e ácido abscísico (COHEN et al., 2008). Em Oratórios, o aumento da massa de grãos pode ter sido resultado da ação conjunta de *R. tropici* + *A. brasilense* ou ação individual de *A. brasilense*, visto a significância do contraste 4 vs. 5. Em Viçosa esse aumento foi resultado da ação individual de *R. tropici*, visto a falta de significância do contraste 4 vs. 5.

Assim como a nutrição nitrogenada, a estimulação da síntese de hormônios vegetais também pode aumentar o crescimento vegetal (SPAEPEN et al., 2007; COATTI et al., 2015). Auxinas, giberelinas e citocininas participam do crescimento e do desenvolvimento das sementes da planta (CHENG et al., 2002; GUTIERREZ et al., 2007, TAIZ et al., 2017).

Em Viçosa, a significância do contraste 2,3 vs. 4,5 para número e massa de nódulos mostra que a coinoculação aumentou a nodulação das plantas que receberam os microrganismos. Contudo, a significância do contraste 4 vs. 5 indica que o rizóbio teve maior efeito sobre a nodulação e que a adição do *A. brasilense* teve efeito negativo sobre essa nodulação. Resultados de Burdman et al. (1997) em condições controladas, sugerem que a nodulação do feijão coinoculado com *Rhizobium* spp. e *Azospirillum* spp. pode ser afetada pela concentração dos microrganismos.

No entanto, em Viçosa, a redução da nodulação com a coinoculação dos dois microrganismos não afetou a produtividade das plantas em relação à inoculação, apenas. Um tratamento de coinoculação (2 doses de *R. tropici* + 2 doses de *A. brasilense*) nas sementes, também foi testado por Souza e Ferreira (2017) em sete experimentos na região do Cerrado no Brasil, mas sem avaliação da nutrição molibídica.

Esses autores só verificaram redução significativa da massa de nódulos na coinoculação (2 doses de *R. tropici* + 2 doses de *A. brasilense*) em relação à inoculação (2 doses de *R. tropici*) em apenas em um experimento. Nos nossos experimentos houve redução de nodulação com a coinoculação em Viçosa, mas não em Oratórios. Logo sugere-se que a massa nodular pode se comportar de maneira diferente, nas comparações entre inoculação e coinoculação dependendo das condições edafoclimáticas do local.

Souza e Ferreira (2017) concluíram com a análise geral dos dados, para àquelas condições, que a coinoculação com os dois microrganismos aumentou a nodulação (massa e número de nódulos) e a produtividade em relação à inoculação apenas com *R. tropici*. Mas isso foi possível com a inoculação de 2 doses de *R. tropici* na semente e o uso de 3 doses de *A. brasilense* pulverizado nas folhas no estágio V2/ V3 das plantas. Com esse tratamento os autores obtiveram produtividade de grãos 26% maior que o tratamento com inoculação de *R. tropici* e 5% maior que o tratamento nitrogenado (com 80 kg ha⁻¹ de N/ não inoculado).

Entretanto, gostaríamos de destacar, através da observação dos dados individuais de cada experimento desses autores, que as diferenças nas produtividades entre o tratamento que recebeu *A. brasilense* coinoculado em pulverização na folha (3 doses) foi significativamente superior à coinoculação *A. brasilense* nas sementes (2 doses) em quatro dos sete experimentos. Em ambos os tratamentos (inoculado e coinoculado) *R. tropici* (2 doses) foi veiculado nas sementes. Nós não testamos o uso da coinoculação com *A. brasilense* pulverizado sobre as folhas no estágio V2/ V3 porque entendemos que essa prática oneraria mais o custo de produção da cultura. Uma sugestão para pesquisas futuras é a avaliação de doses alternadas desses microrganismos sobre as sementes em mais ambientes, para que possamos entender melhor o comportamento da coinoculação de *R. tropici* + *A. brasilense* sobre o feijão.

Também é importante destacar que o efeito dessa coinoculação também depende do genótipo do feijão (REMANS et al., 2008). Esse é o primeiro trabalho científico, em que se que se comparou a inoculação com *R. tropici* vs. inoculação conjunta (*R. tropici* + *A. brasilense*) associada à pulverização de Mo foliar na cultivar “Ouro Vermelho”.

Apesar de os tratamentos não terem influenciado a produtividade nossos resultados fomentam a literatura com informações importantes sobre coinoculação de *R. tropici* + *A. brasilense* associada à pulverização de Mo foliar para o feijão na região da Zona da Mata Mineira. Nada obstante, trabalhos são necessários em solos com deficiência de N para melhor avaliar os efeitos da coinoculação em associação com Mo.

6 CONCLUSÕES

A coinoculação de *R. tropici* x *A. brasilense* associada à adubação molíbdica não influenciou a produtividade do feijão. Trabalhos são necessários em solos com deficiência de N para melhor avaliar os efeitos da coinoculação em associação com Mo

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, C.A.; LOPES, A.S.; SANTOS, G. 2007. Micronutrientes. In: NOVAIS R.F.; ALVAREZ, V.V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa: SBCS/ UFV, 2007. p.645-736.

ALMEIDA, F.F.D.; ARAÚJO, A.P.; ALVES, B.J.R. Seeds with high molybdenum concentration improved growth and nitrogen acquisition of rhizobium-inoculated and nitrogen-fertilized common bean plants. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.37, p.367-378, 2013.

ASCHER, J.S.; GRAHAM, R.D.; ELLIOTT, D. E.; SCOTT, J.M.; JESSOP, R.S. Agronomic value of seed with high nutrient content. In: D.A. SAUNDERS; G.P. HETTEL (Ed.). **Wheat in heat stressed environments: irrigated dry areas and rice wheat farming systems**. Mexico: CIMMYT, 1994. p.297-308.

AMANE, M.I.V.; C. VIEIRA, R.F.; NOVAIS, G.A.A. ARAÚJO. Common bean fertilization with nitrogen and molybdenum at Zona da Mata of Minas Gerais State. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.23, p.643-650, 1999.

ANDA - Associação Nacional para Difusão de Adubos. **Setor de Fertilizantes: Anuário estatístico 2017**. Disponível em: <http://www.anda.org.br/>. Acesso em 18 de abril de 2020.

ANPII – Associação Nacional de Produtores e Importadores de Inoculantes. **Estatística**. 2018. Disponível em: <<http://www.anpii.org.br/estatisticas/>>. Acesso em: 17/07/2020

ARAÚJO, F.F.; MUNHOZ, R.E.V.; HUNGRIA, M., 1996. Initial nodulation in seven bean cultivars inoculated with two *Rhizobium* strains. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.31, 435-443, 1996.

BERGER, P.G.; VIEIRA, C.; ARAÚJO, G.A.A. Efeitos de doses e épocas de aplicação do molibdênio sobre a cultura do feijão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.31, p.473-480, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº13, de 24 de março de 2011. Aprova as normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura, bem como as relações dos micro-organismos autorizados e recomendados para produção de inoculantes no Brasil. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, 25 mar. 2011. Seção 1, p.3-7.

BODDEY, R.M.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I; DOBEREINER, J. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field-grown wheat. **Plant and Soil**, v.95, p.109-121, 1986.

BURDMAN, S.; KIGEL, J.; OKON, Y. Effects of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.923-929, 1997.

CAMACHO, M.; SANTAMARIA, C.; TEMPRANO, F., RODRIGUEZ-NAVARRO, D. N.; DAZA, A. Co-inoculation with *Bacillus* sp. CECT 450 improves nodulation in *Phaseolus vulgaris* L. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, n.11, p.1058-1062, 2001.

CARNEIRO, J. E.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. **Feijão: do plantio à colheita**. Viçosa: UFV, 2014, 384p.

CASSAN, F.; PERRIG, D.; SGROY, V.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; LUNA, V. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* Journal L.). **European of Soil Biology**, p.28-35, 2009.

CHENG, W.H.; ENDO, A.; ZHOU, L.; PENNEY, J.; CHEN, H. C.; ARROYO, A.; LEON, P.; NAMBARA, E.; ASAMI, T.; SEO, M.; KOSHIBA, T.; SHEEN, J. A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. **The Plant Cell**, v.14, p.2723-2743, 2002.

COATTI, G.C., ANDRADE, D.S.; CARDOSO, J.D.; MATOS, M.A. Produção de AIA e diversidade fenotípica de estirpes elite de rizobio isoladas de feijão. **Journal of Health Sciences**, v.66, p.23-30, 2015.

COBRA NETTO, A.; ACCORSI, W. R.; MALAVOLTA, E. Estudos sobre a nutrição mineral do feijão (*Phaseolus vulgaris* L., var. Roxinho). **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v.28, p.257-274, 1971.

COHEN, A.C.; BOTTINI, R.; PICCOLI, P.N. *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants. **Plant Growth Regulation**, v.54, p.97-103, 2008.

DALL'AGNOL, R.F.; RIBEIRO, R.A.; DELAMUTA, J.R.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; ROGEL, M.A.; ANDRADE, D.S.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. *Rhizobium paranaense* sp. nov., na effective N₂-fixing symbiont of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with broad geographical distribution in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.64, p.3222-3229, 2014.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. **Dados conjunturais da produção de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) no Brasil (1985 a 2018): área, produção e rendimento**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2019. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>>. Acesso em: 18 de abril de 2020.

FERREIRA, E.P.B.; MERCANTE, F.M.; HUNGRIA, M.; MENDES, I.C.; ARAÚJO, J. L. S.; FERNANDES JÚNIOR, P.I.; ARAÚJO, A.P. Contribuição para melhoria da eficiência da fixação biológica de nitrogênio no feijão-comum no Brasil. In: ARAÚJO, A.P.; ALVES, B.J.R. (Ed.). **Tópicos em Ciência do Solo v.3**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2013. p.251-291.

FIGUEIREDO, M.A.D.; OLIVEIRA, D.P.; SOARES, B.L.; MORAIS, A.R.D.; MOREIRA, F.M.D.S; ANDRADE, M.J.B.D. Nitrogen and molybdenum fertilization and inoculation of common bean with *Rhizobium* spp. in two oxisols. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.38, p.85-92, 2016.

GEORGE, T.; SINGLETON, P.W. Nitrogen assimilation traits and dinitrogen fixation in soybean, and common bean. **Agronomy Journal**, v.84, p.1020-1028, 1992.

GRAHAM, P.H. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: a review. **Field crops research**, v.4, p.93-112, 1981.

GRAHAM, P.H.; VANCE, C.P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. **Field Crops Research**, v.65, p.93-106, 2000.

GÓMEZ, M.M.; E.C. MERCADO; E.G. PINEDA. Azospirillum una rizobacteria con uso potencial en la agricultura. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, v.16, p.11-18, 2015.

GUTIERREZ, L.; WUYTSWINKEL, O. van; CASTELAIN, M.; BELLINI, C. Combined networks regulating seed maturation. **Trends in plant science**, v.12, p.294-300, 2007.

HAAG, H.P.; MALAVOLTA, E.; GARGANTINI, H.; GARCIA BLANCO, H. Absorção de nutrientes pela cultura do feijão. **Bragantia**, v.26, p.381-391, 1967.

HERRIDGE, D.F.; PEOPLES, M.B.; BODDEY, R.M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and soil**, v.311, p.1-18, 2008.

HILDEBRAND, C. **Manual de métodos de análise químicas de solo e plantas**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1976. 225p.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; CHUEIRE, L.M.O.; PROBANZA, A.; GUTTIERREZ-MAÑERO, F.J.; MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.32, p.1515-1528, 2000.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Soils**, v.39, p.88-93, 2003.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v.331, p.413-425, 2010.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 38 p. (Embrapa Soja. Documentos, 325).

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A.; ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v.49, p.791-801, 2013a.

HUNGRIA, M.; MENDES, I. C.; MERCANTE, F.M. **Tecnologia de fixação biológica do nitrogênio com o feijão**: viabilidade em pequenas propriedades familiares e em propriedades tecnificadas. Londrina, PR: Embrapa Soja, 2013b. 30p. (Embrapa Soja. Documentos, 338).

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v.65, p.151-164, 2000.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; ARAÚJO, R.S. Fixação Biológica do nitrogênio em feijão. In: VARGAS, MAT; HUNGRIA, M. (Ed.). **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 1997, p.187-294.

ITZIGSOHN, R.; KAPULNIK, Y.; OKON, Y.; DOVRAT, A. Physiological and morphological aspects of interactions between *Rhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*) in association with *Azospirillum brasilense*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.39, p.610-615, 1993.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M. Diversity and importance of diazotrophic bacteria to agricultural sustainability in the tropics. In: **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**. Springer: Cham, 2017. p.269-292.

KROUK, G.; LACOMBE, B.; BIELACH, A.; PERRINE-WALKER, F.; MALINSKA, K.; MOUNIER, E.; HOYEROVA, K.; TILLARD, P.; LEON, S.; LJUNG, K.; ZAZIMALOVA, E.; BENKOVA, E.; NACRY, P.; GOJON, A. Nitrate-regulated auxin transport by NRT1. 1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants, **Developmental Cell**. v.18, p.927-937, 2010.

LARA-CABEZAS, W.A.R.; KORNDORFER, G.; MOTTA, S.A. Volatilização de N NH₃ na cultura de milho: I. Efeito da irrigação e substituição parcial da ureia por sulfato de amônio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.21, p.481-487, 1997.

LICKER, R.; JOHNSTON, M.; FOLEY, J. A.; BARFORD, C.; KUCHARIK, C. J.; MONFREDA, C.; RAMANKUTTY, N. Mind the gap: how do climate and agricultural management explain the 'yield gap' of croplands around the world?. **Global Ecology and Biogeography**, v.19, p.769-782, 2010.

MALAVOLTA, E.A.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas**: princípios e aplicações. Piracicaba, Potafos, 1997. 201p.

MAJDA, C.; KHALID, D.; AZIZ, A.; RACHID, B.; BADR, A.S.; LOTFI, A.; MOHAMED, B. Nutri-priming as an efficient means to improve the agronomic performance of molybdenum in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Science of The Total Environment**, v.661, p.654-663, 2019.

MASCIARELLI, O.; URBANI, L.; REINOSO, H.; LUNA, V. Alternative mechanism for the evaluation of indole-3-acetic acid (IAA) production by *Azospirillum brasilense* strains and its effects on the germination and growth of maize seedlings. **Journal of Microbiology**, v.51, p.590-597, 2013.

MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F. M.; FRANCO, A.A.; GRAHAM, P.; PARDO, M. A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, p.417-426, 1991.

MENDEL, R.R.; HÄNSCH, R. Molybdoenzymes and molybdenum cofactor in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.53, n.375, p.1689-1698, 2002.

MERCANTE, F.M.; TEIXEIRA, M.G.; ABBOUD, A.C.S.; FRANCO, A.A. Avanços biotecnológicos na cultura do feijão sob condições simbióticas. **Revista Universidade Rural. Série Ciências da Vida**, v.21, p.127-146, 1999.

MOURA, A.D.; BRITO, L.M. Aspectos Socioeconômicos. In: CANEIRO, J.E.S; PAULA JÚNIOR, T.J.; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão: do plantio à colheita**. Viçosa: UFV, 2015. p.16-36.

NASCENTE, A.S.; CARVALHO, M.C.S.; MELO, L.C.; ROSA, P.H. Nitrogen management effects on soil mineral nitrogen, plant nutrition and yield of super early of super cycle common bean genotypes. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.26, p.369-378, 2017.

OKON, Y., LABANDERA-GONZALEZ, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v.26, p.1591-1601, 1994.

OKON, Y.; KAPULNIK, Y. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. **Plant and soil**, v.90, p.3-16, 1986.

PACHECO, R.S.; BRITO, L.F.; STRALIOTTO, R.; PÉREZ, D.V.; ARAÚJO, A.P. Seeds enriched with phosphorus and molybdenum as a strategy for improving grain yield of common bean crop. **Field Crops Research**, v.136, p.97-106, 2012.

PATE, J.S.; LAYZELL, D.B.; ATKINS, C.A. Economy of carbon and nitrogen in a nodulated and nonnodulated (NO₃-grown) legume. **Plant Physiology**. v.64, p.1083-1088, 1979.

PESSOA, A.C.S.; RIBEIRO, A.C.; CHAGAS, J.M.; CASSINI, S.T.A. Molybdenum leaf concentration and nutrient accumulation by *common beans* "Ouro Negro" in response to leaf molybdenum application. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.24, p.75-84, 2000.

PELEGRIN, R.; MERCANTE, F.M.; OTSUBO, I.M.N.; OTSUBO, A.A. Resposta da cultura do feijão à adubação nitrogenada e à inoculação com rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.33, p.219-226, 2009.

PERRIG, D.; BOIERO, M.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; RUIZ, O.; CASSÁN, F.; LUNA, V. Plant growth regulators production by two agronomical used strains of *Azospirillum brasilense*, and possible implications to inoculants formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.75, 1143-1150. 2007.

RAIJ, B. van. **Fertilidade do solo e manejo dos nutrientes**. 2 ed. Piracicaba: International Plant Nutrition Institute, 2017. 420p.

RAPOSEIRAS, R.; MARRIEL, I.E.; MUZZI, M.R.S.; PAIVA, E.; PEREIRA FILHO, I.A.; CARVALHAIS, L.C.; PASSOS, R.V.M.; PINTO, P.P.; SÁ, N.M.H. Rhizobium strains competitiveness on bean nodulation in Cerrado soils. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.41, p.439-447, 2006.

REMANS, R.; RAMAEKERS, L.; SCHELKENS, S.; HERNANDEZ, G.; GARCIA, A.; REYES, J.L.; MENDEZ, N.; TOSCANO, V.; MULLING, M.; GALVEZ, 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 and soil**, v.312, n.1-2, n.25-37, 2008.

RIBEIRO, A.C.; GUIMARÃES, P.T.G.; ALVAREZ V.; H.V. **Recomendações para uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais. 5ª Aproximação**. Viçosa, MG: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais – CFSEMG, 1999. 359p.

ROBERTS, W.O. Prevention of mineral deficiency by soaking seed in nutrient solution, **Journal of Agricultural Science**, v. 38, p.458-468, 1948.

ROCHETTE, P.; ANGERS, D.; CHANTINI, M.H.; MacDONALD, J.D.; GASSER, M.; BERTRAND, N. Reducing ammonia volatilization in a no-till soil by incorporating urea and pig slurry in shallow bands. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v.84, p.71-80, 2009.

SANGOI, L.; ERNANI, P.R.; LECH, V.A.; RAMPAZZO, C. Volatilização de N-NH₃ em decorrência da forma de aplicação de ureia, manejo de resíduos e tipo de solo, em laboratório. **Ciência Rural**, v.33, p.87-692, 2003.

SARIG, S.; KAPULNIK, Y.; OKON, Y. Effect of *Azospirillum* inoculation on nitrogen fixation and growth of several winter legumes. **Plant and Soil**, v.90, p.335-342, 1986.

SCOTT, J.M.; BLAIR, G. Phosphorus seed coatings for pasture species. Effect of source and rate of phosphorus on emergence and early growth of phalaris (*Phalaris aquatica* L.) and lucerne (*Medicago sativa* L.), **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 39, p.437-445, 1988.

SCOTT, J.M.; MITCHELL, C.J.; BLAIR, G.J. Effect of nutrient seed coating on the emergence and early growth of perennial ryegrass. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 36, p.221-231, 1985.

SFREDO, G. J.; BORKET, C.M.; CASTRO, C. Efeito de micronutrientes sobre a produção de soja em três solos do Paraná. **Informações Agronômicas**, v.75, p.2-3, 1996.

SILCOCK, R.G.; SMITH, F.T. Seed coating and localized application of phosphate for improving seedling growth of grasses on acid, sandy red earths. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.33, p.785-802, 1982.

SINGH, U. Integrated nitrogen fertilization for intensive and sustainable agriculture. In: BASRA A., GOYAL S., TISHNER R. (Ed.). **Enhancing the efficiency of nitrogen utilization in plants**. Journal of Crop Improvement. Food Product Press, The Haworth Press Inc, 2005. p.213–257.

SPAEPEN, S.; DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; VANDERLEYDEN, J. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. **Plant and Soil**, v.312, p.15-23, 2008.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v.31, p.425-448, 2007.

SOARES, B.L.; FERREIRA, P.A.A.; RUFINI, M.; MARTINS, F.A.D.; OLIVEIRA, D.P.; REIS, R.P.; ANDRADE, M.J.B.; MOREIRA, F.M.D.S. Agronomic and economic efficiency of common-bean inoculation with rhizobia and mineral nitrogen fertilization. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.40, 2016.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; NÁJERA, R.; OLIVERA, H.; SEGOVIA, L. Genetic rearrangements of a *Rhizobium phaseoli* symbiotic plasmid. **Journal of bacteriology**, v.167, p.487-491, 1986.

SOUZA, E.F.C.; SORATTO, R.P.; PAGANI, F.A. Nitrogen fertilization and rhizobium inoculation in common bean cultivated after corn intercropped with palisade grass. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, p.370-377, 2011.

SOUSA, M.A.; OLIVEIRA, M.M.; DAMIN, V.; BRITO FERREIRA, E.P. Productivity and Economics of Inoculated Common Bean as Affected by Nitrogen Application at Different Phenological Phases. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, 2020.

SOUZA, J.E.B.; FERREIRA, E.P.B. Improving sustainability of common bean production systems by co-inoculating rhizobia and azospirilla. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v.237, 250-257, 2017.

VALADÃO, F.C.A.; JAKELAITIS, A.; CONUS, L.A.; BORCHARTT, L.; OLIVEIRA, A.A.; VALADÃO JUNIOR, D.D. Seeds inoculation and nitrogen and molybdenum fertilization of common bean in Rolim de Moura, RO. **Acta Amazonica**, v.39, p.741-748, 2009.

VIANELLO, R.L.; ALVES, A.R. **Meteorologia básica e aplicações**. 2 ed. Viçosa: Editora UFV, 2012. 460p.

VIEIRA, C. Adubação mineral e calagem. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão**. 2 ed. Viçosa: UFV, 2006. p. 123-152.

VIEIRA, C.; NOGUEIRA, A.O.; ARAÚJO, G.A.A. Adubação nitrogenada e molíbdica na cultura do feijão. **Revista de Agricultura**, v.67, p.117-124, 1992

VIEIRA, R.F.; SALGADO, L.T.; FERREIRA, A.D.B. Performance of common bean using seeds harvested from plants fertilized with high rates of molybdenum. **Journal of Plant Nutrition**, v. 28, p.363-377, 2005.

VIEIRA, R.F.; CARDOSO, E.J.B.N.; VIEIRA, C.; CASSINI, S.T.A. Foliar application of molybdenum in *common beans*. I. Nitrogenase and reductase activities in a soil of high fertility. **Journal of Plant Nutrition**, v.21, 169-180, 1998a.

VIEIRA, R.F.; VIEIRA, C.; CARDOSO, E.J.B.N.; MOSQUIM, P.R. Foliar application of molybdenum in common bean. II. Nitrogenase and nitrate reductase activities in a soil of low fertility. **Journal of Plant Nutrition**, v.21, p.2141-2151, 1998b.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I.M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2017.

TIEN T.M.; GASKINS, M.H.; HUBBEL 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**, v.37, p.1016-1024, 1979.

WILLIAMS, R.J.P.; FRAUSTO DA SILVA, J.J.R. The involvement of molybdenum in life. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 292, 293-299, 2002

YAHALOM, E.; OKON, Y.; DOVRAT, A. *Azospirillum* effects on susceptibility to *Rhizobium* nodulation and on nitrogen fixation of several forage legumes. **Canadian Journal of Microbiology**, v.33, p.510-514, 1987.

8 APÊNDICE

Figura 1. Experimento de Oratórios (plantas aos 37 dias após a semeadura), 2017.



Figura 2. Experimento de Viçosa (plantas aos 41 dias após a semeadura), 2018.



Figura 3. Experimento de Viçosa (plantas aos 45 dias após a semeadura em estágio R6), 2018



Figura 4. Raiz - Planta em estágio R6 (45 dias após a semeadura). Tratamento N plantio + Molibdênio + *R. tropici* (Semia 4077 + 4088). Destaque para a nodulação na raiz. Experimento de Viçosa, 2018.