

Projeto Agrisus No: 1094/30

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

Interessado: Daiene Camila Dias Chaves Corsini

Instituição: Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira.

Avenida Brasil, 56

Bairro: Centro

15385-000 - Ilha Solteira, SP

Telefone: (18) 3743-1000

daieneagro@gmail.com

Local da Pesquisa: Fazenda de Ensino e Pesquisa – UNESP - Selvíria, MS

Valor financiado pela Fundação Agrisus: R\$ 17.750,00

Vigência do Projeto: 22/01/13 a 01/04/14

---

## RELATÓRIO PARCIAL DA PESQUISA:

### 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).

Porém a utilização e adaptação dessa cultura em um sistema de cultivo agrícola, como o do plantio direto, que visa a sustentabilidade na produção e desperta interesse e a adoção tanto dos pesquisadores como dos produtores, é crescente.

De acordo com Lemos et al. (2008) neste sistema, talvez ocorra a necessidade de utilizar doses

de N elevadas em função da velocidade na taxa de decomposição e da relação C/N da palha, refletindo no processo de imobilização do N, promovendo competição dos microrganismos com o feijoeiro, principalmente nos estádios iniciais de desenvolvimento da palha, sendo o N o nutriente mais absorvido e extraído, limitando assim a produtividade da cultura.

O feijoeiro é uma planta bastante exigente em nutrientes e, em razão do ciclo curto, necessita de que eles estejam prontamente disponíveis nos momentos de maior demanda para não limitar a produtividade de grãos (SILVA e SILVEIRA, 2000), portanto, o desenvolvimento da lavoura de feijão e a produção de grãos dependem de um adequado suprimento de nutrientes (KANEKO et al., 2010).

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 e MELLO, 2011). Segundo Reis Junior et al. (2010), 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), que são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico e fornecê-lo à cultura; é um mecanismo biológico capaz de substituir, pelo menos parcialmente, a adubação nitrogenada resultando numa diminuição dos custos com adubação nitrogenada (HUNGRIA et al., 1997).

Straliotto (2002) destaca que o feijoeiro quando inoculado com o rizóbio, pode chegar a gerar produtividade entre 1.500 e 2.000 kg ha<sup>-1</sup>, e quando a suplementação com o adubo nitrogenado é realizada na época do florescimento, permite um aumento no crescimento dos nódulos e maior fixação biológica, fazendo com que o patamar de produção supere os 3000 kg ha<sup>-1</sup>.

Portanto, existe ainda a possibilidade de fazer complementações com N mineral ao uso do rizóbio, porém, muitos autores enfatizam que ao utilizar-se desta prática, está deve ser feita com cautela, uma vez que doses em excesso tanto na semeadura como em cobertura podem causar uma diminuição na eficiência simbiótica (FERREIRA, et al. 2000 e VENTURINI, et al. 2002).

De acordo com Rosolem (1987), pequenas quantidades de nitrogênio aplicadas ao solo permitem um aumento no crescimento dos nódulos e maior fixação do nitrogênio, sendo que níveis muito baixos de nitrato no solo podem ser limitantes à atividade simbiótica. A adição de elevadas quantidades de nitrogênio afeta inicialmente o número e peso de nódulos, mas não inibe o seu desenvolvimento e a fixação simbiótica de nitrogênio (RUSCHEL e RUSCHEL, 1975 e RUSCHEL e SAITO, 1977).

Porém, 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 devido ao processo de nodulação ser considerado lento (CHAVERRA e GRAHAM, 1992 e SCHRODER, 1992).

Como alternativa, a utilização de *Azospirillum* juntamente com *Rhizobium* spp, pode melhorar o desempenho do *Rhizobium* na inoculação do feijoeiro. Na literatura existem vários trabalhos confirmando que o *Azospirillum* 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* e *Rhizobium*, em relação ao desenvolvimento e crescimento das plantas, podem ser atribuídas devido a nodulação precoce, um aumento no número de nódulos, e uma melhora geral no desenvolvimento do sistema radicular (VOLPIN e KAPULNIK, 1994). Segundo Hungria (2011) o maior desenvolvimento das raízes pela inoculação com *Azospirillum* pode implicar em vários outros efeitos. Já foram relatados incrementos na absorção da água e minerais, maior tolerância a estresses como salinidade e seca, resultando em uma planta mais vigorosa e produtiva (HUNGRIA, 2011).

De acordo com Steffens (2011), experimentos de inoculação a campo revelaram que o gênero *Azospirillum* sp., além da fixação biológica do nitrogênio, promove ganhos em rendimento e no aumento da superfície da absorção das raízes da planta. Isso ocorre porque a inoculação modifica a morfologia do sistema radicular, alterando o número de radículas e o diâmetro médio das raízes laterais.

De acordo com Figueiredo et al. (2010) a utilização de bactérias promotoras de crescimento de

plantas (BPCPs), para o aumento da produção agrícola, será provavelmente uma das táticas mais importantes para a atualidade no mundo. Pois 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).

De acordo com os dados disponíveis na literatura, é possível que a utilização da inoculação de sementes com *Azospirillum* e *Rhizobium* pode ser benéfico 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.

## 2. MATERIAIS & MÉTODOS

### a. Experimento em campo

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.

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 1370mm, a temperatura média anual é de 23,5°C e a umidade relativa do ar está entre 70 e 80% (média anual).

As características químicas do solo foram determinadas antes da instalação do experimento, seguindo a metodologia proposta por RAIJ e QUAGGIO (1983). A adubação básica nos sulcos de semeadura foi realizada levando-se em consideração as características químicas do solo e as recomendações de AMBROSANO et al. (1996).

O experimento foi instalado em área anteriormente ocupada com milho. Foram coletadas amostras para obtenção da produção de massa seca de plantas, antes da semeadura do feijão, por meio de amostragens aleatórias em oito pontos da área experimental, utilizando um quadrado com 0,25m<sup>2</sup> de área. As amostras foram colocadas para secagem, em estufa de circulação forçada de ar a

temperatura de 65°C, posteriormente foi realizada a pesagem e os dados transformados em kg ha<sup>-1</sup>.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados disposto em um esquema fatorial 4x5. Os tratamentos foram constituídos pela inoculação de sementes (T1 – testemunha, T2 – *Azospirillum brasilense*, T3 – *Rhizobium tropici*, T4 - *Azospirillum brasilense* + *Rhizobium tropici*) e por cinco diferentes doses de nitrogênio (0, 30, 60, 90 e 120kg ha<sup>-1</sup>). As parcelas foram cultivadas com 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.

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 no tratamento de sementes com as doses recomendadas de *Azospirillum brasilense* (100 g do inoculante para cada 25 kg de semente) e de *Rhizobium tropici* (100 g do inoculante para cada 25 kg de semente), tanto para os tratamentos com as bactérias isoladas como para a utilização destas em conjunto. As estirpes utilizadas para a inoculação de *Azospirillum brasilense* foram AbV5 e AbV6 com 2x10<sup>8</sup> Ufc/g e para *Rhizobium tropici* SEMIA 4080 2x10<sup>8</sup> células viáveis/g, 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 abril de 2012, em campo em espaçamento de 0,50m entrelinhas e 12 plantas/m.

Foram realizadas as seguintes avaliações em campo:

- **Massa da matéria seca inicial da cobertura vegetal:**

Imediatamente após a passagem do desintegrador mecânico foi realizada a avaliação da produção de massa da matéria seca da cobertura vegetal, por meio de amostragens utilizando-se um quadrado de arame com 0,25m<sup>2</sup> de área. A coleta do material vegetal foi feita de maneira aleatória em quatro pontos de cada parcela. 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<sup>-1</sup>.

• **População de plantas:** aproximadamente 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  $\text{ha}^{-1}$ .

• **Nitrogênio Foliar:** as folhas das plantas coletadas para avaliação anterior, na fase de desenvolvimento  $R_6$  (florescimento), foram moídas em moinho tipo Wiley para em seguida serem submetidas à digestão sulfúrica, conforme metodologia proposta por Malavolta et al. (1997).

• **Massa seca de parte aérea:** foram determinada através da separação da parte aérea das plantas na ocasião de florescimento pleno da cultura. A parte aérea 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  $\text{g planta}^{-1}$ .

• **Índice de clorofila foliar:** a estimativa do teor médio de clorofila foliar foi realizada em condições de campo na fase de desenvolvimento  $R_6$  (florescimento), com a utilização de clorofilômetro portátil marca ClorofiLOG<sup>®</sup>, modelo CFL 1030 (Falker Automação Agrícola<sup>®</sup>), 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.

• **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 através da relação do número total de vagens/número de plantas; **número de grãos por planta:** foi obtido através da relação do número total de grãos/número de plantas;

• **Massa da matéria seca final da cobertura vegetal:** Após a colheita do feijão será realizada a avaliação da produção de massa da matéria seca da cobertura vegetal, por meio de amostragens utilizando-se um quadrado de arame com 0,25m<sup>2</sup> de área. A coleta do material vegetal será feita de

maneira aleatória em quatro pontos de cada parcela. Após a secagem, em estufa de circulação forçada de ar a temperatura de 65°C, será realizada a pesagem e os dados transformados em kg ha<sup>-1</sup>.

Serão realizadas as seguintes avaliações

• **Componentes da produção: número médio de grãos por vagem:** será calculado através da relação do número total de grãos/número total de vagens; **massa de 100 grãos:** será obtido através da coleta ao acaso e pesagem de 2 amostras de 100 grãos por parcela;

• **Rendimento de grãos:** as plantas da área útil de cada parcela serão arrancadas e deixadas para secagem a pleno sol. Após a secagem, as mesmas serão submetidas a trilha mecânica, os grãos serão pesados e os dados transformados em kg ha<sup>-1</sup> (13 % base úmida);

• **Ciclo:** será avaliado o número de dias transcorridos entre a emergência e a colheita.

**Nitrogênio dos grãos:** após a colheita, os grãos serão moídos em moinho tipo Wiley para em seguida serem submetidos à digestão sulfúrica, conforme metodologia proposta por Malavolta et al. (1997).

#### **b. Experimento em laboratório**

O experimento será instalado em Casa de Vegetação pertencente ao Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Socio-Economia, em Ilha Solteira com coordenadas geográficas 51°20'33" longitude oeste e 20°25'58" latitude sul, e altitude de aproximadamente 335 metros.

Serão utilizados vasos com capacidade de 10 litros de solo, com os mesmos tratamentos descritos para o experimento em campo, porém com 3 repetições. Como substrato será utilizado o solo da área experimental.

Foram realizadas as seguintes avaliações em laboratório:

• **Índice de clorofila foliar:** A estimativa do teor médio de clorofila foliar foi realizada em condições de campo na fase de desenvolvimento R<sub>6</sub> (florescimento), com a utilização de clorofilômetro portátil marca ClorofiLOG<sup>®</sup>, modelo CFL 1030 (Falker Automação Agrícola<sup>®</sup>), 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 (vaso), em três plantas e com os dados obtidos destas medições obteve-se a média por parcela (vaso).

- **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. 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 planta<sup>-1</sup>.

- **Nitrogênio foliar:** As folhas das plantas coletadas para avaliação anterior, na fase de desenvolvimento R<sub>6</sub> (florescimento), foram moídas em moinho tipo Wiley para em seguida serem submetidas à digestão sulfúrica, conforme metodologia proposta por Malavolta et al. (1997).

- **Número de nódulos:** o solo foi coletado no vaso contemplando todo o volume de solo presente no vaso, na fase de desenvolvimento R<sub>6</sub> (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.

- **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 foi obtido a massa de nódulos.

Serão realizadas as seguintes avaliações:

- **Quantificação de bactérias endofíticas diazotróficas: *Azospirillum* sp.:** A estimativa do número de bactérias do gênero *Azospirillum* spp. em associação com o solo da rizosfera de plantas de feijão será determinada pelo método descrito por Döbereiner et al. (1995) na fase de desenvolvimento R<sub>6</sub> (florescimento). Será utilizado o meio de cultura NFb, que é semi-seletivo para o isolamento de *Azospirillum* sp. Amostras de solo serão diluídas em solução salina 0,85%, agitadas em agitador horizontal e diluídas serialmente, de 10<sup>-2</sup> até 10<sup>-7</sup>. Serão retiradas alíquotas diluídas e inoculadas nos frascos com meio de cultura. Os frascos serão incubados a 30 °C e após 5 dias o



crescimento bacteriano será avaliado verificando-se o aparecimento de película característica. O número populacional será obtido com o uso da tabela de Mc Crady, tomando-se por base o número de frascos positivos.

As amostras para as avaliações de número de nódulos, massa de nódulos, quantificação de bactérias endofíticas diazotróficas - *Azospirillum* sp, e massa de sistema radicular, serão acondicionadas em câmara fria para conservação das mesmas.


Os dados serão submetidos ao teste F da análise de variância. Quando constatada interação significativa entre as fontes de variação, procederá o desdobramento, comparando as médias dos tratamentos com inoculação pelo teste de Tukey, adotando-se o nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ), de acordo com Pimentel Gomes e Garcia (2002).

O efeito das doses de nitrogênio será analisado por regressão polinomial, ajustando-se modelos de equações lineares e quadráticas significativas pelo teste F ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ), para melhor discussão dos resultados.

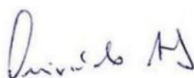
### 3. RESULTADOS E SUA DISCUSSÃO

Algumas avaliações do experimento estão sendo realizadas, e devido à isso os dados já obtidos não foram tabulados e analisados.

01 de setembro de 2013



Daiene Camila Dias Chaves Corsini  
Coordenador do projeto



Orivaldo Arf  
Orientador