

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

ALEXANDRA DE ANDRADE SANTOS

**OTIMIZAÇÃO DA FBN E RESPOSTA ANTIOXIDATIVA DO FEIJÃO-
CAUPI (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) COM E SEM ESTRESSE
SALINO**

**Recife
2017**

Alexandra de Andrade Santos

Engenheira Agrônoma

Otimização da FBN e resposta antioxidativa do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) com e sem estresse salino

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Agronomia – Ciências do Solo.

Orientadora: Dra. Márcia do Vale Barreto Figueiredo

Coorientadores: Dra. Adália Cavalcanti do Espírito Santo Mergulhão

Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira

**Recife
2017**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

S237o Santos, Alexandra de Andrade
Otimização da FBN e resposta antioxidativa do feijão-caupi
(*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) com e sem estresse salino / Alexandra
de Andrade Santos. – 2017.
138 f. : il.

Orientadora: Márcia do Vale Barreto Figueiredo.

Coorientadores: Adália Cavalcanti do Espírito Santo Mergulhão
e Joaquim Albenísio Gomes da Silveira.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo,
Recife, BR-PE, 2017.

Inclui referências, apêndice(s) e anexo(s).

1. BPCP 2. ERO's 3. Sinergismo 4. Leguminosas 5. Salinidade
I. Figueiredo, Márcia do Vale Barreto, orient. 6. Fixação N2
II. Mergulhão, Adália Cavalcanti do Espírito Santo, coorient.
III. Silveira, Joaquim Albenísio Gomes da, coorient. IV. Título

CDD 631.4

ALEXANDRA DE ANDRADE SANTOS

Otimização da FBN e resposta antioxidativa do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) com e sem estresse salino

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Agronomia – Ciências do Solo.

Aprovada em 23 de fevereiro de 2017

Dra. Márcia do Vale Barreto Figueiredo
Orientadora
Instituto Agrônômico de Pernambuco – IPA

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Artenisa Cerqueira Rodrigues
Universidade Federal do Piauí – UFPI/ Departamento de Engenharia Agrícola e Solos (DEAS/CCA)

Profa. Dra. Giselle Gomes Monteiro Fracetto
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE/ Departamento de Agronomia

Profa. Dra. Maria Betânia Galvão dos Santos Freire
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE/ Departamento de Agronomia

Profa. Dra. Janete Magali de Araújo
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE/ Departamento de Antibiótico

A Mainha e Vozinha

*Mulheres fortes e fiéis a Deus e que
dedicaram sua vida à família e a caridade.*

DEDICO E OFEREÇO

*Eu salvarei aqueles que me amam
e protegerei os que reconhecem
que eu sou Deus, o Senhor.
Quando eles me chamarem, eu
responderei e estarei com eles nas
horas de aflição. Eu os livrarei e
farei com que sejam respeitados.*

Salmo 91: 14-15

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, meu Senhor e Salvador, que me abençoou com sonhos incapazes de realizar sem Ele para me guiar e proteger.

Aos meus pais Graça e Mario e minha avó Luiza, pelo exemplo de dignidade, perseverança, amor e caridade, por ter me ajudado, apoiado e guiado sempre que precisei.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e ao programa de Pós-graduação em Agronomia – Ciência do Solo pela oportunidade e conhecimentos.

Ào Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), em especial ao Laboratório de Biologia do Solo, pela oportunidade de realizar este trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo durante o curso.

À minha orientadora e mãe científica Dra. Márcia do Vale Barreto Figueiredo pelo apoio, estímulo e ensinamentos.

Àos meus coorientadores Drs Adália Cavalcanti do Espírito Santo Mergulhão e Professor Joaquim Albenísio Gomes da Silveira pelo apoio, receptividade e ensinamentos.

Ào Dr. José de Paula Oliveira por todo apoio e ajuda para a realização deste trabalho.

À amiga e mãe Maria Vanilda dos Santos Santana que sempre esteve ao meu lado mesmo que distante.

Àos amigos do Laboratório de Biologia do Solo do IPA, Josemir Ferreira da Silva Junior, por ser meu braço direito, Maria do Carmo Barreto pela parceria e amizade, Carolina Kropniczki Gouveia minha fotografa particular, Luiza Bastos e Jadson Emmanuel Lopes Antunes, a todos pelo convívio, conversas, amizade, lanches e carinho.

Aos funcionários do IPA Drs. José Nildo Tabosa, Venézio dos Santos, Almira Galdino, Marilene Pimentel, Fabio Santana, Odemar Reis, Sr. Mario, e Fernando pelo constante apoio.

Aos Professores Drs. Maria Bethania Freire, Edivan Souza, Mateus Ribeiro Filho, Newton Stamford, Clístenes Nascimento, Valdomiro Souza Junior, Brivaldo Almeida, Caroline Biondi, Caroline Etienne, Ana Dolores Freitas, Giselle Fracetto, Emídio Oliveira e Julia Sobral pelos ensinamentos prestados.

Às Professoras Dras. Artenisa Rodrigues e Aurenivea Bonifácio pela amizade e empenho na realização deste trabalho.

Àos funcionários da UFRPE Josué (*in memoriam*) e Socorro Santana pela ajuda prestada.

A todos os amigos do LabPlant em especial a Elieser Araujo, Vicente Alencar, Jonatas Melo e Girlaine Martins, pela amizade e apoio nas realizações das análises.

À amiga Patricia Andrade que não me deixou desistir de tentar e vice-versa.

À amiga Emmanuella Vila Nova pelos primeiros 14 anos de amizade e companheirismo, sempre que precisar eu estarei com você.

À amiga Barbara Karina Wanderley que esteve ao meu lado, me ajudou quando pode, por todos os momentos bons e ruins que vivemos, que venha muitas viagens e sorrisos.

Às amigas Jordania Gabriel, Helen Araujo e Clice Mendonça pela confiança, acolhimento e amizade.

À minha avó Luiza, minhas tias Marluce e Marlene e meus tios Antônio e Valdeci pelo carinho, apoio e mimo.

Às minhas primas Angelica Lima pelo apoio, carinho e amizade, Elaine Nascimento, Eli Nascimento e Fernanda Barbosa pelo apoio conversas e carinho.

À minhas sobrinhas Maria Luisa, Agatha Santos e Nicole Santos e meu afilhado Luis Henrique Franco pelo amor e brincadeiras que me fortaleceram e acalmaram.

E a todos aqueles que ajudaram direta ou indiretamente, na realização deste trabalho.

Otimização da FBN e resposta antioxidativa do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) com e sem estresse salino

RESUMO GERAL

A fim de mitigar os efeitos deletérios do estresse abiótico, tem sido crescente o uso de bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP) em associação com bactérias diazotróficas. Tal associação pode promover um ambiente favorável para o crescimento vegetal e levar ao incremento da fixação biológica de nitrogênio (FBN). Neste contexto, o trabalho teve como objetivos avaliar o sinergismo da coinoculação com *Bradyrhizobium* sp. e BPCP como alternativa para otimizar a performance simbiótica e o desenvolvimento do feijão-caupi com e sem indução de estresse salino, assim como investigar as enzimas chaves no processo da FBN referentes ao metabolismo nitrogênio-carbono e de estresse/proteção oxidativo. Foram conduzidos dois experimentos em casa-de-vegetação do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), com feijão-caupi cv. "IPA 206" e foram inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. (UFLA 03-84) e coinoculadas com diferentes estirpes de BPCP. No experimento I, as plantas foram cultivadas em condições axênicas, inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. isoladamente e coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e 15 estirpes de BPCP, sendo mantidas com 50 mmol L⁻¹ de NaCl e sem estresse salino, usando o delineamento em blocos casualizados, com arranjo fatorial (16 x 2) + 1 controle absoluto, com três repetições. No experimento II, o delineamento experimental adotado foi em blocos ao acaso com arranjo fatorial (5 x 2) + 1 controle absoluto, com quatro repetições, sendo uma inoculação com *Bradyrhizobium* sp. e quatro coinoculações com *Bradyrhizobium* sp. e BPCP. Foram avaliados vários parâmetros referentes à simbiose, indicadores bioquímicos relacionados ao metabolismo nitrogênio-carbono e ao estresse/proteção oxidativo. As respostas em relação ao sinergismo dos micro-organismos, crescimento, nodulação e mecanismos de tolerância à salinidade foram observadas nas plantas coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp.; *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp.; *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp.; *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis*; e *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus durus*. Estas associações foram promissoras para otimizar a performance simbiótica e o desenvolvimento do feijão-caupi cv. "IPA206". A salinidade afetou alguns parâmetros no metabolismo nitrogênio-carbono nas plantas de feijão-caupi, promovendo diminuição nos teores do nitrogênio total em nódulos, aminoácidos, amônia livre, ureídeos, proteínas, e no aumento dos teores de sacarose e açúcares solúveis, assim como no aumento do teor de sódio, peróxido de hidrogênio, peroxidação de lipídeos, atividade da superóxido dismutase e diminuição do status redox da glutatona. A coinoculação de *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. no feijão-caupi cv. "IPA 206" proporcionou uma melhor performance simbiótica, mitigando os efeitos deletérios do estresse salino e foi promissora na resposta ao estresse oxidativo.

Palavras-chave: BPCP. ERO's. Sinergismo. Leguminosa. Salinidade. Fixação N₂.

GENERAL ABSTRACT

Optimization of FBN and antioxidant response of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) with and without saline stress

In order to mitigate the deleterious effects of abiotic stress has been increasing the use of growth-promoting bacteria in plants in association with diazotrophic bacteria. Such association may promote a favorable environment for plant growth and lead to the increase of biological nitrogen fixation. In this context, the aim of this work was to evaluate the synergism of the co-inoculation with *Bradyrhizobium* sp. and PGPB as an alternative to optimize the symbiotic performance and development of cowpea with or without induction of saline stress, as well as to investigate the key enzymes in the BNF process related to nitrogen-carbon metabolism and oxidative stress/protection. Two experiments were conducted in a greenhouse at the Agronomical Institute of Pernambuco (IPA), with cowpea cv. "IPA 206" and were inoculated with *Bradyrhizobium* sp. (UFLA 03-84) and coinoculated with different strains of PGPB. In the first experiment the plants were cultivated under axenic conditions, inoculated with *Bradyrhizobium* sp. Inoculated and coinoculated with *Bradyrhizobium* sp. e 15 PGPB strains, being maintained with 50 mmol L⁻¹ NaCl and without salt stress, using a randomized block design with (16 x 2) + 1 factorial arrangement, one inoculation with *Bradyrhizobium* sp. and four co-inoculations with *Bradyrhizobium* sp. and PGPB and one absolute control with three replications. In the second experiment, the experimental design was randomized blocks with (5 x 2) + 1 factorial arrangement and one absolute control with four replications. Several parameters related to symbiosis were measured, biochemical indicators related to nitrogen-carbon metabolism and oxidative stress/protection. The responses regarding the synergism of microorganisms, growth, nodulation and mechanisms of tolerance to salinity were observed in the plants coinoculated with *Bradyrhizobium*. sp. and *Actinomadura* sp.; *Bradyrhizobium* sp. and *Bacillus* sp.; *Bradyrhizobium* sp. and *Streptomyces* sp.; *Bradyrhizobium* sp. and *Paenibacillus graminis* and *Bradyrhizobium* sp. and *Paenibacillus durus*, were promising to optimize symbiotic performance and the development of cowpea cv. "IPA206". The salinity affected some parameters in the nitrogen-carbon metabolism in cowpea plants, showing a decrease in nodule total nitrogen, amino acids, free ammonia, ureides, proteins, and in the increase of sucrose and soluble sugars, as well as in the increase of sodium content, hydrogen peroxide, lipid peroxidation, superoxide dismutase activity and decreased redox status of glutathione. Co-inoculation *Bradyrhizobium* sp. and *Bacillus* sp. in the cowpea cv. "IPA 206" provided better symbiotic performance, mitigating the deleterious effects of stress and was promising the response to oxidative stress.

Keywords: PGPB. ROS. Synergism. Legume. Salinity. N₂ fixation.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- Figura 1 – Altura de planta (*CV = 15,77%) de feijão-caupi inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e coinoculadas *Bradyrhizobium* sp e BPCP - (A), cultivadas em condição controle e estresse salino (0 e 50 mmol L⁻¹ NaCl) - (B). Médias seguidas de mesma letra minúscula (combinações de bactérias) e maiúscula (condições de cultivo) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05) 56
- Figura 2 – Massa seca da parte aérea (*CV = 22,70%) de plantas de feijão-caupi “IPA 206” inoculado com *Bradyrhizobium* sp. e coinoculadas *Bradyrhizobium* sp. e BPCP, cultivadas em condição controle e estresse salino (0 e 50 mmol L⁻¹ NaCl). Médias seguidas de mesma letra minúscula (combinações de bactérias) e maiúscula (condições de cultivo) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05) 57
- Figura 3 – Massa seca da raiz (*CV = 21,01%) de plantas de feijão-caupi inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e coinoculadas *Bradyrhizobium* sp e BPCP - (A) cultivadas em condição controle e estresse salino (0 e 50 mmol L⁻¹ NaCl) - (B). Médias seguidas de mesma letra minúscula (combinações de bactérias) e maiúscula (condições de cultivo) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05) 58
- Figura 4 – Comprimento da raiz (*CV = 19,02%) de plantas de feijão-caupi cv “IPA 206” inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e coinoculadas *Bradyrhizobium* sp. e BPCP, independentes da condição de cultivo. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre as combinações bacterianas, pelo teste de Tukey (p<0,05) 59
- Figura 5 – Relação massa seca da parte aérea e massa seca da raiz (*CV = 21,45%) das plantas de feijão-caupi “IPA 206” inoculado com *Bradyrhizobium* sp. e coinoculadas *Bradyrhizobium* sp. e BPCP, cultivadas em condição controle e estresse salino (0 e 50 mmol L⁻¹ NaCl). Médias seguidas de mesma letra minúscula (combinações de bactérias) e maiúscula (condições de cultivo) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05) 60
- Figura 6 – Massa seca de nódulos (*CV = 7,84%) de plantas de feijão-caupi “IPA 206” inoculado com *Bradyrhizobium* sp. e coinoculadas *Bradyrhizobium* sp. e BPCP, cultivadas em condição controle e estresse salino (0 e 50 mmol L⁻¹ NaCl). Médias seguidas de mesma letra minúscula (combinações de bactérias) e maiúscula (condições de cultivo) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05) 61
- Figura 7 – Número de nódulos (*CV = 13,99%) de plantas de feijão-caupi inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e coinoculadas *Bradyrhizobium* sp e BPCP - (A), cultivadas em condição controle e estresse salino (0 e 50 mmol L⁻¹ NaCl) - (B). Médias seguidas de mesma letra minúscula (combinações de bactérias) e maiúscula (condições de cultivo) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05) 62

Figura 8 –	Tamanho de nódulos (*CV = 29,81%) em plantas de feijão-caupi inoculadas com <i>Bradyrhizobium</i> sp. e coinoculadas <i>Bradyrhizobium</i> sp e BPCP - (A), cultivadas em condição controle e estresse salino (0 e 50 mmol L ⁻¹ NaCl) - (B). Médias seguidas de mesma letra minúscula (combinações de bactérias) e maiúscula (condições de cultivo) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)	63
Figura 9 –	Nitrogênio total (*CV = 8,10%) em plantas de feijão-caupi inoculadas com <i>Bradyrhizobium</i> sp. e coinoculadas <i>Bradyrhizobium</i> sp e BPCP - (A), cultivadas em condição controle e estresse salino (0 e 50 mmol L ⁻¹ NaCl) - (B). Médias seguidas de mesma letra minúscula (combinações de bactérias) e maiúscula (condições de cultivo) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)	64
Figura 10 –	Nodulação específica (*CV = 17,24%) em plantas de feijão-caupi “IPA 206” inoculado com <i>Bradyrhizobium</i> sp. e coinoculadas <i>Bradyrhizobium</i> sp. e BPCP, independentes da condição de cultivo. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre as combinações bacterianas, pelo teste de Tukey (p<0,05)	65
Figura 11 –	Teor de sódio (*CV = 25,11%) na parte aérea de plantas de feijão-caupi cv. “IPA 206” inoculadas com <i>Bradyrhizobium</i> sp. e coinoculadas <i>Bradyrhizobium</i> sp e BPCP, cultivadas em condição controle e estresse salino (0 e 50 mmol L ⁻¹ NaCl). Médias seguidas de mesma letra minúscula (combinações de bactérias) e maiúscula (condições de cultivo) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)	66
Figura 12 –	Teor de potássio (*CV = 20,86%) na parte aérea de plantas de feijão-caupi cv. “IPA 206” inoculadas com <i>Bradyrhizobium</i> sp. e coinoculadas <i>Bradyrhizobium</i> sp e BPCP, cultivadas em condição controle e estresse salino (0 e 50 mmol L ⁻¹ NaCl). Médias seguidas de mesma letra minúscula (combinações de bactérias) e maiúscula (condições de cultivo) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)	68
<i>Capítulo II</i>		
Figura 1 –	Contraste entre plantas de feijão-caupi “IPA 206” sem inoculação e sem salinidade (TA) e as inoculadas. Médias (4 repetições) seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).....	82
Figura 2 –	Altura das plantas (*CV=19,36%) de feijão-caupi cv. “IPA 206” inoculadas com <i>Bradyrhizobium</i> sp. (T1) ou coinoculadas com <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Actinomadura</i> sp. (T2), <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Paenibacillus graminis</i> (T3), <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Bacillus</i> sp. (T4) e <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Streptomyces</i> sp. (T5) cultivadas em condições controle e de estresse salino (50 mmol L ⁻¹ de NaCl). Médias (4 repetições) seguidas de mesma letra minúscula (combinações bacterianas) e maiúscula (condições de cultivo), não diferem entre si pelo acordo com o teste de Tukey (p<0,05)	83

- Figura 3 – Massa fresca (*CV=13,95%) (A) e seca de nódulos (*CV=14,81%) (B) de plantas de feijão-caupi inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. (T1) ou coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5) em condições controle e de estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl). Médias (4 repetições) seguidas de mesma letra minúscula (combinações bacterianas) e maiúscula (condições de cultivo), não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)..... 84
- Figura 4 – Número de nódulos (*CV=18,18%) de plantas de feijão-caupi cv. "IPA 206" inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. (T1) ou coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5). Médias (4 repetições) seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).... 85
- Figura 5 – Nitrogênio total da parte aérea (*CV=9,79) de plantas de feijão-caupi cv. "IPA 206" inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. (T1) ou coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5) em condições controle e de estresse salino (50 mmol.L⁻¹ de NaCl). Médias (4 repetições) seguidas de mesma letra minúscula (combinações bacterianas) e maiúscula (condições de cultivo), não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)..... 86
- Figura 6 – Nitrogênio total em nódulos (*CV=10,42%) de plantas de feijão-caupi cv. "IPA 206" inoculado com *Bradyrhizobium* sp. (T1) ou coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), em condições controle e de estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl). Médias (4 repetições) seguidas de mesma letra minúscula (combinações bacterianas) e maiúscula (condições de cultivo), não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)..... 87
- Figura 7 – Teor de amônia livre (A) (*CV=14,57%), Aminoácidos livre (B) (CV=14,57%), ureídeos (C) (CV=33,47%) e massa seca da parte aérea (D) (CV=18,17%) em nódulos de feijão-caupi cv. "IPA 206" cultivadas sem e com estresse salino (0 e 50 mmol L⁻¹ de NaCl), inoculado com *Bradyrhizobium* sp. (T1) e coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5). Médias (4 repetições) seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).... 88

- Figura 8 – Teor de prolina (*CV=39,18%) em nódulos de plantas de feijão-caupi cv. “IPA 206” inoculado com *Bradyrhizobium* sp. (T1) ou coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), em condições controle e de estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl). Médias (4 repetições) seguidas de mesma letra minúscula (combinações bacterianas) e maiúscula (condições de cultivo), não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)..... 89
- Figura 9 – Teor de leghemoglobina (*CV=15,51%) em nódulos de feijão-caupi cv. “IPA 206” inoculado com *Bradyrhizobium* sp. (T1) ou coinoculado com *Bradyrhizobium* sp. (T1) ou coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), em condições controle e de estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl). Médias (4 repetições) seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)..... 89
- Figura 10 – Concentração de proteínas solúveis (*CV=39,18%) em nódulos de plantas de feijão-caupi cv. “IPA 206” inoculado com *Bradyrhizobium* sp. (T1) ou coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), em condições controle e de estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl). Médias (4 repetições) seguidas de mesma letra minúscula (combinações bacterianas) e maiúscula (condições de cultivo), não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)..... 90
- Figura 11 – Concentração de sacarose (*CV=18,52%) e açúcares solúveis (CV=14,62%) em nódulos de plantas de feijão-caupi cv. “IPA 206” inoculado com *Bradyrhizobium* sp. (T1) ou coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), em condições controle e de estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl). Médias (4 repetições) seguidas de mesma letra minúscula (combinações bacterianas) e maiúscula (condições de cultivo), não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)..... 91

- Figura 12 – Atividade de glutamina sintetase (*CV=14,48%) em nódulos de plantas de feijão-caupi cv. “IPA 206” inoculado *Bradyrhizobium* sp. (T1) ou coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), em condições controle e de estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl). Médias (4 repetições) seguidas de mesma letra minúscula (combinações bacterianas) e maiúscula (condições de cultivo), não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)..... 92
- Figura 13 – Atividade de glutamato sintase (A) (*CV=13,59%) e glutamato desidrogenase aminante (B) (*CV=19,59%) em nódulos de plantas de feijão-caupi cv. “IPA 206” inoculado com *Bradyrhizobium* sp. (T1) ou coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), em condições controle e de estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl). Médias (4 repetições) seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)..... 93
- Figura 14 – Atividade de invertase ácida (*CV=7,87%) em nódulos de plantas de feijão-caupi cv. “IPA 206” inoculado *Bradyrhizobium* sp. (T1) ou coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), em condições controle e de estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl). Médias (4 repetições) seguidas de mesma letra minúscula (combinações bacterianas) e maiúscula (condições de cultivo), não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)..... 94
- Figura 15 – Atividade de invertase neutra (*CV=4,52%) em nódulos de plantas de feijão-caupi cv. “IPA 206” inoculado *Bradyrhizobium* sp. (T1) ou coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), em condições controle e de estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl). Médias (4 repetições) seguidas de mesma letra minúscula (combinações bacterianas) e maiúscula (condições de cultivo), não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)..... 95

Capítulo III

Figura 1 –	Análise de contraste comparando plantas controle absoluto sem inoculação e sem salinidade com plantas inoculadas sem e com estresse salino (0 e 50 mmol L ⁻¹ de NaCl)	114
Figura 2 –	Teor de sódio (*CV = 15,36%) e potássio (*CV = 14,42 %) na parte aérea de plantas de feijão-caupi cv. “IPA 206” cultivadas sem e com estresse salino (0 e 50 mmol L ⁻¹ de NaCl), inoculado com <i>Bradyrhizobium</i> sp. (T1) e coinoculadas com <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Actinomadura</i> sp. (T2), <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Paenibacillus graminis</i> (T3), <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Bacillus</i> sp. (T4) e <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Streptomyces</i> sp. (T5). Médias seguidas de mesma letra maiúscula (condições de cultivo) e minúscula (combinações de bactérias) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).....	113 115
Figura 3 –	Peróxido de hidrogênio (*CV=4,24%) em nódulos de plantas de feijão-caupi “IPA 206” inoculado com <i>Bradyrhizobium</i> sp. (T1) ou coinoculadas com <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Actinomadura</i> sp. (T2), <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Paenibacillus graminis</i> (T3), <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Bacillus</i> sp. (T4) e <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Streptomyces</i> sp. (T5) - (A), e em condições controle e de estresse salino (50 mmol L ⁻¹ de NaCl) - (B). Médias seguidas de mesma letra maiúscula (condições de cultivo) e minúscula (combinações de bactérias) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)	117
Figura 4 –	Peroxidação de lipídeos (*CV=10,53%) em nódulos de plantas de feijão-caupi “IPA 206” inoculado com <i>Bradyrhizobium</i> sp. (T1) e coinoculadas com <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Actinomadura</i> sp. (T2), <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Paenibacillus graminis</i> (T3), <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Bacillus</i> sp. (T4) e <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Streptomyces</i> sp. (T5) - (A) em condições controle e estresse salino (50 mmol L ⁻¹ de NaCl) - (B). Médias seguidas de mesma letra maiúscula (condições de cultivo) e minúscula (combinações de bactérias) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)	118

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1 –	Bactérias, origem, código de acesso e procedência.....	51
Tabela 2 –	Combinações bacterianas utilizadas para a inoculação e coinoculação do feijão-caupi cv. ‘IPA 206’.....	53
Tabela 3 –	Análise de contraste entre os tratamentos não inoculados e inoculados.....	54

- Figura 5 – Superóxido dismutase (A) (*CV = 8,68%) em nódulos de plantas de feijão-caupi “IPA 206” inoculado com *Bradyrhizobium* sp. (T1) ou coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5) - (A) em condições controle e estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl) - (B). Médias seguidas de mesma letra maiúscula (condições de cultivo) e minúscula (combinações de bactérias) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05) 119
- Figura 6 – Peroxidase de fenóis (A) (*CV = 3,15%) e Catalase (B) (CV = 5,28%) em nódulos de plantas de feijão-caupi “IPA 206” inoculado com *Bradyrhizobium* sp. (T1) e coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), em condições controle e estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl). Médias seguidas de mesma letra maiúscula (condições de cultivo) e minúscula (combinações de bactérias) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05) 120
- Figura 7 – Ascorbato total (*CV = 4,91) (A) e reduzido (CV = 5,87) (B) em nódulos de plantas de feijão-caupi “IPA 206” inoculado com *Bradyrhizobium* sp. (T1) e coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), em condições controle e estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl). Médias seguidas de mesma letra maiúscula (condições de cultivo) e minúscula (combinações de bactérias) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05) 122
- Figura 8 – Ascorbato oxidado (*CV = 6,54) (A) e status redox de ascorbato (CV = 7,85) (B) em nódulos de plantas de feijão-caupi “IPA 206” inoculado com *Bradyrhizobium* sp. (T1) e coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), em condições controle e estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl). Médias seguidas de mesma letra maiúscula (condições de cultivo) e minúscula (combinações de bactérias) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05) 123

Figura 9 –	Glutaciona total (*CV = 6,00) (A) e Glutaciona oxidada (CV = 6,87) (B) em nódulos de plantas de feijão-caupi “IPA 206” inoculado com <i>Bradyrhizobium</i> sp. (T1) e coinoculadas com <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Actinomadura</i> sp. (T2), <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Paenibacillus graminis</i> (T3), <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Bacillus</i> sp. (T4) e <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Streptomyces</i> sp. (T5), em condições controle e estresse salino (50 mmol L ⁻¹ de NaCl). Médias seguidas de mesma letra maiúscula (condições de cultivo) e minúscula (combinações de bactérias) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)	124
Figura 10 –	Glutaciona reduzida (*CV = 6,20) em nódulos de plantas de feijão-caupi “IPA 206” inoculado com <i>Bradyrhizobium</i> sp. (T1) e coinoculadas com <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Actinomadura</i> sp. (T2), <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Paenibacillus graminis</i> (T3), <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Bacillus</i> sp. (T4) e <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Streptomyces</i> sp. (T5), em condições controle e estresse salino (50 mmol L ⁻¹ de NaCl). Médias seguidas de mesma letra maiúscula (condições de cultivo) e minúscula (combinações de bactérias) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)	125
Figura 11 –	Status redox da glutaciona total (*CV = 8,23) em nódulos de plantas de feijão-caupi “IPA 206” inoculado com <i>Bradyrhizobium</i> sp. (T1) e coinoculadas com <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Actinomadura</i> sp. (T2), <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Paenibacillus graminis</i> (T3), <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Bacillus</i> sp. (T4) e <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Streptomyces</i> sp. (T5) (A) em condições controle e estresse salino (50 mmol L ⁻¹ de NaCl) (B). Médias seguidas de mesma letra maiúscula (condições de cultivo) e minúscula (combinações de bactérias) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)	126
Table 1	Formulações de inoculantes e tratamentos utilizados no experimento	80
<i>Capítulo III</i>		
Tabela 1	Formulações de inoculantes e tratamentos utilizados no experimento	112

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	29
1.1 Hipóteses	30
1.3 Objetivos específicos	31
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	32
2.1 Aspectos gerais e importância econômica do feijão-caupi (<i>Vigna unguiculata</i> [L.] Walp.).....	32
2.2 Fixação biológica de nitrogênio (FBN)	33
2.3 Compostos e enzimas envolvidos na FBN	34
2.4 Efeito do estresse salino na FBN	36
2.5 Estresse oxidativo em plantas.....	37
Referências	38
3 SINERGISMO ENTRE MICRO-ORGANISMOS NA COINOCULAÇÃO DE <i>Bradyrhizobium</i> sp. E BPCP EM FEIJÃO-CAUPI COM E SEM INDUÇÃO DO ESTRESSE SALINO	47
Resumo.....	48
Abstract.....	49
3.1 Introdução	50
3.2 Material e Métodos.....	51
3.2.1 Obtenção dos micro-organismos e preparo dos inoculantes.....	51
3.2.2 Delineamento experimental e análise estatística	52
3.2.3 Variáveis analisadas.....	53
3.3 Resultados e Discussão	54
3.4 Conclusões.....	69
Referências	69
4 COINOCULAÇÃO COM <i>Bradyrhizobium</i> sp. E BPCP NO METABOLISMO NITROGÊNIO-CARBONO EM PLANTAS DE FEIJÃO-CAUPI COM E SEM ESTRESSE SALINO	75
Resumo.....	76
Abstract.....	77
4.1 Introdução	78
4.2 Material e Métodos	79
4.2.1 Produção de micro-organismos e preparo de inoculantes	79
4.2.2 Cultura de planta e tratamento	79
4.2.3 Delineamento experimental e análise estatística	81

4.2.4 Determinações bioquímicas	81
4.3 Resultados	82
4.4 Discussão.....	95
4.5 Conclusões.....	99
Referências	100
5 RESPOSTA ANTIOXIDATIVA DO <i>Vigna unguiculata</i> [L.] WALP. COINOCULADO COM <i>Bradyrhizobium</i> sp. E BPCP COM E SEM ESTRESSE SALINO.....	107
Resumo	108
Abstract	109
5.1 Introdução	110
5.2 Material e Métodos	111
5.2.1 Produção de micro-organismos e preparo dos inoculantes.....	111
5.2.2 Cultura de planta e tratamento	112
5.2.3 Delieamento experimental e análise estatística	113
5.2.4 Determinações bioquímicas	113
5.3 Resultados e Discussão	114
5.4 Conclusões.....	126
Referências	127
APÊNDICE A – Análise de variância (ANOVA) das variáveis analisadas na parte aérea e nódulos do feijão-caupi cv “IPA 206” inoculado com <i>Bradyrhizobium</i> sp. (UFLA 03-84) e coinoculado com <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Actinomadura</i> sp.; <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Bacillus</i> sp.; <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Azospirillum amazonense</i> ; <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ; <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Burkholderia tropica</i> ; <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Streptomyces</i> sp.; <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Bacillus cereus</i> ; <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Bacillus pumilus</i> ; <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Brevibacillus brevis</i> ; <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Paenibacillus brasiliensis</i> ; <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Paenibacillus graminis</i> ; e <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Paenibacillus durus</i> , cultivadas em condição controle e estresse salino (0 e 50 mmol L ⁻¹ NaCl).	134
APÊNDICE B - Análise de variância (ANOVA) das variáveis analisadas nos nódulos de feijão-caupi inoculado com <i>Bradyrhizobium</i> sp. (UFLA 03-84) ou coinoculado com <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Actinomadura</i> sp. (UFLA 03-84 e 183-EL); <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Paenibacillus graminis</i> (UFLA 03-84 e MC 04.21); <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Bacillus</i> sp. (UFLA 03-84 e IPACC11); e <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Streptomyces</i> sp. (UFLA 03-84 e 212) em condições controle e estresse salino (50 mmol L ⁻¹ de NaCl).	135
APÊNDICE C - Análise de variância (ANOVA) das variáveis analisadas nos nódulos de feijão-caupi inoculado com <i>Bradyrhizobium</i> sp. (UFLA 03-84) ou coinoculado com <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Actinomadura</i> sp. (UFLA 03-84 e 183-EL); <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Paenibacillus graminis</i> (UFLA 03-84 e MC 04.21); <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Bacillus</i> sp.	

(UFLA 03-84 e IPACC11); e <i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Streptomyces</i> sp. (UFLA 03-84 e 212) em condições controle e estresse salino (50 mmol L ⁻¹ de NaCl).	136
ANEXO A – Composição dos meios de cultura utilizados para multiplicação das bactérias utilizadas nos experimentos.....	138

1 INTRODUÇÃO GERAL

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) é um dos principais componentes da dieta alimentar do brasileiro, principalmente na região do semiárido nordestino, sendo uma excelente fonte de proteínas (aproximadamente 23 %), nutrientes e fibras. Tem importância socioeconômica para as famílias das regiões Norte e Nordeste do Brasil, onde é comumente cultivado, principalmente por pequenos agricultores em sistema de sequeiro, pois tolera as condições de déficit hídrico, salinidade e temperatura (FREIRE FILHO et al., 2011; SILVA et al., 2013; BRITO et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015). É uma cultura que nodula com diversas estirpes de rizóbios, sendo considerada promíscua, a nodulação contribui no fornecimento de nitrogênio para a planta, melhorando sua nutrição (LIRA JUNIOR et al., 2015; FREITAS et al., 2015)

O nitrogênio é o elemento mais abundante na atmosfera, porém é o nutriente que mais limita a produtividade das culturas por não estar disponível às plantas no solo. Em clima tropical, devido às altas temperaturas e pluviosidade a matéria orgânica é decomposta rapidamente, e grande parte do nitrogênio é perdido, sendo necessária sua adição ao solo pelo uso de fertilizantes. Nos cultivos agrícolas, faz-se necessário a adição deste elemento por meio de compostos ricos em nitrogênio, podendo aumentar o custo de produção (MELO, 2009; LOPES et al., 2016). Alguns micro-organismos que possuem a enzima nitrogenase são capazes de converter o nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia (NH_3), processo conhecido como fixação biológica de nitrogênio (FBN) (FREITAS et al., 2015; LOPES et al., 2016)

Os micro-organismos capazes de realizar a FBN são chamados de diazotróficos. As bactérias diazotróficas podem ser denominadas como bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP) as quais são encontradas em habitats naturais, colonizando interna e externamente os órgãos de plantas. As BPCP colonizam as plantas como epifíticas ou endofíticas e não são fitopatogênicas, dentre estes organismos estão às espécies do gênero *Rhizobium*, que são comumente denominadas de rizóbios (MARIANO; SILVEIRA, 2004; FREITAS et al., 2015; PANKIEVICZ et al., 2015). A inoculação com bactérias diazotróficas em plantas de importância agrícola é utilizada desde o século XIX (HUNGRIA; ARAÚJO, 1994).

Segundo Fagan et al. (2007) o uso de inoculantes contendo estirpes de *Bradyrhizobium* spp. proporciona uma economia de aproximadamente 3,2 bilhões de

dolares por ano, quanto a aplicação de fertilizantes nitrogenados. A coinoculação com rizóbio e BPCP é uma alternativa que visa aumentar a produção, onde a coinoculação é realizada com diferentes combinações de micro-organismos que produzem um efeito sinérgico, ou seja, o incremento produtivo desta combinação excede os obtidos de uma maneira isolada (ZUFFO et al., 2015). O desenvolvimento, nodulação e produtividade das plantas de feijão-caupi podem ser afetadas por diversos estresses abióticos, como o estresse salino (MEDEIROS et al., 2008; ANDRADE et al., 2012; XAVIER et al., 2014)

O estresse salino prejudica o crescimento das plantas por deficiência hídrica e toxicidade iônica, diminuindo sua produtividade, aumentando ainda a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células vegetais, como o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH^\cdot) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os quais atuam como mecanismo de defesa da planta ao estresse (PUPPO et al., 2005; TORRES et al., 2006; MAIA et al., 2015). Essas EROs são subprodutos do metabolismo aeróbico e fotossintético e, em concentrações compatíveis com a homeostase redox celular, são componentes de diversas vias de sinalização (MAIA et al., 2012).

São poucos os estudos sobre o estresse e proteção oxidativa em nódulos de leguminosas, sendo importante para entender o papel do estresse oxidativo resultante do estresse salino sobre a fixação biológica de nitrogênio, bem como a interação entre leguminosa, rizóbio e bactérias promotoras de crescimento vegetal. Neste contexto, elaborou-se uma hipótese de que a coinoculação com *Bradyrhizobium* sp. e bactérias promotoras de crescimento vegetal permite minimizar os efeitos deletérios do estresse salino através da proteção oxidativa, beneficiando a fixação biológica de nitrogênio.

1.1 Hipóteses

- A coinoculação com *Bradyrhizobium* sp. e bactérias promotoras de crescimento em plantas permite minimizar os efeitos deletérios do estresse salino através da proteção oxidativa, beneficiando a fixação biológica de nitrogênio.
- A inoculação e/ou coinoculação com *Bradyrhizobium* sp. e BPCP pode otimizar o desenvolvimento e a performance simbiótica em plantas de feijão-caupi, com e sem indução do estresse salino, além de mitigar os efeitos deletérios causado pelo estresse salino.

- Elucidar como se procede as atividades das enzimas chaves no processo da FBN pela interação sinérgica entre *Bradyrhizobium* sp. e BPCP, com e sem indução de estresse abiótico, para selecionar combinações de micro-organismos mais eficientes.
- A coinoculação com *Bradyrhizobium* sp. e BPCP permite minimizar os efeitos deletérios do estresse salino através da proteção oxidativa, beneficiando a fixação biológica de nitrogênio no feijão-caupi.

1.2 Objetivo geral

- Avaliar compostos e atividades enzimáticas envolvidos na fixação do N₂ e no estresse oxidativo, em nódulos de feijão-caupi, assim como a interação sinérgica entre *Bradyrhizobium* sp. e bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP) no processo de fixação biológica de nitrogênio com e sem indução de estresse salino.

1.3 Objetivos específicos

- Avaliar o sinergismo da coinoculação com *Bradyrhizobium* sp. e BPCP como alternativa para otimizar a performance simbiótica e o desenvolvimento do feijão-caupi com e sem indução de estresse salino.
- Investigar as enzimas chaves no processo da FBN referentes ao metabolismo nitrogênio-carbono e de estresse/proteção oxidativo.
- Determinar os possíveis danos causados pelo estresse salino impostos às plantas de feijão-caupi por meio de variáveis indicadoras, tais como: biomassa da planta e de nódulo, teor de nitrogênio total em planta e nódulo e concentração de íons Na⁺;
- Mensurar as atividades de peroxidase do ascorbato, superóxido dismutase, peroxidase de fenóis e catalase, bem como avaliar o papel do ciclo do ascorbato-glutationa na proteção oxidativa, com base no balanço redox do ascorbato e da glutathione (total, reduzida e oxidada), em nódulos de plantas de feijão-caupi, com e sem indução do estresse salino.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aspectos gerais e importância econômica do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.)

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) é uma Dicotyledonea, pertencente à ordem Fabales, da família Fabaceae, do gênero *Vigna*. Tem origem africana e foi introduzido no Brasil no século XVI, no estado da Bahia pelos portugueses. Depois seu cultivo foi se expandindo a outros estados, como os estados das regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste (FREIRE FILHO et al., 2011; BRITO et al., 2015).

A região Nordeste, tem uma grande participação na área cultivada, cerca de 82% da área plantada de todo país, na safra 2015/16, porém com baixa produtividade, a qual pode ser aumentada com a utilização de inoculantes de bactérias fixadoras de nitrogênio. Por ser uma importante fonte de emprego e renda na área rural, o aumento de sua produtividade beneficiaria os agricultores (SABOYA et al., 2013; RUFINI, et al., 2014; CONAB, 2017).

Na safra 2015/16 foram plantados no Brasil 1.249 mil hectares de feijão-caupi, com uma produtividade de 290 kg ha⁻¹, gerando uma produção de 362,3 mil toneladas. No Nordeste a área plantada é de 1.034,2 mil hectares, com uma produtividade de 191 kg ha⁻¹ e uma produção total de 197,9 mil toneladas (CONAB, 2017). Nesta região, a produção tradicionalmente concentra-se nas áreas semiáridas, devido sua capacidade de sobrevivência nas condições climáticas de elevada temperatura e baixa precipitação. O plantio, é geralmente, realizado por empresários e agricultores familiares que ainda utilizam práticas tradicionais de cultivo (FREIRE FILHO et al., 2011; SILVA et al., 2013; CAVALCANTE JUNIOR et al., 2016).

O feijão-caupi é tolerante à seca e moderadamente tolerante à salinidade, tolera a irrigação com água salina com condutividade elétrica (CE) de até 3,3 dSm⁻¹ e condutividade elétrica do extrato de saturação do solo de até 4,9 dSm⁻¹ (AYERS; WESTCOT, 1991; COELHO et al., 2013). É pouco exigente em fertilidade do solo e pode obter nitrogênio do solo, a partir da mineralização da matéria orgânica, dos fertilizantes nitrogenados e da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), quando em associação com rizóbio (BRITO et al., 2009; ALMEIDA et al., 2011; SOUSA et al., 2014).

Os rizóbios são capazes de nodular as raízes do feijão-caupi, o qual quando bem nodulado, pode crescer independente de outras fontes de nitrogênio (N) e apresentar aumento de produção (GUALTER et al., 2008; CAMPO et al., 2009; ALMEIDA et al., 2010; COSTA et al., 2011; MARTINS et al., 2013). Estima-se que de 40 a 90% do total de N acumulado pelo feijão-caupi, seja obtido pela FBN. Esta cultura tem demonstrado maior rendimento de grãos com utilização de inoculantes com rizóbios (XAVIER et al., 2007; BRITO et al., 2009; MUSINGUZI et al., 2010).

2.2 Fixação biológica de nitrogênio (FBN)

Visando suprir a demanda da planta por nitrogênio, algumas espécies vegetais podem formar associações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogênio, estas se tornam bacteroides e podem converter o nitrogênio atmosférico em amônia nos nódulos das plantas (FIGUEIREDO et al., 2008).

O nitrogênio fixado pela simbiose entre leguminosas e bactérias do gênero *Rhizobium* ocorre nos nódulos e representa uma alternativa aos fertilizantes químicos nitrogenados. Esta fixação ocorre se a concentração de nitrogênio no solo for insuficiente ao desenvolvimento da planta. A FBN pode suprir total ou parcialmente a necessidade de nitrogênio da planta, podendo aumentar sua produtividade (RUMJANEK et al., 2005; CHIANU et al., 2011; GUALTER et al., 2011; HUNGRIA et al., 2013).

A FBN é a conversão do nitrogênio atmosférico (N₂) em amônia (NH₃) pela ação da nitrogenase (FIGUEIREDO et al., 2008). A amônia, uma vez liberada, é incorporada em aminas ou em ureídeos para então ser exportada para a planta hospedeira (LADRERA et al., 2007). Plantas como o feijão transportam o N oriundo da FBN gerado pela simbiose entre rizóbios e a leguminosa, principalmente na forma de N-ureídeo (alantoína e ácido alantóico) (AMARANTE et al. 2006; CAMARGOS; SODEK, 2010; NAVEED et al., 2015; BOGINO et al., 2015).

As bactérias promotoras de crescimento promovem nas plantas o aumento na taxa de germinação, comprimento das raízes, crescimento de colmos ou caules, aumento do número de folhas, flores e área foliar, além do rendimento, da nodulação e da fixação de nitrogênio. Este benefício à planta pode ser específico para a interação com a espécie, cultivar ou genótipo de plantas (LUGTENBERG et al., 2002; VESSEY;

BUSS, 2002; HAN et al., 2005; LACAVA et al., 2008; COMPANT et al., 2010; RODRIGUES et al., 2015).

Os efeitos benéficos destes micro-organismos às plantas são atribuídos à capacidade de fixação de nitrogênio, solubilizar nutrientes e produzir hormônios vegetais, como o ácido indol-acético (AIA), giberelinas e citocininas, ainda promove o controle biológico, a indução de resistência sistêmica a patógenos, absorção de nutrientes pela solução do solo e minimizar os efeitos deletérios de estresses bióticos e abióticos (LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009; FARINA et al., 2012; STAMFORD et al., 2013; NAVEED et al., 2015).

A inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio na agricultura tem contribuído para reduzir o uso de fertilizantes químicos, bem como o impacto ambiental causado por estes. Estima-se que no Brasil a FBN tenha contribuído com cerca de 7,3 milhões de toneladas ano⁻¹ de nitrogênio. A coinoculação entre rizóbios e BPCP tem apresentado aumento na nodulação, fixação de nitrogênio e a competitividade do rizóbio pelos múltiplos efeitos positivos na rizosfera das plantas, dependendo da combinação e compatibilidade entre bactérias e espécie vegetal (FILOSO et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 2010; AHEMAD; KIBRET, 2014; NAVEED et al., 2015).

2.3 Compostos e enzimas envolvidos na FBN

O nitrogênio é absorvido como amônio (NH_4^+) ou nitrato (NO_3^-), sendo o amônio incorporado em aminoácidos pelas enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT), formando glutamina (GLN), glutamato (GLU) e outros aminoácidos e seus metabólitos. O nitrato é incorporado pela ação da redutase do nitrato (NR) e redutase do nitrito (NiR). A glutamina é utilizada em diversos eventos metabólicos, sendo um dos principais compostos nitrogenados translocados na planta juntamente com a aspargina e ureídeos (alantoína e ácido alantoico) (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000; BRAUN et al., 2013; KOJIMA et al., 2014; LOPES et al., 2016).

A leghemoglobina é uma proteína hemo-constituente, presente nos nódulos de leguminosas, e tem a função de transportar oxigênio em taxas suficientes para o metabolismo aeróbio dos bacteróides de rizóbios nos nódulos das leguminosas, sem

excessos para que não inibam a atividade da nitrogenase (OTT et al., 2005; MA et al., 2011).

A atividade da GS na planta aumenta durante a nodulação de muitas espécies de leguminosas, este aumento deve ocorrer ao mesmo tempo em que a nitrogenase é expressa no bacterióide do rizobio e a leghemoglobina é produzida no citosol da célula da planta (OHYAMA; KUMAZAWA, 1980; COSTA, 1999). A expressão dos genes GS e GOGAT nos nódulos sofre influência do desenvolvimento do nódulo e a presença da amônia produzida pela ação da nitrogenase (MELLO, 2009; DUNN, 2014).

A sacarose e carboidratos são oriundos da redução do carbono, atuando em diversas funções no metabolismo vegetal, como: armazenamento, translocação de carbono, e proteção contra condições ambientais adversas. A atividade de enzimas como as invertases, beneficia a distribuição destes compostos entre os órgãos da planta (LEITE et al., 2011; BALIZA et al., 2014).

As principais enzimas envolvidas diretamente no metabolismo da sacarose são: sacarose fosfato sintase, sacarose sintase, invertase ácida solúvel e invertase neutra (KOMOR, 2000). As invertases quebram a sacarose e produzem glicose, frutose e sacarose sintase, que produzem UDP-glicose e frutose, assim, disponibilizando células de carbono e energia para o processo de respiração, energia e síntese de diversos compostos (ROITSCH; GONZÁLEZ, 2004; DUNCAN et al., 2006; LOBO, 2012; RODRIGUES et al., 2013).

Existem duas isoformas da invertase ácida. Uma está envolvida na síntese da sacarose fora dos tecidos dreno, no apoplasto, ligada a parede celular, estabelecendo um gradiente de concentração de sacarose dos tecidos fonte para os drenos. A outra isoforma, está relacionada com o armazenamento de açúcares, regulação osmótica e respostas a estresses abióticos. A invertase neutra ou alcalina é considerada uma enzima de manutenção, e está localizada no citoplasma, e envolvida na degradação da sacarose. Já as atividades da invertase ácida da parede celular e sacarose sintase estão baixas, sugerindo o envolvimento da invertase neutra na degradação e acúmulo de sacarose no vacúolo (KOCH, 2004; ROITSCH; GONZÁLEZ, 2004; YAO et al., 2009; LOBO et al., 2012).

2.4 Efeito do estresse salino na FBN

Os solos salinos são caracterizados por condutividade elétrica do extrato de saturação (CEes) $\geq 4 \text{ dS m}^{-1}$, a 25°C , percentual de sódio trocável (PST) $< 15\%$, relação de adsorção de sódio (RAS) < 13 e $7 < \text{pH} < 8,5$. (RICHARDS, 1954; FREIRE; FREIRE, 2007; HOLANDA et al., 2010). No Brasil, os solos salinos ou halomórficos ocorrem no Rio Grande do Sul, no Pantanal Mato-grossense e na região semiárida do Nordeste. Estes solos são caracterizados por conterem elevados teores de sais solúveis, sódio trocável ou ambos, em horizontes ou camadas próximas à superfície. Os sais solúveis mais encontrados na solução do solo salino são: cloretos, sulfatos e bicarbonatos de Na^{2+} , Ca^{2+} e Mg^{2+} e, em menor quantidade, nitratos e carbonatos de K^+ e NH_4^+ e os ânions SO_4^{2-} , HCO_3^- e CO_3^{2-} (SCHOSSLER et al., 2012; PEDROTTI et al., 2015).

A salinidade é resultante do processo de salinização, onde ocorre a concentração de sais solúveis na solução do solo, sendo estes sais oriundos dos minerais primários que compõem as rochas, liberados pela ação do intemperismo químico. A salinização pode ser natural ou primária, onde ocorre o acúmulo de sais oriundos de áreas circunvizinhas, ascensão capilar ou acúmulo em áreas baixas. Já a salinização antrópica ocorre devido à deposição de sais oriundos de água de irrigação, em virtude do manejo inadequado da irrigação e drenagem (RIBEIRO et al., 2009; TAVARES FILHO et al., 2012; PEDROTTI et al., 2015).

A salinidade prejudica o rendimento e produção das culturas agrícolas, principalmente as cultivadas em regiões semiáridas, em decorrência das condições climáticas de baixa precipitação e elevada evapotranspiração, agravando os efeitos deletérios da salinização do solo. O estresse salino é promovido pelo componente iônico e osmótico, onde o primeiro promove desbalanço nutricional, metabólico e efeitos tóxicos dos íons na planta, podendo reduzir a permeabilidade das raízes à água, o segundo componente induz o déficit hídrico, dificultando a absorção de água pelas plantas (FREIRE; FREIRE, 2007; PRISCO; GOMES FILHO, 2010; MAIA et al., 2012; PEDROTTI et al., 2015).

As plantas desenvolvem vários mecanismos fisiológicos e bioquímicos para sobreviver em solos salinos, como o controle da absorção e transporte interno de sais, acúmulo de Na^+ no interior da planta, a compartimentação intracelular, ativação de

enzima antioxidante e síntese de compostos antioxidantes dentre outros (GUPTA; HUANG, 2014).

2.5 Estresse oxidativo em plantas

As plantas desenvolveram mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo, os quais envolvem mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. O acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) que pode ser diminuído pela capacidade de acionar os mecanismos de defesa antioxidantes. O excesso das EROs causa danos pela oxidação de proteínas, lipídeos e DNA, caracterizando o estresse oxidativo secundário, podendo causar danos e pode levar a célula à morte (KIM; KWAK, 2010; MAIA et al., 2012; BARBOSA et al., 2014).

Para evitar os danos oxidativos, as plantas possuem sistemas antioxidantes e mantêm a concentração das EROs em níveis não tóxicos. Este sistema tem a participação dos compostos ascorbato, glutathione, tocoferol, carotenoides e compostos fenólicos e as enzimas superóxido dismutase, catalase, peroxidase do ascorbato e peroxidase de fenóis (BARBOSA et al., 2010; BARBOSA et al., 2014; MAIA et al., 2015; ALVES et al., 2016).

Nas plantas, a dismutase de superóxido catalisa a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a partir do íon superóxido (O_2^-), e as catalases atuam protegendo a célula vegetal de danos oxidativos provocados pelo acúmulo excessivo de H_2O_2 , dismutando ou oxidando substratos. As peroxidases do ascorbato catalisam a redução do H_2O_2 em água pela oxidação do ascorbato, estas podem ser encontradas nos cloroplastos, mitocôndrias, citosol, peroxissomos e glioxissomos, podendo ser encontradas sob diferentes isoformas. Já as peroxidases de fenóis são encontradas no citosol, vacúolo e parede celular, e têm papéis diversos nas plantas, como a participação na lignificação da parede celular, regulação do crescimento, biossíntese do etileno e resposta a vários estresses, bem como apresenta atividade antifúngica (GHOSH, 2006; OLIVEIRA et al., 2010; SHARMA et al., 2012; MAIA et al., 2015).

Referências

AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanism and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University-Science**, Riyadh, v. 26, n. 1, p. 1-20, 2014.

ALMEIDA, A. L. G.; ALCÂNTARA, R. M. C. M.; NÓBREGA, R. S. A.; NÓBREGA, J. C. A.; LEITE, L. F. C.; SILVA, J. A. L. Produtividade do feijão-caupi cv. BR 17 Gurguéia inoculado com bactérias diazotróficas simbióticas no Piauí. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 5, n. 3, p. 364-369, 2010.

ALMEIDA, W. S.; BELÉM, F. R. F.; BERTINI, C. H. C. M. PINHEIRO, M. S.; TEÓFILO, E. M. Identificação de genótipos de feijão-caupi tolerantes a salinidade avaliado por meio de método multivariado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 11, p. 1884-1889, 2011.

ALVES, G.; RODRIGUES, M.; PEREIRA, J. W. D. L.; LUZ, L. N. D.; LIMA, L.; SANTOS, R. C. D. Genotypic variability of peanut lines in response to water stress, based on biochemical descriptors. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 29, n. 3, p. 528-536, 2016.

AMARANTE L.; LIMA, J. D.; SODEK, L. Growth and stress conditions cause similar changes in xylem amino acids for different legume species. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 58, p. 123-129, 2006.

ANDRADE, J. R.; BARBOSA, J. W. S.; ALENCAR, A. E. V.; NASCIMENTO, R. MELO, D. F. Crescimento do feijão caupi submetido a inoculação com rizóbio e irrigação com água salina. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v. 7, n.3, p. 06-09 2012.

AYERS, R.S.; WESTCOT, D.W. **A qualidade da água na agricultura**. 2. Ed. Campina Grande: UFPB. FAO, 1991, 39p.

BALIZA, D. P.; SANTOS, M. O.; ALVES, J. D.; GUIMARÃES, R. J.; CUNHA, R. L. Metabolismo da sacarose em cafeeiros submetidos a diferentes níveis de sombreamento. **Coffee Science**, Lavras, v. 9, n. 4, p. 445-455, 2014.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. D. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. D. A.; WILLADINDO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.

BOGINO, P. C.; NIEVAS, F. L.; GIORDANO, W. A review: Quorum sensing in *Bradyrhizobium*. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 94, p. 49-58, 2015.

BRAUN, H.; COELHO, F. S.; SILVA, M. C. C.; FOTES, P. C. R.; CECON, P. R. BUSATO, C. Absorção, metabolismo e diagnóstico do estado de nitrogênio em plantas de batata. **Revista de Ciências Agrárias**. Recife, v. 56, n. 3, p. 185-195, 2013.

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulation of nitrogen absorption and assimilation in plants. **Ciência rural**, Santa Maria, v. 30, n. 2, p. 365-372, 2000.

BRITO, K. Q. D.; NASCIMENTO, R.; SANTOS, J. E. A.; SOUZA, F. G.; SILVA, I. A. C; Crescimento de genótipos de feijão-caupi irrigados com água salina. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v. 10, n. 5, p. 16-21, 2015.

BRITO, M. M. P.; MURAOKA, T.; SILVA, E. C. D. Marcha de absorção do nitrogênio do solo, do fertilizante e da fixação simbiótica em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) e feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) determinada com uso de ^{15}N . **Revista Brasileira de Ciência do solo**, Viçosa, v. 33, n. 4, p. 895-905, 2009.

CAMARGOS, L. S.; SODEK, L. Nodule growth and nitrogen fixation of *Calopogonium mucunoides* L. show low sensitivity to nitrate. **Symbiosis**, Halifax, v. 51, p. 167-174, 2010.

CAMPO, J. R.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Molybdenum-enriched soybean seeds enhance N accumulation, seed yield, and seed protein content in Brazil. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 110, n. 3, p. 219-224, 2009.

CAVALCANTE JUNIOR, E. G.; MEDEIROS, J. F. D.; SOBRINHO, J. E.; FIGUEIRÊDO, V. B.; COSTA, J. P. SANTOS, W. D. O. Development and water requirements of cowpea under climate change conditions in the Brazilian semi-arid region. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 20, n. 9, p. 783-788, 2016.

CHIANU, J. N.; NKONYA, E. M.; MAIRURA, F. S.; CHIANU, J. N.; AKINNIFESI, F. K. Biological nitrogen fixation and socioeconomic factors for legume production in sub-Saharan Africa: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, Les Ulis, v. 31, p. 139-154, 2011.

COELHO, J. B. M.; BARROS, M. F. C.; BEZERRA NETO, E.; CORREA, M. M. Comportamento hídrico e crescimento do feijão vigna cultivado em solos salinizados. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 17, n. 4, p. 379-385, 2013.

COMPANT, S. S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, San Diego, v. 42, p. 669-678, 2010.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Brasília, 2017. v. 4, n. 4, 160 p.

COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; MARTINS, L. V.; AMARAL, F. H. C.; MOREIRA, F. M. S. Nodulação e produtividade de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. por cepas de rizóbio em Bom Jesus, PI. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 1, p. 1-7, 2011.

COSTA, R. C. L. **Assimilação de nitrogênio e ajustamento osmótico em plantas noduladas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] submetidas ao estresse hídrico**. 1999. 225 f. Tese (Doutorado em Bioquímica). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

DUNN, M. F. Key roles of microsymbiont amino acid metabolism in rhizobia-legume interactions. **Critical reviews in microbiology**, Boca Raton, v. 41, n. 4, p. 411-451, 2015.

DUNCAN, K.A.; HARDIN, S.C.; HUBER, S.C. The three maize sucrose synthase isoforms differ in distribution, localization, and phosphorylation. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 47, n. 7, p. 959-971, 2006.

FAGAN, E. B.; MEDEIROS, S. L. P.; MANFRON, P. A.; CASAROLI, D.; SIMON, J.; DOURADO NETO, D.; Müller, L. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja - Revisão. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 14, n. 1, p. 89-106, 2007.

FARINA, R.; BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; DE CAMPOS, S. B.; LISBOA, B. B.; WENDISCH, V.; VARGAS, L. K.; PASSAGLIA, L. M. Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 55, p. 44-52, 2012.

FIGUEIREDO, M. V. B.; MARTINEZ, C. R.; BURITY, H. A.; CHANWAY, C. P. Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **World Journal Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 24, p.1187-1193, 2008.

FIGUEIREDO, M. V. B.; SELDIN, L.; ARAUJO, F. F.; MARIANO, R. L. R. Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications. In: Maheshwari, D. K. (Ed.), **Plant Growth and Health Promoting Bacteria**. Springer-Verlag, Berlin, 2010. pp. 21 e 43.

FILOSO, S.; MARTINELLI, L. A.; HOWARTH, R. W.; BOYER, E. W.; DENTENER, F. Human activities changing the nitrogen cycle in Brazil. **Biogeochemistry**, Netherlands, v. 79, n. 1-2, p. 61-89, 2006.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. M.; SILVA, K. J. D.; NOGUEIRA, M. S. R.; RODRIGUES, E. V. **Feijão caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011, 84 p.

FREIRE, B. G. S.; FREIRE, F. J. Fertilidade do solo e seu manejo em solos afetados por sais. In: NOVAIS, et al. (eds.). **Fertilidade do Solo**, Viçosa, 2007. 1017p.

FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SANTOS, C. E. R. S.; SILVA, A. F.; SOUZA, R. J. C. Fixação biológica de nitrogênio no Semiárido Brasileiro. **Revista Brasileira de Geografia Física**, Rio de Janeiro, v. 8, p. 585-597, 2015.

GHOSH, M. Antifungal properties of haem peroxidase from *Acorus calamus*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 98, p. 1145-1153, 2006.

GUALTER, R. M. R.; BODDEY, R. M.; RUMJANEK, N. G.; FREITAS, A.; XAVIER, G. Eficiência agronômica de estirpes de rizóbio em feijão-caupi cultivado na região da Pré-Amazônia maranhense. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 3, p. 303-308, 2011.

GUALTER, R. M. R.; LEITE, L. F. C.; ARAÚJO, A. S. F.; ALCANTARA, R. M. C. M.; COSTA, D. B. Inoculação e adubação mineral em feijão-caupi: efeitos na nodulação, crescimento e produtividade. **Scientia agraria**, Curitiba, v. 9, n. 4, p. 469-474, 2008.

HAN, J.; SUN, L.; DONG, X.; CAI, Z.; SUN, X.; YANG, H.; WANG, Y.; SONG, W. Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various pathogens. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 28, p. 66–76, 2005.

HOLANDA, J. S.; AMORIM, J. R. A.; Neto, M. F.; HOLANDA, A. C. Qualidade da água para irrigação. In: Gheyi, H. R.; Dias, N. S.; Lacerda, C. F. (ed.) **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados**. Fortaleza: INCT Sal, 2010. 472p.

HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA, 1994. 542 p.

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**, Berlin, v. 49, n. 7, p. 791-801,

KIM, Y. H.; KWAK, S. S. The role of antioxidant enzymes during leaf development. In: GUPTA, S. D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2010. p. 129-150.

KOCH, K. E. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. **Plant Biology**, California, Stuttgart, v. 7, n. 3, p. 235-246, 2004.

KOJIMA, S.; KONISHI, N.; BEIER, M. P.; ISHUYAMA, K.; MARU, I.; HAYAKAWA, T.; YAMAYA, T. NADH-dependent glutamate synthase participated in ammonium assimilation in Arabidopsis root. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 9, n. 8, p. e29402, 2014.

KOMOR, E. The physiology of sucrose storage in sugarcane. In: **Carbohydrate reserves in plants: synthesis and regulation**. (Eds AK Gupta, N Kaur). v. 26, p. 35-53, 2000.

LACAVA, P. T.; ANDREOTE, F. D.; AZEVEDO, J. L. Metabólicos secundários produzidos por microrganismos endofíticos. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S. (Ed.). **Microrganismos e agrobiodiversidade: O novo desafio para agricultura**. Guaíba - RS: Agrolivros, 2008. p. 211-232.

LADRERA, R.; MARINO, D.; LARRAINZAR, E.; GONZÁLEZ, E.M.; ARRESE-IGOR, C. Reduced carbon availability to bacteroids and elevated ureides in nodules, but not in shoots, are involved in the nitrogen fixation response to early drought in soybean. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 145, p. 539–546, 2007.

LEITE, G. H. P.; CRUSCIOL, C. A. C.; SILVA, M. D. A.; LIMA, G. P. P. Atividade das enzimas invertases e acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar sob efeito do nitrato de potássio, etefon e etil-trinexapac. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 4, p. 649-656, 2011.

LIRA JUNIOR, M.; NASCIMENTO, L. R. S.; FRACETTO, G. G. M. Legume-rhizobia signal Exchange: promiscuity and environmental effects, **Frontiers in Microbiology**, Lausanne v. 6, 2015.

LOBO, A. K. M. **Modulação da fotossíntese por açúcares e deficiência hídrica em plantas de cana-de-açúcar**. 2012. 107 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

LOPES, É. C. P.; MORAES, A.; LANG, C. R. Estudo do fracionamento isotópico de nitrogênio aplicado a gramíneas e leguminosas forrageiras. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, Guarapuava, v. 9, n. 1, 2016.

LUGTENBERG, B. J.; CHIN-A-WOENG, T. C.; BLOEMBERG, G. Microbe–plant interactions: principles and mechanisms. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 81, n. 1-4, p. 373-383, 2002.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 63, p. 541-556, 2009.

MA, Y.; PRASAD, M.N.V.; RAJKUMAR, M.; FREITAS, H. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 29, p. 248-258, 2011.

MAIA, J. M., MACÊDO, C. E. C., SILVEIRA, J. A. G., SILVA, A. F., LIRA, E. H. A., MELO, A. S., MENESES, C. H. S. G. Seca e salinidade na resposta antioxidativa de raízes de feijão caupi. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, Campina Grande, v. 11, n. 1, p. 59-93 2015.

MAIA, J. M.; FERREIRA-SILVA, S. L.; VOIGT, E. L.; MACEDO, C. E. C.; PONTE, L. F. A.; SILVEIRA, J. A. G. Atividade de enzimas antioxidantes e inibição do crescimento radicular de feijão caupi sob diferentes níveis de salinidade. **Acta Botânica Brasílica**, Belo Horizonte, v. 26, n. 2, p. 342-349, 2012.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. Mancha aquosa: importante bacteriose do meloeiro no Brasil. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 1, p.79-88, 2004.

MARTINS, R. N. L.; NÓBREGA, R. S. A.; SILVA, A. F. T.; NÓBREGA, J. C. A.; AMARAL, F. H. C.; COSTA, E. M.; LUSTOSA FILHO, J. F.; MARTINS, L. V. Nitrogênio e micronutrientes na produção de grãos de feijão-caupi. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 34, n. 4, p. 1577-1586, 2013.

MEDEIROS, R.; SANTOS, V.; ARAUJO, A.; OLIVEIRA FILHO, C. Estresse salino sobre a nodulação em feijão-caupi. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 21, n. 5, p. 202-206, 2008.

MELLO, G. S. V. **Análise computacional de genes associados ao metabolismo de fixação de nitrogênio no feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) e cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. 2009. 160f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Federal de Pernambuco. Recife.

MELO, S. R. **Desempenho da fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijão-caupi recomendadas para Roraima**. 2009. 59f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Federal de Roraima, Boa Vista.

MUSINGUZI, P.; TENYWA, J. S.; BEKUNDA, M. A. Strategic nutrient management of field pea in southwestern Uganda. **African Journal of Food Agriculture, Nutrition and Development**, Nairobi, v. 10, n. 6, p. 2695-2706, 2010.

NAVEED, M.; MEHBOOB, I. HUSSAIN, M. B.; ZAHIR, Z. A. Perspectives of rhizobial inoculation for sustainable crop production. In: **Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets**, p. 209-239, 2015.

OHYAMA, T.; KUMAZAWA, K. NITROGEN ASSIMILATION IN SOYBEAN NODULES: I. The Role of GS/GOGAT System in the assimilation of ammonia produced by N₂-fixation. **Soil science and plant nutrition**, Nishigara, v. 26, n. 1, p. 109-115, 1980.

OLIVEIRA, J. T. A.; GONDIM, D. M. F.; VASCONCELOS, I. M. Ensaio enzimáticos de proteínas e inibidores de proteases envolvidos com a defesa de plantas a patógenos. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; OLIVEIRA, J. P. O.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P. **Biotecnologia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais**. Brasília: Embrapa Agrobiologia, 2010, p. 61-92.

- OLIVEIRA, R. L.; QUARESMA, C. C. F.; CASTRO, H. G. C.; LIMA, J. M. P.; MOURA, M. F. V. Determinação de umidade, cinzas e fósforo em quatro variedades de feijão caupi. **Revista Química: ciência, tecnologia e sociedade**, Mossoró, v. 4, n. 2, 2015.
- OTT, T.; VAN DONGEN, J. T.; GÜNTHER, C.; KRUSELL, L.; DESBROSSES, G.; VIGEOLAS, H.; BOCK, V.; CZECHOWSKI, T.; GEIGENBERGER, P.; UDVARDI, M. K. Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. **Current Biology**, London, v. 15, p. 531-535, 2005.
- PANKIEVICZ, V. C. S.; AMARAL, F. P.; SANTOS, K. F. D. N.; AGTUCA, B.; XU, Y.; SCUPELLER, M. J.; ARISI, A. C. M.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; STACEY, G.; FERRIERI, R. A. Robust biological nitrogen fixation in a model grass–bacterial association. **The Plant Journal**, Oxford, v. 81, p. 907–919, 2015.
- PEDROTTI, A., CHAGAS, R. M., RAMOS, V. C., NASCIMENTO PRATA, A. P., LUCAS, A. A. T., SANTOS, P. B. Causas e consequências do processo de salinização dos solos. **Electronic Journal of Management, Education and Environmental Technology**, Santa Maria, v. 19, n. 2, p. 1308-1324, 2015.
- PRISCO, J. T.; GOMES FILHO, E. Fisiologia e bioquímica do estresse salino em plantas. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. **Manejo da salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados**. Fortaleza: INCT sal, 2010. 472 p.
- PUPPO, A.; GROTEN, K.; BASTIAN, F.; CARZANIGA, R.; SOUSSI, M.; LUCAS, M. M.; FOYER, C. H. Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. **New Phytologist**, Wiley-Blackwell, v. 165, n. 3, p. 683-701, 2005.
- RIBEIRO, M. R.; BARROS, M. F. C.; FREIRE, M. B. G. S. Química dos solos salinos e sódicos. In: Melo, V. F.; Alleoni, L. R. (ed). In: **Química e mineralogia do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2009. v. 2., cap. 19, p. 449- 484.
- RICHARDS, L. A. (Ed.). **Diagnosis and improvement of saline and alkali soils**. Washington: U. S. Department of Agriculture, 1954. 160 p. (Handbook, 60).
- RODRIGUES, A. C., BONIFACIO, A., ANTUNES, J. E. L., SILVEIRA, J. A. G., FIGUEIREDO, M. V. B. Minimization of oxidative stress in cowpea nodules by the interrelationship between *Bradyrhizobium* sp. and plant growth-promoting bacteria. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 64, p. 245-251, 2013.
- RODRIGUES, A. C., BONIFACIO, A., ARAUJO, F. F.de, LIRA JUNIOR, M. A., FIGUEIREDO, M. V. B. *Azospirillum* sp. as a Challenge for Agriculture In: **Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem**. 1 ed. London : Springer, 2015, v.12, p. 29-51.

- ROITSCH, T.; GONZÁLEZ, M. C. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 9, n. 12, 2004.
- RUFINI, M.; SILVA, M. A. P.; FERREIRA, P. A. A.; CASSETARI, A. A.; SOARES, B. L.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. S. Symbiotic efficiency and identification of rhizobia that nodulate cowpea in a *Rhodocyclotron*. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 50, p. 115-122, 2014.
- RUMJANEK, N.G.; MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G.R. & NEVES, M.C.P. Fixação biológica de nitrogênio. In: FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J.A.A. & RIBEIRO, V.Q., eds. **Feijão-caupi; avanços tecnológicos**. Brasília, Embrapa/ Informação Tecnológica, 2005. p.281-335.
- SABOYA, R. D. C. C.; BORGES, P. R. S.; SABOYA, L. M. F.; REIS, F. P. M.; SOUZA, S. E. A.; SANTOS, A. F.; SANTOS, E. R. Resposta do feijão-caupi a estirpes fixadoras de nitrogênio em Gurupi-TO. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 4, n. 1, 2013.
- SCHOSSLER, T. R.; MACHADO, D. M.; ZUFFO, A. M.; ANDRADE, F. R.; PIAULINO, A. C.; PIAUÍ, B. J. B. Salinidade: efeitos na fisiologia e na nutrição mineral de plantas. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 8, p. 1563-1578, 2012.
- SHARMA, P., JHA, A. B., DUBEY, R. S., PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, Oxford, v. 2012, 2012.
- SILVA, E. F.; JÚNIOR, A. P. B.; SILVEIRA, L. M.; SOUZA SANTANA, F. M.; SANTOS, M. G. Avaliação de cultivares de feijão-caupi irrigado para produção de grãos verdes em Serra Talhada-PE. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 26, n.1, p. 21-26, 2013.
- SOUSA, G. G.; VIANA, T. V. A.; LACERDA, C. F.; AZEVEDO, B.M.; SILVA, G. L.; COSTA, F. R. B. Estresse salino em plantas de feijão-caupi em solo com fertilizantes orgânicos. **Revista Agro@ambiente On-line**, Roraima, v. 8, n. 3, p. 359-367, 2014.
- STAMFORD, N.P.; SILVA JUNIOR, S.; SANTOS, C.E.R.S.; FREITAS, A.D.S.; LIRA JUNIOR, M.A.; BARROS, M.F.C. Cowpea nodulation, biomass yield and nutrient uptake, as affected by biofertilizers and rhizobia, in a sodic soil amended with *Acidithiobacillus*. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v.35, n.4, p.453-459, 2013.
- TAVARES FILHO, A. N.; BARROS, M. F. C.; ROLIM, M. M.; SILVA, E. F. F. Incorporação de gesso para correção da salinidade e sodicidade de solos salino-sódicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 16, n. 3, p. 247-252, 2012.
- TORRES, M. A.; JONES, J. D.; DANGL, J. L. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. **Plant physiology**, Lancaster, v. 141, n. 2, p. 373-378, 2006.

VESSEY, K.; BUSS, T. J. *Bacillus cereus* UW85 inoculation effects on growth, nodulation, and N accumulation in grain legumes: Controlled-environment studies. **Canadian Journal Plant Science**, Ottawa, v.82, p.282-290, 2002.

XAVIER, D. A.; FURTADO, G. F.; SOUSA JUNIOR, J. R.; SOUSA, J. R. M.; SOARES, L. A. A. Índices fisiológicos do feijão-caupi irrigado com água salina e adubação nitrogenada. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v. 9, n. 1, p. 294-298, 2014

XAVIER, T. F., ARAÚJO, A. S. F., SANTOS, V. B., CAMPOS, F. L. Ontogenia da nodulação em duas cultivares de feijão-caupi. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 2, 561-564, 2007.

YAO, S. G., KODAMA, R., WANG, H., ICHII, M., TAKETA, S., YOSHIDA, H. Analysis of the rice SHORT-ROOT5 gene revealed functional diversification of plant neutral/alkaline invertase family. **Plant science**, Shannon, v.176, n.5, p.627-634, 2009.

ZUFFO, A. M.; REZENDE, P. M.; BRUZI, A. T.; OLIVEIRA, N. T.; SOARES, I. O.; NETO, G. F. G.; CARDILLO, B. E. S.; SILVA, L. O. Co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* in the soybean crop. **Revista de Ciências Agrárias**, Recife, v. 38, n.1, p. 87-93, 2015.

Capítulo I

3 SINERGISMO ENTRE MICRO-ORGANISMOS NA COINOCULAÇÃO DE *Bradyrhizobium* sp. E BPCP EM FEIJÃO-CAUPI COM E SEM INDUÇÃO DO ESTRESSE SALINO

Artigo a ser submetido para publicação no periódico Journal of Microbiology

3 Sinergismo entre micro-organismos na coinoculação de *Bradyrhizobium* sp. e BPCP em feijão-caupi com e sem indução do estresse salino

Resumo

Em leguminosas como o feijão-caupi, o nitrogênio pode ser suprido pela fixação biológica de nitrogênio, com o uso de inoculantes com rizóbios. A coinoculação de rizóbios e bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) em leguminosas pode potencializar a nodulação, aumentar crescimento das plantas e favorecer a fixação de nitrogênio. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o sinergismo da coinoculação com *Bradyrhizobium* sp. e BPCP como alternativa para otimizar a performance simbiótica e o desenvolvimento do feijão-caupi com ou sem indução de estresse salino. As plantas de feijão caupi cv. "IPA 206" foram cultivadas em condições axênicas, inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e 15 estirpes de BPCP, sendo mantidas com (50 mmol L⁻¹ de NaCl) e sem estresse salino. Foram avaliados, o crescimento, massa seca e nodulação e realizada análise do teor de nitrogênio, sódio e potássio na parte aérea das plantas. Foi observada uma diminuição no número de nódulos, massa seca da raiz, altura de plantas e nitrogênio total, quando o feijão-caupi cv "IPA 206" foi cultivado com estresse salino, indicando que esta cultivar é sensível ao estresse induzido por um período de 23 dias. Porém a inoculação e coinoculação com o *Bradyrhizobium* sp. e BPCP permitiu a sobrevivência das plantas e o seu desenvolvimento. As respostas em relação ao sinergismo dos micro-organismos, quanto ao crescimento, nodulação e mecanismos de tolerância à salinidade foram observadas nas plantas coinoculadas com *Bradyrhizobium*. sp. e *Actinomadura* sp., *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp., *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp., *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* e *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus durus*. Estas associações foram promissoras para otimizar a performance simbiótica e o desenvolvimento do feijão-caupi cv "IPA 206".

Palavras chave: *Vigna unguiculata* [L.] Walp.. Rizóbio. FBN. Salinidade. Bactérias promotoras de crescimento de plantas.

Synergism between microorganisms in the inoculation of *Bradyrhizobium* sp. and BPCP in cowpea with and without salt stress induction

Abstract

In legumes such as cowpea, nitrogen can be supplied by biological fixation of nitrogen, with the use of *rhizobium* inoculants. The co-inoculation of rhizobia and plant growth promoting bacteria (PGPB) in legumes can potentiate nodulation, increase plant growth and favor nitrogen fixation. In this context, the objective of this work was to evaluate the synergism of the co-inoculation with *Bradyrhizobium* sp. and BPCP as an alternative to optimize symbiotic performance and the development of cowpea with or without salt stress induction. The plants of cowpea cv. "IPA 206" were cultivated under axenic conditions, inoculated with *Bradyrhizobium* sp. and coincidental with *Bradyrhizobium* sp. and 15 PGPB strains, being maintained with (50 mmol L⁻¹ of NaCl) and without saline stress. Growth, dry mass and nodulation were evaluated and nitrogen, sodium and potassium contents were analyzed in the aerial part of the plants. A decrease in the number of nodules, root dry matter, plant height and total nitrogen was observed when the cowpea cv "IPA 206" was cultivated with saline stress, indicating that this cultivar is sensitive to stress induced by a period of 23 days. However, inoculation and co-inoculation with *Bradyrhizobium* sp. and PGPB allowed for the survival of plants and their development. The response to microorganism synergism regarding growth, nodulation and mechanisms of salinity tolerance were observed in the plants co-inoculated with *Bradyrhizobium*. sp. and *Actinomadura* sp., *Bradyrhizobium* sp. and *Bacillus* sp., *Bradyrhizobium* sp. and *Streptomyces* sp., *Bradyrhizobium* sp. and *Paenibacillus graminis* and *Bradyrhizobium* sp. and *Paenibacillus durus*. These associations were promising to optimize symbiotic performance and the development of cowpea cv "IPA 206".

Keywords: *Vigna unguiculata* [L.] Walp.. *Rhizobium*. BNF. Sanility. Plant growth promoting bacteria.

3.1 Introdução

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) é uma leguminosa que compõe a alimentação básica de muitos brasileiros, principalmente nas regiões Norte e Nordeste. É fonte de proteínas (23 a 25% em média), fibras, aminoácidos essenciais, carboidratos, vitaminas e minerais (FROTA et al., 2008; CHAGAS JÚNIOR et al., 2014). Esta cultura, é amplamente cultivada na região Nordeste, porém com baixa produtividade, em decorrência do baixo nível tecnológico utilizado no cultivo, mesmo sendo adaptada às condições tropicais e subtropicais, (FREIRE FILHO et al., 2011).

O feijão-caupi quando em simbiose com bactérias capazes de realizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN) é beneficiada pela redução ou eliminação no uso de fertilizantes nitrogenados. Sendo a FBN importante na produção sustentável de alimentos agrícolas e ambientalmente saudáveis (BOGINO et al., 2015; SOUZA et al., 2015). Muitas bactérias que se associam às plantas têm a capacidade de promover seu crescimento, sendo denominadas de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), as quais podem ser associativas, endofíticas ou de vida livre (MOREIRA et al., 2010).

As bactérias BPCP podem promover o crescimento vegetal, pela FBN, pela produção de substâncias que auxiliam o crescimento radicular, que apresentem efeito antagônico contra fitopatógenos, solubilização de fosfatos inorgânicos, produção de fitormônios, entre outros, aumentando a resistência a estresses abióticos (COMPANT et al., 2010; MASCIARELLI et al., 2014). A coinoculação com rizóbios e BPCP em leguminosas pode potencializar a nodulação, aumentar o crescimento das plantas e favorecer a FBN, promover a nodulação precoce e aumento na produção de grãos, quando a interação entre as espécies bacterianas é positiva (HUNGRIA et al., 2013; CHIBEBA et al., 2015).

Neste estudo, foi testada a hipótese de que a inoculação e/ou coinoculação com *Bradyrhizobium* sp. e BPCP pode otimizar o desenvolvimento e a performance simbiótica em plantas de feijão-caupi, com e sem indução do estresse salino, além de mitigar os efeitos deletérios causado pelo estresse salino. Esta hipótese foi testada para investigar a interação sinérgica entre *Bradyrhizobium* sp. e BPCP, que pode resultar em seleção de micro-organismos mais eficientes para o feijão-caupi. O objetivo deste trabalho foi avaliar o sinergismo da coinoculação com *Bradyrhizobium*

sp. e BPCP como alternativa para otimizar a performance simbiótica e o desenvolvimento do feijão-caupi com ou sem indução de estresse salino.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Obtenção dos micro-organismos e preparo dos inoculantes

A estirpe de rizóbio e bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP) utilizadas no experimento foram multiplicadas em condições controladas para a produção dos inoculantes (Tabela 1). Os meios de cultura de purificação e multiplicação de cada estirpe estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos meios utilizados para multiplicação de estirpes de bactérias promotoras de crescimento em plantas

Meio de cultura	Referência	pH	Estirpe bacteriana	Código de acesso
YM e YMA	Vincent, 1970	6,5	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	UFLA 03-84
AY e AYA	Nonomura; Ohara, 1971	6,4	<i>Actinomadura</i> sp. <i>Streptomyces</i> sp.	183-EL 212 e S30
DYGS	Rodrigues Neto, 1986	6,0	<i>Bacillus</i> sp <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	IPACC11 BR11175
		6,8	<i>Azospirillum amazonense</i> <i>Burkholderia tropica</i>	BR11140 BR11364
TSA e TSB		7,3	<i>Bacillus</i> ssp. <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Brevibacillus brevis</i> <i>Paenibacillus brasiliensis</i> <i>Paenibacillus graminis</i> <i>Paenibacillus durus</i>	ANBE 31 440 448 447 24 MC 04.21 C 04.21 e CRIP 105

Os inoculantes foram incubados em agitador rotatório (200 rpm e 28° C) por 96 horas, para a estirpe de *Bradyrhizobium* sp. (UFLA 03-84) e para as 15 estirpes de BPCP foram (200 rpm a 30° C) por 48 a 96 horas de acordo com as estirpes bacterianas.

O experimento foi conduzido em condições axênicas em casa-de-vegetação do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA; Recife/PE/ Brasil). Sementes do cultivar “IPA 206” de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], foram desinfestadas (HUNGRIA; ARAÚJO, 1994) e semeadas em vasos de Leonard contendo areia lavada (pH 6,5), ambos previamente autoclavados (1 h; 120° C; 101 kPa). Na ocasião da

semeadura, as sementes foram inoculadas utilizando-se 1,0 mL da suspensão bacteriana (10^8 UFC mL⁻¹), contendo o *Bradyrhizobium* sp. (UFLA 03-84) ou coinoculadas com 1,0 mL da suspensão bacteriana contendo o *Bradyrhizobium* sp. e 1,0 mL da suspensão bacteriana contendo uma estirpe de BPCP (10^7 UFC mL⁻¹).

Durante o experimento, as plantas foram irrigadas por capilaridade com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) isenta de nitrogênio e modificada conforme Silveira et al. (1998). O desbaste foi realizado aos cinco dias após a germinação (DAG) e mantiveram-se duas plantas por vaso (unidade experimental).

As plantas foram submetidas ao estresse salino aos 10 DAG, as quais foram adicionados 50 mmol L⁻¹ de cloreto de sódio (NaCl) na solução nutritiva, em 50% dos vasos, sendo a solução nutritiva colocada nos vasos de Leonard com pH de 6,5 e CE de 1,18 mS cm⁻¹ e 6,07 mS cm⁻¹, sem e com NaCl, respectivamente. As soluções nutritivas foram trocadas a cada três a quatro dias.

3.2.2 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso, com arranjo em fatorial (16 x 2) + 1 controle, sendo 16 combinações bacterianas (uma inoculação apenas com *Bradyrhizobium* sp. e 15 coinoculações com *Bradyrhizobium* sp. e BPCP), conforme descrito na Tabela 2. Aplicaram-se dois níveis de salinidade (0 e 50 mmol L⁻¹ NaCl), em três blocos casualizados e o tratamento controle absoluto (plantas não inoculadas, sem nitrogênio e sem NaCl).

Tabela 2. Inoculação e coinoculações utilizadas nas sementes de feijão-caupi cv. ‘IPA 206”, para formação dos tratamentos

Tratamento	Combinação bacteriana	Espécie bacteriana
T1	UFLA 03-84	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
T2	UFLA 03-84 e 183-EL	<i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Actinomadura</i> sp.
T3	UFLA 03-84 e IPACC11	<i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Bacillus</i> sp.
T4	UFLA 03-84 e BR11140	<i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Azospirillum amazonense</i>
T5	UFLA 03-84 e BR11175	<i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Herbaspirillum seropedicae</i>
T6	UFLA 03-84 e BR11364	<i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Burkholderia tropica</i>
T7	UFLA 03-84 e S30	<i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Streptomyces</i> sp.
T8	UFLA 03-84 e 212	<i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Streptomyces</i> sp.
T9	UFLA 03-84 e ANBE 31	<i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Bacillus</i> sp.
T10	UFLA 03-84 e 440	<i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Bacillus cereus</i>
T11	UFLA 03-84 e 448	<i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Bacillus pumilus</i>
T12	UFLA 03-84 e 447	<i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Brevibacillus brevis</i>
T13	UFLA 03-84 e 24	<i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Paenibacillus brasilensis</i>
T14	UFLA 03-84 e MC 04.21	<i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Paenibacillus graminis</i>
T15	UFLA 03-84 e C 04.50	<i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Paenibacillus durus</i>
T16	UFLA 03-84 e CRIP 105	<i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Paenibacillus durus</i>

3.2.3 Variáveis analisadas

A coleta do experimento foi realizada aos 33 DAG, no Laboratório de Biologia do Solo no IPA, onde as plantas foram induzidas ao estresse salino por 23 dias. Foram avaliadas as seguintes variáveis: altura de plantas com o trena graduada, comprimento da raiz (CR) com régua graduada, massa seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e de nódulos (MSN) com balança de precisão, Relação massa seca da parte aérea e massa seca da raiz (MSPA/MSR) por cálculo, número de nódulos (NN) contando, nitrogênio total pelo método de Kjeldahl (BREMNER, 1965), tamanho dos nódulos e nodulação específica, calculados segundo metodologia de Gulden e Vessey, 1998, teor de sódio e potássio na MSPA, segundo métodos descritos em EMBRAPA (SILVA, 2009).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com níveis de significância de 5% pelo teste F, análise de contraste entre o tratamento controle e as médias comparadas pelo teste de Tukey a ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Assistat (SILVA et al., 2009).

3.3 Resultados e Discussão

Os tratamentos inoculados proporcionaram melhor desenvolvimento vegetal do que as plantas não inoculadas, para as variáveis: altura da planta (AP) massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de nódulos (MSN), relação massa seca da parte aérea e massa seca da raiz (MSPA/ MSR), número de nódulos (NN) e nodulação específica (Tabela 3). Entretanto foi observado que a inoculação com o *Bradyrhizobium* sp. (UFLA 03-84) e/ou a coinoculação com as BPCP não interferiram na MSR e CR.

Tabela 3. Análise de contraste entre os tratamentos não inoculados e inoculados

Tratamento	AP		MSPA		MSR		CR		MSPA/MSR	
	cm		g.vaso ⁻¹		g.vaso ⁻¹		cm.vaso ⁻¹		g.g ⁻¹	
Não inoculado	22,27	B	0,94	B	0,69	A	16,33	A	1,48	B
Inoculado	31,79	A	2,22	A	0,68	A	14,76	A	3,72	A
Tratamento	NN		MSN		NE		Sódio		Potássio	
	vaso ⁻¹		g.vaso ⁻¹		NN.g ⁻¹ MSR		g.kg ⁻¹ MSPA		g.kg ⁻¹ MSPA	
Não inoculado	0,00	B	0,00	B	0,00	B	0,00	B	12,61	B
Inoculado	132,4	A	0,22	A	211,90	A	9,49	A	17,50	A

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) AP – Altura de planta, MSPA – massa seca da parte aérea. MSR – massa seca de raiz, CR – comprimento de raiz, MSPA/MSR – relação massa seca da parte aérea e massa seca da raiz, NN – número de nódulos, MSN – massa seca de nódulos, NE – nodulação específica, sódio – teor de sódio na parte aérea, potássio – teor de potássio na parte aérea

Como foi observado para MSPA, AP, MSN, MSPA/MSR e NN, a inoculação de sementes de leguminosas com bactérias fixadoras de nitrogênio contribui significativamente para o aumento dos rendimentos na produção de grãos (VOISIN et al., 2010; FERREIRA et al., 2011), pode dispensar o uso de fertilizante mineral nitrogenado, caso esta inoculação seja sinérgica (HUNGRIA; MEGÍAS, 2013), sendo necessário avaliar a compatibilidade da combinação bacteriana, e se esta permite aumentar a produtividade agrícola (BEN SALAH et al., 2011).

O sinergismo e benefício da coinoculação entre rizóbio e BPCP depende da estirpe utilizada no inoculante, de sua eficácia, da especificidade com a espécie vegetal, do cultivar e genótipo, composição do exsudato de raiz da planta hospedeira, densidade de células de inóculo aplicada, dose de inoculação ideal, e variação de temperatura (REMANS et al., 2008; MISHRA et al., 2009; FOX et al., 2011).

Houve incremento na altura das plantas inoculadas com T12, seguido por T16 e depois T14, T5, T10, T7, T2, T1, T13 e T11, independente da condição de cultivo (Figura 1), as plantas coinoculadas com os tratamentos T4, T6, T9 e T15, apresentaram plantas menores. O tratamento T15 (*Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus durus* (UFLA 03-84 e C 04.50) neste trabalho apresentou tamanho menor altura das plantas, não corroborando com o resultado encontrado por Rodrigues et al., (2012). Este resultado indica a importância da interação sinérgica entre o rizóbio e a BPCP, favorecendo o desenvolvimento da planta.

Rodrigues et al. (2012) cultivou plantas de feijão-caupi cv “IPA 206”, em vasos de Leonard em casa-de-vegetação”, o feijão foi coinoculado com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) e *Bacillus*, *Brevibacillus* ou *Paenibacillus*, onde o tratamento coinoculado com o *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus durus* (BR 3267 e C 04.50) teve maior altura de planta aos 35 dias após o plantio.

Comparando as diferentes condições de cultivo com e sem estresse salino observa-se uma redução de 27 % na altura das plantas (Figura 1B). Quando foram cultivadas na presença de 50 mmol L⁻¹ de NaCl, as combinações bacterianas permitiram o crescimento das plantas, mesmo estas plantas apresentando diminuição no seu porte e área foliar, em comparação com as plantas sob condição controle. A tolerância ao estresse salino foi influenciada pela inoculação com *Bradyrhizobium* sp. (T1), tendo em vista que a estirpe *Bradyrhizobium* sp. (UFLA 03-84) tolera até 30 g L⁻¹ de NaCl in vitro (NÓBREGA et al., 2004), pois as plantas sem inoculação e mantidas sob estresse salino morreram durante a condução do experimento (dados não apresentado).

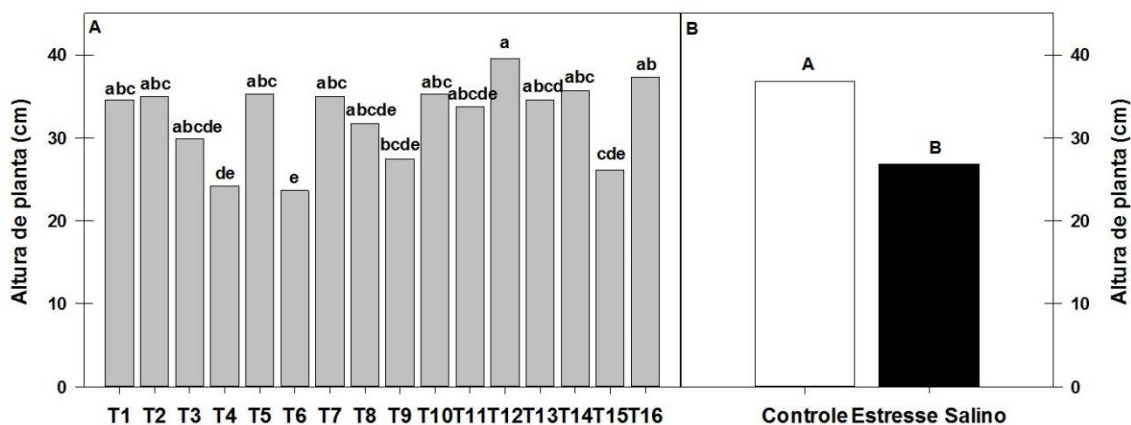


Figura 1. Altura de planta (*CV = 15,77%) de feijão-caupi inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e coinoculadas *Bradyrhizobium* sp e BPCP - (A), cultivadas em condição controle e estresse salino (0 e 50 mmol L⁻¹ NaCl) - (B). Médias seguidas de mesma letra minúscula (combinações de bactérias) e maiúscula (condições de cultivo) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). *coeficiente de variação.

*T1 - *Bradyrhizobium* sp., T2 - *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp., T3 e T9 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp., T4 - *Bradyrhizobium* sp. e *Azospirillum amazonense*, T5 - *Bradyrhizobium* sp. e *Herbaspirillum seropedicae*, T6 - *Bradyrhizobium* sp. e *Burkholderia tropica*, T7 e T8 - *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp., T10 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus cereus*, T11 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus pumilus*, T12 - *Bradyrhizobium* sp. e *Brevibacillus brevis*, T13 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus brasiliensis*, T14 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis*, T15 e T16 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus durus*.

A tolerância ao estresse salino das plantas coinoculadas pode ter sido favorecida pela produção da enzima ACC deaminase pela BPCP, tendo em vista que a ACC deaminase auxilia a manter o crescimento e desenvolvimento de plantas sob condições de estresse, por diminuir a síntese de etileno (SALEE et al., 2007), a estirpe IPACC11 apresentou atividade positiva para ACC deaminase (ANTUNES et al., 2016).

A inoculação com *Bradyrhizobium* sp. (T1) e as coinoculações com *Bradyrhizobium* sp. e BPCP responderam diferentemente quanto ao crescimento da raiz, sendo as raízes maiores nos tratamentos *Bradyrhizobium* sp. (T1) isoladamente e todos os tratamento coinoculados exceto, T3, T6, T9, T10, T11 e T13 (Figura 2). O maior crescimento da raiz permite que a planta explore um maior volume de solo, beneficiando a absorção de nutrientes e água pelas plantas (SILVA; DELATORRE, 2009).

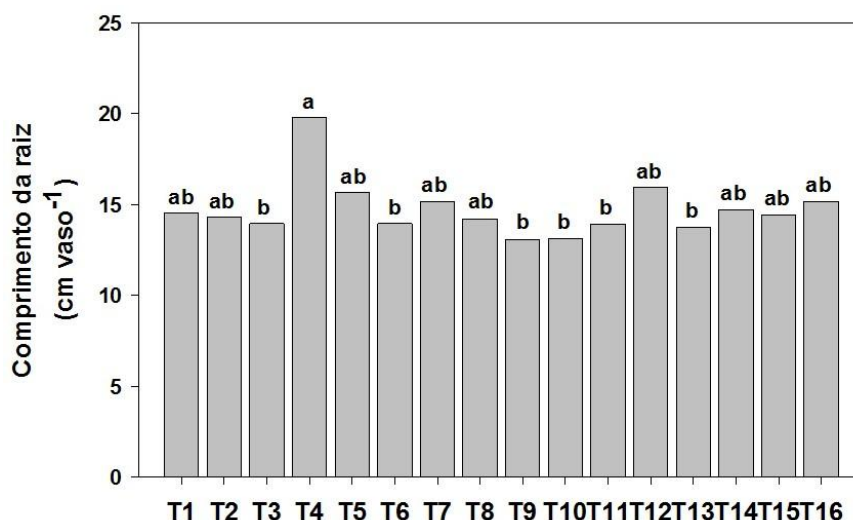


Figura 2. Comprimento da raiz (*CV = 19,02%) de plantas de feijão-caupi cv “IPA 206” inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e coinoculadas *Bradyrhizobium* sp. e BPCP, independentes da condição de cultivo. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre as combinações bacterianas, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *coeficiente de variação.

*T1 - *Bradyrhizobium* sp., T2 - *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp., T3 e T9 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp., T4 - *Bradyrhizobium* sp. e *Azospirillum* amazonense, T5 - *Bradyrhizobium* sp. e *Herbaspirillum* seropedicae, T6 - *Bradyrhizobium* sp. e *Burkholderia tropica*, T7 e T8 - *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp., T10 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus cereus*, T11 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus pumilus*, T12 - *Bradyrhizobium* sp. e *Brevibacillus brevis*, T13 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus brasilensis*, T14 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis*, T15 e T16 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus durus*.

Quando as plantas de feijão-caupi foram cultivadas sob condição controle houve incremento na produção massa seca da parte aérea em algumas combinações bacterianas, nas plantas inoculadas com todas as combinações bacterianas, exceto os tratamentos T4, T6, T9, T11 e T15. Porém quando cultivadas sob estresse salino nenhuma das combinações bacterianas foi beneficiada quanto à massa seca da parte aérea (Figura 3).

A presença ACC-deaminase em BPCP facilita a simbiose entre rizóbios e leguminosas, uma vez que diminui a síntese de etileno endógeno e portanto, facilita o alongamento da raiz e a nodulação, resultando em maior crescimento e produtividade vegetal, induzindo tolerância a estresses como o de seca e de salinidade. Bactérias de diversos gêneros como *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, e *Rhizobium* exibiram atividade de ACC-deaminase (AHMAD; KIBRET, 2014; GLICK, 2014).

Comparando as condições de cultivos, os tratamentos T3, T4, T6, T8, T9 e T15, não apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), quanto a massa seca da parte aérea, quando cultivadas com e sem estresse salino. A maioria das plantas que apresentaram MSPA maior que 3,0 g vaso⁻¹, quando em condição

controle, tiveram a massa seca da parte aérea reduzida quando cultivadas sob estresse salino, com exceção dos tratamentos T3 e T8 (Figura 3).

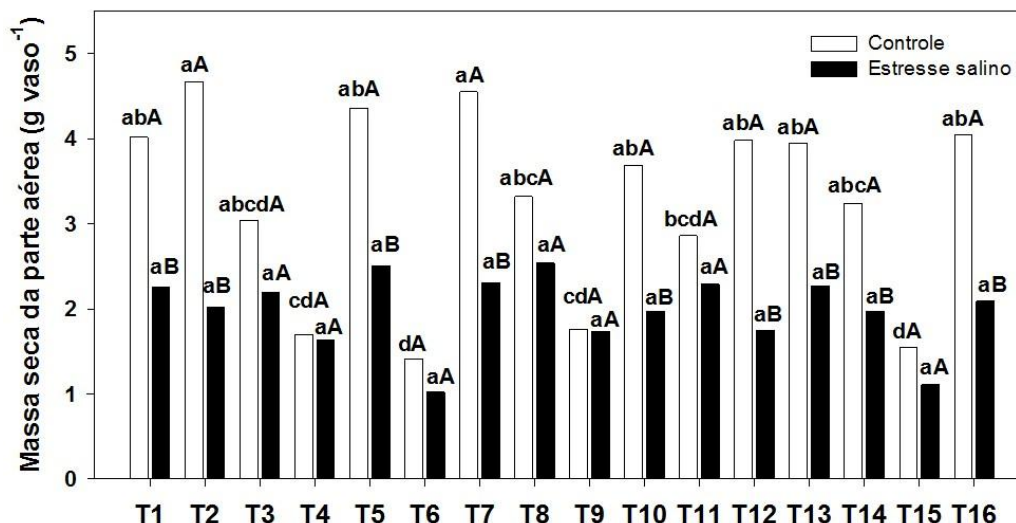


Figura 3. Massa seca da parte aérea (*CV = 22,70%) de plantas de feijão-caupi “IPA 206” inoculado com *Bradyrhizobium* sp. e coinoculadas *Bradyrhizobium* sp. e BPCP, cultivadas em condição controle e estresse salino (0 e 50 mmol L⁻¹ NaCl). Médias seguidas de mesma letra minúscula (combinações de bactérias) e maiúscula (condições de cultivo) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). *coeficiente de variação.

*T1 - *Bradyrhizobium* sp., T2 - *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp., T3 e T9 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp., T4 - *Bradyrhizobium* sp. e *Azospirillum amazonense*, T5 - *Bradyrhizobium* sp. e *Herbaspirillum seropedicae*, T6 - *Bradyrhizobium* sp. e *Burkholderia tropica*, T7 e T8 - *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp., T10 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus cereus*, T11 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus pumilus*, T12 - *Bradyrhizobium* sp. e *Brevibacillus brevis*, T13 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus brasiliensis*, T14 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis*, T15 e T16 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus durus*.

O aumento no crescimento, como evidenciado na altura de plantas e massa seca da parte aérea das plantas de feijão-caupi promovido pelas BPCP, que utilizam mecanismos para beneficiar a planta, tais como a produção de fitohormônio, sideróforos, amônia, atividade da nitrogenase e solubilização de fosfato (FIGUEIREDO et al., 2008; ANJUM et al., 2011; LONGATTI et al., 2013; AHMED; KIBRET, 2014).

Maior massa seca da raiz foi encontrada nas plantas inoculadas com o tratamento T1 e com todas as coinocuações exceto os tratamentos, T4, T6, T9 e T15, independente das condições de cultivo (Figura 4A). Diferentes coinoculações beneficiaram o crescimento radicular, como foi observado nas Figuras 2 e 4A, apenas nas plantas coinoculadas os tratamentos T4 e T15, que promoveram maior crescimento de raízes, porém com pouca massa, indicando ter menos raízes laterais, consequentemente menor aérea de absorção de nutrientes e água.

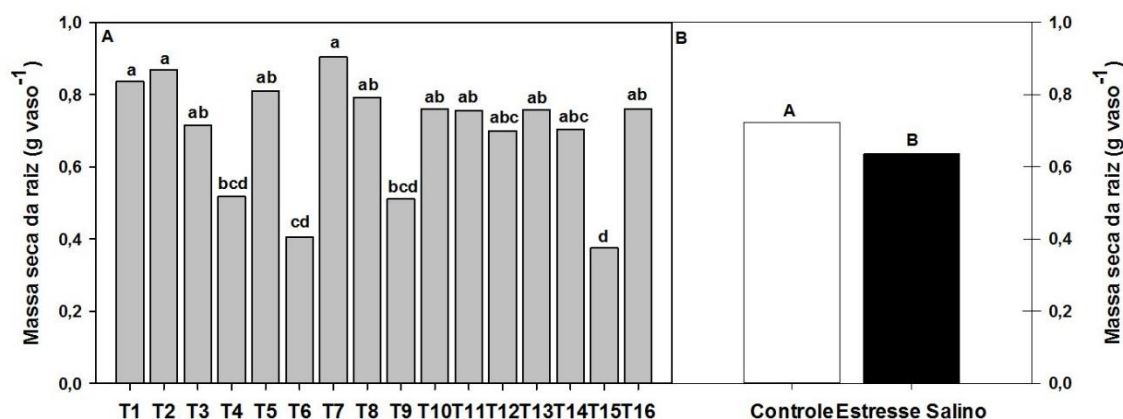


Figura 4. Massa seca da raiz (*CV = 21,01%) de plantas de feijão-caupi inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e coinoculadas *Bradyrhizobium* sp. e BPCP - (A) cultivadas em condição controle e estresse salino (0 e 50 mmol L⁻¹ NaCl) - (B). Médias seguidas de mesma letra minúscula (combinações de bactérias) e maiúscula (condições de cultivo) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *coeficiente de variação.

*T1 - *Bradyrhizobium* sp., T2 - *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp., T3 e T9 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp., T4 - *Bradyrhizobium* sp. e *Azospirillum* amazonense, T5 - *Bradyrhizobium* sp. e *Herbaspirillum seropedicae*, T6 - *Bradyrhizobium* sp. e *Burkholderia tropica*, T7 e T8 - *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp., T10 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus cereus*, T11 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus pumilus*, T12 - *Bradyrhizobium* sp. e *Brevibacillus brevis*, T13 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus brasiliensis*, T14 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis*, T15 e T16 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus durus*.

Quando as plantas foram cultivadas sob estresse salino a massa seca da raiz reduziu 49,37%, quando comparadas com as plantas que foram cultivadas em condição controle. Segundo Maia et al., (2015) o estresse salino provoca a morte do meristema apical das plantas, inibindo o crescimento da raiz principal (Figura 4B).

Diversas BPCP podem sintetizar ácido-3-indol acético (AIA), inclusive as dos gêneros *Azospirillum*, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, como a estirpe de *Bacillus* sp. (IPACC11) (ANTUNES, 2016), *Azospirillum amazonense* (BR11140) (REIS JÚNIOR et al., 2004) e *Herbaspirillum seropedicae* (BR11175) (PORTO et al., 2017). Promovendo a divisão celular, o crescimento das raízes (pela formação de raízes laterais e adventícias) e formação de nódulos, nas leguminosas, assim como a resistência a condições estressantes (TEALE et al., 2006; AHMAD; KIBRET, 2014).

As plantas cultivadas sem salinidade apresentaram maior massa seca de nódulos (MSN) nas que foram coinoculadas com os tratamentos T2, T7, e T12, porém nas plantas cultivadas sob salinidade a MSN foi maior nas plantas coinoculadas com os tratamentos T2, T3, T7, T8, T9, T10, T11, T14 e T16 (Figura 5). Comparando as condições de cultivo observou-se que apenas as plantas coinoculadas com os

tratamentos T4 e T9, não apresentaram redução significativa na massa seca de nódulos, porém estas coinoculações não apresentaram diminuição na MSN quando as plantas foram cultivadas sem salinidade. Nas demais coinoculações houve uma redução significativa na MSN nas plantas submetidas ao estresse salino quando comparadas as cultivadas na condição controle (Figura 5).

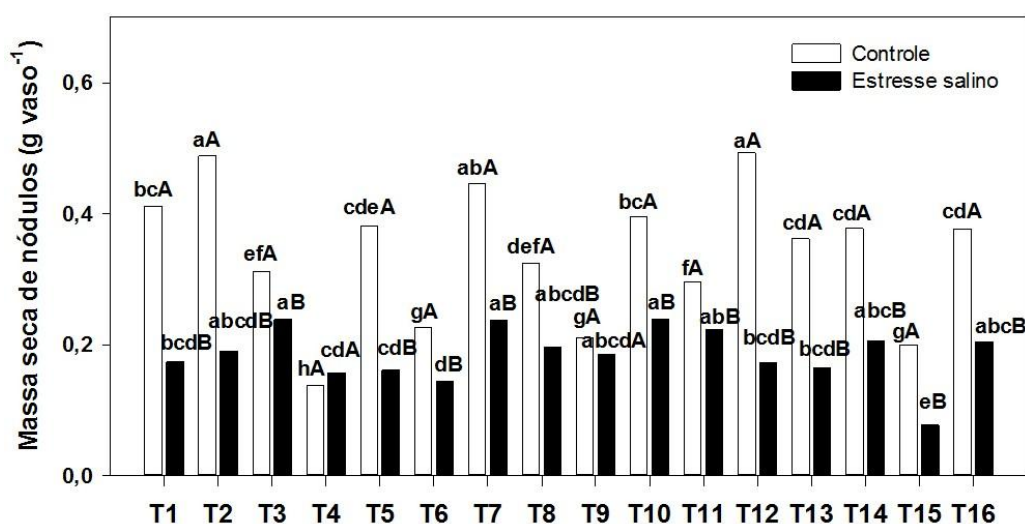


Figura 5. Massa seca de nódulos (*CV = 7,84%) de plantas de feijão-caupi "IPA 206" inoculado com *Bradyrhizobium* sp. e coinoculadas *Bradyrhizobium* sp. e BPCP, cultivadas em condição controle e estresse salino (0 e 50 mmol L⁻¹ NaCl). Médias seguidas de mesma letra minúscula (combinações de bactérias) e maiúscula (condições de cultivo) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). *coeficiente de variação.

*T1 - *Bradyrhizobium* sp., T2 - *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp., T3 e T9 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp., T4 - *Bradyrhizobium* sp. e *Azospirillum amazonense*, T5 - *Bradyrhizobium* sp. e *Herbaspirillum seropedicae*, T6 - *Bradyrhizobium* sp. e *Burkholderia tropica*, T7 e T8 - *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp., T10 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus cereus*, T11 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus pumilus*, T12 - *Bradyrhizobium* sp. e *Brevibacillus brevis*, T13 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus brasilensis*, T14 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis*, T15 e T16 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus durus*.

A relação entre massa seca da parte aérea e massa seca da raiz (MSPA/ MSR) não apresentou diferença significativa pelo teste de Tukey (p<0,05) entre a inoculação com *Bradyrhizobium* sp. e as coinoculações com *Bradyrhizobium* sp. e BPCP, quando as plantas foram cultivadas na presença de estresse salino (50 mmol L⁻¹ NaCl) ou sem estresse, podendo indicar um mecanismo de adaptação destas plantas à salinidade (Figura 6).

A relação MSPA/MSR foi menor apenas nas plantas coinoculadas com o tratamento T14 (*Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* - UFLA 03-84 e MC 04.21), quando cultivadas sob estresse salino em comparação as plantas cultivadas na condição controle (Figura 6). Isto indica que o crescimento da parte aérea foi mais prejudicado do que o crescimento da raiz, quando as plantas foram cultivadas na presença do NaCl devido a menor relação MSPA/MSR. Segundo Morales et al. (2001), as partes da planta não são afetadas igualmente pela salinidade.

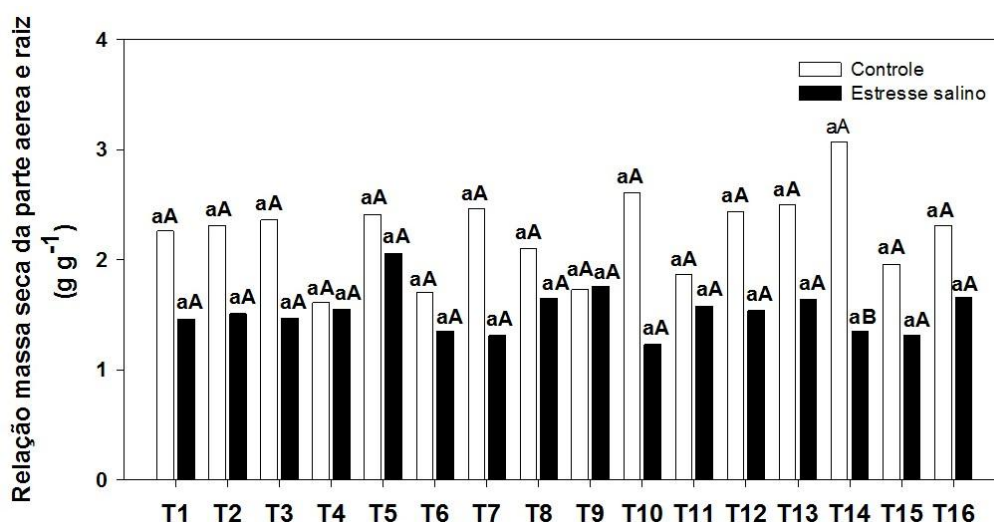


Figura 6. Relação massa seca da parte aérea e massa seca da raiz (*CV = 21,45%) das plantas de feijão-caupi "IPA 206" inoculado com *Bradyrhizobium* sp. e coinoculadas *Bradyrhizobium* sp. e BPCP, cultivadas em condição controle e estresse salino (0 e 50 mmol L⁻¹ NaCl). Médias seguidas de mesma letra minúscula (combinações de bactérias) e maiúscula (condições de cultivo) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). *coeficiente de variação

*T1 - *Bradyrhizobium* sp., T2 - *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp., T3 e T9 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp., T4 - *Bradyrhizobium* sp. e *Azospirillum amazonense*, T5 - *Bradyrhizobium* sp. e *Herbaspirillum seropedicae*, T6 - *Bradyrhizobium* sp. e *Burkholderia tropica*, T7 e T8 - *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp., T10 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus cereus*, T11 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus pumilus*, T12 - *Bradyrhizobium* sp. e *Brevibacillus brevis*, T13 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus brasilensis*, T14 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis*, T15 e T16 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus durus*.

As plantas utilizam alguns mecanismos de adaptação à salinidade como a redução da área foliar e controle na abertura dos estômatos que diminuem a perda de água por transpiração, reduzindo assim a taxa fotossintética, diminuindo o crescimento destas plantas, e o ajustamento osmótico, que ocorre devido ao acúmulo dos íons absorvidos nos vacúolos das células das folhas, conservando a concentração salina no citoplasma e nas organelas em níveis baixos (FLOWERS, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2009; DIAS; BLANCO, 2010).

Não houve diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) no número de nódulos das plantas inoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. isoladamente ou com quaisquer umas das coinoculações (Figura 7A). O aumento na massa e no número de nódulos pode indicar maior acúmulo de nitrogênio nas plantas de feijão-caupi, no entanto muitos nódulos não são suficientes, a planta deve ter nódulos grandes, com maior eficiência relativa (XAVIER et al., 2007).

A salinidade ($50 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaCl}$) reduziu o número de nódulos em 11,92%, nas plantas de feijão-caupi quando comparada com as plantas cultivadas sem salinidade (Figura 7B). A concentração de NaCl que corresponda a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$, é considerada moderada para o feijão-caupi, promovendo poucos danos ao crescimento da planta (AYERS; WESTCOT, 1999; SILVEIRA et al., 2001).

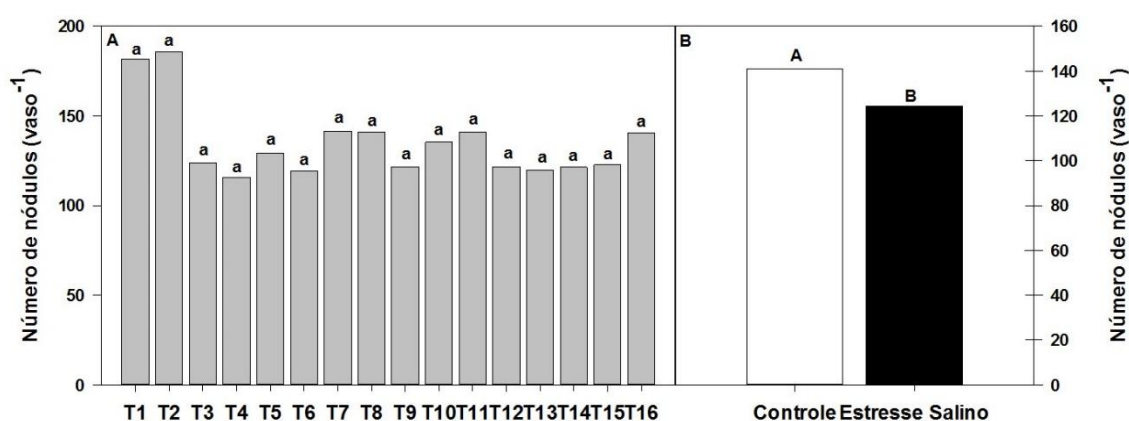


Figura 7. Número de nódulos (*CV = 13,99%) de plantas de feijão-caupi inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e coinoculadas *Bradyrhizobium* sp. e BPCP - (A), cultivadas em condição controle e estresse salino (0 e $50 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaCl}$) - (B). Médias seguidas de mesma letra minúscula (combinações de bactérias) e maiúscula (condições de cultivo) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *coeficiente de variação.

*T1 - *Bradyrhizobium* sp., T2 - *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp., T3 e T9 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp., T4 - *Bradyrhizobium* sp. e *Azospirillum* amazonense, T5 - *Bradyrhizobium* sp. e *Herbaspirillum* seropedicae, T6 - *Bradyrhizobium* sp. e *Burkholderia tropica*, T7 e T8 - *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp., T10 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus cereus*, T11 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus pumilus*, T12 - *Bradyrhizobium* sp. e *Brevibacillus brevis*, T13 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus brasilensis*, T14 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis*, T15 e T16 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus durus*.

A redução na massa seca de nódulos e no número de nódulos (Figura 5 e 7, respectivamente) quando as plantas foram cultivadas na presença de NaCl (50 mmol L^{-1}), pode indicar uma sensibilidade ao estresse salino na interação entre *Bradyrhizobium* sp. e o feijão-caupi cv. "IPA 206". Medeiros et al. (2008), avaliando o efeito do estresse salino sobre a nodulação do feijão-caupi inoculado com estirpe de

Bradyrhizobium sp. (BR 2001), observaram, aos 35 dias após emergência, uma diminuição acentuada na massa nodular a partir da concentração de 1 dS m^{-1} , sendo a menor MSN observada na água de irrigação com CE de 8 dS m^{-1} e uma redução no número de nódulos com o aumento na condutividade elétrica da água de irrigação (0 a 8 dS m^{-1}).

Combinação entre rizóbio e BPCP que sejam eficientes, podem melhorar o crescimento da planta e a fixação de nitrogênio por induzir a ocupação de rizóbios nos nódulos da leguminosa (TILAK et al., 2006). A eficiência do metabolismo do nitrogênio proveniente da FBN pode ser avaliada pelo teor de nitrogênio total na massa seca da parte aérea (Figura 8) e pela nodulação específica (Figura 10).

Alto teor de nitrogênio foi observado em todas as plantas inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. isoladamente (T1) e nas coinoculações, exceto aquelas coinoculadas com os tratamentos T6, T9 e T15, independente das condições de cultivo (Figura 8A). A salinidade diminuiu em 26,43% o teor de nitrogênio total na massa seca da parte aérea nas plantas de feijão-caupi quando comparadas as plantas cultivadas sem salinidade.

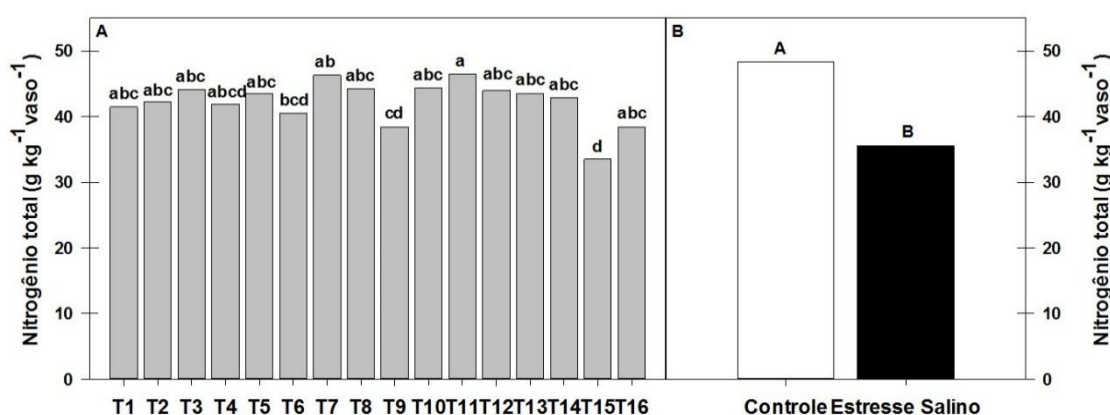


Figura 8. Nitrogênio total (*CV = 8,10%) em plantas de feijão-caupi inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e coinoculadas *Bradyrhizobium* sp e BPCP - (A), cultivadas em condição controle e estresse salino (0 e $50 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaCl}$) - (B). Médias seguidas de mesma letra minúscula (combinações de bactérias) e maiúscula (condições de cultivo) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *coeficiente de variação.

*T1 - *Bradyrhizobium* sp., T2 - *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp., T3 e T9 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp., T4 - *Bradyrhizobium* sp. e *Azospirillum amazonense*, T5 - *Bradyrhizobium* sp. e *Herbaspirillum seropedicae*, T6 - *Bradyrhizobium* sp. e *Burkholderia tropica*, T7 e T8 - *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp., T10 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus cereus*, T11 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus pumilus*, T12 - *Bradyrhizobium* sp. e *Brevibacillus brevis*, T13 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus brasiliensis*, T14 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis*, T15 e T16 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus durus*.

O fato da inoculação com o *Bradyrhizobium* sp. e algumas coinoculações com BPCP terem apresentado teor de nitrogênio na parte aérea que não diferiram entre si, indica fluxo de nitrogênio do rizóbio para a planta, bem como o estímulo da FBN na presença de algumas BPCP, permitindo maior fornecimento de nitrogênio fixado, o que pode ser observado pelo aumento de 10,80% no teor de nitrogênio na parte aérea das plantas de feijão-caupi coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus pumilus* (T11), respectivamente, em comparação com a inoculação com o *Bradyrhizobium* sp. (T1) isoladamente (Figura 8).

O tamanho do nódulo foi maior nas plantas inoculadas o *Bradyrhizobium* sp. (T1) e todas as coinoculações, exceto as coinoculações *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus durus* (T15), que apresentou menor tamanho de nódulos (Figura 9A). Os nódulos das plantas cultivadas sob estresse salino apresentaram tamanho reduzido em 34,78%, quando comparada às plantas cultivadas sob condição controle (Figura 9B).

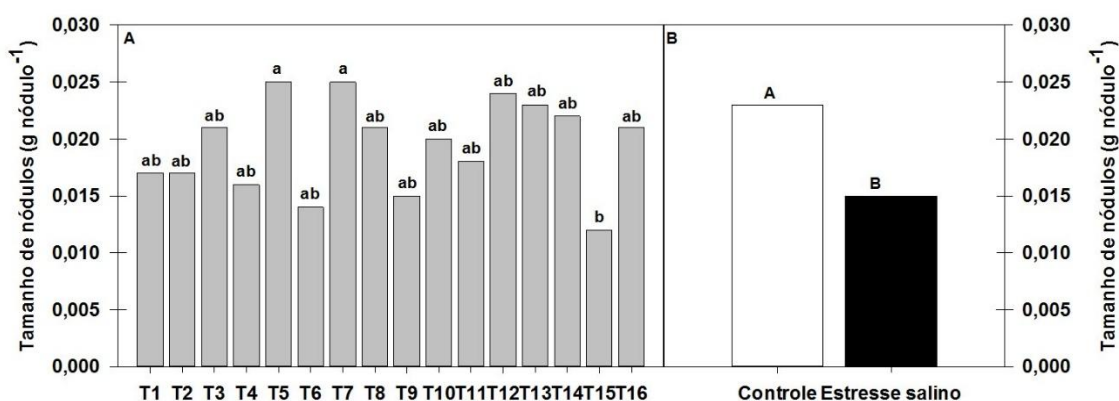


Figura 9. Tamanho de nódulos (*CV = 29,81%) em plantas de feijão-caupi inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e coinoculadas *Bradyrhizobium* sp e BPCP - (A), cultivadas em condição controle e estresse salino (0 e 50 mmol L⁻¹ NaCl) - (B). Médias seguidas de mesma letra minúscula (combinações de bactérias) e maiúscula (condições de cultivo) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). *coeficiente de variação

*T1 - *Bradyrhizobium* sp., T2 - *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp., T3 e T9 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp., T4 - *Bradyrhizobium* sp. e *Azospirillum amazonense*, T5 - *Bradyrhizobium* sp. e *Herbaspirillum seropedicae*, T6 - *Bradyrhizobium* sp. e *Burkholderia tropica*, T7 e T8 - *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp., T10 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus cereus*, T11 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus pumilus*, T12 - *Bradyrhizobium* sp. e *Brevibacillus brevis*, T13 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus brasiliensis*, T14 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis*, T15 e T16 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus durus*.

A nodulação específica foi influenciada por diferentes combinações bacterianas, onde as maiores foram observadas nas inoculadas com o tratamento T1

e algumas coinoculações, porém as que foram coinoculadas com os tratamentos T5, T7 e T13, tiveram menor desempenho quanto a nodulação específica (Figura 10). Para uma simbiose bem-sucedida, que resulte em fixação de nitrogênio eficiente, são necessárias várias etapas, onde os simbiontes troquem sinais químicos, como flavonóides das plantas e fatores Nod bacterianos, bem como a expressão de vários genes (BOGINO et al., 2015).

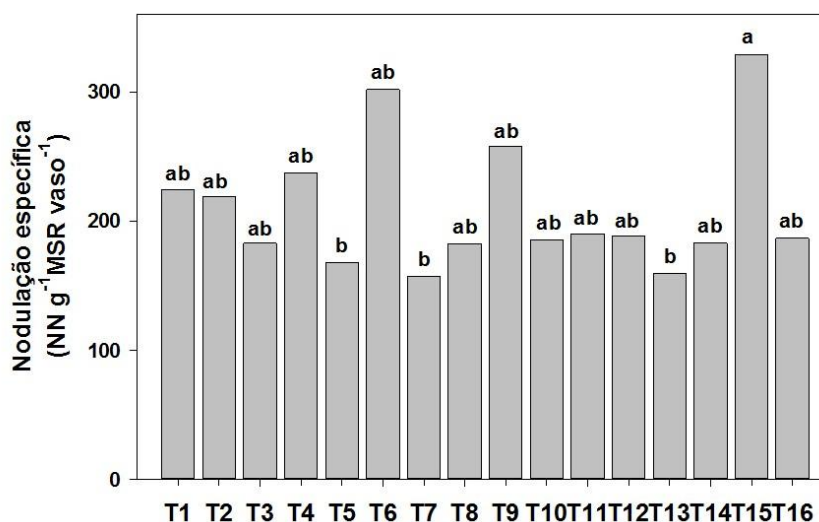


Figura 10. Nodulação específica (*CV = 17,24%) em plantas de feijão-caupi "IPA 206" inoculado com *Bradyrhizobium* sp. e coinoculadas *Bradyrhizobium* sp. e BPCP, independentes da condição de cultivo. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre as combinações bacterianas, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *coeficiente de variação

*T1 - *Bradyrhizobium* sp., T2 - *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp., T3 e T9 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp., T4 - *Bradyrhizobium* sp. e *Azospirillum amazonense*, T5 - *Bradyrhizobium* sp. e *Herbaspirillum seropedicae*, T6 - *Bradyrhizobium* sp. e *Burkholderia tropica*, T7 e T8 - *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp., T10 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus cereus*, T11 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus pumilus*, T12 - *Bradyrhizobium* sp. e *Brevibacillus brevis*, T13 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus brasilensis*, T14 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis*, T15 e T16 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus durus*.

O efeito da salinidade nas plantas pode ser associado a dificuldade em absorver água, devido à redução do potencial osmótico no solo, ocasionado pelo excesso de sais solúveis na solução do solo, toxicidade de íons (cloreto, sódio, boro, etc.) e pela interferência dos sais em processos fisiológicos (efeitos indiretos), provocando a redução no crescimento e no desenvolvimento das plantas (DIAS; BLANCO, 2010).

Plantas tolerantes à salinidade absorvem cloreto de sódio em altas taxas, acumulando-o em suas folhas para estabelecerem um equilíbrio osmótico com o baixo potencial da solução do solo (DIAS; BLANCO, 2010). O acúmulo de sódio na parte aérea das plantas de feijão-caupi, foi observado nas que foram submetidas a estresse

salino quando inoculadas com o tratamento T1 e coinoculadas com os tratamentos T2 e T14, em contrapartida quando as plantas foram cultivadas sem salinidade, o teor de sódio foi semelhante em todas as combinações bacterianas estudadas (Figura 11).

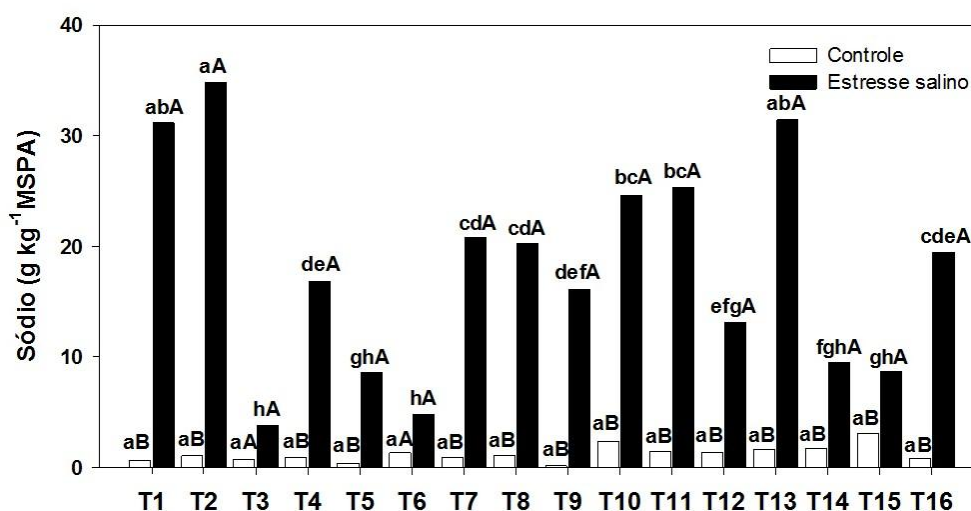


Figura 11: Teor de sódio (*CV = 25,11%) na parte aérea de plantas de feijão-caupi cv. "IPA 206" inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e coinoculadas *Bradyrhizobium* sp e BPCP, cultivadas em condição controle e estresse salino (0 e 50 mmol L⁻¹ NaCl). Médias seguidas de mesma letra minúscula (combinações de bactérias) e maiúscula (condições de cultivo) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). *coeficiente de variação

*T1 - *Bradyrhizobium* sp., T2 - *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp., T3 e T9 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp., T4 - *Bradyrhizobium* sp. e *Azospirillum amazonense*, T5 - *Bradyrhizobium* sp. e *Herbaspirillum seropedicae*, T6 - *Bradyrhizobium* sp. e *Burkholderia tropica*, T7 e T8 - *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp., T10 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus cereus*, T11 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus pumilus*, T12 - *Bradyrhizobium* sp. e *Brevibacillus brevis*, T13 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus brasilensis*, T14 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis*, T15 e T16 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus durus*.

O menor acúmulo de sódio na parte aérea das plantas de feijão-caupi, quando cultivadas sob salinidade, foi apresentado naquelas coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T3). Segundo Maia et al. (2015), plantas que restringem a absorção de Cl⁻ e Na⁺ pelas raízes, durante estresse salino tendem a ser mais tolerante a salinidade. Porém, segundo Dias e Blanco (2010), plantas tolerantes são capazes de aumentar a absorção de K⁺ e reduzir a absorção de Na⁺, o K contribui para manter a alta relação K/Na na planta, o que foi observado nas plantas coinoculadas com o tratamento T3, quando submetidas a estresse salino (dados não apresentados).

Não houve aumento significativo no acúmulo de sódio quando as plantas foram cultivadas sob estresse salino em comparação as plantas cultivadas sob condição controle quando coinoculadas com o tratamento T3 e T6. As demais combinações

bacterianas apresentaram uma maior concentração de sódio, quando foram cultivadas sob estresse salino, este aumento variou de 5,56 a 33,78 g kg⁻¹ MSPA (Figura 11).

O acúmulo de sódio nas plantas favorece o acúmulo desse cátion no interior da célula, e pode ser um dos motivos da redução no seu crescimento o que causa alteração na absorção de K⁺ (MAIA et al., 2015; PEDROTTI et al., 2015). Porém, todas as plantas que foram submetidas ao estresse salino tiveram redução no crescimento da planta, mesmo as que apresentaram menor acúmulo de sódio quando as plantas foram cultivadas sob estresse salino.

O feijão-caupi pode reduzir o crescimento sob estresse salino, porém a absorção de macro e micronutrientes nem sempre é inibida, podendo utilizar o ajustamento osmótico como mecanismo de tolerância, onde a planta absorve alguns íons em grande quantidade (MAIA et al., 2015). O ajustamento osmótico envolve a absorção de íons, sua compartimentalização em certos tecidos e organelas das células, associadas ao acúmulo de solutos orgânicos no citoplasma, favorecendo a manutenção do turgor e o volume celular, garantindo o crescimento vegetal (PRISCO; GOMES FILHO, 2010; WILLADINO; CAMARA, 2010).

Sob condição controle as plantas de feijão-caupi coinoculadas com os tratamentos T3, T7, T9, T10 e T13, apresentaram maior concentração de potássio na massa seca da parte aérea (MSPA). Quando cultivadas sob estresse salino, as plantas coinoculadas com os tratamentos T2, T3, T10, T13 e T16, permitiram maior concentração de potássio na MSPA das plantas (Figura 12). O uso de BPCP que disponibilizam mais fósforo e potássio para as plantas melhora seu crescimento, sendo promissoras para a melhoria na nutrição e produtividade das plantas (FIGUEIREDO et al., 2016).

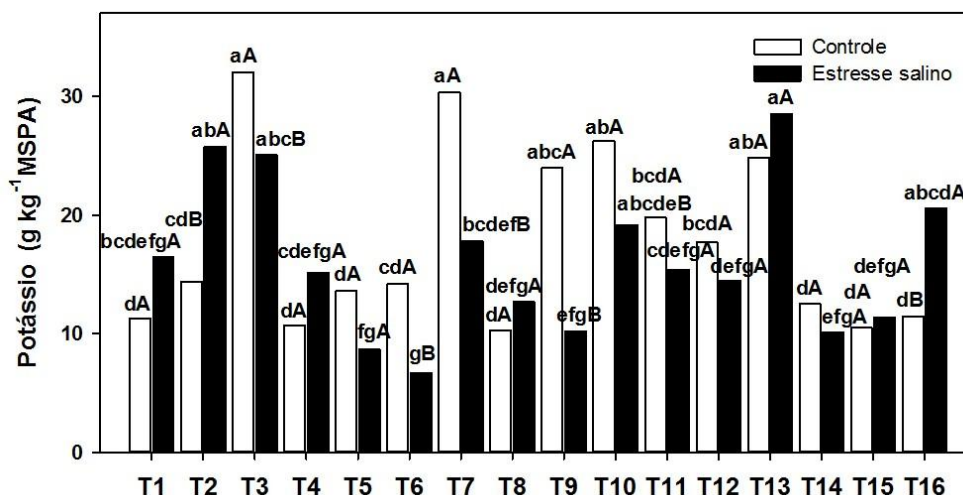


Figura 12: Teor de potássio (*CV = 20,86%) na parte aérea de plantas de feijão-caupi cv. "IPA 206" inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e coinoculadas *Bradyrhizobium* sp e BPCP, cultivadas em condição controle e estresse salino (0 e 50 mmol L⁻¹ NaCl). Médias seguidas de mesma letra minúscula (combinações de bactérias) e maiúscula (condições de cultivo) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). *coeficiente de variação

*T1 - *Bradyrhizobium* sp., T2 - *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp., T3 e T9 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp., T4 - *Bradyrhizobium* sp. e *Azospirillum* amazonense, T5 - *Bradyrhizobium* sp. e *Herbaspirillum* seropedicae, T6 - *Bradyrhizobium* sp. e *Burkholderia tropica*, T7 e T8 - *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp., T10 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus cereus*, T11 - *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus pumilus*, T12 - *Bradyrhizobium* sp. e *Brevibacillus brevis*, T13 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus brasilensis*, T14 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis*, T15 e T16 - *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus durus*.

A salinidade afeta o crescimento das plantas ao diminuir a absorção de vários outros nutrientes como fósforo, potássio, nitrato e cálcio e também leva à toxicidade iônica e ao estresse osmótico (TUTEJA et al., 2012). Este comportamento foi observado nas plantas de feijão-caupi cv. "IPA 206" coinoculadas com os tratamentos T3, T6, T7, T9 e T10, reduziram o teor de potássio na parte aérea, quando cultivadas sob estresse salino, em comparação com as plantas cultivadas sem estresse salino. Porém mesmo reduzindo o teor de potássio na parte aérea das plantas de feijão-caupi os tratamentos T3, e T10, permitiram alta concentração de potássio na MSPA sob estresse salino (Figura 12).

As plantas que foram coinoculadas com os tratamentos T2 e T16 aumentaram o teor de potássio na MSPA quando foram cultivadas sob estresse salino em comparação com as cultivadas sem estresse salino. As bactérias que, mesmo sob estresse salino, mantiveram alto o teor de potássio nas plantas, permitiram as plantas de feijão caupi cv. "IPA 206" maior eficiência na manutenção do ajuste osmótico e iônico, consequentemente, na tolerância ao estresse salino, pois o K⁺ é o soluto que mais colabora para manter a pressão osmótica e a força iônica (MAIA et al., 2015).

3.4 Conclusões

A coinoculação com o *Bradyrhizobium* sp. e BPCP (*Actinomadura* sp., *Bacillus* sp., *Herbaspirillum seropedicae*, *Streptomyces* sp., *Brevibacillus brevis* e *Paenibacillus graminis* e *P. durus*) resultaram em sinergismo positivo, proporcionando maior crescimento das plantas de feijão-caupi 'IPA 206' independente das condições de cultivo.

Em relação ao sinergismo de micro-organismos quanto ao crescimento do feijão-caupi cultivadas sem estresse salino foi observado melhor crescimento nas plantas coinoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp.; e *Bradyrhizobium* sp. e *Brevibacillus brevis*.

Sob condição de estresse salino as coinoculações com o *Bradyrhizobium* sp. e BPCP (*Actinomadura* sp, *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., *Bacillus cereus* e *B. pumillus* e *Paenibacillus graminis* e *P. durus*) proporcionaram maior crescimento das plantas de feijão-caupi cv. "IPA 206", sendo estas estirpes promissoras para otimizar a performance simbiótica na presença de 50 mmol L⁻¹ de NaCl.

As plantas de feijão-caupi cv. "IPA 206" coinoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (UFLA 03-84 e IPACC11), responderam bem quanto à resposta adaptativa ao estresse salino pelo baixo teor de sódio e alto teor de potássio.

As plantas de feijão-caupi cv. "IPA 206" coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e BPCP (*Actinomadura* sp, *Bacillus* sp., *Bacillus cereus* e *Paenibacillus brasiliensis* e *P. durus*), apresentaram melhor proteção ao estresse salino pelo ajuste osmótico.

Referências

AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanism sand applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University-Science**, Riyadh, v. 26, n. 1, p. 1-20, 2014.

ANJUM, M. A.; ZAHIR, Z. A.; ARSHAD, M.; ASHRAF, M. Isolation and screening of rhizobia for auxin biosynthesis and growth promotion of mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings under axenic conditions. **Soil Environmental**, Missouri, v. 30, n. 1, p. 18-26, 2011.

ANTUNES, J. E. L. **Bactérias diazotróficas endofíticas em cana-de-açúcar: estratégia para uma agricultura sustentável**. 2016. 154 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

AYERS, R.S.; WESTCOT, D. W. **A qualidade da água na agricultura**. 2. Ed. Campina Grande: UFPB. FAO, 1991, 39p.

BREMNER, J. M. Total nitrogen. In: BLACK, C. A. (ed.). **Methods of soil analysis chemical and microbiological properties**. Madison: American Society of Agronomy, Part 2, 1965. p. 1149-1178.

BEN SALAH, I.; SLATNI, T.; GRUBER, M.; MESSEDI, D.; GANDOUR, M.; BENZARTI, M.; HAOUALA, R.; ZRIBI, K.; BEN HAMED, K.; ALFOCEA, F. P.; ABDELLY, C. Relation ship between symbiotic nitrogen fixation, sucrose synthesis and antioxidant activities in source leave sof two *Medicago ciliaris* lines cultivated under salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 70, p. 166-173, 2011.

BOGINO, P. C.; NIEVAS, F. L.; GIORDANO, W. A review: Quorum sensing in *Bradyrhizobium*. **Applied Soil Ecology**, Amsterdan, v. 94, p. 49-58, 2015.

CHAGAS JÚNIOR, A. F.; OLIVEIRA, A. G.; SANTOS, G. R.; BORJAS REIS, A. F.; CHAGAS, L. F. B. Promoção de crescimento em feijão-caupi inoculado com rizóbio e *Tricoderma* spp. no Cerrado. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 27, n. 3, p. 190-199, 2014.

CHIBEBA, A. M.; GUIMARÃES, M. F.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Co-inoculation of soybean with *Bradyrhizbium* and *Azospirillum* promotes early nodulation. **American Journal of Plant Sciences**, California, v. 6, n. 10, p. 1641, 2015.

COMPANT, S. S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, San Diego, v. 42, p. 669-678, 2010.

DIAS, N. S.; BLANCO, F. F. **Efeito dos sais no solo e na planta**. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. Manejo da salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados. Fortaleza: INCT sal, 2010. 472 p.

FERREIRA, E. P. B.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Nodulação e produção de grãos em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) inoculado com isolados de rizóbio. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 24, n. 4, p. 27-35, 2011.

FROTA, K. M. G.; SOARES, R. A. M.; ARÊAS, J. A. G. Composição química do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), cultivar BRS-Milênio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 2, p. 470-476, 2008.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. M.; SILVA, K. J. D.; NOGUEIRA, M. S. R.; RODRIGUES, E. V. **Feijão caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011, 84 p.

FIGUEIREDO, M. V. B., BONIFACIO, A. RODRIGUES, A. C., ARAIJO, F. F. Plant Growth-promoting Rhizobacteria: Key Mecanisms of action. In: CHOUDHARY, D. K.; VARMA, A. (Ed.). **Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants**. Springer, 2016. cap. 3, p. 23-37.

FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; MARTINEZ, C.; CHANWAY, C. P. Alleviation of water stress effects in cammom bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation *Paenibacillus x Rhizobium tropici*. **Applied Soil Ecology**, Amsterdan, v. 40, p. 182-188, 2008.

FLOWERS, T. J. Improving crops alt tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.55, p.307-319, 2004.

FOX, S. L.; O'HARA, G. W.; BRÄU, L. Enhanced nodulation and symbiotic effectiveness of *Medicago truncatula* when co-inoculated with *Pseudomonas fluorescens* WSM3457 and Ensifer (*Sinorhizobium*) *medicae* WSM419. **Plant and soil**, The Hague, v. 348, n. 1-2, p. 245, 2011.

GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, Jena, v. 169, n. 1, p. 30-39, 2014.

GULDEN, R. H.; VESSEY, J. K. Low concentrations of ammonium inhibit specific nodulation (nodule number g⁻¹ root DW) in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). **Plant and Soil**, The Hague, v. 198, p. 127-136, 1998.

GUPTA, B.; HUANG, B. Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization. **International Journal of Genomics**, Rockville Pike, v. 2014, p. 1-18, 2014.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method of growing plants with out soil**. University of California, Berkeley, 1.ed, 1950. 32p.

HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA. 1994.

HUNGRIA, M.; MEGÍAS, M. Uma década de ouro se aproxima para a microbiologia do solo: expectativas da pesquisa, da indústria, dos agricultores e da sociedade. In: Iberoamerican conference on beneficial plant-microorganism-environment interactions. **Anais CNPSO**. 2013. p. 510-517.

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**, Berlin, v. 49, n. 7, p. 791-801, 2013.

LONGATTI, S. M.; MARRA, L. M.; MOREIRA, F. M. S. Evaluation of plant growth-promoting traits of *Burkholderia* and *Rhizobium* strains isolated from Amazon soils for their co-inoculation in common bean. **African Journal of Microbiology Research**, Lagos, v. 7, p. 948-959, 2013.

- MAIA, J. M., MACÊDO, C. E. C., SILVEIRA, J. A. G., SILVA, A. F., LIRA, E. H. A., MELO, A. S., MENESES, C. H. S. G. Seca e salinidade na resposta antioxidativa de raízes de feijão caupi. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, Campina Grande, v. 11, n. 1, p. 59-93 2015.
- MASCIARELLI, O.; LLANES, A.; LUNA, V. A new PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* enhances soybean nodulation. **Microbiological research**, Jena, v. 169, n. 7, p. 609-615, 2014.
- MEDEIROS, R., SANTOS, V., ARAÚJO, A. OLIVEIRA FILHO, C. Estresse salino sobre a nodulação em feijão-caupi. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 21, n. 5, 2008.
- MISHRA, P. K.; MISHRA, S.; SELVAKUMAR, G.; BISHT, J. K.; KUNDU, S.; GUPTA, H. S. Coinoculation of *Bacillus thuringiensis*-KR1 with *Rhizobium leguminosarum* enhances plant growth and nodulation of pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 25, n. 5, p. 753-761, 2009.
- MORALES, M. A.; OLMOS, E.; TORRECILLAS, A.; ALARCON, J. J. Differences in water relations, leaf ion accumulation and excretion rates between cultivated and wild species of *Limonium* sp. grown in conditions of saline stress. **Flora-Morphology-Geobotany-Ecophysiology**, Jena, v. 196, n. 5, p. 345-352, 2001.
- MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, Bom Jesus, v. 1, n. 2, p. 74-99, 2010.
- NÓBREGA, R. S. A.; MOTTA, J. S.; LACERDA, A. M.; MOREIRA, F. M. D. S. Tolerância de bactérias diazotróficas simbióticas à salinidade in vitro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 899-905, 2004.
- NONOMURA, H.; OHARA, Y. Distribution of soil actinomycetes. VI. A culture method effective for both preferential isolation and enumeration of *Microbispora* and *Streptosporangium* strains in soil. **Journal of Fermentation Technology**, Osaka, v. 47, p. 463-469, 1969.
- PEDROTTI, A.; CHAGAS, R. M.; RAMOS, V. C.; NASCIMENTO PRATA, A. P.; LUCAS, A. A. T.; SANTOS, P. B. Causas e consequências do processo de salinização dos solos. **Electronic Journal of Management, Education and Environmental Technology (REGET)**, Santa Maria, v. 19, n. 2, 1308-1324, 2015.
- PORTO, D. S.; FARIAS, E. D. N. C.; CHAVES, J. D. S.; SOUZA, B. F.; MEDEIROS, R. D. D.; ZILLI, J. É.; SILVA, K. D. Symbiotic effectiveness of *Bradyrhizobium ingae* in promoting growth of *Inga edulis* Mart. seedlings. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 41, 2017.
- PRISCO, J. T.; GOMES FILHO, E. Fisiologia e bioquímica do estresse salino em plantas. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. **Manejo da salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados**. Fortaleza: INCT sal, 2010. 472 p.

- REIS JÚNIOR, F.; SILVA, M. F.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, n. 1, p. 103-113, 2004.
- 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**, The Hague, v. 312, n. 1, p. 25-37, 2008.
- RODRIGUES, A. C. ANTUNES, J. E. L., MEDEIROS, V. V., BARROS, B. G. F., FIGUEIREDO, M. V. B. Co-inoculation response of growth promoting bacterias in plants and *Bradyrhizobium* sp. in cowpea. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 1, 2012.
- RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR., V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. **Summa Phytopathologica**, Campinas, v. 12, n. 1-2, p. 16. 1986.
- SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: **7º World congress on computers in agriculture Conference Proceedings**, Nevada, American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009. p. 1.
- SILVA, F. C. S. (Ed.). **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Embrapa Informação Tecnológica; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2009.
- SILVA, A. A.; DELATORRE, C. A. Alterações na arquitetura de raiz em resposta à disponibilidade de fósforo e nitrogênio. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Santa Catarina, v. 8, n. 2, p. 152-163, 2009.
- SILVEIRA, J. A. G.; CONTADO, J.; RODRIGUES, J.; OLIVEIRA, J. Phosfoenol pyruvate carboxylase and glutamine synthetase activities in relation to nitrogen fixation in cowpea nodules. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.10, n.1, p.19-23, 1998.
- SILVEIRA, J. A. G.; MELO, A. R. B.; VIÉGAS, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A. Salinity induced effects on nitrogen assimilation related to growth in cowpea plants. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 46, p.171-179, 2001.
- SOUZA, R.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and molecular biology**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 4, p. 401-419, 2015.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 820 p.

TEALE, W. D., PAPONOV, I. A. PALME, K. Auxin in action: signalling, transport and control of plant growth and development. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 7, p. 847-859, 2006.

TILAK, K. V. B. R.; RAUGANAYAKI, N.; MANOHARACHARI, C. Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and *Rhizobium* on nodulation and nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan*). **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 57, p. 67-71, 2006.

TUTEJA, N.; SINGH, L. P.; GILL, S. S.; GILL, R.; TUTEJA, R. Salinity stress: a major constraint in crop production. In: TUTEJA, N.; GILL, S. S.; TIBURCIO, A. F.; TUTEJA, R. (eds). **Improving crop resistance to abiotic stress**. Wiley, New York, p. 71–96, 2012.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. London: International Biological Programme, 1970. 164 p. (IBP Handbook, 15).

VOISIN, A. S.; MUNIER-JOLAIN, N.; SALON, C. The nodulation process slightly adjusted to plant growth. An analysis using environmentally and genetically induced variation of nodule number and biomass in pea. **Plant and Soil**, The Hague, v. 337, p. 399-412, 2010.

WILLADINO, L.; CAMARA, T. R. Tolerância das plantas à salinidade: aspectos fisiológicos e bioquímicos. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 6, n. 11, p. 1-23, 2010.

XAVIER, T. F., ARAÚJO, A. S. F., SANTOS, V. B., CAMPOS, F. L. Ontogenia da nodulação em duas cultivares de feijão-caupi. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 2, 561-564, 2007.

Capítulo II

4 COINOCULAÇÃO COM *Bradyrhizobium* sp. E BPCP NO METABOLISMO NITROGÊNIO-CARBONO EM PLANTAS DE FEIJÃO-CAUPI COM E SEM ESTRESSE SALINO

Artigo submetido para publicação no periódico Soil Biology and Biochemistry

4 Coinoculação com *Bradyrhizobium* sp. e BPCP no metabolismo nitrogênio-carbono em plantas de feijão-caupi com e sem estresse salino

Resumo

A fim de mitigar os efeitos deletérios do estresse abiótico, tem sido crescente o uso de bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP) juntamente com bactérias diazotróficas. Tal associação pode promover um ambiente favorável para o crescimento vegetal e levar ao incremento da fixação biológica de nitrogênio (FBN). Além disso, a coinoculação de bactérias diazotróficas com BPCP, selecionadas, podem proporcionar aumento na nodulação e resultar em efeitos positivos por incrementar a produção de fitohormônios e a mobilização de nutrientes, principalmente nitrogênio e carbono. Neste contexto, o trabalho teve como objetivo investigar as enzimas chaves no processo da FBN referentes ao metabolismo do nitrogênio e do carbono e elucidar como se procede as atividades dessas enzimas pela interação sinérgica entre *Bradyrhizobium* sp. e BPCP, com e sem indução de estresse salino. As plantas de feijão caupi cv. "IPA 206" foram cultivadas em condições axênicas, inoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. e coinoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp.; *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp.; *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis*; e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. sendo mantidas sem e com estresse salino (0 e 50 mmol L⁻¹ NaCl). A salinidade afetou alguns parâmetros no metabolismo do nitrogênio e do carbono nas plantas de feijão-caupi cv "IPA 206" mostrando diminuição nos teores do nitrogênio total em nódulos, aminoácidos, amônia livre, ureídeos e proteínas, e no aumento dos teores de sacarose e açúcares solúveis. As coinoculações com *Bradyrhizobium* sp e BPCP responderam diferentemente quanto a atividade das enzimas glutamina sintetase sob estresse salino, da glutamato sintase, glutamato desidrogenase aminante, bem como da invertase ácida com e sem estresse. Considerando-se as condições de desenvolvimento do experimento, a coinoculação *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. no feijão-caupi "IPA 206" proporcionou uma melhor performance simbiótica, como fim de mitigar os efeitos deletérios do estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl).

Palavras chave: FBN. Bactérias promotoras de crescimento em plantas. Glutamina sintetase. Invertase ácida. Salinidade.

Coinoculation with *Bradyrhizobium* sp. and BPCP in nitrogen-carbon metabolism in cowpea plants with and without saline stress

Abstract

In order to mitigate the deleterious effects of abiotic stress, there has been increasing use of plant growth promoting bacteria (PGPB) along with diazotrophic bacteria. Such association may promote a favorable environment for plant growth and lead to the increase of biological nitrogen fixation (BNF). In addition, the co-inoculation of diazotrophic bacteria with PGPB, selected, can provide increase in nodulation and result in positive effects by increasing the production of phytohormones and the mobilization of nutrients, mainly nitrogen and carbon. In this context, the objective of this work was to investigate the key enzymes in the FBN process related to nitrogen and carbon metabolism and to elucidate the activities of these enzymes by the synergistic interaction between *Bradyrhizobium* sp. and BPCP, with and without salt stress induction. The plants of cowpea cv. "IPA 206" were cultivated under axenic conditions, inoculated with *Bradyrhizobium* sp. and coincidental with *Bradyrhizobium* sp. and *Actinomadura* sp.; *Bradyrhizobium* sp. and *Bacillus* sp.; *Bradyrhizobium* sp. and *Paenibacillus graminis*; and *Bradyrhizobium* sp. and *Streptomyces* sp. Being maintained without and with saline stress (0 and 50 mmol L⁻¹ NaCl). Salinity affected some parameters in nitrogen and carbon metabolism in "IPA 206" cowpea plants showing a decrease in total nitrogen contents in nodules, amino acids, free ammonia, ureides and proteins, and in the increase of sucrose and Soluble sugars. Co-inoculations with *Bradyrhizobium* sp and PGPB responded differently to the activity of glutamine synthetase enzymes under salt stress, glutamate synthase, glutamate dehydrogenase aminating, as well as acid invertase with and without stress. Considering the development conditions of the experiment, the co-inoculation *Bradyrhizobium* sp. and *Bacillus* sp. In cowpea "IPA 206" provided better symbiotic performance in order to mitigate the deleterious effects of salt stress (50 mmol L⁻¹ NaCl).

Keywords: BNF. Plant growth-promotion bacteria. Glutamine synthetase. Acid invertase. Salinity.

4.1 Introdução

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo realizado por micro-organismos que possuem a enzima nitrogenase, a qual converte o nitrogênio atmosférico (N_2) em duas moléculas de amônia (NH_3^+). Os compostos nitrogenados produzidos pelo rizóbio são trocados por carboidratos fornecidos pela planta hospedeira e estes são utilizados como fonte de energia por estes micro-organismos (CLARKE et al., 2014). A FBN se inicia após o estabelecimento de uma complexa interação com a planta hospedeira e representa uma via de entrada de nitrogênio ambientalmente limpa em sistemas agrícolas (UDVARDI; POOLE, 2013). A inoculação com rizóbios aumenta a disponibilidade de nitrogênio na produção comercial de leguminosas (VAN HAMEREN et al., 2013; CLARKE, et al., 2014).

As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) induzem melhora no crescimento e desenvolvimento das espécies vegetais através de diversos mecanismos, tais como a solubilização de fosfato, síntese de fitormônios e aumento da absorção de ferro devido à produção de sideróforos. Além disso, as BPCP podem também beneficiar as plantas por exibirem ação protetora contra patógenos, doenças e estresses ambientais (GLICK, 2012). As BPCP colonizam as raízes das espécies vegetais e criam um microambiente favorável ao desenvolvimento vegetal. Desta forma, a inoculação de espécies agrícolas com BPCP representa uma técnica bastante promissora (SOUZA et al., 2015).

Plantas submetidas à estresses abióticos, como o estresse hídrico e salino, desenvolvem mecanismos de tolerância ou adaptação, tais como o ajustamento osmótico, que permitem que a planta mantenha seu desenvolvimento mesmo em condições de estresse (COELHO et al., 2014). O ajustamento osmótico com solutos orgânicos ou inorgânicos realizado por espécies vegetais submetidas à salinidade permite que estas mantenham continuamente a captação de água do solo (COELHO et al., 2014). Além disso, a planta pode usar outros mecanismos quando submetidas ao estresse salino, tais como o controle da absorção dos íons como o Na^+ , pelas raízes ou o acúmulo e compartimentalização seletiva dos íons em excesso no vacúolo (GUPTA; HUANG, 2014; PRISCO; GOMES FILHO, 2010).

Vários estudos têm demonstrado que a coinoculação de espécies de leguminosas com rizóbios e BPCP apresenta efeito benéfico para o crescimento e

desenvolvimento destas plantas (RODRIGUES et al., 2012; RODRIGUES et al., 2013; HUNGRIA et al., 2015; BRACCINI et al., 2016). Neste contexto, foi elaborada uma hipótese é que a coinoculação com *Bradyrhizobium* sp. e BPCP, visa otimizar o desenvolvimento e o potencial da FBN em plantas de feijão-caupi, visando mitigar os efeitos deletérios do estresse salino. Essa hipótese foi testada para investigar as enzimas chaves no processo da FBN e elucidar como se procede as atividades dessas enzimas pela interação sinérgica entre *Bradyrhizobium* sp. e BPCP, com e sem aplicação de estresse abiótico, podendo resultar em combinações de micro-organismos mais eficientes. Foram avaliados indicadores bioquímicos e/ou fisiológicos relacionados ao metabolismo do nitrogênio e do carbono e vários parâmetros biológicos foram analisados neste estudo.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Produção de micro-organismos e preparo de inoculantes

A estirpe de rizóbio e BPCP utilizadas no experiment (Tabela 1) foram multiplicadas em condições controladas para a produção dos inoculantes. Para purificação e multiplicação dos micro-organismos foram usados os meios de cultura: YMA e YM a pH 6,5 (VINCENT, 1970), para o *Bradyrhizobium* sp., DYGS a pH 6,0 (RODRIGUES NETO, 1986) para o *Bacillus* sp., TSA e TSB a pH 7,3, para o *Paenibacillus graminis* e AY e AYA a pH 6,4 (NONOMURA; OHARA, 1971) para a *Actinomadura* sp. e *Streptomyces* sp.. O inoculante com *Bradyrhizobium* sp. foram incubados em agitador rotatório (200 rpm) a 28° por 96 horas, e os inoculantes com as quatro estirpes de BPCP, foram mantidos em agitador rotatório (200 rpm) a 28° por 48 a 96 horas, de acordo com a estirpe.

4.2.2 Cultura de planta e tratamento

O experimento foi conduzido em condições axênicas na casa-de-vegetação no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA; Recife-PE). Sementes de feijão-caupi, cultivar “IPA-206” [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], foram desinfestadas (HUNGRIA; ARAÚJO, 1994) e semeadas em vasos de Leonard contendo areia lavada (pH 6,5), ambos previamente autoclavados (1 h; 120 °C; 101 kPa).

Na ocasião da semeadura, as sementes foram inoculadas utilizando-se 1,0 mL da suspensão bacteriana (10^8 UFC mL⁻¹), com *Bradyrhizobium* sp. ou coinoculadas com 1,0 mL da suspensão bacteriana contendo o *Bradyrhizobium* sp. e 1,0 mL da suspensão bacteriana contendo uma estirpe de BPCP (10^7 UFC mL⁻¹). As coinoculações foram formuladas conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Formulação de inoculantes e tratamentos utilizados no experimento.

Tratamento	Combinação bacteriana	Código de acesso	Origem
T1	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	UFLA 03-84	Solo de pastagem em Jí-Paraná, Rondônia
T2	<i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Bacillus</i> sp.	UFLA 03-84 e IPA CC 11	Caules de cana de açúcar (<i>Saccharum officinarum</i>) da zona da mata de Pernambuco
T3	<i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Paenibacillus graminis</i>	UFLA 03-84 e MC 04.21	Rizosfera de milho (<i>Zea mays</i>) em solo do Cerrado
T4	<i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Actinomadura</i> sp.	UFLA 03-84 e 183-EL	Rizosfera da caatinga pernambucana
T5	<i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Streptomyces</i> sp.	UFLA 03-84 e 212	Rizosfera de rúcula (<i>Eruca sativa</i>)

Durante todo o experimento, as plantas foram irrigadas por capilaridade, com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), isenta de nitrogênio e modificada conforme Silveira et al. (1998). O desbaste foi realizado aos quatro dias após a germinação (DAG) e mantiveram-se duas plantas por vaso (unidade experimental). As plantas foram submetidas ao estresse salino aos 15 DAG, adicionando 50 mmol L⁻¹ de cloreto de sódio (NaCl) à solução nutritiva em 50% dos vasos. As soluções nutritivas foram colocadas nos vasos de Leonard com pH de 6,5 e condutividade elétrica (CE) de 0,99 mS cm⁻¹ e 5,6 mS cm⁻¹, para solução nutritiva sem a com adição de NaCl, respectivamente. Semanalmente, a solução nutritiva com e sem NaCl foi trocada. Na ocasião, realizou-se a lavagem do substrato com água destilada, e foram medidos o pH e a CE do drenado, para acompanhar o pH e a CE do vaso.

A coleta do experimento foi realizada aos 37 DAG, no Laboratório de Biologia do Solo no IPA. No momento da coleta, as raízes contendo os nódulos foram imersas em nitrogênio líquido a -80 °C. As raízes contendo os nódulos congelados em N₂ líquido foram acondicionadas em recipientes térmicos contendo gelo seco, e transportadas para o laboratório de Metabolismo de Plantas (Labplant) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) da Universidade Federal

do Ceará (UFC). A parte aérea das plantas coletadas foi seca em estufa (a 65 °C) e pesadas para a obtenção da massa seca da parte aérea.

Os nódulos ainda congelados foram separados das raízes e pesados para obtenção de massa seca, em seguida liofilizados. Após a liofilização os nódulos foram pesados, para obtenção de massa seca, contados, macerados e acondicionados em dessecador até as determinações químicas.

4.2.3 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso, com arranjo em fatorial (5 x 2) + 1, sendo cinco combinações bacterianas (uma inoculação apenas com *Bradyrhizobium* sp. e quatro coinoculações com *Bradyrhizobium* sp. e BPCP), dois níveis de salinidade (0 e 50 mmol L⁻¹ de NaCl), com quatro blocos (duas réplicas por bloco) e o controle absoluto (plantas não inoculadas, sem nitrogênio e sem NaCl). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com níveis de significância de 5% pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SASM-Agri 8.1 (CANTERI et al., 2001).

4.2.4 Determinações bioquímicas

As análises do metabolismo do nitrogênio foram: nitrogênio total (BAETHGEN; ALLEY, 1989), amônia livre (WEATHERBURN, 1967), N- α amino solúvel (aminoácidos livres) - (PEOPLES et al., 1989), Leghemoglobina (SMAGGHE et al., 2009), Ureídeos (YOUNG; CONWAY, 1942), Prolina (BATES, 1973), Proteínas solúveis (BRADFORD, 1976), Glutamina sintetase (ELLIOTT, 1955), Glutamato sintase (SUZUKI et al., 1994), e Glutamato desidrogenase aminante (COOMBS e HALL, 1982).

As análises do metabolismo do carbono foram: sacarose (VAN HANDEL, 1968), Açúcares solúveis totais (DUBOIS et al., 1956), atividade da invertase ácida e invertase neutra (ZHU et al., 1997).

4.3 Resultados

Plantas de feijão-caupi inoculadas foram beneficiadas quando a altura da parte aérea, massa seca da parte aérea e nitrogênio total da parte aérea, onde as plantas inoculadas apresentaram um aumento de 137,7% na altura de parte aérea, de 388,56% massa seca de parte aérea 397,35% nitrogênio total da parte aérea, comparadas com que testemunha absoluta, sem inoculação. Enfatizando a importância da inoculação para o crescimento e desenvolvimento das plantas de feijão-caupi, sob condições axênicas de cultivo (Figura 1).

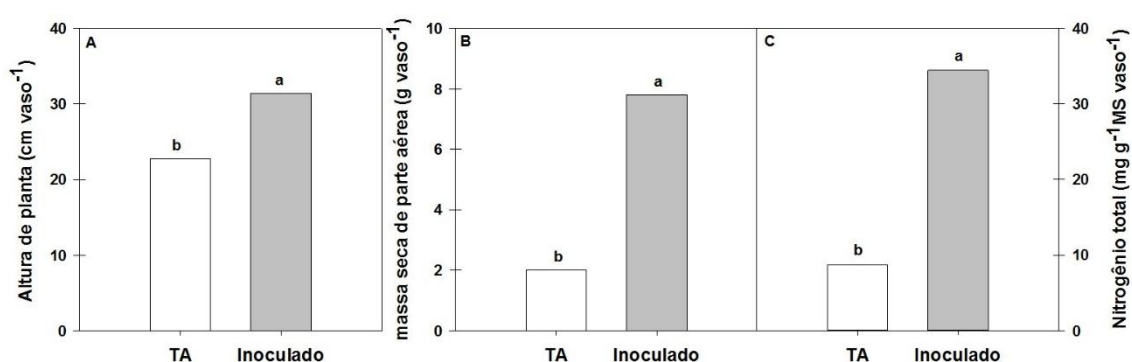


Figura 1. Contraste entre plantas de feijão-caupi “IPA 206” sem inoculação e sem salinidade (TA – 8 repetições) e as inoculadas (40 repetições). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

As plantas de feijão-caupi inoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. (T1) apresentaram altura das plantas superior as plantas coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e BPCP, em condição controle (sem salinidade). Contudo, as plantas de feijão-caupi cultivadas sob estresse salino não apresentaram diferença significativa na altura das plantas de feijão-caupi inoculadas e coinoculadas. Plantas coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3) não apresentaram diferença significativa na altura das plantas, quando comparada na condição controle e de estresse salino (Figura 2).

O fato de não diferir entre este tratamento deve-se ao fato das plantas coinoculadas com o tratamento T3 em condição controle terem baixa altura de plantas. Sendo assim, a inoculação com *Bradyrhizobium* sp. e as demais coinoculações que beneficiaram as plantas de feijão-caupi “IPA 206” quando cultivada em condição controle, foram as mais prejudicadas quando foram submetidas ao estresse salino.

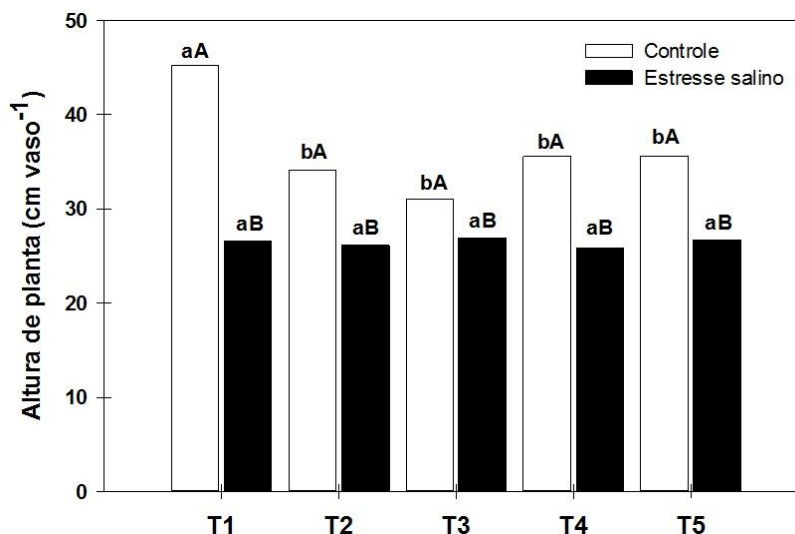


Figura 2. Altura das plantas (*CV=19,36%) de feijão-caupi cv. “IPA 206” inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. (T1) ou coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5) cultivadas em condições controle e de estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl). Médias (4 repetições) seguida de mesma letra minúscula (combinações bacterianas) e maiúscula (condições de cultivo), não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) *Coeficiente de variação

Na condição controle, a massa fresca de nódulos (MFN) de plantas de caupi foi beneficiada pela inoculação com o *Bradyrhizobium* sp. (T1) e coinoculações com *Bradyrhizobium* sp. e *P. graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), enquanto que sob estresse salino as coinoculações entre *Bradyrhizobium* sp. e BPCP, não induziram diferença significativa na MFN em plantas de feijão-caupi (Figura 3A). A MFN foi reduzida nas plantas de feijão-caupi cultivadas sob estresse salino, as plantas de feijão-caupi coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *P. graminis* (T3) apresentaram redução de 47% na MFN sob estresse salino (Figura 3A).

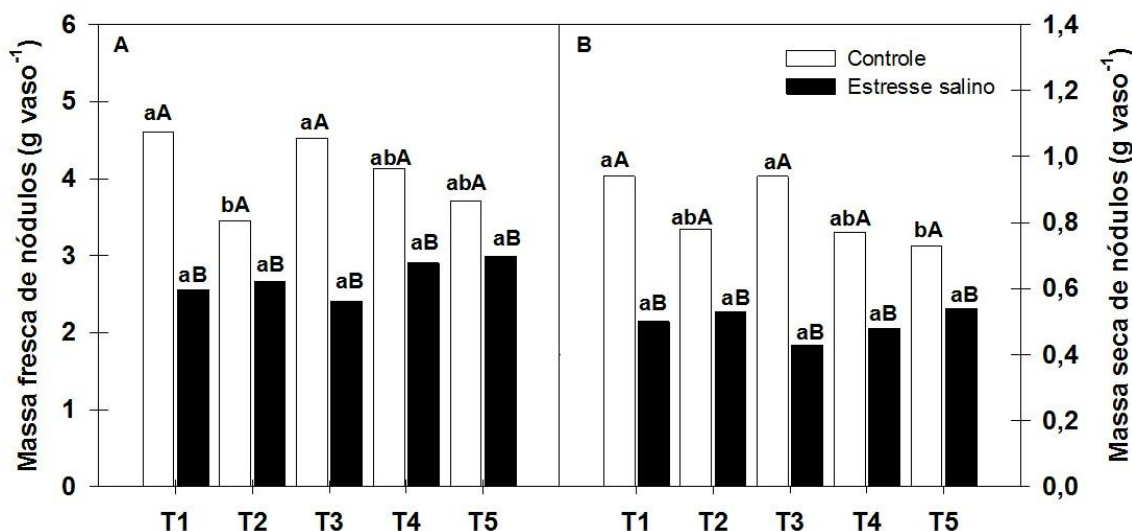


Figura 3. Massa fresca (*CV=13,95%) (A) e seca de nódulos (*CV=14,81%) (B) de plantas de feijão-caupi inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. (T1) ou coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5) em condições controle e de estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl). Médias (4 repetições) seguidas de mesma letra minúscula (combinações bacterianas) e maiúscula (condições de cultivo), não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). *Coeficiente de variação

Observou-se a diminuição na massa seca dos nódulos (MSN) em todas as combinações simbióticas avaliados com destaque para as plantas de feijão-caupi coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *P. graminis* (T3) (redução de 54%) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), (diminuição de 26%). Sob condição controle, as plantas de feijão-caupi coinoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), apresentaram menor MSN. Quando expostas ao estresse salino, as plantas de feijão-caupi inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. ou coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e BPCP, não apresentaram diferença significativa quanto a MSN (Figura 3B).

O estresse salino não influenciou o número de nódulos, sendo este parâmetro influenciado apenas pelas bactérias utilizadas para inocular as plantas de feijão-caupi (Figura 4). As plantas de feijão-caupi coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *P. graminis* (T3), apresentaram maior número de nódulos em relação aos demais tratamentos, sendo o número de nódulos 49% superior em relação ao valor registrado para as inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. (T1) (Figura 4). Embora tenha apresentado maior número de nódulos, notou-se que as plantas de feijão-caupi do tratamento T3, apresentaram nódulos pequenos (dados não apresentados), menores que os demais tratamentos.

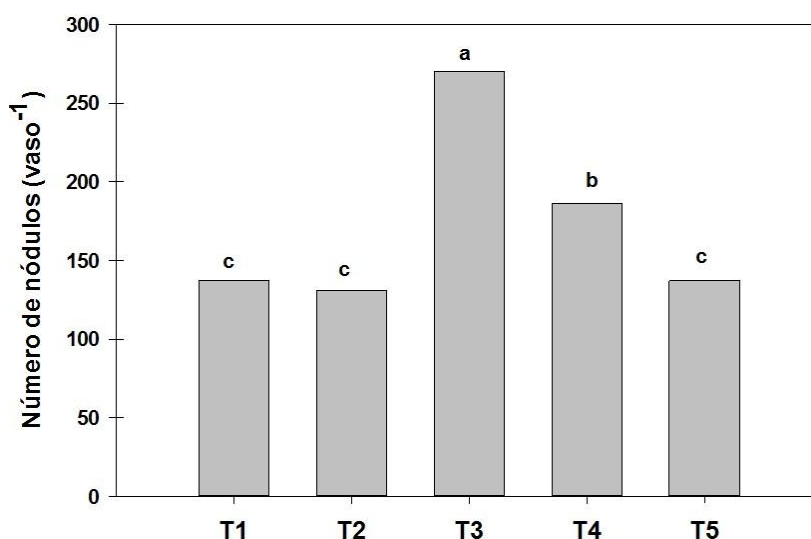


Figura 4. Número de nódulos (*CV=18,18%) de plantas de feijão-caupi cv. "IPA 206" inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. (T1) ou coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5). Médias (4 repetições) seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *Coeficiente de variação.

O nitrogênio total na parte aérea não diferiu significativamente entre as plantas de feijão-caupi inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. (T1) ou coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e BPCP na condição controle, contudo, quando cultivadas sob estresse salino as plantas de feijão-caupi que apresentaram maior nitrogênio total na parte aérea, foram os tratamentos T1, T2 e T5, enquanto que as plantas coinoculadas com a combinação bacteriana T3, apresentaram redução de 29,55% neste parâmetro, em relação ao tratamento T1 (Figura 5). Comparando as condições de cultivo, apenas as plantas que foram coinoculadas com o tratamento T3, reduziram o teor de nitrogênio na parte aérea em 30% quando as plantas foram cultivadas sob salinidade em comparação com as plantas cultivadas em condição controle (Figura 5).

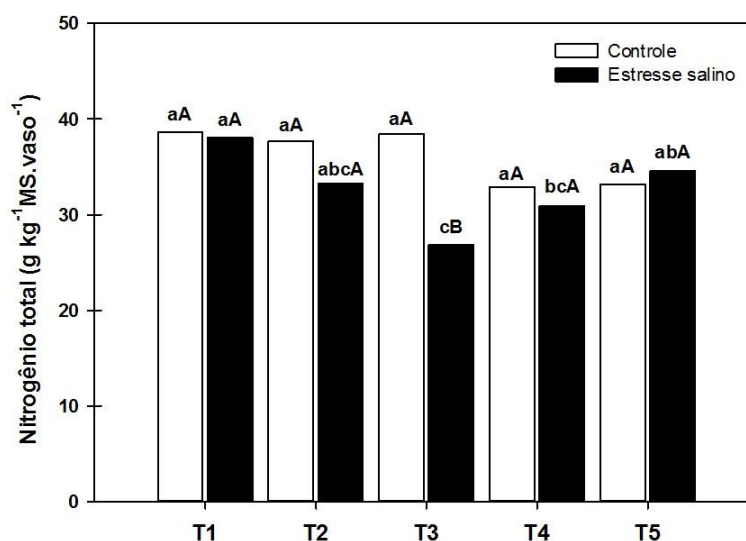


Figura 5. Nitrogênio total da parte aérea (*CV=9,79) de plantas de feijão-caupi cv. "IPA 206" inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. (T1) ou coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5) em condições controle e de estresse salino (50 mmol.L⁻¹ de NaCl). Médias (4 repetições) seguidas de mesma letra minúscula (combinações bacterianas) e maiúscula (condições de cultivo), não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). *Coeficiente de variação.

O teor de nitrogênio total nos nódulos foi maior nas plantas que foram inoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. (T1), e coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), independente se estas foram cultivadas com ou sem estresse salino (Figura 6A). Comparando as condições de cultivo as plantas que foram cultivadas sem estresse salino apresentaram maior teor de nitrogênio nos nódulos, independentes das inoculações. Os tratamentos foram prejudicados pela presença do estresse salino, apresentando uma diminuição de 9,71% no nitrogênio total em nódulos de feijão-caupi cv. "IPA 206" quando as plantas foram cultivadas sob estresse salino (Figura 6B).

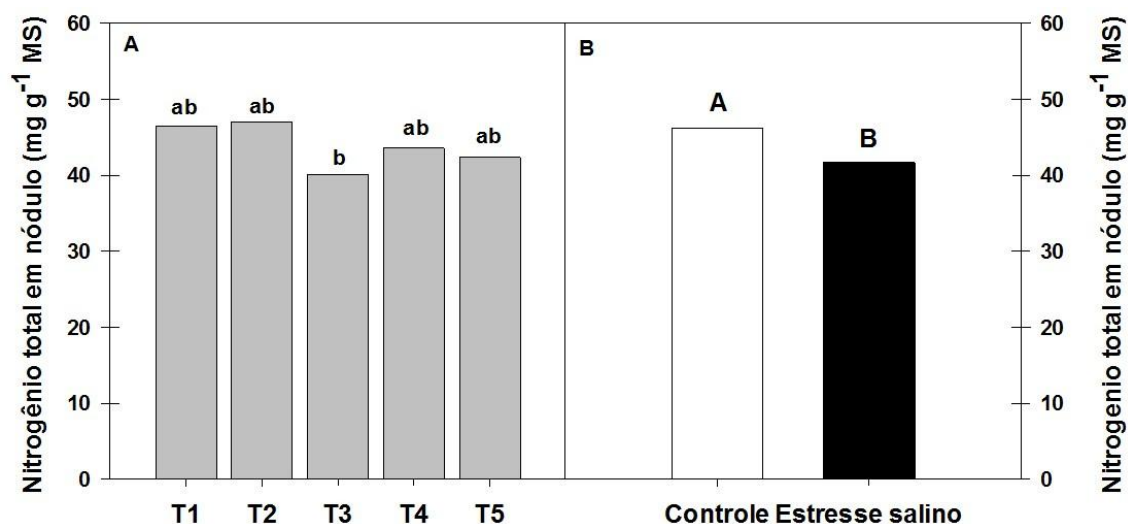


Figura 6. Nitrogênio total em nódulos (*CV=10,42%) de plantas de feijão-caupi cv. “IPA 206” inoculado com *Bradyrhizobium* sp. (T1) ou coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), em condições controle e de estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl). Médias (4 repetições) seguidas de mesma letra minúscula (combinações bacterianas) e maiúscula (condições de cultivo), não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *Coeficiente de variação

Para as variáveis amônia, aminoácidos livres e ureídeos nos nódulos e massa seca da parte aérea das plantas de feijão-caupi as combinações bacterianas não foram significativa, interferindo nestes resultados apenas as condições de controle, onde todos os tratamentos foram utilizados nas médias (Figura 7). O teor de amônia e aminoácidos livres nos nódulos de feijão-caupi “IPA 206” sofreu uma queda de 10,43%, quando as plantas foram cultivadas sob estresse salino, em relação as plantas cultivadas em condição controle, independente da combinação bacteriana que foi inoculada (Figura 7 A e B, respectivamente). O teor de ureídeos foi 39,87% menor nas plantas que foram cultivadas sob estresse salino do que nas plantas cultivadas em condição controle (Figura 7C). As plantas cultivadas sob estresse salino (5,6 mS cm⁻¹) apresentaram diminuição significativa na massa seca da parte aérea, apresentando uma redução de 36,27%, em relação as plantas cultivadas condição controle (Figura 7D).

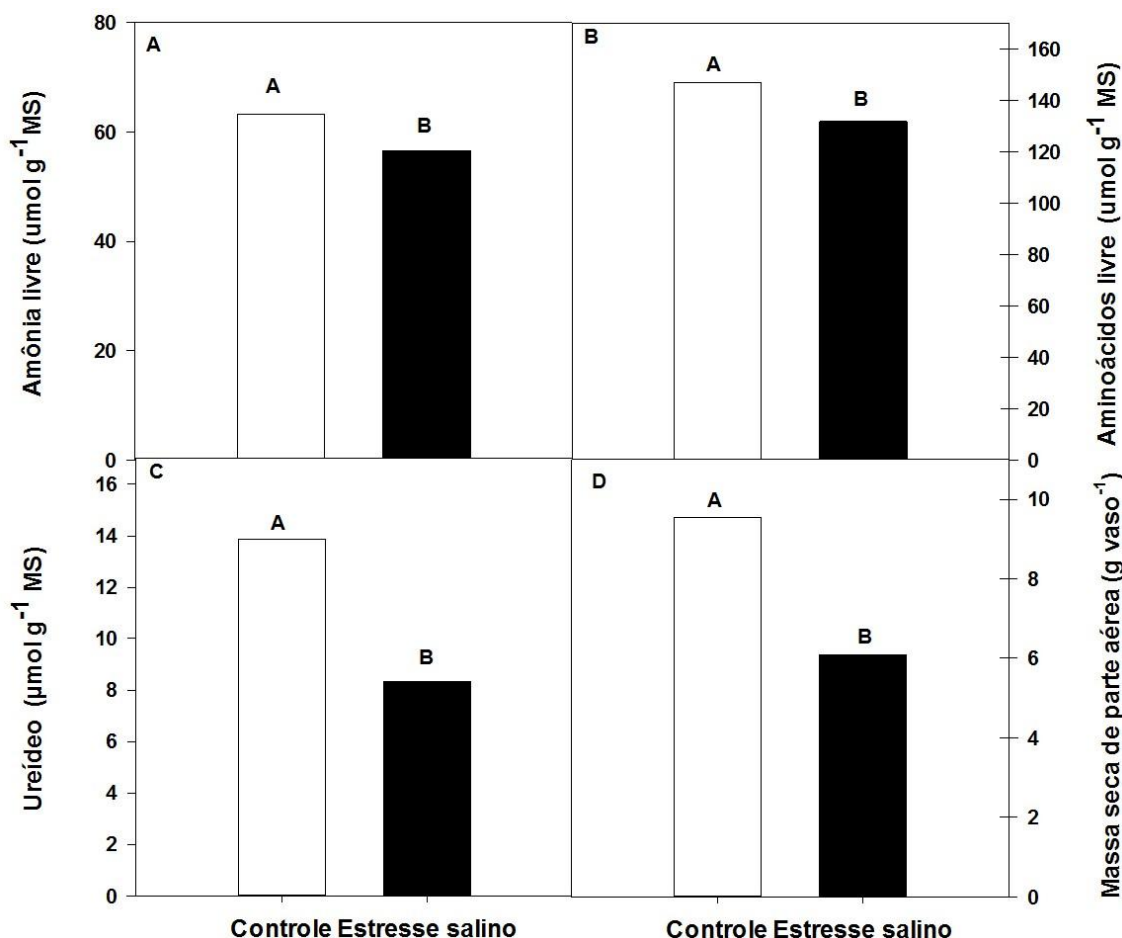


Figura 7. Teor de amônia livre (A) (*CV=14,57%), Aminoácidos livre (B) (CV=14,57%), ureídeos (C) (CV=33,47%) e massa seca da parte aérea (D) (CV=18,17%) em nódulos de feijão-caupi cv. "IPA 206" cultivadas sem e com estresse salino (0 e 50 mmol L^{-1} de NaCl), inoculado com *Bradyrhizobium* sp. (T1) e coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5). Médias (4 repetições) seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *Coeficiente de variação

Houve aumento no teor de prolina nos nódulos das plantas, quando coinoculadas (T2, T3, T4 e T5) em comparação com as plantas inoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. (T1), porém a única coinoculação que diferiu o tratamento T1, foi a coinoculação com *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T3), (Figura 8A), o teor prolina nos nódulos de feijão-caupi cv. "IPA 206" aumentou quando as plantas foram submetidas ao estresse salino (Figura 8B).

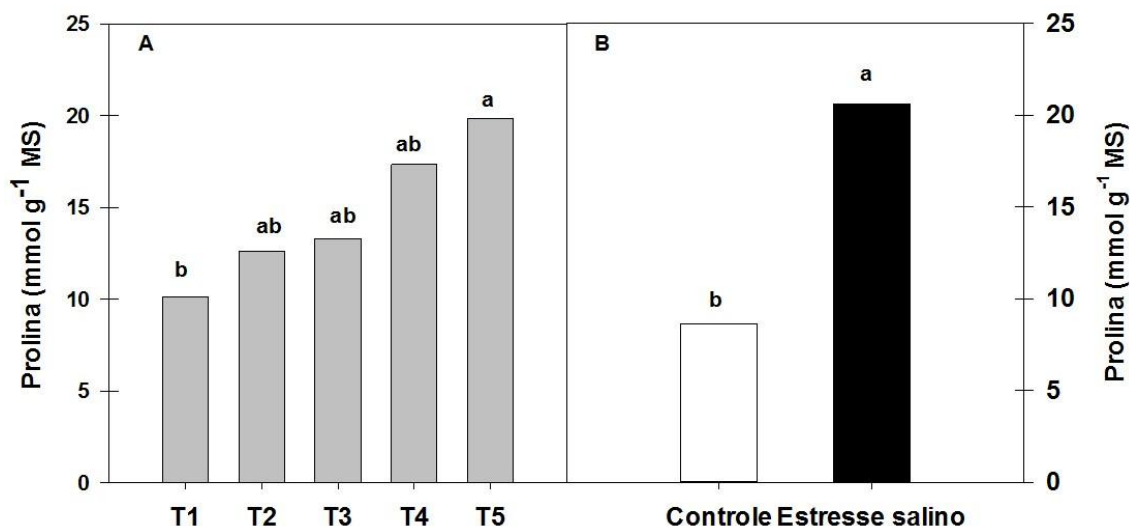


Figura 8. Teor de prolina (*CV=39,18%) em nódulos de plantas de feijão-caupi cv. “IPA 206” inoculado com *Bradyrhizobium* sp. (T1) ou coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), em condições controle e de estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl). Médias (4 repetições) seguidas de mesma letra minúscula (combinações bacterianas) e maiúscula (condições de cultivo), não entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *Coeficiente de variação

As plantas que foram inoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. e coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2) e *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T3) apresentaram aumento teor de leghemoglobina, independente de serem cultivadas com ou sem estresse salino, porém a inoculação com o *Bradyrhizobium* sp. (T1) diferiu das demais coinoculações (Figura 9).

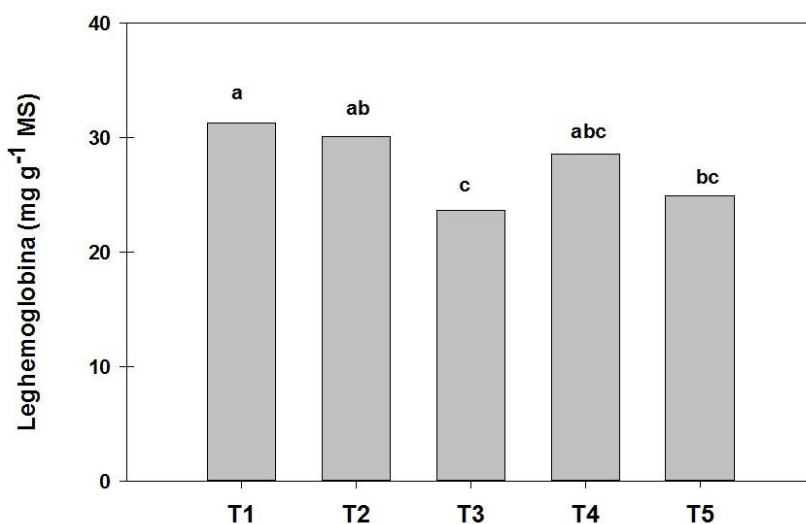


Figura 9. Teor de leghemoglobina (*CV=15,51%) em nódulos de feijão-caupi cv. “IPA 206” inoculado com *Bradyrhizobium* sp. (T1) ou coinoculado com *Bradyrhizobium* sp. (T1) ou coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), em condições controle e de estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl). Médias (4 repetições) seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *Coeficiente de variação

Quando as plantas de feijão-caupi cv. “IPA 206” foram cultivadas em condição controle, os nódulos das plantas inoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. (T1) e coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), apresentaram maior teor de proteínas solúveis, já quando cultivadas com 50 mmol L⁻¹ de NaCl o teor de proteínas solúveis foi maior nos nódulos das plantas inoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. (T1) e coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T3) (Figura 10).

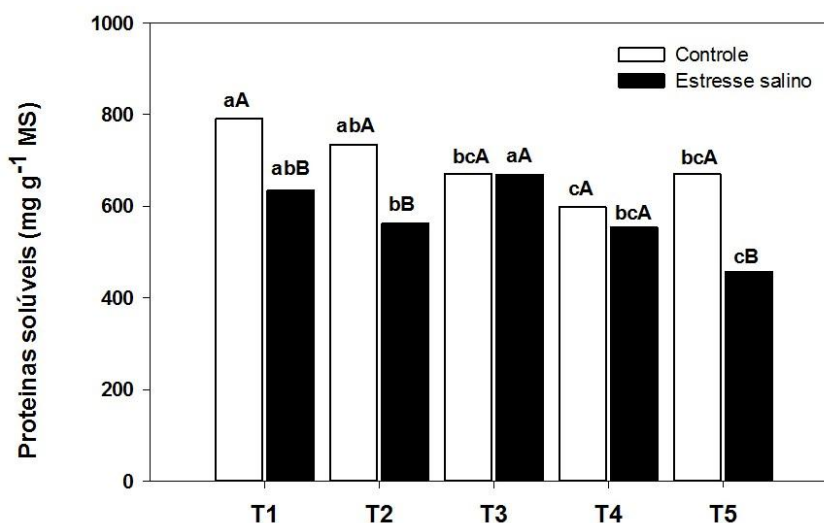


Figura 10. Concentração de proteínas solúveis (*CV=39,18%) em nódulos de plantas de feijão-caupi cv. “IPA 206” inoculado com *Bradyrhizobium* sp. (T1) ou coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), em condições controle e de estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl). Médias (4 repetições) seguidas de mesma letra minúscula (combinações bacterianas) e maiúscula (condições de cultivo), não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). *Coeficiente de variação

Comparando-se as condições de cultivo, os nódulos das plantas coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *P. graminis* (T3) e *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4), apresentaram maior teor de proteínas solúveis quando estas foram cultivadas sob estresse salino, comparada com as cultivadas em condição controle, estas combinações bacterianas permitiram a produção de proteínas solúveis nos nódulos de forma equivalente mesmo quando submetidas a estresse salino, as plantas que foram coinoculadas com os demais tratamentos apresentaram redução da proteína solúvel quando cultivadas na presença do NaCl (Figura 10).

Os nódulos das plantas coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), apresentaram um maior teor de sacarose, quando cultivadas em condição

controle, já quando cultivadas sob salinidade (CE de 5,6 mS cm⁻¹), as coinoculações que proporcionaram aumento no teor de sacarose nos nódulos foram o *Bradyrhizobium* sp. e *P. graminis* (T3) e *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) (Figura 11A).

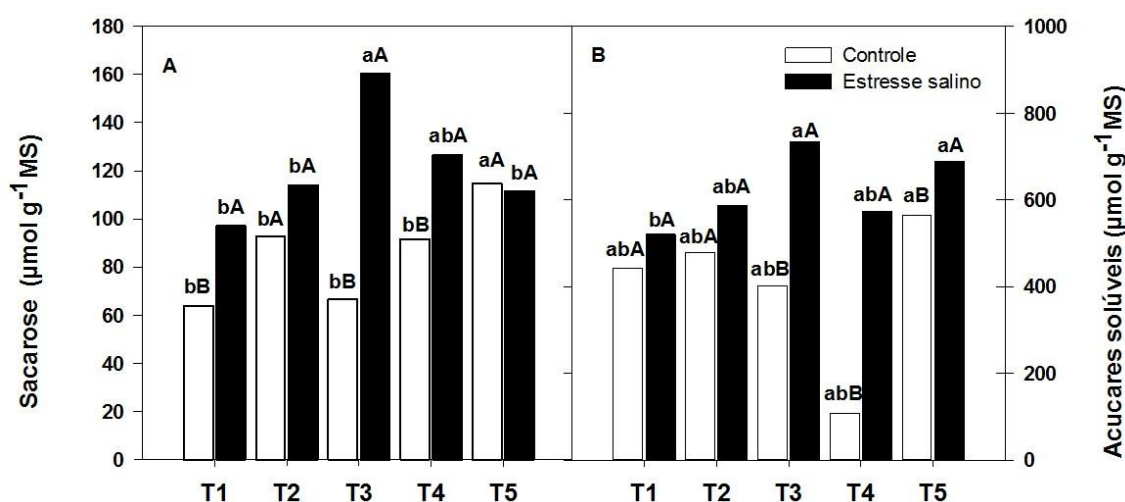


Figura 11. Concentração de sacarose (*CV=18,52%) e açúcares solúveis (CV=14,62%) em nódulos de plantas de feijão-caupi cv. "IPA 206" inoculado com *Bradyrhizobium* sp. (T1) ou coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), em condições controle e de estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl). Médias (4 repetições) seguidas de mesma letra minúscula (combinações bacterianas) e maiúscula (condições de cultivo), não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). *Coeficiente de variação

Comparando o efeito da salinidade nas coinoculações, observa-se que as plantas inoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. (T1) e coinoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. e *P. graminis* e *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4), apresentaram um aumento no teor de sacarose de 151,76%, 240,21% e 138,22% quando as plantas foram submetida a estresse salino, em comparação com as cultivadas em condição controle (Figura 11A).

Não houve diferença entre as combinações bacterianas inoculadas, quanto ao teor de açúcares solúveis, nas plantas cultivadas sob condição controle. Quando as plantas foram cultivadas na presença do NaCl o teor de açúcares solúveis foi maior nas plantas coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *P. graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5) (Figura 11B).

Na comparação entre o cultivo salino e controle observa-se que nas plantas coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *P. graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e

Bacillus sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5) o teor de açúcares solúveis um aumento de 182,95%, 528,71% e 121,93%, respectivamente quando foram cultivadas sob estresse salino (Figura 11B).

A atividade de glutamina sintetase (GS) nas plantas de feijão-caupi cultivadas em condição controle foi maior para as coinoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), já quando as plantas foram cultivadas sob estresse salino, a maior atividade da GS nos nódulos das plantas foi apresentada pelas coinoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. e *P. graminis* (T3) e *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) (Figura 12).

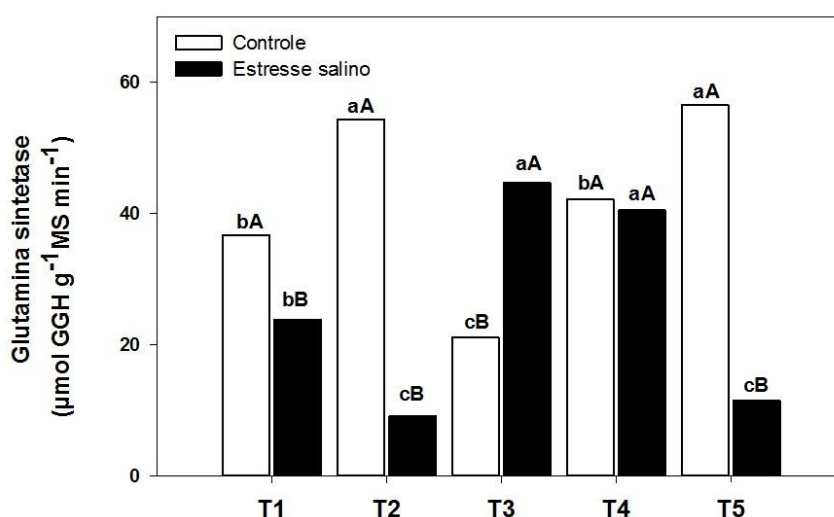


Figura 12. Atividade de glutamina sintetase (*CV=14,48%) em nódulos de plantas de feijão-caupi cv. "IPA 206" inoculado *Bradyrhizobium* sp. (T1) ou coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), em condições controle e de estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl). Médias (4 repetições) seguidas de mesma letra minúscula (combinações bacterianas) e maiúscula (condições de cultivo), não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). *Coeficiente de variação.

Avaliando o efeito do estresse para cada inoculação, observa-se que apenas as plantas coinoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) não apresentaram perda na atividade da GS quando as plantas foram cultivadas sob estresse salino, em comparação com as cultivadas em condição controle, já as plantas coinoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. e *P. graminis* (T3) e apresentaram maior atividade da GS nas plantas cultivadas em condição de estresse salino, do que as que foram cultivadas em condição controle (Figura 12).

Os nódulos das plantas coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5) apresentaram maior atividade da

enzima glutamato sintase (GOGAT), independentes da condição de cultivo (Figura 13A). A atividade da Glutamato desidrogenase (GDH) foi maior em nódulos das plantas de feijão-caupi cv. "IPA 206", que foram inoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. (T1) e coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2) e *Bradyrhizobium* sp. e *P. graminis* (T3), independentes da condição de cultivo (Figura 13B).

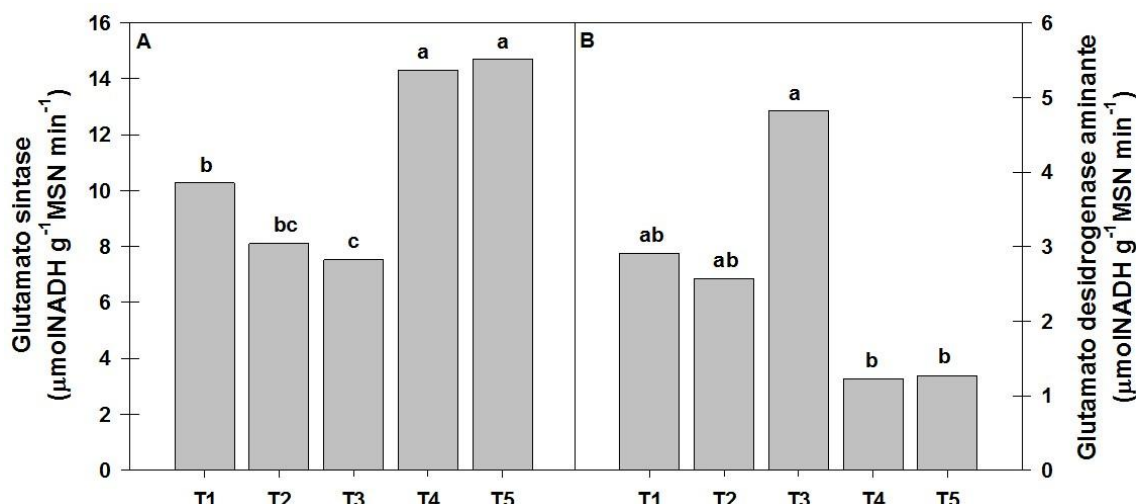


Figura 13. Atividade de glutamato sintase (A) (*CV=13,59%) e glutamato desidrogenase aminante (B) (*CV=19,59%) em nódulos de plantas de feijão-caupi cv. "IPA 206" inoculado com *Bradyrhizobium* sp. (T1) ou coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), em condições controle e de estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl). Médias (4 repetições) seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). *Coeficiente de variação

A atividade da invertase ácida foi maior nos nódulos das plantas coinoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2) e *Bradyrhizobium* sp. e *P. graminis* (T3), quando foram cultivadas sem estresse salino, já quando cultivada sob estresse salino a maior atividade da invertase ácida foi apresentada pela coinoculação com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2) Avaliando as diferentes condições de cultivo, observou-se que as plantas que foram inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. (T1) e coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), aumentaram a atividade da invertase ácida nos nódulos, quando foram cultivadas com solução nutritiva salina (Figura 14).

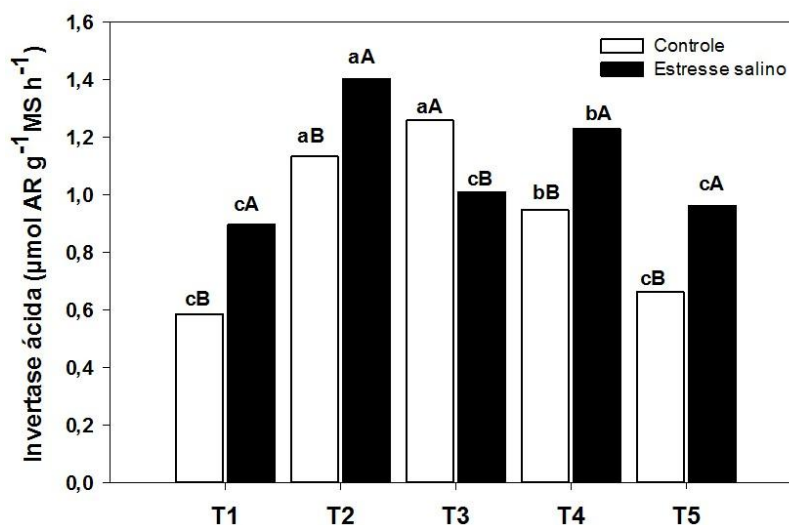


Figura 14. Atividade de invertase ácida (*CV=7,87%) em nódulos de plantas de feijão-caupi cv. "IPA 206" inoculado *Bradyrhizobium* sp. (T1) ou coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), em condições controle e de estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl). Médias (4 repetições) seguidas de mesma letra minúscula (combinações bacterianas) e maiúscula (condições de cultivo), não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *Coeficiente de variação

A atividade da invertase neutra foi maior nos nódulos de plantas de feijão-caupi cv. "IPA 206" foi maior nas plantas coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *P. graminis* (T3), independente das condições de cultivo submetidas, sendo esta coinoculação que apresentou maior concentração de sacarose quando foi submetida a estresse salino. Comparando as condições de cultivo, observou-se que as plantas submetidas a estresse salino apresentaram maior atividade da invertase neutra nos nódulos do que as plantas cultivadas nas condições controle (Figura 15).

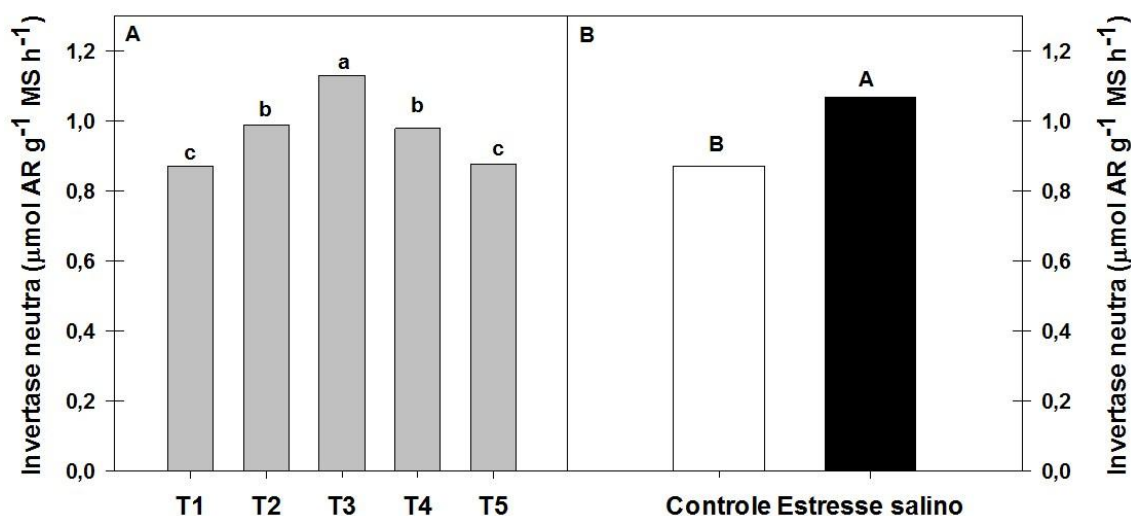


Figura 15. Atividade de invertase neutra (*CV=4,52%) em nódulos de plantas de feijão-caupi cv. “IPA 206” inoculado *Bradyrhizobium* sp. (T1) ou coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), em condições controle e de estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl). Médias (4 repetições) seguidas de mesma letra minúscula (combinações bacterianas) e maiúscula (condições de cultivo), não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *Coeficiente de variação

4.4 Discussão

Neste estudo registrou-se que a coinoculação do feijão-caupi “IPA 206” com *Bradyrhizobium* sp. e BPCP proporcionou aumento significativo no número de nódulos no teor de nitrogênio na parte aérea, na concentração de leghemoglobina e nos níveis de prolina independente das condições de cultivo. A leghemoglobina são proteínas hemo-constituintes, presentes nos nódulos de leguminosas, esta proteína tem a função de transportar oxigênio para manter o metabolismo aeróbio dos bacteróides sem inibir a atividade da nitrogenase (MA et al., 2011; NAVASCUÉS et al., 2012). Algumas coinoculações entre rizóbio e BPCP permitiram o aumento no teor de nitrogênio na parte aérea, mantiveram o teor de proteínas solúveis mesmo em plantas sob estresse salino.

O sinergismo entre o rizóbio e a BPCP favorece o crescimento vegetal, nodulação e fixação de nitrogênio, sendo a promoção do crescimento vegetal, como resultado de múltiplos mecanismos: a solubilização de fosfato, produção de fitohormônio e sideróforos, atividade da ACC deaminase (RODRIGUES et al., 2012; NAVEED et al., 2014; PRAKAMHANG et al., 2015; BRACCINI et al., 2016). O crescimento e a FBN nas plantas podem ser beneficiados pelo fato das BPCP

induzirem os rizóbios introduzidos a ocupar os nódulos de leguminosas, bem como pelo aumento da atividade da nitrogenase (TILAK et al., 2006; SAMAVAT et al., 2012). Prakamhang et al. (2015) observou aumento no número de nódulos e nódulos mais ativos, massa de plantas e maior fixação de nitrogênio em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) coinoculados com *Bradyrhizobium* e BPCP.

Em condições de casa de vegetação, Rodrigues et al. (2012) avaliando os compostos do nitrogênio e carbono, bem como a atividades de algumas enzimas do metabolismo do carbono e nitrogênio, quando cultivou plantas de feijão-caupi cv. "IPA 206" coinoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. e *P. graminis* (BR 3267 e MC 04.21) apresentou um maior teor de nitrogênio no nódulo e a concentração de nitrogênio não apresentou diferença significativa entre os tratamentos estudados. O mesmo não ocorreu neste trabalho onde a coinoculação entre o *Bradyrhizobium* sp. e *P. graminis* (UFLA 03-84 e MC 04.21) foi a que apresentou menor teor de nitrogênio no nódulo reforçando a necessidade de estudos sobre a coinoculação e o sinergismo entre as bactérias envolvidas.

O estresse salino reduziu a altura da planta, porém elas sobreviveram a uma condutividade elétrica da solução nutritiva de $5,6 \text{ mS cm}^{-1}$, tendo em vista que essa cultura é uma espécie moderadamente tolerante à salinidade, podendo tolerar irrigações com água salinas com condutividade elétrica de até $3,3 \text{ dS m}^{-1}$ (AYERS; WESTCOT, 1999; SILVEIRA et al, 1999). Podendo também indicar uma tolerância *in vivo* da estirpe de *Bradyrhizobium* sp. (UFLA 03-84) a salinidade, já que foi tentado manter plantas controle (sem inoculação) sob estresse salino, porém estas não sobreviveram durante a condução do experimento (dados não apresentados), estes dados corroboram com o resultado de Nóbrega et al. (2004) que identificou a tolerância da estirpe de *Bradyrhizobium* sp. (UFLA 03-84) *in vitro* de até 30 g L^{-1} de NaCl, sendo considerada como altamente tolerante a salinidade, e indicada para testes de inoculação em condições de salinidade, visando aumentar o rendimento do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*).

As plantas submetidas ao estresse salino apresentaram redução na massa seca da parte aérea, a massa fresca e seca de nódulos, a redução no crescimento da planta, isto pode está relacionado ao estresse osmótico causado pelo excesso de sais sob homeostase iônica, balanço hídrico, nutrição mineral e metabolismo de carbono fotossintético (ZHU, 2001; MUNNS et al., 2002). Plantas submetidas durante semanas

ao estresse salino apresentam redução do tamanho final e/ou do número de folhas, bem como a morte de folhas mais velhas (MUNNS et al., 2002).

Sabendo-se que os bacteróides convertem o nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia (NH_3), sendo esta liberada e incorporada em aminas ou em ureídeos para então ser exportada para a planta hospedeira (LADRERA et al., 2007; FIGUEIREDO et al., 2008), pode-se sugerir que a redução no teor de nitrogênio total no nódulo, aminoácidos, amônia e ureídeos nos nódulos de feijão-caupi cv. "IPA 206", pelas plantas submetidas ao estresse salino, indica a redução dos compostos de nitrogênio devido a sensibilidade da fixação biológica de nitrogênio a salinidade, desta forma Medeiros et al. (2008) sugeriu que a simbiose entre *Bradyrhizobium* e feijão-caupi é sensível ao estresse salino.

O excesso de sais no solo pode diminuir a disponibilidade de água para a planta, provocando estresse iônico e estresse osmótico, reduzindo o potencial hídrico do substrato, diminuindo a disponibilidade de água (ZHU, 2001; MUNNS; TESTER, 2008), fazendo com que a planta tenha que baixar o seu potencial hídrico a um nível inferior ao do solo, para absorver água, isto se dá pelo aumento na concentração de alguns solutos orgânicos de baixo peso molecular, habitualmente denominado de solutos compatíveis, os quais incluem aminoácidos, prolina, betaínas, carboidratos, sacarose e açúcares (ASHRAF; HARRIS, 2004; WILLADINO; CAMARA, 2010), sendo estes compostos utilizados como estratégia para ajustamento osmótico e prevenção da perda de água e subsequente desidratação celular (TAIZ; ZEIGER, 2009; GUPTA; HUANG, 2014). Utilizando o mecanismo de ajustamento osmótico as plantas de feijão-caupi cv. "IPA 206" aumentaram o teor de prolina, sacarose e açúcares solúveis nos nódulos quando submetidas ao estresse salino.

O aumento no teor de prolina é esperado quando ocorre a osmoregulação da planta ao estresse. Desta forma, ocorre o acúmulo de prolina em diversas plantas que são submetidas aos estresses abióticos como o estresse salino (WILLADINO; CAMARA, 2010; GUPTA; HUANG, 2014). Porém, alguns autores questionam a efetividade da prolina, como um agente que pode conferir tolerância ao estresse salino (SILVEIRA et al., 1999; SOUZA et al., 2011). Muitos trabalhos de pesquisa têm demonstrado que o acúmulo de prolina é uma característica de tolerância ao estresse ambiental (SILVEIRA et al., 2010; RAO et al., 2013).

Existem duas possíveis vias metabólicas para a incorporação de íons amônio para formar aminoácidos, a primeira envolvendo as enzimas glutamato desidrogenase e glutamina sintetase (GDH/GS) e a segunda envolvendo a glutamina sintetase e glutamato sintase (GS/GOGAT) (COSTA, 1999). Este trabalho demonstrou que algumas coinoculações são mais eficientes em manter a atividade da GS sob estresse salino, indicando que estas tenham maior capacidade de incorporar o amônio sob uma salinidade correspondente a $CE = 5,6 \text{ mS cm}^{-1}$, os resultados mostram que as coinoculações se utilizam de diferentes vias metabólicas para a formação de aminoácidos, algumas priorizam a via metabólica GS/GOGAT para a incorporação do amônio, já outras coinoculações utilizam a via alternativa GDH/GS, da assimilação de nitrogênio. Como foi observado claramente, a atividade da GOGAT nos nódulos foi maior do que a atividade da GDH, indicando que a via metabólica GS/GOGAT é a principal para a assimilação da amônia, é sugerido que os genótipos eficientes na síntese do nitrogênio incorporam o íon amônio em aminoácidos, através das enzimas GS e GOGAT (FEITOSA, 2014).

Algumas coinoculações responderam de maneira diferente quando foram submetidas a estresse salino quanto a atividade das invertases, sendo as que foram capazes de manter a atividade da invertase alta, são as que permitem manter a concentração de esqueletos de carbono sem grandes alterações nos nódulos de feijão-caupi "IPA 206", assim mantendo a FBN realizada pelos bacteróides (BEN SALAH et al., 2011).

Existem duas isoformas da invertase ácida, uma está envolvida na síntese da sacarose fora dos tecidos drenos, no apoplasto, ligada a parede celular, estabelecendo um gradiente de concentração de sacarose dos tecidos fonte para os drenos, a outra isoforma, está relacionada com o armazenamento de açúcares, regulação osmótica e respostas a estresses abióticos. A invertase neutra ou alcalina é considerada uma enzima de manutenção, está localizada no citoplasma, envolvida na degradação da sacarose, quando as atividades da invertase ácida da parede celular e sacarose sintase estão baixas, sugerindo o envolvimento invertase neutra na degradação e acúmulo de sacarose no vacúolo (YAO et al., 2009).

As coinoculações com o *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. e *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* foram mais eficientes em não alterar a concentração dos esqueletos de carbono, sob condições controle, já quando as

plantas foram submetidas a estresse salino a coinoculação com o *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. manteve alta a atividade da invertase, mantendo a concentração de esqueletos de carbono sem grandes alterações nos nódulos de feijão-caupi, assim mantendo a FBN realizada pelos bacteróides (BEN SALAH et al., 2011). Neste trabalho pode-se verificar que a interação sinérgica bactéria diazotrófica e BPCP podem proporcionar aumento na nodulação e resultar em efeitos positivos por incrementar a FBN pelo metabolismo nitrogênio – carbono no feijão-caupi cv “IPA 206” sob condição de estresse salino.

No Brasil ainda existe poucos estudos sobre inoculante utilizando coinoculação entre rizóbios e BPCP para espécies leguminosas, bem como quais os efeitos benéficos ou protetores que estas podem promover para plantas submetidas ao estresse. Tendo em vista que a grande biodiversidade natural dos biomas brasileiros é pouco explorada, o potencial da diversidade bacteriana para inoculantes ainda deve ser muito estudado (OLIVEIRA et al. 2014).

4.5 Conclusões

As plantas de feijão-caupi apresentaram redução na eficiência da fixação de nitrogênio e no crescimento.

A inoculação do *Bradyrhizobium* sp. (UFLA 03-84) isoladamente beneficiou o crescimento das plantas de feijão-caupi “IPA 206” até aos 37 DAG, quando cultivadas na ausência de NaCl.

A inoculação com o *Bradyrhizobium* sp. (UFLA 03-84) e as coinoculações com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (UFLA 03-84 e 183-EL); *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (UFLA 03-84 e IPACC11); e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (UFLA 03-84 e 212), foram mais eficientes quanto a fixação de nitrogênio, mesmo quando cultivada com 50 mmol L⁻¹ de NaCl.

As coinoculações das bactérias *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (UFLA 03-84 e IPACC11) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (UFLA 03-84 e 212) utilizam a via GS/ GOGAT para a incorporação do amônio, mesmo quando as plantas foram submetidas ao estresse salino.

As coinoculações com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (UFLA 03-84 e 183-EL) e *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (UFLA 03-84 e MC 04.21),

beneficiaram o metabolismo do carbono nas plantas de feijão-caupi, mesmo quando cultivada sob estresse salino.

A coinoculação *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (UFLA 03-84 e IPACC11) no feijão-caupi cv. "IPA 206" proporcionou uma melhor performance simbiótica sugerindo ser uma boa indicação para otimizar a FBN como fim de mitigar os efeitos deletérios do estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl).

Referências

ASHRAF, M.; HRRIS, P. J. C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. **Plant Science**, Shannon, v. 166, p.3-16, 2004.

AYERS, R. S.; WESTCOT, D. W. **A qualidade da água na agricultura**. Campina Grande, UFPB, 1999. 153p.

BAETHGEN, W. E.; ALLEY, M. M. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digest. **Community Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 20, n. 9-10, p. 961-969, 1989.

BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water stress studies. Short Communication. **Plant and Soil**, The Hague, v. 39, p. 205-207, 1973.

BEN SALAH, I.; SLATNI, T.; GRUBER, M.; MESSEDI, D.; GANDOUR, M.; BENZARTI, M.; HAOUALA, R.; ZRIBI, K.; BEN HAMED, K.; PEREZ-ALFOCEA, F.; ABDELLY, C. Relationship between symbiotic nitrogen fixation, sucrose synthesis and anti-oxidant activities in source leaves of two *Medicago ciliaris* lines cultivated under salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 70, p. 166-173, 2011.

BRACCINI, A. L., MARIUCCI, G. E. G., SUZUKAWA, A. K., LIMA, L. H. S., PICCININ, G. G. Coinoculação e modos de aplicação de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada na nodulação das plantas e rendimento da cultura da soja. **Scientia Agraria Paranaensis**, Paraná, v. 15, p. 27-35, 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 72, P. 248-254, 1976.

CAMACHO, M.; SANTAMARÍA, C.; TEMPRANO, F.; RODRIGUEZ-NAVARRO, D. N.; DAZA, A. Coinoculation with *Bacillus* sp. CECT 450 improves nodulation in *Phaseolus vulgaris* L. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, n. 11, p. 1058- 1061, 2001.

CANTERI, M. G., ALTHAUS, R. A., VIRGENS FILHO, J. S., GIGLIOTI, E. A., GODOY, C. V. SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scoft - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, Ponta Grossa, v. 1, n. 2, p. 18-24, 2001.

CLARKE, V. C.; LOUGHLIN, P. C.; DAY, D. A.; SMIT, P. M. C. Transport processes of the legume symbiosome membrane. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v.5, 9 pages, 2014

COELHO, J. B. M., BARROS, M. F. C., BEZERRA NETO, E.; SOUZA, E. R. Ponto de murcha permanente fisiológico e potencial osmótico de feijão caupi cultivado em solos salinizados. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. Campina Grande, v. 18, n. 7, p. 708-713, 2014.

COOMBS, J.; HALL, D. O. Techniques in productivity and photosynthesis. New York: **Pergamon Press**. 1982. 171p.

COSTA, E. M.; CARVALHO, F.; ESTEVES, J. A.; NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S. Resposta da soja a inoculação e co-inoculação com bactérias promotoras do crescimento vegetal e Bradyrhizobium. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 10, p. 1678-1689, 2014.

COSTA, R. C. L. Assimilação de nitrogênio e ajustamento osmótico em plantas noduladas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] submetidas ao estresse hídrico. 1999. 225 f. **Tese** (Doutorado em Bioquímica). Federal do Ceará, Fortaleza.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Orlando, v. 28 p. 350-356, 1956.

DUNCAN, K. A.; HARDIN, S. C.; HUBER, S. C. The three maize sucrose synthase isoforms differ in distribution, localization, and phosphorylation. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 47, n. 7, p. 959-971, 2006.

ELLIOTT, W. Glutamine synthesis. **Methods in Enzymology**, v. 2, p. 337-342, 1955.

FEITOSA, A. G. S. Modulação da fotossíntese e assimilação do nitrogênio por condições de elevado CO₂ atmosférico em plantas de soja. 2014. 71f. **Dissertação** (mestrado em Agronomia: Solos e nutrição de plantas). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

FIGUEIREDO, M. V. B.; MARTINEZ, C. R.; BURITY, H. A.; CHANWAY, C. P. Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **World Journal of Microbiology Biotechnology**, oxford, v. 24, p. 1187-1193, 2008.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, Cairo, v. 2012, 2012.

GUPTA, B. and HUANG, B. Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization. **International Journal of Genomics**, New York, v. 2014, 18 pages, 2014.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method of growing plants without soil**. University of California, Berkeley, 1. ed, 1950.32p.

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Embrapa-Serviço de Produção e Informação: Brasília, 1994.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Soybean seed coinoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: a new biotechnological tool to improve yield and sustainability. **American Journal of Plant Sciences**, California, v. 6, p. 811-817, 2015.

LADRERA, R.; MARINO, D.; LARRAINZAR, E.; GONZÁLEZ, E. M.; ARRESE-IGOR, C. Reduced carbon availability to bacteroids and elevated ureides in nodules, but not in shoots, are involved in the nitrogen fixation response to early drought in soybean. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 145, p. 539–546, 2007.

MA, Y.; PRASAD, M. N. V.; RAJKUMAR, M.; FREITAS, H. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 29, p. 248-258, 2011.

MEDEIROS, R.; SANTOS, V.; ARAÚJO, A.; OLIVEIRA FILHO, C. Estresse salino sobre a nodulação em feijão-caupi. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 21, n. 5, p. 202-206, 2008.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, California, v. 59, p. 651-681, 2008.

MUNNS, R.; HUSAIN, S. RIVELLI, A. R.; RICHARD, A. J.; CONDON, A. G.; MEGAN, P. L.; EVANS, S. L.; SCHACHTMAN, D. P.; HARE, R. A. Avenues for increasing salt tolerance of crops, and the role of physiologically based selection traits. **Plant and Soil**, The Hague, v. 247, p.93-105, 2002.

NAVASCUÉS, J.; PÉREZ-RONTOMÉ, C.; GAY, M.; MARCOS, M.; YANG, F.; WALKER, F. A.; DESBOISE, A.; ABIÁN, J.; BECANA, M. Leghemoglobin green derivatives with nitrated hemes evidence production of highly reactive nitrogen species during aging of legume nodules. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 109, n. 7, p. 2660-2665, 2012.

NAVEED, M.; MEHBOOB, I. HUSSAIN, M. B.; ZAHIR, Z. A. Perspectives of Rhizobial Inoculation for Sustainable Crop Production. In: **Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets**, Pakistan, p. 209-239, 2015.

NÓBREGA, R. S. A., MOTTA, J. S., LACERDA, A. M., MOREIRA, F. D. S. Tolerância de bactérias diazotróficas simbióticas à salinidade in vitro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n.4, p.899-905, 2004.

OLIVEIRA, A. L. M.; COSTA, K. R.; FERREIRA, D. C.; MILANI, K. M. L.; SANTOS, O. J. A. P.; SILVA, M. B.; ZULUAGA, M. Y. A. Aplicações da biodiversidade bacteriana do solo para a sustentabilidade da agricultura. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, Londrina, v. 3, n.1, p. 56-77, 2014.

PEOPLES, M. B., FAIZAH, A. W., REAKASEM, B.; HERRIDGE, D. F. Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field. **Australian Centre for International Agricultural Research**, Canberra. p. 76. 1989.

PRAKAMHANG, J.; TITTABUTR, P.; BOONKERD, N.; TEAMTISONG, K.; UCHIUMI, T.; ABE, M.; TEAUMROONG, N. Proposed some interactions at molecular level of PGPR coinoculated with *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 and *B. japonicum* THA6 on soybean symbiosis and its potential of field application. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 85, p. 38-49, 2015.

PRISCO, J. T.; GOMES FILHO, E. Fisiologia e bioquímica do estresse salino em plantas. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. **Manejo da salinidade na agricultura**. Fortaleza, INCT Sal, 2010. p. 472. 129-141.

RAO, A.; AHMAD, S. D.; SABIR, S. M.; AWAN, S.; SHAH, H. A.; KHAN, F.; SHAFIQUE, S. ARIF, S. ABBAS, S. R. Potential biochemical indicators improve salt tolerance in fifteen cultivars of wheat (*Triticuma estivum* L.) from Pakistan. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, Gurgaon, v. 4, p. 389-406, 2013.

RODRIGUES, A. C., BONIFACIO, A., ANTUNES, J. E. L., SILVEIRA, J. A. G., FIGUEIREDO, M. V. B. Minimization of oxidative stress in cowpea nodules by the interrelationship between *Bradyrhizobium* sp. and plant growth-promoting bacteria. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 64, p. 245-251, 2013.

RODRIGUES, A. C., ANTUNES, J. E. L., MEDEIROS, V. V., DE FRANÇA BARROS, B. G., FIGUEIREDO, M. D. V. B. Resposta da coinoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas e *Bradyrhizobium* sp. em caupi. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 1, p. 196-202, 2012.

SAMAVAT, S.; SAMAVAT, S.; MAFAKHERI, S.; SHAKOURI, M. J. Promoting common bean growth and nitrogen fixation by the coinoculation of *Rhizobium* and *Pseudomonas fluorescens* isolates. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, Sofia, v. 18, p. 387-395, 2012.

SILVEIRA, J. A. G.; CONTADO, J.; RODRIGUES, J.; OLIVEIRA, J. Phosfoenolpyruvate carboxylase and glutamine synthetase activities in relation to nitrogen fixation in cowpea nodules. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 10, n. 1, p. 19-23, 1998.

- SILVEIRA, J. A. G.; CARDOSO, B. B.; MELO, A. R. B.; VIÉGAS, R. A. Salt-induced decrease in nitrate uptake and assimilation in cowpea plants. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.11, n.2, P.77-82, 1999.
- SILVEIRA, J. A. G.; SILVA, S. L. F.; SILVA, E. N.; VIEGAS, R. A. Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino em plantas. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. **Manejo da salinidade na agricultura**. Fortaleza, INCT Sal, 2010. p. 472.
- SMAGGHE, B.J.; HOY, JA.; PERCIFIELD, R.; KUNDU, S.; HARGROVE, M.S.; SARATH, G.; HILBERT, J.; WATTS, R.; DENNIS, E.S.; PEACOCK, W.J.; DEWILDE, S.; MOENS, L.; BLOUIN, G.C.; OLSON, J.S.; APPLEBY, C.A. Review: correlations between oxygen affinity and sequence classifications of plant hemoglobin. **Biopolymers**, New York, v. 91, n. 12, p. 1083-1096, 2009.
- SOUZA, R.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 4, p. 401-419, 2015.
- SOUZA, R. P.; MACHADO, E. C.; SILVEIRA, J. A. S.; RIBEIRO, R. V. Fotossíntese e acúmulo de solutos em feijoeiro caupi submetido à salinidade. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 46, n. 6, p. 586-592, 2011
- SUZUKI, I.; CRETIN, C.; OMATA, T.; SUGIYAMA, T. Transcriptional and post-transcriptional regulation of nitrogen-responding expression of phosphoenolpyruvate carboxylase gene in maize. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 105, p. 1223-1229, 1994.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- TILAK, K. V. B. R.; RANGANAYAKI, N.; MANOHARACHARI, C. Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and Rhizobium on nodulation and nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan*). **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 57, p. 67–71, 2006.
- UDVARDI, M.; POOLE, P. S. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. **Annual Review of Plant Biology**, California, v. 64, p. 781–805, 2013.
- VAN HANDEL, E. Direct microdetermination of sucrose. **Analytical Biochemical**, Orlando, v. 22, p. 280-283, 1968.
- VAN HAMEREN, B.; HAYASHI, S.; GRESSHOFF, P. M.; Ferguson, B.J. Advances in the identification of novel factors required in soybean nodulation, a process critical to sustainable agriculture and food security. **Jounal Plant Biology Soil Health**, Los Angeles, v. 1, 6p, 2013.
- VANCE, C. P.; EGLI, M. A.; GRIFFITH, S. M. Plant regulated aspects of nodulation and N₂ fixation. **Plant Cell Environment**, Oxford, v. 11, p. 413-427, 1988.

VERMA, D. P.; LONG, S. The molecular biology of *Rhizobium*-legume symbiosis. **Internacional Review of Cytology**, New York, v. 158, p. 151-162. 1983.

WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical chemistry**, Washington, v. 39, n. 8, p.971-974, 1967.

WILLADINO, L.; CAMARA, T. R. Tolerância das plantas à salinidade: aspectos fisiológicos e bioquímicos. **Enciclopédia biosfera**, Goiânia, v. 6, n. 11, p. 1-23, 2010.

YAO, S. G., KODAMA, R., WANG, H., ICHII, M., TAKETA, S., YOSHIDA, H. Analysis of the rice SHORT-ROOT5 gene revealed functional diversification of plant neutral/alkaline invertase family. **Plant science**, Shannan, v. 176, n. 5, p. 627-634, 2009.

YOUNG, E. W.; CONWAY, C. F. On the estimation of allantoin by the rimini-schryver reaction. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 142, p. 839-853, 1942.

ZHU, J. K. Plant Salt Tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 56-71, 2001.

ZHU, Y. J.; KOMOR, E.; MOORE, P. H. Sucrose accumulation in the sugarcane stems regulated by the difference between the activities of soluble acid invertase and sucrose phosphate synthase. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 115, p. 609-616, 1997.

Capítulo III

**5 RESPOSTA ANTIOXIDATIVA DO *Vigna unguiculata* [L.] WALP.
COINOCULADO COM *Bradyrhizobium* sp. E BPCP COM E SEM ESTRESSE
SALINO**

Artigo submetido para publicação no periódico Applied Soil Ecology

5 Resposta antioxidativa do *Vigna unguiculata* [L.] Walp. coinoculado com *Bradyrhizobium* sp. e BPCP com e sem estresse salino

Resumo

São poucos os estudos sobre estresse/proteção oxidativa em nódulos de leguminosas, sendo importantes para entender o papel do estresse oxidativo sobre a fixação biológica de nitrogênio. Bem como a interação entre leguminosa, rizóbio e bactérias promotoras de crescimento vegetal na resposta ao estresse/proteção oxidativa em nódulos de feijão-caupi sob estresse salino. O objetivo deste trabalho foi mensurar as atividades de peroxidase do ascorbato, superóxido dismutase, peroxidase de fenóis e catalase, bem como avaliar o papel do ciclo do ascorbato-glutationa na proteção oxidativa, com base no balanço redox do ascorbato e da glutathione (total, reduzida e oxidada), em nódulos de plantas de feijão-caupi, com e sem indução do estresse salino. As plantas de feijão caupi cv. "IPA 206" foram cultivadas em condições axênicas, inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e coinoculadas *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp.; *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp.; *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis*; e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. sendo mantidas com (50 mmol L⁻¹ NaCl) e sem estresse salino. A salinidade aumentou o teor de sódio, peróxido de hidrogênio, peroxidação de lipídeos, da atividade da superóxido dismutase e diminuição do status redox da glutathione. A inoculação com *Bradyrhizobium* sp. permitiu uma maior atividade de peroxidase de fenóis nos nódulos das plantas cultivadas na presença de 50 mmol L⁻¹ de NaCl. O estresse oxidativo provocou maior degradação lipídica nos nódulos de feijão-caupi coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp.. As coinoculações com *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* e *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. são promissoras na resposta ao estresse oxidativo.

Palavras chave: Feijão-caupi. Bactérias promotoras de crescimento em plantas. Espécies reativas de oxigênio. Catalase. Superóxido dismutase. Salinidade.

**Antioxidative response of *Vigna unguiculata* [L.] Walp. co-inoculated with
Bradyrhizobium sp. and PGPB with and without salt stress**

Abstract

There are few studies on stress/oxidative protection in legume nodules, being important to understand the role of oxidative stress on the biological fixation of nitrogen. As well as the interaction between legume, rhizobium and plant growth promoting bacteria in response to stress/oxidative protection in cowpea nodules under saline stress. The objective of this work was to measure the peroxidase activities of ascorbate, superoxide dismutase, phenol peroxidase and catalase, as well as to evaluate the role of the ascorbate-glutathione cycle in oxidative protection based on redox balance of ascorbate and glutathione (total, Reduced and oxidized), in nodules of cowpea plants, with and without salt stress induction. The plants of cowpea cv. "IPA 206" were cultivated under axenic conditions, inoculated with *Bradyrhizobium* sp. and co-occurring *Bradyrhizobium* sp. and *Actinomadura* sp.; *Bradyrhizobium* sp. and *Bacillus* sp.; *Bradyrhizobium* sp. and *Paenibacillus graminis*; and *Bradyrhizobium* sp. and *Streptomyces* sp. Being maintained with (50 mmol L⁻¹ NaCl) and without saline stress. Salinity increased sodium content, hydrogen peroxide, lipid peroxidation, superoxide dismutase activity, and decreased redox status of glutathione. Inoculation with *Bradyrhizobium* sp. Allowed higher phenolic peroxidase activity in the nodules of cultivated plants in the presence of 50 mmol L⁻¹ of NaCl. The oxidative stress caused greater lipid degradation in cowpea nodules coinoculated with *Bradyrhizobium* sp. and *Actinomadura* sp. and *Bradyrhizobium* sp. and *Streptomyces* sp. co-cultivations with *Bradyrhizobium* sp. and *Paenibacillus graminis* and *Bradyrhizobium* sp. and *Bacillus* sp. are promising in the response to oxidative stress.

Keywords: Cowpea bean. Growth-promoting bacteria in plants. Oxygen-reactive species. Catalase. Superoxide dismutase. Salinity.

5.1 Introdução

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) é um dos produtos agrícolas de maior importância econômico e social. Segundo a CONAB (2017), no Brasil a cultura será plantada em 1.308,8 mil hectares na safra 2016/17, e no Nordeste, a área plantada será de 1.080,4 mil hectares. O plantio desta safra se inicia em janeiro de 2017, sendo esperada uma produção de 592,6 mil toneladas para todo o território nacional e de 327,2 mil toneladas para o Nordeste. Na região Nordeste o feijão-caupi é tradicionalmente plantado na região semiárida, pois esta cultura é adaptada às condições climáticas deste bioma (FREIRE FILHO, et al., 2011; SANTOS et al., 2016).

Os solos do semiárido nordestino podem sofrer salinização naturalmente, devido ao baixo índice pluviométrico e a ocorrência de temperaturas elevadas ou devido ao inadequado manejo da irrigação. Plantas desenvolvem diversos mecanismos para sobreviver ao estresse salino, dentre eles, estão a homeostase iônica e compartimentalização, ativação de enzima antioxidante e síntese de compostos antioxidantes (GUPTA; HUANG, 2014; LIMA JUNIOR; SILVA, 2010; ANDRADE, 2009).

Quando as plantas estão sob condições normais de cultivo, os antioxidantes por elas produzidos são capazes de neutralizar as espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil ($\cdot OH$) e oxigênio molecular (1O_2), encontram-se em baixas concentrações. Se a planta está submetida a estresses abióticos como o estresse salino, a produção de EROs é aumentada e acumulam-se na planta, podendo causar danos aos lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, pois os antioxidantes produzidos pela planta não são suficientes para neutralizar as EROs, causando o estresse oxidativo na planta, e este estresse inibe a fixação de nitrogênio e o desenvolvimento vegetal, podendo resultar em menor produção. As plantas utilizam composto e enzimas antioxidantes para a proteção celular, visando diminuir os danos oxidativos (SHARMA et al., 2012; SILVEIRA et al., 2011; PRISCO; GOMES FILHO, 2010).

Compostos ou enzimas antioxidantes celular vegetal, podem evitar a formação, sequestrar ou degradar os radicais livres, prevenindo os danos oxidativos nas células vegetais. Entre os principais metabólitos antioxidantes, encontram-se o ácido

ascórbico ou ascorbato, a glutathiona (γ -glutamil-cisteinil-glicina, GSH), o α -tocoferol (vitamina E) e os carotenoides (DINAKAR et al 2012; SERKEDJIEVA, 2011).

Várias enzimas antioxidantes estão envolvidas na defesa celular contra os radicais livres, destacam-se a superóxido dismutase, a catalase, e a peroxidase de fenóis. A superóxido dismutase, catalisa a desmutação do radical superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2). Este H_2O_2 é eliminado pela catalase e outras peroxidases, a catalase converte duas moléculas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) à água (H_2O) e oxigênio molecular (O_2) (ALVES et al., 2016; SHARMA et al., 2012; LOCATO et al., 2010).

São poucos os estudos sobre o estresse e proteção oxidativa em nódulos de leguminosas, sendo importante para entender o papel do estresse oxidativo resultante do estresse salino sobre a fixação biológica de nitrogênio, bem como a interação entre leguminosa, rizóbio e bactérias promotoras de crescimento vegetal. Neste contexto, foi elaborada uma hipótese de que a coinoculação com *Bradyrhizobium* sp. e bactérias promotoras de crescimento de plantas permite minimizar os efeitos deletérios do estresse salino através da proteção oxidativa, beneficiando a fixação biológica de nitrogênio no feijão-caupi.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Produção de micro-organismos e preparo dos inoculantes

A estirpe de rizóbio e bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP) utilizadas no experiment (Tabela 1) foram multiplicadas em condições controladas para a produção dos inoculantes. Para purificação e multiplicação dos micro-organismos foram usados os meios de cultura: YMA e YM a pH 6,5 (VINCENT, 1970), para o *Bradyrhizobium* sp., DYGS a pH 6,0 (RODRIGUES NETO, 1986) para o *Bacillus* sp., TSA e TSB a pH 7,3, para o *Paenibacillus graminis* e AY e AYA a pH 6,4 (NONOMURA; OHARA, 1971) para a *Actinomadura* sp. e *Streptomyces* sp., conforme anexo A. O inoculante com *Bradyrhizobium* sp. foram incubados em agitador rotatório (200 rpm) a 28° por 96 horas, e os inoculantes com as quatro estirpes de BPCP, foram mantidos em agitador rotatório (200 rpm) a 28° por 48 a 96 horas, de acordo com a estirpe.

5.2.2 Cultura de planta e tratamento

O experimento foi conduzido em condições axênicas na casa de vegetação no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA; Recife-PE). Sementes do cultivar “IPA-206” de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], foram desinfestadas (HUNGRIA; ARAÚJO, 1994) e semeadas em vasos de Leonard contendo areia lavada (pH 6,5), ambos previamente autoclavados (1 h; 120 °C; 101 kPa).

Na ocasião da semeadura, as sementes foram inoculadas utilizando-se 1,0 mL da suspensão bacteriana (10^8 UFC mL⁻¹), com *Bradyrhizobium* sp. ou coinoculadas com 1,0 mL da suspensão bacteriana contendo o *Bradyrhizobium* sp. e 1,0 mL da suspensão bacteriana contendo uma estirpe de BPCP (10^7 UFC mL⁻¹). As coinoculações foram formuladas conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Formulação de inoculantes e tratamentos utilizados no experimento.

Tratamento	Combinação bacteriana	Código de acesso	Origem
T1	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	UFLA 03-84	Solo de pastagem em Jí-Paraná, Rondônia
T2	<i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Bacillus</i> sp.	UFLA 03-84 e IPA CC 11	Caules de cana de açúcar (<i>Saccharum officinarum</i>) da zona da mata de Pernambuco
T3	<i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Paenibacillus graminis</i>	UFLA 03-84 e MC 04.21	Rizosfera de milho (<i>Zea mays</i>) em solo do Cerrado
T4	<i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Actinomadura</i> sp.	UFLA 03-84 e 183-EL	Rizosfera da caatinga pernambucana
T5	<i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Streptomyces</i> sp.	UFLA 03-84 e 212	Rizosfera de rúcula (<i>Eruca sativa</i>)

Durante todo o experimento, as plantas foram irrigadas por capilaridade, com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) isenta de nitrogênio e modificada conforme Silveira et al. (1998). O desbaste foi realizado aos quatro dias após a germinação (DAG) e mantiveram-se duas plantas por vaso (unidade experimental). As plantas foram submetidas ao estresse salino aos 15 DAG, adicionando 50 mmol L⁻¹ de cloreto de sódio (NaCl) à solução nutritiva em 50% dos vasos. As soluções nutritivas foram colocadas nos vasos de Leonard com pH de 6,5 e condutividade elétrica (CE) de 0,99 mS cm⁻¹ e 5,6 mS cm⁻¹, para solução nutritiva sem a com adição de NaCl, respectivamente. Semanalmente, a solução nutritiva com e sem NaCl foi trocada. Na ocasião realizou-se a lavagem do substrato com água destilada, e foram

medidos o pH e a CE do drenado, para acompanhamento do pH e CE da solução no vaso.

A coleta do experimento foi realizada aos 37 DAG, no Laboratório de Biologia do Solo no IPA. No momento da coleta, as raízes contendo os nódulos foram imersas em nitrogênio líquido a -80°C . As raízes contendo os nódulos congelados em N_2 líquido foram acondicionados em recipientes térmicos contendo gelo seco, e transportadas para o laboratório de Metabolismo de Plantas (Labplant) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os nódulos ainda congelados foram separados das raízes, em seguida liofilizados. Após a liofilização, os nódulos foram macerados e acondicionados em dessecador até as determinações químicas.

5.2.3 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso, com arranjo em fatorial $(5 \times 2) + 1$, sendo cinco combinações bacterianas (uma inoculação apenas com *Bradyrhizobium* sp. e quatro coinoculações com *Bradyrhizobium* sp. e BPCP), dois níveis de salinidade (0 e 50 mmol L^{-1} de NaCl), com quatro blocos (duas réplicas por bloco) e um controle absoluto (plantas não inoculadas, sem nitrogênio e sem NaCl). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com níveis de significância de 5% pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa ASSISTAT Versão 7.7 beta (2016) (SILVA; AZEVEDO, 2009).

5.2.4 Determinações bioquímicas

Foram realizadas análises do teor de sódio e potássio segundo métodos descritos pela Embrapa (2009). As análises dos compostos indicadores de estresse oxidativo foram: peroxidação de lipídeos foi estimada pelo conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) conforme Heath; Packer (1968), o teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BRENNAN; FRENKEL, 1977), ascorbato total, reduzido, oxidado e status redox de ascorbato (KAMPFENKEL et al., 1995), glutatona total, reduzida, oxidada e status redox da glutatona (GRIFFITH, 1980), bem como análises de atividade enzimática, catalase (HAVIR; MCHALE, 1987), peroxidase

de fenóis (AMAKO et al.,1994), superóxido dismutase (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977).

5.3 Resultados e Discussão

As plantas de feijão-caupi cv. “IPA 206” inoculadas e coinoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. e BPCP apresentaram um aumento de 89,73% no teor de sódio e de 69,03% no teor de potássio na parte aérea em relação as plantas não inoculadas, sem nitrogênio e sem salinidade (tratamento controle absoluto), indicando que a inoculação e/ou coinoculação com *Bradyrhizobium* sp. e BPCP, submetido ou não a salinidade melhora a nutrição da planta e a capacidade de ajuste osmótico (Figura 1).

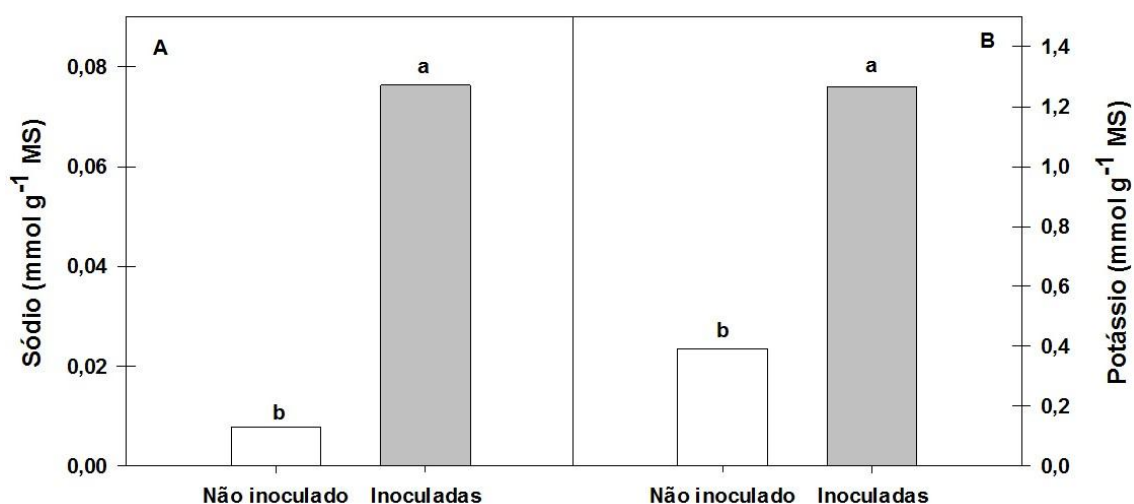


Figura 1. Análise de contraste dos teores de sódio e potássio em massa seca de parte aérea de plantas de feijão-caupi cv. “IPA 206”, comparando plantas não inoculadas e sem estresse salino com plantas inoculadas sem e com estresse salino (0 e 50 mmol L⁻¹ de NaCl)

Sob condição controle, a inoculação *Bradyrhizobium* sp. ou a coinoculação *Bradyrhizobium* sp. e BPCP estudadas não promoveram diferença significativa no teor de sódio na parte aérea das plantas de feijão-caupi, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Entretanto, quando as plantas foram cultivadas sob estresse salino, os tratamentos coinoculados com *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (UFLA 03-84 e MC 04.21) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (UFLA 03-84 e 212) acumularam mais sódio na parte aérea das plantas (Figura 2A). Comparando as formas de cultivo, foi

observado que o teor de sódio na parte aérea das plantas de feijão-caupi aumentou significativamente independente da combinação bacteriana estudada, sendo este aumento de 94 a 99 % (Figura 2A), resultando em alteração no balanço nutricional das plantas submetidas a salinidade, caracterizando o estresse iônico. As plantas de feijão-caupi coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3) e *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4), quando cultivadas sem salinidade, tiveram o teor de potássio na parte aérea das plantas aumentado (Figura 2B).

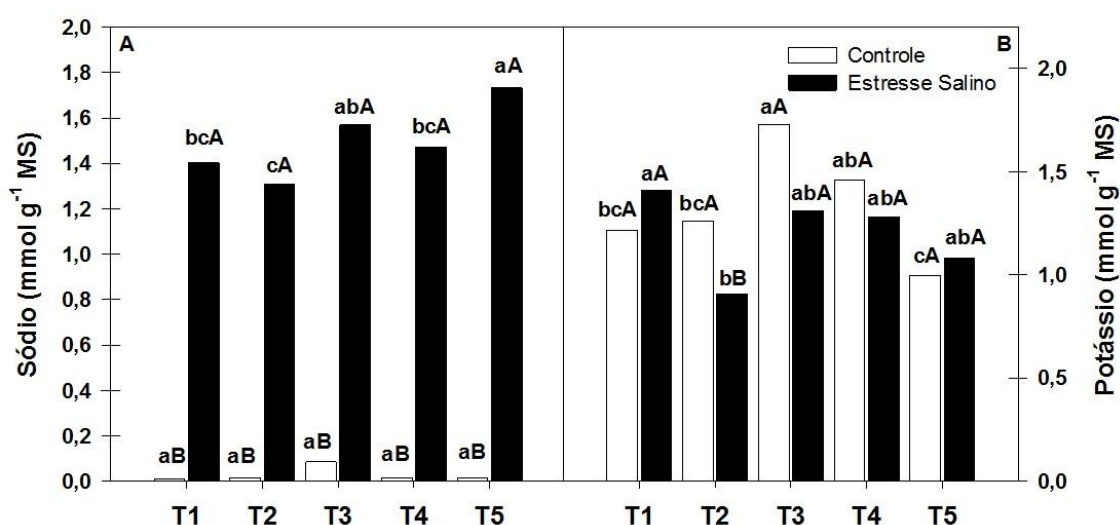


Figura 2. Teor de sódio (*CV = 15,36%) e potássio (*CV = 14,42 %) na parte aérea de plantas de feijão-caupi cv. "IPA 206" cultivadas sem e com estresse salino (0 e 50 mmol L⁻¹ de NaCl), inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. (T1) e coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5). Médias seguidas de mesma letra maiúscula (condições de cultivo) e minúscula (combinações de bactérias) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). *coeficiente de variação

Quando cultivadas na presença de 50 mmol L⁻¹ de NaCl, a inoculação com *Bradyrhizobium* sp. (T1) e a coinoculação *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5) proporcionaram maiores teores de potássio na parte aérea das plantas em relação à coinoculação *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), indicando um favorecimento destas combinações bacterianas no balanço iônico das plantas e possibilitando uma maior tolerância ao estresse salino (Figura 2B).

A inoculação com *Bradyrhizobium* sp. (T1) e a coinoculação *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5) proporcionaram aumento na concentração de potássio

quando as plantas foram cultivadas sob estresse salino em relação às plantas cultivadas sob condição controle, o oposto ocorreu quando as plantas foram coinoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3) e *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4), reduzindo o potássio na parte aérea das plantas, quando cultivadas sob estresse salino (Figura 2B).

Sendo o potássio o soluto que mais contribui para a manutenção da pressão osmótica e da força iônica nas plantas quando estressadas pela indução do NaCl, é importante relatar a participação deste nutriente no ajustamento osmótico, tendo em vista que os estudos apresentam respostas diversas do teor de potássio a salinidade. O antagonismo entre Na^+ e K^+ , promove a redução na absorção de K^+ e o influxo de Na^+ aumenta, em contrapartida o acúmulo de K^+ sob estresse, pode estar relacionado à redução na translocação deste nutriente, devido a menor demanda para o crescimento das plantas (LACERDA et al., 2006; DUTRA et al., 2011; MAIA et al., 2015). Esta diversidade de resposta à salinidade demonstra a importância do estudo dos mecanismos apresentados como resposta ao estresse salino em plantas de feijão-caupi inoculadas e coinoculadas com diferentes estirpes bacterianas.

Plantas submetidas a estresse salino ativam transportadores de cátions no tonoplasto e na membrana celular, para manter a homeostase iônica, sendo este um mecanismo de tolerância ao estresse (MAIA et al., 2015). O sódio pode ser absorvido por competição através de carregadores de K^+ e Ca^{2+} , tendo em vista que não existem transportadores específicos de Na^+ , principalmente pela similaridade entre o raio iônico hidratado do sódio e do potássio bem como por meio de canais não seletivos, gerando um antagonismo entre a absorção de sódio e potássio (SCHOSSLER et al., 2012; WILLADINO; CAMARA, 2010; MÄSER et al, 2002).

Diferentes respostas de inoculações e coinoculações foram observadas por Oliveira (2011), sendo que a concentração de potássio na parte aérea de plantas de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), foi maior quando coinoculadas com as estirpes *Rhizobium tropici* (CIAT 899) e *Burkholderia fungorum* (UFLA 04-155) do que as demais combinações bacterianas avaliadas.

As plantas coinoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2) e *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3) apresentaram menor conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nos nódulos (Figura 3), indicando melhor controle nos

níveis desta espécie reativa de oxigênio (EROs), devido a maior eficiência do sistema antioxidativo nas plantas coinoculadas com estas estirpes de BPCP. Comparando as condições de cultivo, observa-se que o teor H_2O_2 aumentou em 11,6% nos nódulos das plantas de feijão-caupi quando estas foram cultivadas sob estresse salino em comparação com as plantas controle, independentes da combinação bacteriana inoculada.

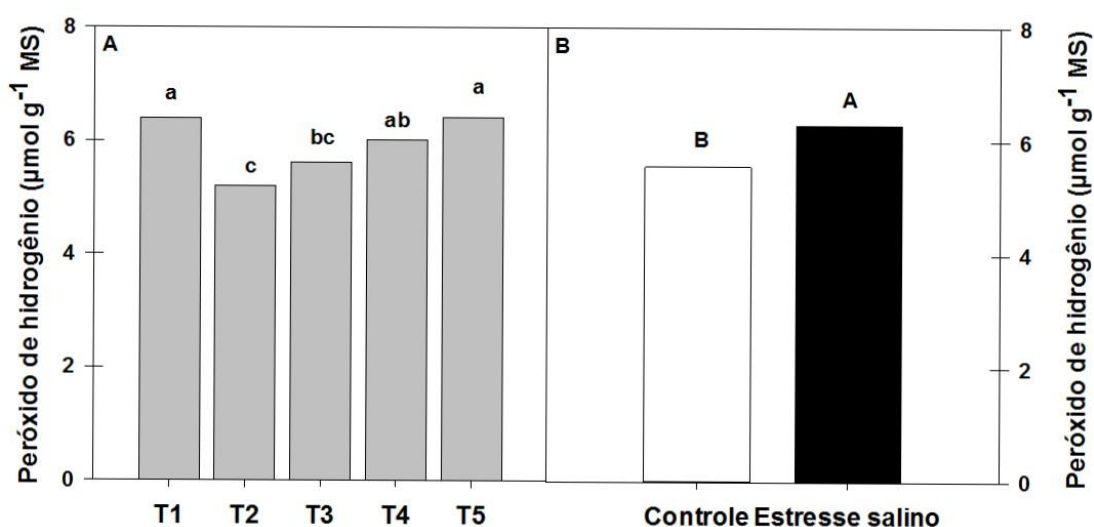


Figura 3. Peróxido de hidrogênio (*CV=4,24%) em nódulos de plantas de feijão-caupi cv. “IPA 206” inoculado com *Bradyrhizobium* sp. (T1) ou coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5) - (A), e em condições controle e de estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl) - (B). Médias seguidas de mesma letra maiúscula (condições de cultivo) e minúscula (combinações de bactérias) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). *coeficiente de variação

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode ser convertido em água pela ação da catalase nos peroxissomas, ou no citosol pelo ciclo ascorbato-glutationa envolvendo a peroxidase do ascorbato, o ascorbato reduzido, a glutatona reduzida e a glutatona redutase (SILVEIRA et al., 2011). Batista et al. (2015) encontraram menor concentração de H_2O_2 nas plantas de feijão-caupi cv. “Vinagre” inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267), quando comparadas com o tratamento controle absoluto e controle nitrogenado.

No presente estudo, a peroxidação de lipídeos foi maior nos nódulos das plantas coinoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), indicando que houve menor eficiência do sistema antioxidante nos nódulos dessas plantas, do que nas demais inoculações,

independendo da forma de cultivo (Figura 4A). O mesmo não foi observado por Rodrigues et al (2013), em que observaram nível superior de peroxidação lipídica em plantas de feijão-caupi cv. "IPA 206" inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267), tanto no ponto de floração (mesma fase fisiológica das plantas neste estudo) como na fase de senescência.

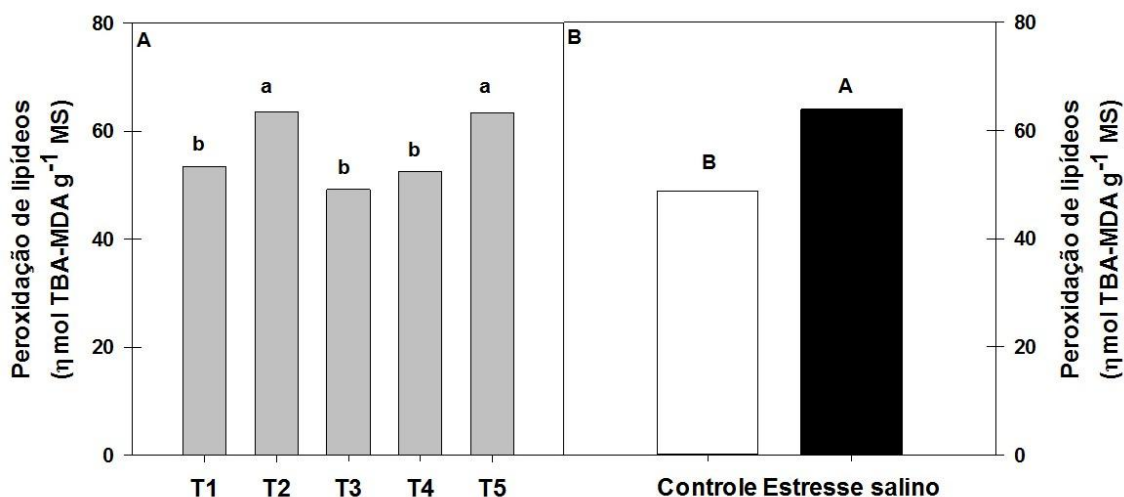


Figura 4. Peroxidação de lipídeos (*CV=10,53%) em nódulos de plantas de feijão-caupi cv. "IPA 206" inoculado com *Bradyrhizobium* sp. (T1) e coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5) - (A) em condições controle e estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl) - (B). Médias seguidas de mesma letra maiúscula (condições de cultivo) e minúscula (combinações de bactérias) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). *coeficiente de variação

O estresse salino pode causar intensa peroxidação lipídica devido ao estresse oxidativo. A peroxidação de lipídeos, pode ser gerada pela competição entre as EROs num mesmo sítio que induz maior quantidade de radicais livres. Esta degradação dos lipídeos pode levar à quebra da cadeia e assim, aumentar a fluidez e a permeabilidade da membrana (SHARMA et al., 2012; CARVALHO et al., 2011; KRUSE et al., 2006). Neste estudo, o nível de peroxidação de lipídeos foi elevado nas plantas submetidas ao estresse salino (5,6 mS cm⁻¹) em 31 % em relação as plantas que foram cultivadas sob condição controle (Figura 4B).

No presente estudo, os nódulos das plantas de feijão-caupi coinoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), apresentaram maior atividade de superóxido dismutase (SOD) e menor teor de H₂O₂, indicando que este peróxido não acumulava nas células provavelmente

pela regeneração dos antioxidantes oxidados através da peroxidase do ascorbato (APX), e glutathiona redutase (GR), tendo em vista que estes tratamentos apresentaram menor teor de ascorbato, quando as plantas foram submetidas ao estresse salino (Figura 5).

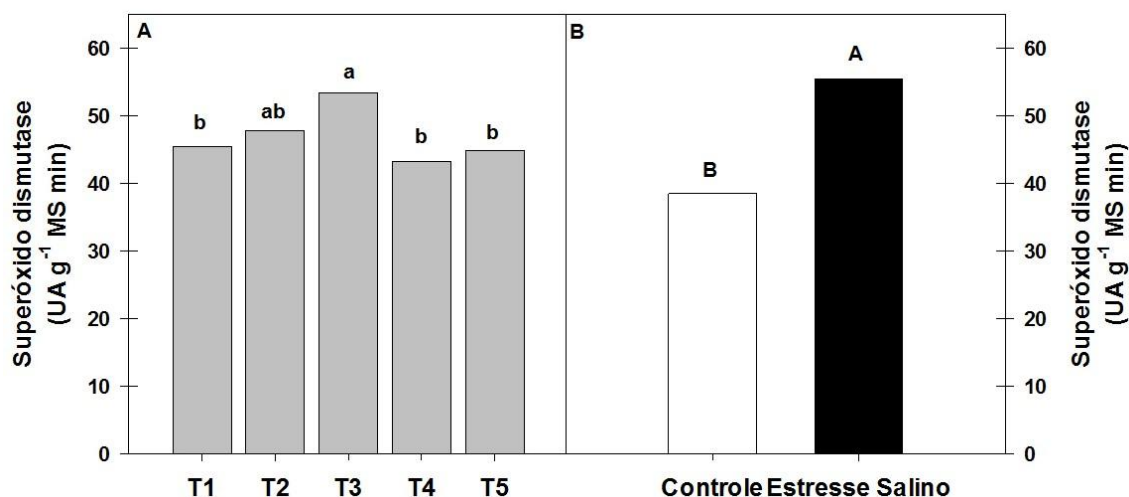


Figura 5. Superóxido dismutase (A) (*CV = 8,68%) em nódulos de plantas de feijão-caupi cv. “IPA 206” inoculado com *Bradyrhizobium* sp. (T1) ou coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5) - (A) em condições controle e estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl) - (B). Médias seguidas de mesma letra maiúscula (condições de cultivo) e minúscula (combinações de bactérias) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). *coeficiente de variação

A Superóxido dismutase é a primeira enzima a atuar no sistema antioxidante, catalisando a conversão do radical superóxido (O₂[•]) em peróxido de hidrogênio (H₂O₂), podendo ser encontrada no citoplasma, mitocôndria e citosol celular (SHARMA et al., 2012). Rodrigues et al. (2013) não encontrou diferença na atividade de SOD no período de floração das plantas de feijão-caupi cv. “IPA 206” inoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) e coinoculadas com as BPCP.

A maior atividade da peroxidase de fenóis (POX) foi encontrada nos nódulos das plantas inoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. (T1) e coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5) quando cultivada em condição controle. Já quando as plantas foram cultivadas sob condição de estresse foi encontrado maior atividade da peroxidase de fenóis apenas nos nódulos das plantas inoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. (T1), podendo estas combinações bacterianas promover maior proteção celular contra as reações oxidativas, sendo a POX uma enzima importante na eliminação do excesso de H₂O₂ da célula (NONATO, 2016).

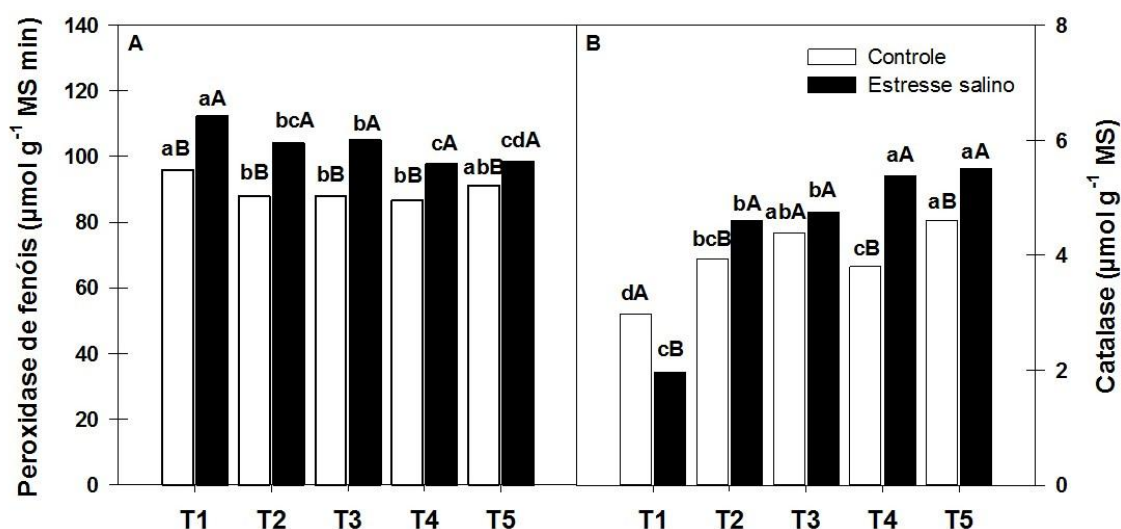


Figura 6. Peroxidase de fenóis (A) (*CV = 3,15%) e Catalase (B) (*CV = 5,28%) em nódulos de plantas de feijão-caupi cv. “IPA 206” inoculado com *Bradyrhizobium* sp. (T1) e coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), em condições controle e estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl). Médias seguidas de mesma letra maiúscula (condições de cultivo) e minúscula (combinações de bactérias) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *coeficiente de variação

Comparando as formas de cultivo (sem e com salinidade), observa-se que todas as combinações bacterianas apresentaram aumento na atividade da peroxidase de fenóis (Figura 6A). Esta enzima está ligada à lignificação dos tecidos, resultando no espessamento da parede celular, auxilia a defesa vegetal ao ataque de patógenos e resposta a estresses, como a salinidade. O aumento na atividade da POX promove a remoção do H₂O₂ restringindo o crescimento celular, o qual resulta em menor crescimento vegetal, neste trabalho, este comportamento foi encontrado nas plantas cultivadas sob estresse salino (NONATO, 2016; MAIA et al., 2012; PASSARDI et al., 2004). Maia et al. (2010) observaram que a peroxidase de fenóis foi a principal enzima detoxificante de H₂O₂ em raízes de duas variedades de feijão-caupi com 100 mmol L⁻¹ de NaCl.

A atividade da catalase foi maior sob condição controle nos nódulos das plantas coinoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3) enquanto que sob estresse salino as maiores atividades de catalase foi observada nos nódulos das plantas que foram coinoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5) (Figura 6B). A enzima catalase (CAT) está presente no peroxissomo removendo o excesso de H₂O₂ produzido como

resposta ao estresse salino, realizando a proteção da própria organela e evitando o vazamento do H_2O_2 para outros locais da célula (SILVEIRA et al., 2010).

Comparando as condições de cultivo, os nódulos das plantas coinoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5) não apresentaram diferença na atividade da catalase, nas duas condições de cultivo estudadas (com e sem estresse salino), enquanto nos nódulos das plantas coinoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5) houve aumento na atividade da catalase quando submetidas a estresse salino, permitindo maior remoção do peróxido de hidrogênio dos nódulos das plantas submetidas ao estresse salino (Figura 6B).

Os resultados da atividade enzimática apresentados neste trabalho confirmam a informação de Figueiredo et al. (2016) que a inoculação com BPCP na rizosfera de plantas pode contribuir para a produção de enzimas antioxidantes em plantas.

O ascorbato é um antioxidante que proporciona proteção da membrana por meio da reação com $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , tendo um papel fundamental na remoção de H_2O_2 . O excesso deste é reduzido a água e oxigênio molecular, pela ação da enzima peroxidase do ascorbato (APX), que utiliza o ascorbato reduzido (ASC) como doador de elétrons, gerando o ascorbato oxidado (dehidroascórbico - DHA). Este é rapidamente reduzido a ascorbato pelo ciclo ascorbato-glutationa (AsA-GSH) (DINAKAR et al., 2012; SHARMA et al., 2012). A forma reduzida do ascorbato é comum no cloroplasto quando as plantas estão submetidas a condições fisiológicas normais, o estado redox do ascorbato, representa a fração do ascorbato efetivamente capaz de atuar na proteção oxidativa (CONKLIN; BARTH, 2004; SMIRNOFF, 2000).

Sob condição controle os nódulos de plantas de feijão-caupi cv. "IPA 206" apresentou teor de ascorbato total maior nas coinoculações com a estirpe *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5). Já o teor de ascorbato reduzido foi maior nos nódulos das plantas coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), sendo este um composto importante na remoção de H_2O_2 estas combinações bacterianas favoreceram a remoção quando as plantas não estão submetidas a estresse. Estas combinações bacterianas também aumentaram o teor de ascorbato total quando as plantas foram submetidas a estresse salino (Figura 7A).

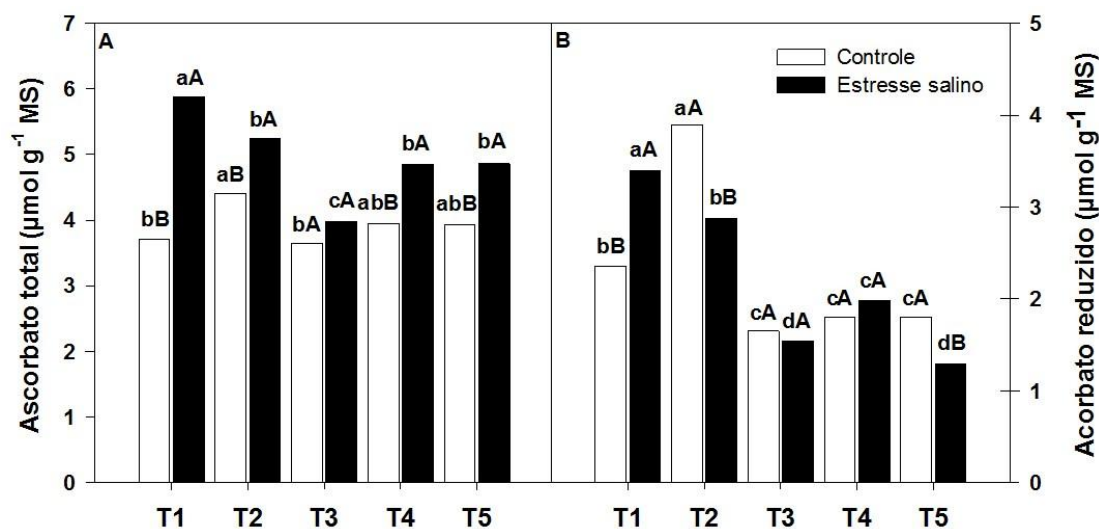


Figura 7. Ascorbato total (*CV = 4,91) (A) e reduzido (*CV = 5,87) (B) em nódulos de plantas de feijão-caupi cv. "IPA 206" inoculado com *Bradyrhizobium* sp. (T1) e coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), em condições controle e estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl). Médias seguidas de mesma letra maiúscula (condições de cultivo) e minúscula (combinações de bactérias) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). *coeficiente de variação

Quando cultivadas sob estresse salino (5,6 mS cm⁻¹), o teor de ascorbato total e reduzido foi maior nos nódulos das plantas inoculadas apenas com o *Bradyrhizobium* sp. (T1) e menor em todas as coinoculações, indicando que sob estresse salino nenhuma coinoculação permitiu maior remoção do H₂O₂ do que a inoculação o *Bradyrhizobium* sp.. Quando se compara as diferentes formas de cultivo observa-se que esta estirpe também aumentou o teor de ascorbato reduzido quando as plantas foram submetidas a estresse salino (Figura 7B).

Em condição controle, o ascorbato oxidado foi maior nas plantas coinoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5). Quando submetidas a estresse salino as plantas coinoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), apresentaram maior teor de ascorbato oxidado (Figura 8A). Mostrando que nem todas as combinações bacterianas que removeram o H₂O₂ nos nódulos de feijão-caupi, sob condição controle foi capaz de manter esta proteção oxidada quando as plantas foram submetidas a estresse salino, sendo a coinoculação com o *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), a única que pode manter esta proteção oxidativa mesmo sob estresse salino.

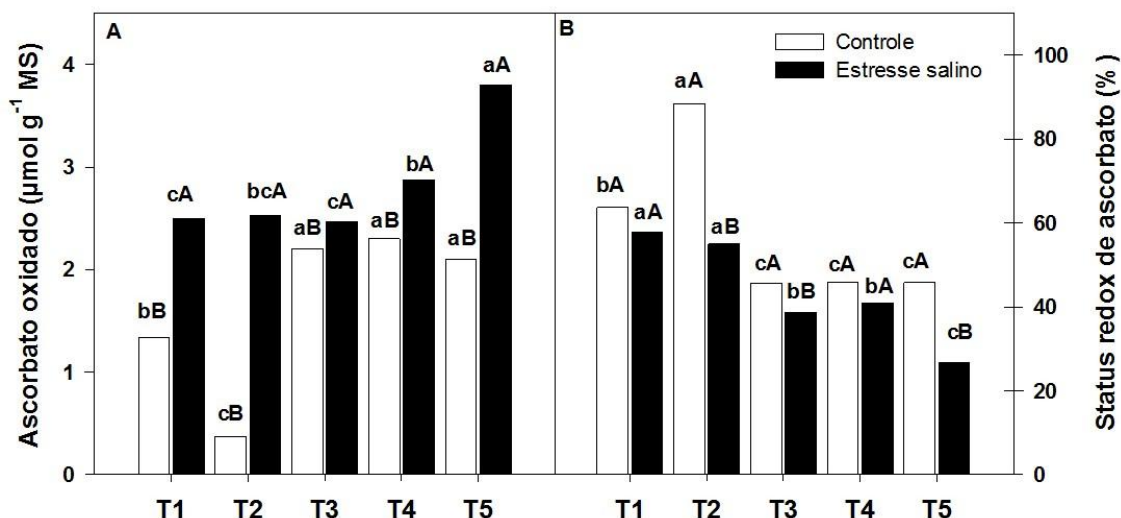


Figura 8. Ascorbato oxidado (*CV = 6,54) (A) e status redox de ascorbato (*CV = 7,85) (B) em nódulos de plantas de feijão-caupi cv. "IPA 206" inoculado com *Bradyrhizobium* sp. (T1) e coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), em condições controle e estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl). Médias seguidas de mesma letra maiúscula (condições de cultivo) e minúscula (combinações de bactérias) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). *coeficiente de variação

Todas as combinações bacterianas aumentaram o teor de ascorbato oxidado quando foram submetidas a estresse salino, se comparadas com as plantas cultivadas na condição controle, caracterizando o estresse oxidativo sofrido pelas plantas sob salinidade (5,6 mS cm⁻¹).

Os nódulos de feijão-caupi, apresentaram uma maior proteção oxidativa, quando as plantas foram coinoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), quando cultivadas na condição controle, onde 88% do ascorbato era composto pelo ascorbato reduzido. Já quando cultivadas sob estresse salino esta mesma coinoculação juntamente com a inoculação apenas com o *Bradyrhizobium* sp. (T1), apresentou a mesma proteção indicada pelo status redox do ascorbato com valores de cerca de: 55% e 58%, respectivamente (Figura 8B).

O teor de glutatona total nos nódulos das plantas inoculada com o *Bradyrhizobium* sp. (T1) e coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3) e *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4), o aumento da glutatona total pode indicar oxidação, bem como do estresse oxidativo (Figura 9A). Apenas a coinoculação com o *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), não apresentaram aumento no

teor da glutathiona oxidada, independente da forma de cultivo (Figura 9B). As estirpes que foram capazes de aumentar a oxidação da glutathiona consequentemente reduziram do ascorbato oxidado no ciclo ascorbato-glutathiona, independente, beneficiando a resposta antioxidativa nos nódulos das plantas de feijão-caupi.

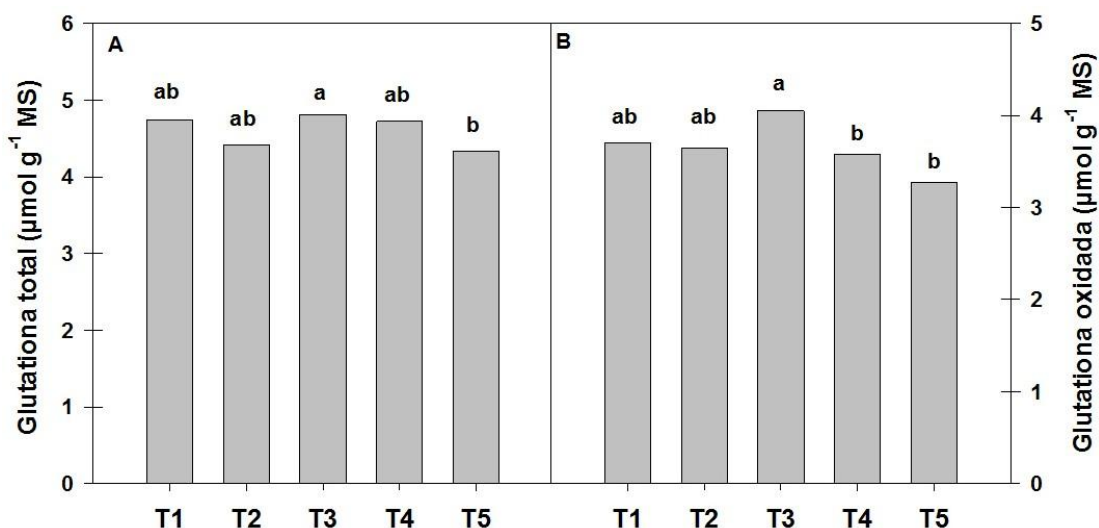


Figura 9. Glutathiona total (*CV = 6,00) (A) e Glutathiona oxidada (CV = 6,87) (B) em nódulos de plantas de feijão-caupi cv. "IPA 206" inoculado com *Bradyrhizobium* sp. (T1) e coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), em condições controle e estresse salino (50 mmol L^{-1} de NaCl). Médias seguidas de mesma letra maiúscula (condições de cultivo) e minúscula (combinações de bactérias) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *coeficiente de variação

A glutathiona é um composto importante na proteção contra o estresse oxidativo devido a redução do ascorbato oxidado no ciclo ascorbato-glutathiona. A glutathiona ocorre de forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). A reduzida reduz o H_2O_2 , mas devido a lenta reação esta não é a principal rota de conversão deste composto, sendo o ascorbato o substrato responsável pela desintoxicação redutiva do H_2O_2 (SEMPREBOM, 2008).

A glutathiona reduzida nos nódulos das plantas de feijão-caupi sob condição controle foi maior nas plantas inoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. (T1) e coinoculadas *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5). Já quando submetidas ao estresse salino apenas os nódulos das plantas coinoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) apresentou maior teor de glutamina reduzida (Figura 10), mostrando ter maior potencial para a redução do ascorbato oxidado no ciclo ascorbato-glutathiona, e reduzir o estresse

oxidativo nos nódulos das plantas submetidas ao estresse salino. Tendo em vista que a biossíntese de glutatona reduzida é uma resposta essencial das plantas ao estresse, aumentando a capacidade de defesa da planta, as plantas coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. podem promover maior proteção oxidativa ao estresse salino (SEMPREBOM, 2008).

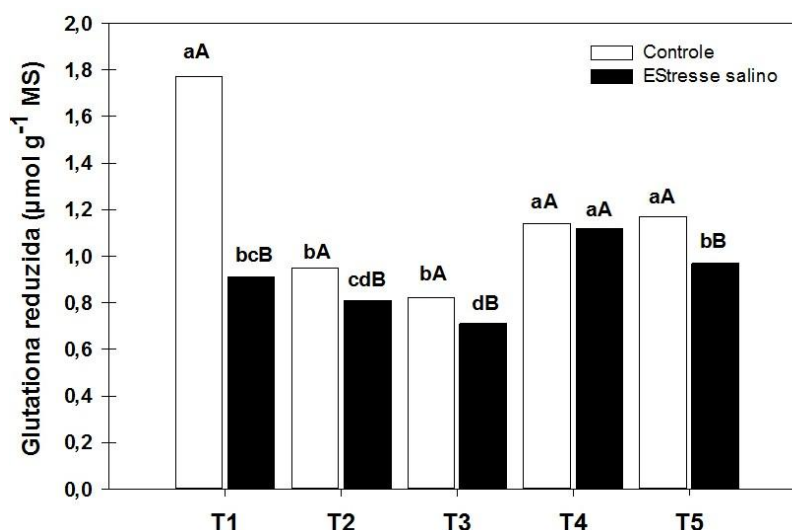


Figura 10. Glutaciona reduzida (*CV = 6,20) em nódulos de plantas de feijão-caupi cv. "IPA 206" inoculado com *Bradyrhizobium* sp. (T1) e coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), em condições controle e estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl). Médias seguidas de mesma letra maiúscula (condições de cultivo) e minúscula (combinações de bactérias) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *coeficiente de variação

Nos nódulos das plantas de feijão-caupi inoculadas com as estirpes *Bradyrhizobium* sp. (T1) e co-inoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5), apresentaram maior status redox da glutaciona, tendo em vista que 22, 24 e 25% de glutaciona estava presente nos nódulos na forma reduzida, indicando que estas combinações bacterianas têm maior potencial na proteção oxidativa do que as demais estudadas, independente da forma de cultivo (Figura 11A). O estresse salino reduziu o status redox da glutaciona em 12,87%, em comparação das plantas cultivadas sob condição controle (Figura 11B).

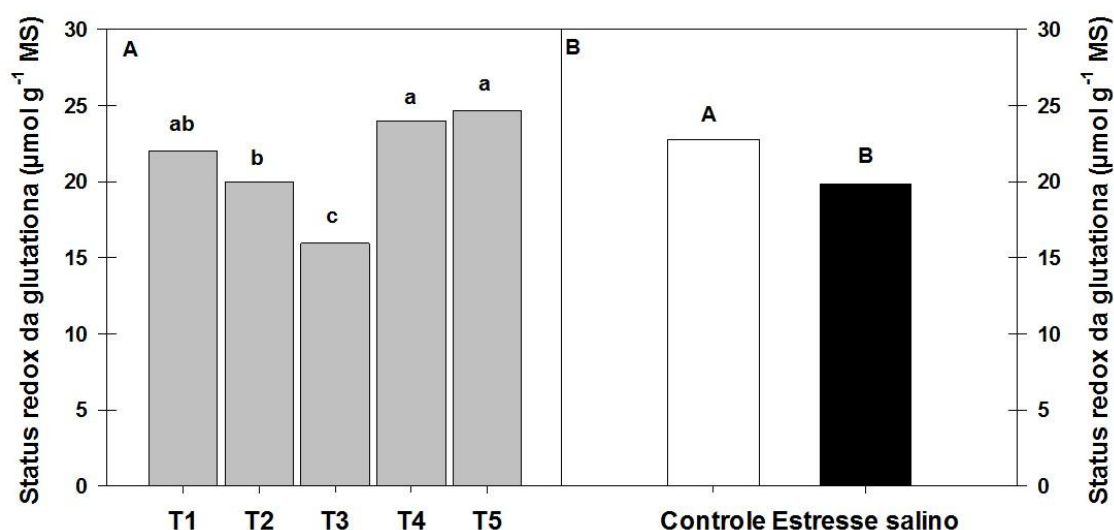


Figura 11. Status redox da glutationa total (*CV = 8,23) em nódulos de plantas de feijão-caupi cv. "IPA 206" inoculado com *Bradyrhizobium* sp. (T1) e coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (T2), *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (T3), *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (T4) e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (T5) (A) em condições controle e estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl) (B). Médias seguidas de mesma letra maiúscula (condições de cultivo) e minúscula (combinações de bactérias) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *coeficiente de variação

A glutathiona reduzida está relacionada à regulação da absorção de enxofre no tecido radicular, bem como atua como antioxidante, no tamponamento redox e na expressão de genes de defesa (SILVEIRA et al., 2010). As pesquisas mostram que a capacidade de manter uma alta proporção de glutathiona e ascorbato reduzidos seja importante para a defesa oxidativa das plantas (SEMPREBOM, 2008).

O estresse salino diminuiu a proporção de glutathiona reduzida, devido a maior oxidação sofrida por este composto, aumentando o estresse oxidativo nos nódulos de feijão-caupi quando cultivados na presença de 50 mmol L⁻¹ de NaCl.

5.4 Conclusões

As plantas coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* e com *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. apresentaram maior ajuste osmótico quando submetidas ao estresse salino.

A salinidade aumentou o teor de peróxido de hidrogênio e a peroxidação de lipídeos, bem como a atividade da superóxido dismutase, assim como reduziu a

proporção de glutathione reduzida nos nódulos de feijão-caupi, indicando que houve estresse oxidativo sob estresse salino.

As plantas coinoculadas com o *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* apresentaram maior tolerância ao estresse oxidativo, induzido pelo estresse salino.

As plantas submetidas ao estresse salino aumentaram a atividade das enzimas antioxidantes.

As diferentes combinações bacterianas estudadas utilizaram com maior eficiência as diferentes enzimas para remoção de espécies reativas de oxigênio e proteção oxidativa nos nódulos de feijão-caupi.

As coinoculações com *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* e com *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. são promissoras na proteção ao dano oxidativo quando inoculadas em plantas de feijão-caupi cv “IPA 206”, sendo importante investigar outros mecanismos de defesa e da resposta antioxidativa.

Referências

- AMAKO, K.; CHEN, G. X.; ASADA, K. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 35, p. 497-504, 1994.
- ANDRADE, E. M. A irrigação e suas implicações sobre o capital natural em regiões áridas e semiáridas: uma revisão. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 56, n. 4, p. 390-398, 2009.
- ALVES, M. R. G.; PEREIRA, J. W. D. L.; LUZ, L. N.; LIMA, L. M.; SANTOS, R. C. Genotypic variability of peanut lines in response to water stress, based on biochemical descriptors. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 29, n. 3, p. 528-536, 2016.
- BATISTA, R. D.; BATISTA, R. D.; SANTOS, G. R.; BONIFACIO, A.; RODRIGUES, A. C. Respostas antioxidativas em nódulos de caupi inoculado com *Bradyrhizobium*. **DESAFIOS**, Tocantins, v. 2, n. Especial, p. 76-88, 2015.
- BRENNAN, T.; FRENKEL, C. Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 59, p. 411-416, 1977.
- CARVALHO, F. E.; LOBO, A. K.; BONIFACIO, A.; MARTINS, M. O.; NETO, M. C. L.; SILVEIRA, J. A. Aclimação ao estresse salino em plantas de arroz induzida pelo pré-tratamento com H₂O₂. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 15, n. 4, p. 416- 423, 2011.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, Brasília, v. 4, n. 4, 2017.

CONKLIN, P. L.; BARTH, C. Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 27, p. 959-970. 2004.

DINAKAR, C.; DJILIANOV, D. BARTELS, D. Photosynthesis in desiccation tolerant plants: energy metabolism and antioxidative stress defense. **Plant Science**, Shannon, v. 182, p. 29-41, 2012.

DUTRA, A. T., SILVA, E. N., RODRIGUES, C. R., VIEIRA, S. A., ARAGÃO, R. M., SILVEIRA, J. A. Temperaturas elevadas afetam a distribuição de íons em plantas de feijão Caupi pré-tratadas com NaCl. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.15, n. 4, 403-409, 2011.

EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Embrapa Informação Tecnológica. 2ª edição revista e ampliada, Brasília, 2009, p. 217-218.

FIGUEIREDO, M. V. B., BONIFACIO, A. RODRIGUES, A. C., ARAIJO, F. F. Plant Growth-promoting Rhizobacteria: Key Mechanisms of action. In: CHOUDHARY, D. K.; VARMA, A. (Ed.). **Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants**. Springer, 2016. cap. 3, p. 23-37.

GIANNOPOLITIS, O.; RIES, S. K. Superoxide dismutase: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

GRIFFITH, O. W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 106, p. 207-212, 1980.

GUPTA, B.; HUANG, B. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. **International journal of genomics**, New York, v. 2014, 2014.

HAVIR, E.; MCHALE, N. Biochemical and development characterization of multiples forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 84, n. 2, p. 450-455, 1987.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 125, n. 1, p. 189-198, 1968.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method of growing plants without soil**. University of California, Berkeley, 1.ed, 1950. 32p.

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Embrapa-Serviço de Produção e Informação: Brasília, 1994. 35 p.

KAMPFENKEL, K.; MONTAGU, M. V.; INZÉ, R. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 225, p. 165-167, 1995.

KRUSE, N. D.; VIDAL, R. A.; TREZZI, M. M.; SIQUEIRA, I. R. Estresse oxidativo em girassol (*Helianthus annuus*) indica sinergismo para as misturas dos herbicidas metribuzin e clomazone. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 24, n. 2, p. 379-390, 2006.

LACERDA, C. F.; ASSIS JÚNIOR, J. O.; LEMOS FILHO, L. C. A.; GUIMARÃES, F. V. A.; OLIVEIRA, T. S.; GOMES FILHO, E.; PRISCO, J. T.; BEZERRA, M. A. Morpho-physiological responses of cowpea leaves to salt stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, p. 455-465, 2006.

LOCATO, V.; PINTO, M. C.; PARADISO, A., GARA, L. Reactive oxygen species and ascorbate glutathione interplay in signaling and stress responses. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2010. p. 45-64.

LIMA JUNIOR, J. A.; SILVA, A. L. P. Estudo do processo de salinização para indicar medidas de prevenção de solos salinos. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 6, n. 11; 2010.

MAIA, J. M., MACÊDO, C. E. C., SILVEIRA, J. A. G., SILVA, A. F., LIRA, E. H. A., MELO, A. S., MENESES, C. H. S. G. Seca e salinidade na resposta antioxidativa de raízes de feijão caupi. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, Campina Grande, v. 11, n. 1, p. 59-93 2015.

MÄSER, P.; GIERTH, M.; SCHROEDER, J. I. Molecular mechanisms of potassium and sodium uptake in plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 247, p. 43-54, 2002.

MAIA, J. M.; FERREIRA-SILVA, S. L.; VOIGT, E. L.; MACEDO, C. E. C.; PONTE, L. F. A.; SILVEIRA, J. A. G. Atividade de enzimas antioxidantes e inibição do crescimento radicular de feijão caupi sob diferentes níveis de salinidade. **Acta Botânica Brasílica**, Belo Horizonte, v. 26, n. 2, p. 342-349, 2012.

MAIA, J. M.; VOIGT, E. L.; MACÊDO, C. E.; FERREIRA-SILVA, S. L.; SILVEIRA, J. A. Salt-induced changes in antioxidative enzyme activities in root tissues do not account for the differential salt tolerance of two cowpea cultivars. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 22, n. 2, p. 113-122, 2010.

NONATO, J. J. **Nutrição, fisiologia e produtividade de soja inoculada com Azospirillum brasilense e reguladores vegetais**. Dissertação mestrado. Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal. Guarapuava, 2016, 77f.

OLIVEIRA, S. M. **Rizobactérias promovem o crescimento de feijoeiro-comum e de milho por diferentes processos**. 2011. 103p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

PASSARDI, F.; PENEL, C.; DUNAND, C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 9, p. 534-540, 2004.

PRISCO, J. T.; GOMES FILHO, E. Fisiologia e bioquímica do estresse salino em plantas. In: HANS, R. G.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados**. Fortaleza, INCT, 2010, p. 143-159.

RODRIGUES, A. C.; BONIFACIO, A.; ANTUNES, J. E. L.; SILVEIRA, J. A. G.; FIGUEIREDO, M. V. B. Minimization of oxidative stress in cowpea nodules by the interrelationship between *Bradyrhizobium* sp. and plant growth-promoting bacteria. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 64, p. 245-251, 2013.

SCHOSSLER, T. R.; MACHADO, D. M.; ZUFFO, A. M.; ANDRADE, F. R.; PIAULINO, A. C.; PIAUÍ, B. J. B. Salinidade: efeitos na fisiologia e na nutrição mineral de plantas. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 8, p. 1563-1578, 2012.

SEMPREBOM, T. R. **Glutamina e metabolismo antioxidante durante a organogênese adventícia em folhas de *Ananas comosus***. 2008. 76p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

SERKEDJIEVA, J. Antioxidant effects of plant polyphenols: a case study of a polyphenol-rich extract from *Geranium sanguineum* L. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2011. Chap.13, p. 275-293.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, 2012.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: **World congress on computers in agriculture**, Nevada, v. 7, 2009.

SILVEIRA, J. A. G.; FIGUEIREDO, M. V. B.; CAVALCANTI, F. R.; FERREIRA-SILVA, S. L. Legume nodule oxidative stress and N₂ fixation efficiency. In: ARAUJO, A. S. F.; FIGUEIREDO, M. V. B. **Microbial Ecology of Tropical Soils**. Nova Science Publishers Inc., New York, p. 49-78, 2011.

SILVEIRA, J. A. G.; SILVA, S. L. F.; SILVA, E. N. VIÉGAS, R. A. Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino em plantas. In: HANS, R. G.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados**. Fortaleza, INCT, 2010, p. 166-185.

SILVEIRA, J. A. G.; CONTADO, J.; RODRIGUES, J.; OLIVEIRA, J. Phosfoenolpyruvate carboxylase and glutamine synthetase activities in relation to nitrogen fixation in cowpea nodules. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 10, n. 1, p. 19-23, 1998.

SMIRNOFF, N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-facetted molecule. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, n. 3, p. 229-235, 2000.

WILLADINO, L.; CAMARA, T. R. Tolerância das plantas à salinidade: aspectos fisiológicos e bioquímicos. **Enciclopédia biosfera**, Goiânia, v. 6, n. 11, p. 1-23, 2010.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Análise de variância (ANOVA) das variáveis analisadas na parte aérea e nódulos do feijão-caupi cv “IPA 206” inoculado com *Bradyrhizobium* sp. (UFLA 03-84) e coinoculado com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp.; *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp.; *Bradyrhizobium* sp. e *Azospirillum amazonense*; *Bradyrhizobium* sp. e *Herbaspirillum seropedicae*; *Bradyrhizobium* sp. e *Burkholderia tropica*; *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp.; *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus cereus*; *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus pumilus*; *Bradyrhizobium* sp. e *Brevibacillus brevis*; *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus brasiliensis*; *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis*; e *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus durus*, cultivadas em condição controle e estresse salino (0 e 50 mmol L⁻¹ NaCl).

Variável analisada	Bactéria (B)	Salinidade (S)	B x S ¹	Tratamento	Contraste	CV
	Valores de F				Ta x Inoculada	
Altura da parte aérea	6,5 **	101,95 **	0,69 ns	6,70 **	10,83 **	15,77
Massa seca da parte aérea	11,94 **	120,16 **	3,36 **	11,42 **	23,27 **	22,7
Massa seca da raiz	7,11 **	6,74 *	0,97 ns	4,12 **	0,13 ns	21,01
Massa seca de nódulos	58,58 **	1340,74 **	30,99 **	86,58 **	38,22 **	7,84
Relação massa seca da parte aérea e massa seca da raiz	1,57 ns	64,69 **	2,57 **	4,56 **	24,03 **	21,45
Comprimento da raiz	1,89 *	0,06 ns	0,81 ns	1,30 ns	1,06 ns	19,02
Número de nódulos	2,26 **	5,62 *	0,54 ns	6,12 **	157,73 **	13,99
Tamanho de nódulos	3,26 **	48,65 **	1,70 ns	4,78 **	34,76 **	29,81
Nodulação específica	2,58 **	0,00 ns	0,95 ns	4,72**	103,95 **	17,24
Nitrogênio total	5,76 **	379,47 **	1,63 ns	22,37 **	189,43 **	8,10
Sódio	23,46 **	1134,78 **	23,97 **	59,56 **	71,52 **	25,11
Potássio	16,87 **	5,03 *	6,42 **	11,43 **	7,43 **	20,86
	Bactéria (B)	Salinidade (S)	B x S ¹	Tratamento		Total
Graus de liberdade	15	1	15	33	1	

P ≥ 0,05(ns); 0,01 ≤ P < 0,05(*); P < 0,01(**)

APÊNDICE B - Análise de variância (ANOVA) das variáveis analisadas nos nódulos de feijão-caupi inoculado com *Bradyrhizobium* sp. (UFLA 03-84) ou coinoculado com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (UFLA 03-84 e 183-EL); *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (UFLA 03-84 e MC 04.21); *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (UFLA 03-84 e IPACC11); e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (UFLA 03-84 e 212) em condições controle e estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl).

Variável analisada	Bactéria (B)	Salinidade (S)	B x S1	Tratamento	Contraste	CV
	Valor de F				Ta x Inoculada	(%)
Altura da parte aérea (APA)	3,13 **	4,05 **	69,64 **	19,41 **	19,28 **	19,36
Massa seca da parte aérea (MSPA)	1,97 ns	68,43 **	1,84 ns	15,36 **	69,91 **	18,17
Massa Fresca de nódulos (MFN)	1,61 ns	104,13 **	4,44**	14,26 **		13,95
Massa seca de nódulos (MSN)	1,28 ns	115,48 **	3,69 *	15,04 **		14,81
Número de nódulos (NN)	28,28 **	3,58 ns	1,11 ns	13,46 **		18,18
Nitrogênio total da parte aérea (NTPA)	5,36 **	11,90 **	5,08 **	29,81 **	244,40 **	9,79
Nitrogênio total de nódulos (NTN)	3,20 *	9,57 **	0,33 ns	2,63 **		10,42
Leghemoglobina	4,68 **	0,38 ns	1,26 ns	2,69 **		15,51
Amônia livre (NH ₄ ⁺)	2,60 ns	5,71 **	0,57 ns	2,05 **		14,57
Aminoácidos livre (AA)	2,60 ns	5,71 *	0,57 ns	2,05 *		14,57
Ureídeos	0,83 ns	22,10 **	1,59 ns	3,53 **		33,47
Prolina	3,20 *	30,59 **	0,85 ns	5,20 **		39,18
Proteína	12,72 **	55,52 **	6,45 **	4,69 **		7,90
Sacarose	4,03 *	34,85 **	6,84 **	8,70 **		18,52
Açúcares solúvel	4,55 **	41,94 **	3,26 **	8,13 **		14,62
Glutamina sintetase (GS)	6,14 **	109,04 **	71,74 **	46,72 **		14,48
Glutamato sintetase (GOGAT)	40,99 **	0,03 ns	1,45 ns	18,87 **		13,59
Glutamato desidrogenase aminante (GDH)	9,45 **	0,06 ns	1,65 ns	4,99 **		19,59
Atividade da invertase ácida	63,84 **	52,88 **	18,64 **	42,53 **		7,87
Atividade da invertase neutra	34,66 **	147,77 **	2,23 ns	32,82 **		4,52
	Bactéria (B)	Salinidade (S)	B x S	Tratamento		Total
Grau de liberdade	4	1	4	9		39

P ≥ 0,05(ns); 0,01 ≤ P < 0,05(*); P < 0,01(**)

APÊNDICE C - Análise de variância (ANOVA) das variáveis analisadas nos nódulos de feijão-caupi inoculado com *Bradyrhizobium* sp. (UFLA 03-84) ou coinoculado com *Bradyrhizobium* sp. e *Actinomadura* sp. (UFLA 03-84 e 183-EL); *Bradyrhizobium* sp. e *Paenibacillus graminis* (UFLA 03-84 e MC 04.21); *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. (UFLA 03-84 e IPACC11); e *Bradyrhizobium* sp. e *Streptomyces* sp. (UFLA 03-84 e 212) em condições controle e estresse salino (50 mmol L⁻¹ de NaCl).

Variável analisada	Valores de F			Tratamento	Contraste Ta x Inoculada	CV (%)
	Bactéria (B)	Salinidade (S)	B x S ¹			
Teor de Sódio [Na]	4,38 **	1569,41 **	3,55 *	177,90 **	956,68 **	15,368
Teor de Potássio [K]	9,76 **	5,41 *	4,27 **	6,84 **	665,74 **	14,42
Peroxidação de lipídeos	9,93 *	64,95 **	1,64 ns	12,36 **		10,53
Peróxido de hidrogênio	26,07 **	62,98 **	0,88 ns	18,98 **		4,24
Ascorbato total	20,99 **	169,04 **	14,56 **	34,58 **		4,91
Ascorbato reduzido	233,18 **	3,00 ns	49,93 **	126,16 **		5,87
Ascorbato oxidado	93,35 **	471,15 **	42,50 **	122,73 **		6,54
Status redox de Ascorbato	82,49 **	93,46 **	14,05 **	53,29 **		7,85
Glutationa total	3,56 *	0,03 ns	1,88 ns	2,42 *		6,00
Glutationa reduzida	37,83 **	45,13 **	3,57 *	23,41 **		6,20
Glutationa oxidada	7,51 **	0,88 ns	1,87 ns	4,27 **		6,87
Status redox da Glutationa	24,15 **	21,00 **	1,32 ns	13,65 **		8,23
Catalase	123,49 **	37,57 **	28,35 **	71,66 **		5,28
Peroxidase de fenóis	17,23 **	198,90 **	3,90 **	31,90 *		3,15
Superóxido dismutase	7,54 **	172,13 **	1,97 ns	23,35 **		8,68
	Bactéria (B)	Salinidade (S)	B x S ¹	Tratamento	Total	
Grau de liberdade	4	1	4	9	39	

P ≥ 0,05(ns); 0,01 ≤ P < 0,05(*); P < 0,01(**)

ANEXO

ANEXO A – Composição dos meios de cultura utilizados para multiplicação das bactérias utilizadas nos experimentos

Meio de cultivo	YM e YMA - Manitol, extrato de levedura e manitol, extrato de levedura ágar (Vincent, 1970)										
Bactéria	<i>Bradyrhizobium</i> sp.										
Composição por litro	KH ₂ PO ₄ [10%] 4 mL	K ₂ HPO ₄ [10%] 1 mL	MgSO ₄ .7H ₂ O (10%) 2 mL	NaCl [10%] 1 mL	Manitol 10 g	Vermelho Congo [0,25%] 10 mL	Azul de bromotimol [0,5%] 5 mL	Extrato de levedura 0,4 g	Ágar 18,0 g	pH final 6,5 a 6,8	
Meio de cultivo	AY e AYA - Arginina, levedura e ágar (Nonomura; Ohara, 1971)										
Bactérias	<i>Actinomadura</i> sp. e <i>Streptomyces</i> sp.										
Composição por litro	L-arginina 0,3 g	Glicose 1,0 g	Glicerol 1,0 g	K ₂ HPO ₄ 0,3 g	MgSO ₄ .7H ₂ O 0,2 g	NaCl 0,3 g	Extrato de levedura 1,0 g	Solução de sais 1,0 ml	Ágar 15,0 g	pH final 6,4	
Meio de cultivo	DYGS - Dextrose Levedura Glucose Sacarose (Rodrigues Neto, 1986)										
Bactérias	<i>Azospirillum amazonense</i> , <i>Herbaspirillum seropedicae</i> , <i>Burkholderia tropica</i> e <i>Bacillus</i> sp.										
Composição por litro	Glicose 2,0 g	Ácido D-Málico 2,0 g	Peptona bacteriológica 1,5 g	Extrato de levedura 2,0 g		K ₂ HPO ₄ 0,5 g	MgSO ₄ .7H ₂ O 0,5 g	Ácido glutâmico 1,5 g	Ágar 18,0 g	pH final 6,0 e 6,8	
Meio de cultivo	TSB - Caldo tripton de soja										
Bactérias	<i>Bacillus</i> sp., <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Brevibacillus brevis</i> , <i>Paenibacillus brasiliensis</i> , <i>Paenibacillus durus</i> , <i>Paenibacillus polymyxa</i>										
Composição por litro	Peptona de caseína 17,0 g		Peptona de soja 3,0 g		Glicose 2,5 g	NaCl 5,0 g	K ₂ HPO ₄ 2,5 g	pH final 7,3			
Meio de cultivo	TSA - Ágar tripton de soja										
Bactérias	<i>Bacillus</i> sp., <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Brevibacillus brevis</i> , <i>Paenibacillus brasiliensis</i> , <i>Paenibacillus durus</i> e <i>Paenibacillus polymyxa</i>										
Composição por litro	Tripton de soja 15,0 g		Digestão papaica de soja 5,0 g		NaCl 5,0 g		Ágar 15,0 g		pH final 7,3		