



Universidade Federal Rural De Pernambuco - UFRPE

Unidade Acadêmica De Serra Talhada - UAST

Bacharelado em Agronomia

Mayara Bernardo Tavares

**Produtividade, estresse e proteção oxidativa em feijão-caupi
inoculado com estirpes de Alfa e Beta-Rizóbios**

Serra Talhada – PE

2022

Mayara Bernardo Tavares

**Produtividade, estresse e proteção oxidativa em feijão-caupi
inoculado com estirpes de Alfa e Beta-Rizóbios**

Trabalho de Conclusão de
Curso apresentado a Universidade
Federal Rural de Pernambuco,
Unidade Acadêmica de Serra
Talhada, como requisito básico para
a conclusão do Curso de Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Adriano do Nascimento Simões

Serra Talhada – PE

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M378p Martim, Mayara Bernardo Tavares Martim
 Produtividade, estresse e proteção oxidativa em feijão-caupi inoculado com estirpes de Alfa e Beta-Rizóbios / Mayara Bernardo Tavares Martim Martim. - 2022.
 54 f.
- Orientador: Adriano do Nascimento Simoes.
 Coorientadora: Carolina Etienne de Rosalia e Santos .
 Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Agronomia, Serra Talhada, 2022.
1. Feijão-caupi. 2. estresse oxidativo. 3. rizóbio. 4. TBARS, H2O2, ASA. 5. produtividade. I. Simoes, Adriano do Nascimento, orient. II. , Carolina Etienne de Rosalia e Santos, coorient. III. Título

**Produtividade, estresse e proteção oxidativa em feijão-caupi
inoculado com estirpes de Alfa e Beta-Rizóbios**

Trabalho de Conclusão de
Curso apresentado a Universidade
Federal Rural de Pernambuco,
Unidade Acadêmica de Serra
Talhada, como requisito básico para
a conclusão do Curso de Agronomia.

Aprovada em 27 de Maio de 2022.

Banca Examinadora

Dr. Adriano do Nascimento Simões
(Orientador, UAST/UFRPE)

Dr^a. Carolina Etienne de Rosália e Santos Silva
(Examinador externo, UFRPE/Sede)

Dr. Fred Augusto Lourêdo de Brito
(Examinador interno, UAST/UFRPE)

Serra Talhada – PE

2022

DEDICATÓRIA

Dedico, ao senhor meu Deus, por sempre ter sido meu refugio nos momentos que eu mais precise, e aos meus pais e meu esposo por me apoiarem.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda a sabedoria, pela força para continuar lutando em busca dos meus objetivos e não ter me deixado desistir.

A minha mãe Lucila Bernardo pelo amor e apoio e por ser meu porto seguro durante todo esse tempo.

Ao meu esposo José Martim, que foi o meu maior incentivador para que eu continuasse estudando e pela compressão durante todo esse período.

Ao meu filho Josué, que surgiu na minha vida no final desse ciclo acadêmico, mas que já faz parte dessa jornada.

Ao meu pai Edvaldo Tavares e aos meus familiares, pelo o apoio durante essa jornada.

Ao meu orientador, Adriano do Nascimento Simões, por todo ensinamento e conhecimento destinados, pela assistência e orientação durante a fase final de graduação.

Ao meu amigo Nilo Ricardo, pela a parceria e por esta comigo durante todo o período de graduação.

A amiga que ganhei no final da graduação, Lady Daiane, por ter me ajudado em todas as etapas do projeto de conclusão de curso.

Aos meus amigos(as) Rhaiana Aviz, Jheizon Nascimento, Thamila Menezes e Gabriel Italo por terem me ajudado nos experimentos do trabalho de monografia e Priscila Cavalcante, Alessandro Higor, Angela Lucena, Natalia Alves e Jessica Patrícia pela parceria da jornada acadêmica.

Ao Núcleo de Estudos de Fisiologia e Pós-colheita (NEFP) do qual fiz parte e por disponibilizar sua estrutura para realização das análises, e pelo o apoio de todos os integrantes.

Ao Grupo de Fixação Biológica do Nitrogênio (GFBN) pela disponibilização de todo o material biológico.

A banca examinadora pela disponibilização para avaliação do meu trabalho de monografia.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	6
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS.....	10
RESUMO.....	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Importância do Feijão-caupi	16
2.2 Fixação biológica de nitrogênio e a inoculação com estirpes	17
2.3 Estresse oxidativo em plantas	18
2.4 Sistema de defesa antioxidante (enzimático e não-enzimático).....	18
2.5 Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal	19
3 OBJETIVO GERAL.....	21
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Obtenção do material vegetal.....	22
4.2 Tratamentos impostos ao feijão-caupi	23
4.3 Tratos culturais.....	24
4.4 Avaliações.....	25
4.4.1 Medidas do estresse oxidativo	25
4.4.2 Medição do sistema antioxidante enzimático	26
4.4.3 Medidas do sistema antioxidante não-enzimático	27
4.4.4 Produtividade	28
4.5 Delineamento experimental	28
5 RESULTADOS	29
5.1 Modulação do dano oxidativo em plantas de feijão-caupi submetidas a inoculação de rizobactérias nativas do semiárido.....	29
5.2 Atividades enzimáticas e não enzimáticas de defesa antioxidante	30
5.3 Produtividade em plantas de feijão-caupi inoculadas com rizobactérias nativas do semiárido.	34
6 DISCUSSÃO.....	35

7	CONCLUSÃO	39
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Condições climáticas em Serra Talhada durante a condução do experimento.	22
Figura 2. Peroxidação lipídica (TBARS) em planta de feijão-caupi (IPA 206), submetidas a cinco tratamentos com inoculação e sem inoculação com rizóbios (Beta- rizóbio (C60-2), Alfa-rizóbio (C78-2), BR 3267, Nitrogênio e Controle (sem nitrogênio e sem inoculante) coletadas aos 57 dias após a semeadura (A) e 68 dias após a semeadura (B). Letras diferentes significam diferenças estatísticas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.....	29
Figura 3. Conteúdo de Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) em planta de feijão-caupi (IPA 206), submetidas a cinco tratamentos com inoculação e sem inoculação com rizóbios (Beta-rizóbio (C60-2), Alfa-rizóbio (C78-2), BR 3267, Nitrogênio e Controle (sem nitrogênio e sem inoculante) coletadas aos 57 dias após a semeadura (A) e 68 dias após a semeadura (B). Letras diferentes significam diferenças estatísticas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey	30
Figura 4. Atividade enzimática Superóxido dismutase (SOD) em planta de feijão-caupi (IPA 206), submetidas a cinco tratamentos com inoculação e sem inoculação com rizóbios (Beta-rizóbio (C60-2), Alfa-rizóbio (C78-2), BR 3267, Nitrogênio e Controle (sem nitrogênio e sem inoculante) coletadas aos 57 dias após a semeadura (A) e 68 dias após a semeadura (B). Letras diferentes significam diferenças estatísticas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey	31
Figura 5. Atividade enzimática antioxidante peroxidase (POD) em planta de feijão- caupi (IPA 206), submetidas a cinco tratamentos com inoculação e sem inoculação com rizóbios (Beta-rizóbio (C60-2), Alfa-rizóbio(C78-2), BR 3267, Nitrogênio e Controle (sem nitrogênio e sem inoculante).....	31
Figura 6. Conteúdo de Ascorbato reduzido (ASA) em planta de feijão-caupi (IPA 206), submetidas a cinco tratamentos com inoculação e sem inoculação com rizóbios (Beta- rizóbio (C60-2), Alfa-rizóbio(C78-2), BR 3267, Nitrogênio e Controle (sem nitrogênio e sem inoculante) coletadas aos 57 dias após a semeadura (A) e 68 dias após a semeadura (B). Letras diferentes significam diferenças estatísticas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey	32

Figura 7. Proteínas solúveis totais em planta de feijão-caupi (IPA 206), submetidas a cinco tratamentos com inoculação e sem inoculação com rizóbios (Beta-rizóbio (C60-2), Alfa-rizóbio(C78-2), BR 3267, Nitrogênio e Controle (sem nitrogênio e sem inoculante) coletadas aos 57 dias após a semeadura (A) e 68 dias após a semeadura (B). Letras diferentes significam diferenças estatísticas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.....	33
Figura 8. Compostos fenólicos em planta de feijão-caupi (IPA 206), submetidas a cinco tratamentos com inoculação e sem inoculação com rizóbios (Beta-rizóbio (C60-2), Alfa-rizóbio(C78-2), BR 3267, Nitrogênio e Controle (sem nitrogênio e sem inoculante) coletadas aos 57 dias após a semeadura (A) e 68 dias após a semeadura (B). Letras diferentes significam diferenças estatísticas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.....	33
Figura 9. Produtividade da planta de feijão-caupi (IPA 206), submetidas a cinco tratamentos com inoculação e sem inoculação com rizóbios (Beta-rizóbio (C60-2), Alfa-rizóbio(C78-2), BR 3267, Nitrogênio e Controle (sem nitrogênio e sem inoculante) coletadas aos 57 dias após a semeadura (A) e 68 dias após a semeadura (B). Letras diferentes significam diferenças estatísticas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atributos químicos do solo da área experimental da UAST-UFRPE	23
Tabela 2. Dados de pH e condutividade elétrica da água de irrigação utilizada durante o experimento. (Análises a cada 15 dias).	23

Mayara Bernardo Tavares, Bacharelado em Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco/Unidade Acadêmica de Serra Talhada, maio de 2022. **Estresse e proteção oxidativa em feijão-caupi inoculado com estirpes de Alfa e Beta-Rizóbios.** Orientador: Adriano do Nascimento Simões.

RESUMO

Em busca de novas tecnologias para aumentar a produtividade do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) e diminuir uso de fertilizantes químicos, tem-se buscado alternativas como o uso de inoculantes contendo bactérias fixadoras de nitrogênio, ou diazotróficas. A utilização dessas bactérias proporcionam um melhor desenvolvimento da cultura. Na região semiárida, as condições edafoclimáticas locais, como baixa precipitação pluviométrica e altas temperaturas, podem proporcionar diversos estresses ambientais às plantas, o que pode causar um excessivo estresse oxidativo na célula da planta que devido a sua toxidez ocasiona a morte da mesma. Em resposta a esse tipo de estresse, a planta produz mecanismos de defesa antioxidante, para tentar equilibrar o estresse oxidativo. O presente trabalho propõe o uso de inoculantes com bactérias diazotróficas nativas do Semiárido, adaptadas às condições locais. Diante disto, objetivou-se avaliar a produtividade e os efeitos sobre o estresse oxidativo e o sistema de defesa antioxidante enzimático e não-enzimático em feijão-caupi inoculado com estirpes de bactérias diazotróficas, classificadas com Alfa e Beta-rizóbios. O experimento foi desenvolvido em condições de campo na Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UFRPE/UAST), Serra Talhada – PE. Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados com quatro repetições onde o feijão-caupi (IPA206) foi submetido aos tratamentos com estirpe de alfa C78-2 (*Bradyrhizobium japonicum*) e uma estirpe de beta C60-2 (*Paraburkholderia sabiae*) nativas do semiárido. Os tratamentos de controle foram a estirpe recomendada para a cultura do feijão-caupi (BR 3267), fertilizante nitrogenado na dose (Uréia, 80 kg. ha⁻¹) eo tratamento sem inoculante e sem fertilizante nitrogenado (controle). A inoculação foi feita nas sementes, com inoculante turfoso. A semeadura foi feita com três sementes por cova, posteriormente foi feito o desbaste após cinco dias da germinação. A aplicação de ureia foi parcelada, sendo duas aplicações uma no ato da semeadura e outra após 20 dias do plantio com 5,6 g/m em cada aplicação. As plantas foram irrigadas três vezes por

semana por meio do sistema de gotejamento, e colhidas em dois períodos diferentes: aos 57 dias após o plantio e aos 68 dias após o plantio. Ao final do experimento em campo foram feitas as avaliações em laboratório de produtividade (kg. ha^{-1}); conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2); peroxidação lipídica (TBARS); de atividades enzimáticas de superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (POD); e atividades não-enzimáticas ácido ascórbico reduzido (ASA), compostos fenólicos e de proteínas totais. Os resultados indicaram que todos tratamentos se mostraram promissoras na redução do estresse oxidativo na colheita de 57 dias após o plantio. Para o período de senescência da planta o tratamento controle apresentou valores elevados, devido a fase da perda das características fisiológicas da planta. Todas as estirpes apresentaram resultados satisfatório com relação ao sistema de defesa para planta do feijão-caupi, com destaque para a estirpe comercial BR 3267 que apresentou os melhores resultados para as análises do sistema de defesa antioxidante. A produtividade mostrou valor superior para a estirpe de Alfa rizóbio C78-2, com relação aos demais tratamentos que mesmo tendo valores abaixo obtiveram uma produtividade satisfatória.

Palavras chaves: Feijão-caupi, estresse oxidativo, rizóbio, TBARS, H_2O_2 , ASA, compostos fenólicos, proteína, produtividade

1 INTRODUÇÃO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma leguminosa bastante cultivada no Brasil, sendo um componente de grande importância socioeconômica para a região Nordeste, por concentrar sua maior produção. Essa região enfrenta a falta de recursos hídricos devido as chuvas irregulares, entretanto o feijão-caupi apresenta uma boa adaptação a essas condições, sendo viável o cultivo pela agricultura familiar (ALMEIDA et al., 2010; BEZERRA et al., 2010). O feijão-caupi é bastante explorado em diversas regiões do Brasil, devido ser uma cultura de boa adaptação em vários estados brasileiros. Na safra de 2019/2020 o estado do Mato Grosso foi o que mais produziu, registrando 150,6 mil t ha⁻¹, seguido de outros estados produtores como Ceará (144,9 mil t ha⁻¹), Bahia (109,6 mil t ha⁻¹) e Piauí (85,7 mil t ha⁻¹), totalizando quase 70% da produção nacional (ARAÚJO et al., 2019; DANTAS et al., 2019; SILVA et al., 2019). No semiárido, a produção de feijão-caupi ainda é baixa (470 kg ha⁻¹) quando comparada com outras regiões do Brasil (BARROS et al., 2013; COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO-CONAB, 2021), esse índice está relacionado a implementação de novas tecnologias e aos fatores ambientais como déficit hídrico, baixa fertilidade e salinidade do solo (SOUZA et al., 2021).

A demanda por aumentar a produtividade levou ao uso intensivo de fertilizantes químicos, elevando o custo da produção. Novas tecnologias estão sendo desenvolvidas para aumentar a produtividade do feijão-caupi a custos relativamente baixos quando comparados ao uso de fertilizantes químicos. Dentre essas tecnologias, pode-se destacar o uso de bactérias que promovem a fixação biológica de nitrogênio (FBN), que se apresenta como uma tecnologia viável economicamente e ecologicamente (MOREIRA, 2010). A fixação biológica de nitrogênio fornece o nitrogênio de forma viável para a planta, através da associação de bactérias por meio da simbiose leguminosa-rizóbio que promove o crescimento da planta, isso ocorre devido ao processo de nodulação onde a planta e o rizóbio se beneficiam mutuamente (TAIZ e ZEIGER, 2013; SOUZA et al., 2021).

As plantas podem sofrer diversos estresses ambientais, esses estresses podem causar o aumento excessivo do estresse oxidativo nas células da planta que devido a sua toxidez ocasiona a morte da mesma (CAVERZAN et al., 2019). O excesso de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) é prejudicial aos lipídios, ácidos nucléicos e proteínas.

Isso ocorre devido ao aumento da produção do oxigênio singlete, radical aniônico superóxido, radical hidroxila e de peróxido de hidrogênio (MILLER et al., 2010). No entanto a planta apresenta mecanismos de defesa antioxidante como resposta o equilíbrio do estresse oxidativo. Essa defesa antioxidante é composta pelos sistemas enzimático e não-enzimático. O sistema enzimático age com a ação simultânea das enzimas para remoção das ERO's de superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e peroxidase (POD). O sistema não-enzimático é formado principalmente por fenóis, ácido ascórbico, clorofilas, carotenóides, proteínas e aminoácidos (LANGARO et al., 2016; MENEGAZZO et al., 2021).

As bactérias que disponibilizam o nitrogênio para as leguminosas são as bactérias chamadas genericamente de rizóbios, as quais pode pertencer as classes Alfa e Beta Proteobacteria, as quais proporcionam à planta o nitrogênio proveniente da atmosfera, o N₂, além da produção de fitohormônios, devido a produção da enzima ACC-deaminase, e da produção de metabólitos voláteis (VCC), dando resistência a planta para tolerar o estresse abiótico, de forma que esse estresse seja equilibrado por meio das enzimas antioxidantes (BHAT et al., 2019; VARMA et al., 2019). Santos et al.(2018) relataram um aumento na atividade enzimáticas em plantas de feijão-caupi coinoculadas com *Bradyrhizobium* e Rizobactérias promotoras de crescimento submetidas a estresse salino, ocorrendo assim a diminuição dos níveis de H₂O₂ e de peroxidação lipídica.

A inoculação com estirpes rizobianas proporcionam um melhordesenvolvimento para o feijão-caupi (GUALTER et al., 2007; ZILLI et al., 2009, SOUZA et al., 2021). Nesse sentido, se faz necessário estudar o mecanismo de ação que essa biotecnologia proporciona no desenvolvimento do feijão-caupi, utilizando tanto estirpes de Alfa quanto de Beta-rizóbio. Assim, é importante averiguar as medições de dano e proteção oxidativos e da produtividade utilizando essas estirpes.

Maior parte dos estudos encontrados na literatura analisa o desenvolvimento das plantas leguminosas utilizando a inoculação com rizóbios comerciais, como a *Bradyrhizobium* BR 3267, para fixação biológica de nitrogênio em feijão-caupi (BASTOS et al., 2012; RAMOS et al., 2020). Outros trabalhos levam em consideração a sequência do gene 16S rRNA, para a classificação das estirpes do grupo Alfa e Beta-rizóbios, essa classificação pode ser feita a partir de isolamentos bacterianos ou até mesmo de amostra de solo nas diferentes classes de solos e biomas do Brasil

(BARAÚNA, 2017; SILVA, 2019). Diferente da maior parte dos estudos encontrados na literatura este trabalho propõe o uso de rizóbios nativos do semiárido, comparados com o uso de inoculante rizobiano comerciais, amplamente estudadas.

Deste modo, objetiva-se avaliar a produtividade e analisar a capacidade protetiva das estirpes de bactérias de alfa e beta-rizóbio, nativas do solo do semiárido, nos danos oxidativos em plantas de feijão-caupi, (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), cultivadas nas condições edafoclimáticas do semiárido.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância do Feijão-caupi

O Feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L Walp.), a princípio foi classificado nos gêneros *Phaseolus* e *Dolichos*, até ser classificado no gênero *Vigna*, por Savi em 1894 (Phillips, 1951, citado por SELLSCHOP, 1962). É uma espécie de origem africana, bastante cultivada e é um dos principais alimentos do oeste da África, sendo que a introdução no Brasil foi feita pelos colonizadores portugueses, no século XVI (ROCHA *et al.*, 2016; FREIRE FILHO, 1988). Esse feijão entrou no Brasil através do estado da Bahia, o qual foi o primeiro estado a cultivar o feijão-caupi, e a partir da Bahia se espalhou por todo o Brasil, principalmente pelas regiões Nordeste e Norte (ROCHA *et al.*, 2016; FREIRE FILHO, 2011).

O feijão-caupi é uma cultura de grande importância alimentar, sendo uma proteína fundamental na dieta das populações mais pobres da África e da América Latina (GONÇALVES e LIMA, 2021). Essa espécie é de grande influência socioeconômica no Brasil, sendo encontrada em todas as regiões. Na região Nordeste essa cultura é bastante explorada por pequenos agricultores de baixa renda, pois se adequa as condições edafoclimáticas do semiárido com relação às outras espécies de leguminosas da família Fabaceae. Entretanto apesar da sua adaptação no Nordeste a produtividade ainda é baixa devido à falta de tecnologias adequadas e assistência técnica aos agricultores. Já a produtividade média da região Centro-Oeste é maior, devido ao uso de uma agricultura mais tecnificada, onde o feijão-caupi, segue a cultura da soja, além de utilizar um material genético mais adequado (SILVA, *et al.*, 2018; GONÇALVES e LIMA, 2021). Os baixos índices de produtividade na região Nordeste estão associados também aos solos com baixa fertilidade e elevados níveis de sais, bem como períodos com baixa disponibilidade hídrica. Porém, com avanços científicos e tecnologias disponíveis, esse cenário tem mudado. Comumente para obtenção da elevada produtividade, faz-se aplicação de fertilizantes minerais prontamente solúveis. Por outro lado, o uso da fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), com a tilozação de estirpes de rizóbios eferentes, tem isentado o uso de fertilizantes minerais, que eleva os custos da produção, dessa forma a FBN eleva a produtividade com baixo custo,

ampliando a renda do agricultor (OLIVEIRA, 2016; ARAÚJO, 2019; SOUZA et al., 2021).

2.2 Fixação biológica de nitrogênio e a inoculação com estirpes

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é uma tecnologia que busca melhorar a produtividade de cultura com baixo custo e aumentar a renda de produtores rurais (ZILLI et al., 2009; SOUZA et al., 2021). O nitrogênio é um macronutriente que pode ser encontrado em muitos compostos orgânicos como os aminoácidos, as proteínas e os ácidos nucleicos. Portanto, as plantas necessitam de uma grande quantidade desse nutriente (EPSTEIN e BLOOM, 2006; TAIZ e ZEIGER, 2013; SOUZA et al., 2021).

O nitrogênio atmosférico (N_2) pode ser reduzido por bactérias fixadoras de nitrogênio e convertido em amônio (NH_4^+), forma disponível para as plantas. Para isso é necessário que ocorra a infecção radicular e formação dos nódulos nas plantas, pois essas bactérias habitam dentro dos nódulos, esse processo é feito através de sinais moleculares entre as bactérias e as plantas, podendo formar associações, onde as plantas fornecem carboidratos provenientes da fotossíntese para as bactérias e fornecem o nitrogênio para as plantas (SILVA et al., 2006, SOUZA et al., 2021).

As bactérias fixadoras de nitrogênio também são chamadas de diazotróficas e podem ser de vida livre, associativa e simbiótica, podendo estimular o crescimento das plantas (MOREIRA et al., 2010). Essas bactérias são chamadas genericamente de rizóbios (BHATTACHARYA e JHA, 2012). Possuem alguns gêneros de taxonomia polifásica: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, entre outros (MOREIRA, 2008).

A maioria das bactérias diazotróficas de interesse agrícola fazem parte do grupo proteobactérias, as bactérias desse grupo são todas gram-negativas. Sua divisão é feita com base no gene 16S do rRNA, sendo dividida em seis classes de Alpha, Beta, Gamma, Delta, Epsilon e Zetaproteobacteria (MADIGAN et al., 2016). A classe Alphaproteobacteria é a segunda maior classe com cerca de quase mil espécies, suas espécies estão dentro das ordens *Rhizobiales*, *Rickettsiales*, *Rhodobacterales*, *Rhodospirillales*, *Caulobacterales* e *Sphingomonadales*. A terceira maior classe é a Betaproteobacteria com 500 espécies e possuem seis ordens como *Burkholderiales*,

Hydrogenophilales, Methylophilales, Neisseriales, Nitrosomonadales e Rhodocyclales (MADIGAN et al., 2016).

2.3 Estresse oxidativo em plantas

O estresse oxidativo (EROS) em condições ambientais adequadas, pode favorecer o metabolismo da planta, mas em condições desfavoráveis a desenvolvimento da planta, pode causar dano e até a morte da célula. Esse estresse ocasionado em grandes quantidades e por longo período, pode se tornar tóxico, culminando em efeitos deletérios, por meio da oxidação de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (FIORI, 2011; SHINOZAKI et al., 2015). As condições ambientais que causam as EROS estão relacionadas com a seca, temperatura (estresse ao frio e ao calor), a poluição do ar, aplicação de herbicidas, infecção por patógenos e senescência da planta (SHINOZAKI et al., 2015). O estresse oxidativo está ligado a redução parcial do oxigênio em metabolismo aeróbico e fotossintético (MAIA et al., 2012; SHINOZAKI et al., 2015; OLIVEIRA, 2016). O aumento causado pelo estresse ambiental ou atividades metabólicas pode tornar o oxigênio muito danoso (POLIDOEROS et al., 2005; PHANIENDRA et al., 2015), o resultado desse aumento de energia extra ocasiona o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). A redução de O_2 ocorre na mitocôndria, e com o recebimento de quatro elétrons o estresse oxidativo é neutralizado, durante todo esse procedimento são gerados os compostos reativos, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido (O^-), hidroxila (HO^-) e hidroperoxila (HO^-) (MITTLER, 2002; AZEVEDO NETO et al., 2008; DEMIDCHIK, 2015). A planta através do sistema antioxidante de defesa (enzimático e não-enzimático) limpa e elimina o excesso de EROS presente nas unidades subcelulares (SHINOZAKI et al., 2015; OLIVEIRA, 2016).

2.4 Sistema de defesa antioxidante (enzimático e não-enzimático)

As plantas sofrem estresse biótico e abiótico, formando as EROS que ficam acumuladas nas células, podendo ocasionar a morte da planta (PANDHAIR e SEKHON, 2006; TAIZ et al., 2017). O sistema de defesa reage para equilibrar a

produção e eliminar o excesso de EROS (OLIVEIRA, 2016). O sistema antioxidante é composto pelos sistemas enzimático e não-enzimático (BARREIROS et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2007, OLIVEIRA, 2016). O sistema enzimático é formado pelas enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, peroxidase e glutathione reductase (ASADA, 1999; MITTLER, 2002; MITTLER et al., 2004; OLIVEIRA, 2016). A enzima superóxido dismutase (SOD), na reação redox de superóxido (O_2^-), reduz para peróxido de hidrogênio (H_2O_2), posteriormente o peróxido de hidrogênio é desintoxicado a água (H_2O) pelas enzimas de ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX) (GRATÃO et al., 2005; MONTEIRO, 2010). O sistema antioxidante não-enzimático é de origem dietética e é composto por vitaminas, minerais e compostos fenólicos. O sistema não-enzimático é formado por compostos fenólicos, ácido ascórbico, clorofilas, carotenóides, proteínas e aminoácidos (LANGARO et al., 2016; MENEGAZZO, 2021). Os carotenóides atuam como pigmentos auxiliares, que são responsáveis pela fotoproteção das membranas fotossintéticas (LANGARO et al., 2016), dissipam o estado excitado da clorofila e neutraliza as EROS, visto que são antioxidantes com baixo peso molecular (KRESLAVSKI et al., 2013; MENEGAZZO, 2021). O ácido ascórbico (vitamina C) e a vitamina E interagem para inibir a peroxidação lipídica e para proteger a planta contra os estresses oxidativos ao DNA (BIANCHI, 1999).

2.5 Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal

O aumento da demanda de produção de alimento fez com que o homem buscasse novas tecnologias para aumentar a produtividade. Essa demanda fez com que os agricultores passassem a utilizar fertilizantes e defensivos agrícolas, os chamados agrotóxicos, o que causou diversos impactos ambientais, sendo uma prática considerada insustentável aos agricultores de baixa renda devido ao alto custo (CARVALHO e CHAGAS, 2019; RAI et al., 2020). Em busca de tecnologias alternativas para garantir um equilíbrio sustentável a longo prazo, buscou-se práticas como a rotação de cultura, uso de cobertura morta, entre outras práticas, com o objetivo de diminuir os impactos causados por agrotóxicos, no entanto, essas alternativas não foram suficientes, sendo necessário alternativas complementares com o uso de microrganismos, de preferência as rizobactérias promotoras de crescimento vegetal e as bactérias diazotróficas

(ABHILASH et al., 2016; SINGH et al., 2017; LOPES et al. 2018). Algumas bactérias diazotróficas, além de fixar N_2 , pode também promover o crescimento vegetal. As rizobactérias de maior destaque são dos gêneros *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Serratia*. A ação desses microrganismos pode ser de forma direta (biofertilizantes e bioestimulantes) e de forma indireta (biocontrole) (LOPES et al., 2021; Rezende et al., 2021). As plantas interagem com os microrganismos do solo, proporcionando benefícios desde a germinação até a fase final do desenvolvimento da planta, devido ao uso dessa biotecnologia (POSADA et al., 2021). As rizobactérias, que são bactérias do solo, localizadas na rizosfera das plantas, promovem o aumento da concentração da auxina, giberelina, citocinina, 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase, enzima que age na redução do etileno, além de produzir os metabólitos voláteis (VCC), tornando a planta resistente as doenças e tolerante ao estresse abiótico. As rizobactérias também agem na diminuição do estresse aumentando a produção de exopolissacarídeos, osmorregulantes e antioxidantes, otimizando o desenvolvimento da planta com o uso da biotecnologia (BHAT et al., 2019; VARMA et al., 2019).

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produtividade e os efeitos sobre o estresse oxidativo e o sistema de defesa antioxidante enzimático e não-enzimático em feijão-caupi, (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) inoculado com estirpes de rizóbios dos grupos Alfa e Beta-rizóbios.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar as atividades enzimáticas em feijão-caupi, das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD).
- Quantificar as atividades não-enzimáticas de vitamina C, compostos fenólicos e proteínas totais.
- Quantificar o conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e peroxidação lipídica (TBARS).
- Quantificar a eficiência dos rizóbios quanto à produtividade (kg. ha⁻¹).

Os atributos químicos do solo utilizado encontram-se na (Tabela 01). As análises foram realizadas no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA).

Tabela 1. Atributos químicos do solo da área experimental da UAST-UFRPE.

pH H ₂ O	P mg.dm ⁻³	Cacmolc.dm ⁻³	Mg	Na	K	Al	H	S	CTC	V%.....	M
6,80	424	4,50	0,80	0,07	0,33	0,00	1,15	5,7	6,9	83	0

pH: potencial hidrogeniônico; **P:** fósforo; **Ca:** cálcio; **Mg:** magnésio; **Na:** sódio; **K:** potássio; **Al:** alumínio; **H:** hidrogênio; **S:** enxofre; **CTC:** capacidade de troca de cátions; **V:** saturação por bases; **m:** saturação por alumínio. **Fonte:** IPA, 2021

O pH e condutividade elétrica da água de irrigação, eram avaliados a cada 15 dias, durante o período de condução do experimento.

Tabela 2. Dados de pH e condutividade elétrica da água de irrigação utilizada durante o experimento. (Análises a cada 15 dias).

Análise	pH	Condutividade e elétrica (dS.m ⁻¹)
1	7,30	2,131
2	7,08	2,097
3	7,44	2,133

Para a obtenção do material vegetal foi adotado o delineamento experimental em blocos casualizados com quatro repetições, com parcelas de cinco linhas de 1 m cada, onde foram realizadas duas colheitas durante o ciclo da cultura, a primeira no estágio reprodutivo com 57 dias após a semeadura e outra no estágio de senescência, aos 68 dias após a semeadura (DAP).

4.2 Tratamentos impostos ao feijão-caupi

Os tratamentos realizados foram executados antes da semeadura do feijão-caupi, dos quais constituíram a inoculação nas sementes por meio de inoculante turfoso, que

fazem parte da coleção do grupo de Pesquisa em Fixação Biológica do Nitrogênio (GFBN) da UFRPE e da Embrapa Semiárido. A inoculação das bactérias foram feitas em meio líquido com extrato de levedura manitol (YM) com crescimento em três dias para a estirpe comercial e Beta C60-2 e para a estirpe Alpha C78-2 foram sete dias. O inoculante turfosofoi feito com 50g de turfa e 12,5 ml do meio líquido (YM) contendo bactérias e foram adicionados a 100 sementes do feijão-caupi por 30 minutos. Foram utilizadas duas estirpes nativas da região semiárida: A estirpe de alfa-rizóbio foi a C78-2 (*Bradyrhizobium japonicum*) foi proveniente de um Planossolo do município de Salgueiro e a estirpe de beta rizóbio foi a C60-2 (*Paraburkholderia sabiae*). Foi proveniente de um Neossolo Litólico do município de Verdejante. A estirpe BR 3267 recomendada para a cultura, e os tratamentos sem inoculação que foram: uso de fertilizante nitrogenado em forma de ureia (80 kg. ha⁻¹), e o controle absoluto sem fertilizante e sem inoculação.

4.3 Tratos culturais

O feijão-caupi foi submetido aos seguintes tratos culturais:

- Semeadura que foi realizada com três sementes por cova, comespaçamento de 20 x 60 cm entre covas e após cinco dias da emergência foi realizado o desbaste das plântulas.
- A aplicação da ureia (80 kg.ha⁻¹) foi feita em duas aplicações, sendo a primeira no dia do plantio e a segunda após 20 dias, com 5,6 g.m⁻¹ em cada aplicação.
- As plantas foram irrigadas pelo sistema de gotejamento a cada três dias (segunda-feira, quarta-feira e sexta-feira) pela manhã de acordo com a ETc
- O manejo em forma de controle de plantas invasoras foi realizado por meio da capina quando necessário.
- Colheitas das folhas foram feitas a 57 e 68 dias do desenvolvimento do feijão-caupi, as amostras de cada tratamento foram colocadas em tubo com tampa e congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C.

4.4 Avaliações

4.4.1 Medidas do estresse oxidativo

4.4.1.1 Peroxidação lipídica (TBARS)

A determinação da peroxidação lipídica foi estimada pelo conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme Heath e Packer (1968). A extração foi realizada com a maceração de 0,1 g de tecido foliar em um almofariz com 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) (60 g L^{-1}). Posteriormente, o extrato foi centrifugado a $7960 \times g$ por 15 min a 4°C .

O ensaio foi realizado com a mistura 0,5 mL do sobrenadante que foi adicionado a 2 mL de meio reacional contendo 200 g L^{-1} de TCA e 5 g L^{-1} de TBA. O tubo foi mantido a 95°C por 1 hora e incubado a 25°C por 30 min, posteriormente, foi centrifugado a $5000 \times g$ por 10 min a 4°C . As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Modelo libra S8, Biochrom, Cambridge, Inglaterra) com absorbâncias de 532 e 660 nm. O cálculo foi feito com base no coeficiente de extinção molar de 155 mM cm^{-1} e expressa em $\mu\text{mol g}^{-1}\text{ MF}$.

4.4.1.2 Conteúdo de H_2O_2

A determinação da conteúdo de H_2O_2 foi estimada pelo conteúdo de substâncias reativas ao ácido tricloroacético (TCA), conforme Zheng et al. (2019). A extração foi realizada com a maceração de 0,1 g de tecido foliar em um almofariz com 1 mL de ácido tricloroacético (TCA), 0,1%. Posteriormente foi centrifugado a $12.000 \times g$ por 15 min a 4°C .

O ensaio foi realizado com a mistura 0,5 mL do sobrenadante que foi adicionado a 2 mL de meio reacional contendo 1 mL de iodeto de potássio e 1 mL de tampão fosfato de potássio. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Modelo libra S8, Biochrom, Cambridge, Inglaterra) com absorbância de 390 nm. O cálculo foi feito com base na curva padrão de H_2O_2 e expressa em $\text{mmol kg}^{-1}\text{ MF}$.

4.4.2 Medição do sistema antioxidante enzimático

4.4.2.1 Superóxido dismutase (SOD)

O extrato foi obtido a partir da maceração de 0,20 g do tecido foliar em 2 mL de tampão fosfato de potássio (0,1M) (pH 7,0) contendo (EDTA, β -Mercaptoethanol e PVPP) posteriormente foi centrifugado a 7960 x g por 23 minutos a 4° C.

A atividade de superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1), foi realizada conforme descrito por Giannopolitis e Ries (1977) com adaptações. As alíquotas de 10 μ L do extrato foram transferidas para tubos de ensaio contendo 870 μ L de tampão fosfato de potássio (50 mM) (pH 7,8), contendo EDTA 1 μ M e L-metionina 13 mM. E foi adicionado 100 μ L de Nitro blue tetrazolium chloride (NBT) (750 μ M) e 20 μ L riboflavina (1mM). Em seguida foram transferidas para a câmara de luz composta por lâmpadas fluorescentes de 18 W por 15 min. Após o desligamento das luzes, foram feitas as leituras no espectrofotômetro (Biochrom, Libra S8, Cambridge, Inglaterra) a 560 nm. A determinação da atividade da inibição da redução de NBT, foi definida pela unidade de atividade com a quantidade de enzima que inibirá 50% da foto-redução (Beauchamp e Fridovich, 1971). A atividade foi expressa em U g⁻¹ proteína.

4.4.2.2 Peroxidase (POD)

A atividade de peroxidase (POD; EC 1.11.1.7), foi determinada de acordo com Hemeda e Kellin (1990), com adaptações. O extrato foi macerado com amostra de 0,20 g da folha de feijão-caupi, com 1,5 mL de tampão fosfato de potássio (0,2M) (pH 6,0), e centrifugado a 10.000 x g por 21 minutos a 4°C.

O ensaio da enzima POD foi definido pela adição de 100 μ L do sobrenadante ao meio de reação contendo 1 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 6,0), 100 μ L de guaiacol (40 mM) e 100 μ L de peróxido de hidrogênio (23 mM). As leituras foram feitas no espectrofotômetro (Biochrom, Libra S8, Cambridge, Inglaterra) com absorvância de 470 nm, a 30°C, por dois minutos com leituras sucessivas a cada 30 segundos, o cálculo foi feito com base no coeficiente de extinção molar de 26,6 mM⁻¹ cm⁻¹ para guaiacol, e expressa em μ mol guaiacol min⁻¹ g⁻¹ MF.

4.4.3 Medidas do sistema antioxidante não-enzimático

4.4.3.1 Conteúdo de ascorbato reduzido (ASA)

A medição do conteúdo de ascorbato reduzido foi realizada conforme o método de Kampfenkel, Van Montagu e Inzé (1995). A extração foi feita com 0,2 g de MF de cada amostra foliar, adicionando 1,5 mL da solução de ácido tricloroacético (TCA) (6%). O extrato foi transferido para eppendorf, identificado e centrifugado a 10.000 g por 15 minutos.

Para o ensaio da ASA, as alíquotas com 100 µL de extrato foram adicionadas em meio de reação contendo 300 µL de tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 7,4), 100 µL de água destilada, 500 µL TCA (10%), 400 µL de ácido fosfórico (45%), 400 µL de biperidil (4%) e 200 µL de FeCl₃ (3%). As amostras foram submetidas a banho-maria a 42 °C por 30 minutos. As leituras foram feitas no espectrofotômetro (Biochrom, Libra S8, Cambridge, Inglaterra) com absorvância de 525 nm, o cálculo foi feito com base no conteúdo expresso em µmol g⁻¹ MF, estimado pela curva padrão.

4.4.3.2 Proteínas totais

A determinação do conteúdo de proteínas totais foi determinada conforme o método descrito por Bradford (1976) e Zimmermann et al. (2006). A extração foi iniciada pesando-se 0,2 g de MF, e adicionado tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0 (1 mL). O extrato foi transferido para o eppendorf, identificados e centrifugados a 10.000 x g por 15 minutos.

O ensaio de proteína foi feito adicionando 100 µL de extrato foram adicionadas em meio de reação contendo 1 mL de solução de Bradford, sendo homogeneizado. Após 15 minutos, as leituras foram feitas no espectrofotômetro (Biochrom, Libra S8, Cambridge, Inglaterra) com absorvância 595 nm, e o conteúdo de proteína foi estimada de acordo com curva padrão elaborada com albumina do soro bovino (BSA), sendo determinada em mg proteína g⁻¹ MF.

4.4.3.3 Compostos fenólicos totais

A determinação para quantificação de compostos fenólicos totais foi utilizado a metodologia de Jaramillo-Flores et al. (2003), com adaptações. A extração foi realizada com a maceração de 0,20 g da folha do feijão-caupi, contendo 1,5 mL de metanol, logo após foi centrifugada a 10.000 rpm a 4 °C por 21 minutos.

Para o ensaio de compostos foi utilizado, 250 µL da alíquota, adicionado meio de reação contendo 250 µL do reagente Folin–Ciocalteu (1 N), onde essa mistura permaneceu em repouso por 2 min. Em seguida foi acrescentada 500 µL de uma solução de carbonato de sódio a 20% (p/v), e a mistura permaneceu em repouso por mais 10 min. As leituras foram feitas no espectrofotômetro (Biochrom, Libra S8, Cambridge, Inglaterra) com absorvância de 757 nm. O cálculo foi feito com base na curva padrão de ácido gálico, expressa em mg de ácido gálico por mg de MF.

4.4.4 Produtividade

A produtividade foi realizada aos 68 dias de desenvolvimento das plantas, onde foi feita a colheita das vagens e posteriormente foram pesados os grãos de cada parcela e convertido em kg. ha⁻¹.

4.5 Delineamento experimental

Os dados do experimento serão definidos pelo delineamento em blocos casualizados (DBC) com quatro repetições. Os dados foram submetidos aos testes de normalidade, análise de variância e teste de Tukey a 5% de probabilidade com o auxílio do software R x 64 3.4.0. Para a elaboração dos gráficos foi utilizado o software Sigma Plot versão 14.

5 RESULTADOS

5.1 Modulação do dano oxidativo em plantas de feijão-caupi submetidas a inoculação de rizobactérias nativas do semiárido.

Os resultados obtidos da peroxidação lipídica (TBARS), não mostraram diferença significativas entre os tratamentos na primeira colheita de 57 dias após o plantio (Fig. 2A). Para os períodos de senescência aos 68 dias após o plantio foram observados que a inoculação com a estirpe Beta C60-2 resultou em menores valores no conteúdo de TBARS (Fig. 2B), e foram observados que os tratamentos Alfa C78-2 e o controle, obtiveram um maior rendimento nos níveis de TBARS, mas o tratamento BR3267 e o nitrogênio não obtiveram diferença significativas entre eles, e o tratamento Beta C60-2 obtive o menor resultado de TBARS (Fig. 2B).

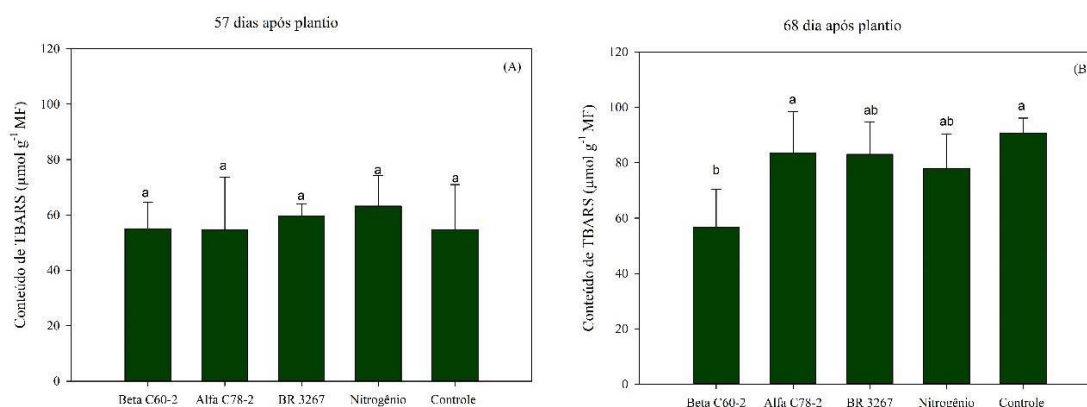


Figura 2. Peroxidação lipídica (TBARS) em planta de feijão-caupi (IPA 206), submetidas a cinco tratamentos com inoculação e sem inoculação com rizóbios (Beta- rizóbio (C60-2), Alfa-rizóbio (C78-2), BR 3267, Nitrogênio e Controle (sem nitrogênio e sem inoculante) coletadas aos 57 dias após a semeadura (A) e 68 dias após a semeadura (B). Letras diferentes significam diferenças estatísticas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Com relação ao conteúdo de peróxido de hidrogênio, na primeira colheita de 57 dias após o plantio (Fig. 3A) não apresentou diferença significativa entre as inoculações impostas nas plantas. A colheita feita após 68 dias do plantio, mostra que ocorreu um

aumento gradativo nos níveis de H_2O_2 para o tratamento do controle, seguido pelo o tratamento de nitrogênio, diferindo-se das estirpes nativas e da comercial (Fig. 3B).

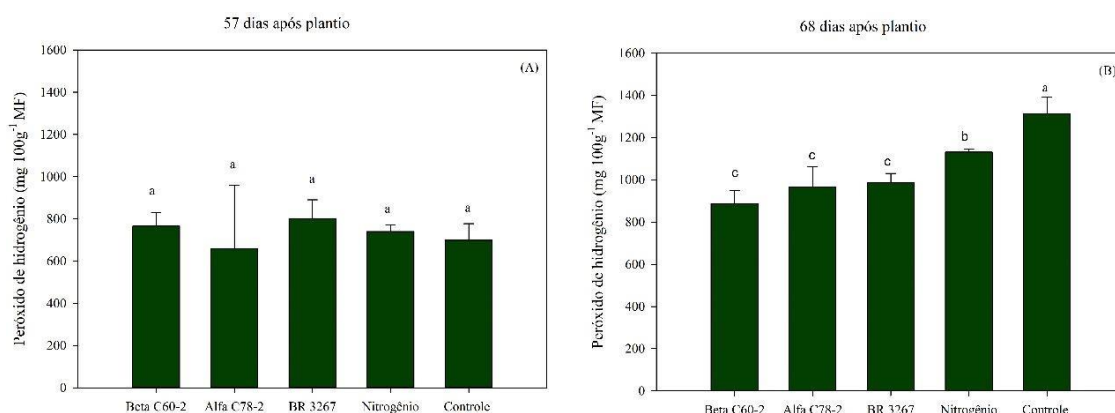


Figura 3. Conteúdo de Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em planta de feijão-caupi (IPA 206), submetidas a cinco tratamentos com inoculação e sem inoculação com rizóbios (Beta-rizóbio (C60-2), Alfa-rizóbio (C78-2), BR 3267, Nitrogênio e Controle (sem nitrogênio e sem inoculante) coletadas aos 57 dias após a semeadura (A) e 68 dias após a semeadura (B). Letras diferentes significam diferenças estatísticas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

5.2 Atividades enzimáticas e não enzimáticas de defesa antioxidante.

Ao avaliar o sistema antioxidante enzimático a atividade da enzima SOD, verificou-se que para a aos 57 dias após a semeadura, todas as plantas submetidas aos tratamentos de Alfa C78-2, BR 3267, Nitrogênio e o Controle, apresentaram significativamente altas atividades para a SOD, em relação as plantas inoculadas com Beta C60-2 (Fig. 4A). Na segunda colheita, aos 68 dias, não houve diferença significativa entre os tratamentos (Fig. 4B).

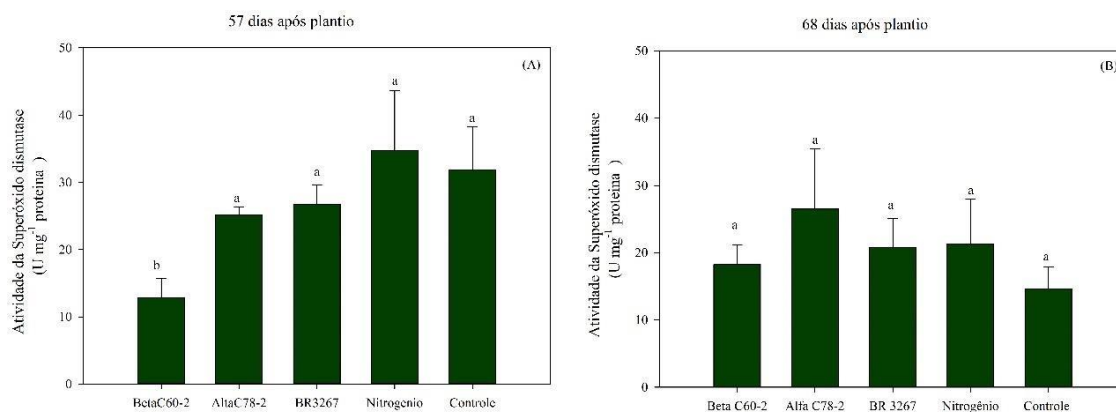


Figura 4. Atividade enzimática Superóxido dismutase (SOD) em planta de feijão-caupi (IPA 206), submetidas a cinco tratamentos com inoculação e sem inoculação com rizóbios (Beta-rizóbio (C60-2), Alfa-rizóbio (C78-2), BR 3267, Nitrogênio e Controle (sem nitrogênio e sem inoculante) coletadas aos 57 dias após a semeadura (A) e 68 dias após a semeadura (B). Letras diferentes significam diferenças estatísticas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

A atividade da POD, aos 57 dias foi mais elevada em plantas inoculadas com BR3267, seguido pelos tratamentos inoculados com estirpes do Semiárido e adubadas com nitrogênio mineral (Fig. 5A). Plantas do controle, aos 57 dias tiveram menor atividade da POD (Fig. 5A). Aos 68 dias após a semeadura, atividade da POD foi semelhantes estatisticamente para todos os tratamentos (Fig. 5B).

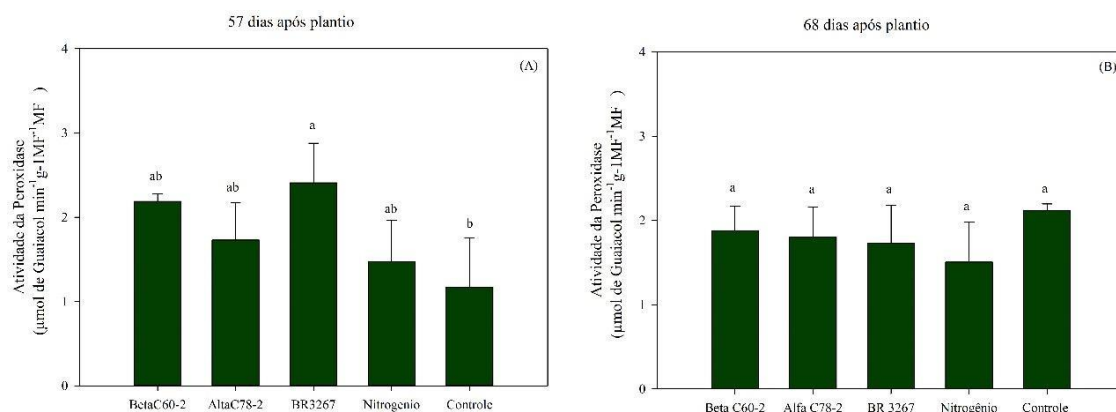


Figura 5. Atividade enzimática antioxidante peroxidase (POD) em planta de feijão- caupi (IPA 206), submetidas a cinco tratamentos com inoculação e sem inoculação com rizóbios (Beta-rizóbio (C60-2), Alfa-rizóbio(C78-2), BR 3267, Nitrogênio e Controle (sem nitrogênio e sem inoculante)

coletadas aos 57 dias após a semeadura (A) e 68 dias após a semeadura (B). Letras diferentes significam diferenças estatísticas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Após medir o conteúdo de ascorbato nas plantas aos 57 dias e 68 dias, verificou-se que aos 57 dias, os maiores níveis foram nas plantas controle e adubadas com nitrogênio (Fig. 6A), enquanto que as plantas inoculadas apresentaram os mais baixos níveis de ASA (Fig. 6A). Na figura 6B, o tratamento controle teve o maior nível de asa, o tratamento com os inoculantes não diferiram entre eles e o nitrogênio teve o menor valor com relação aos demais tratamentos.

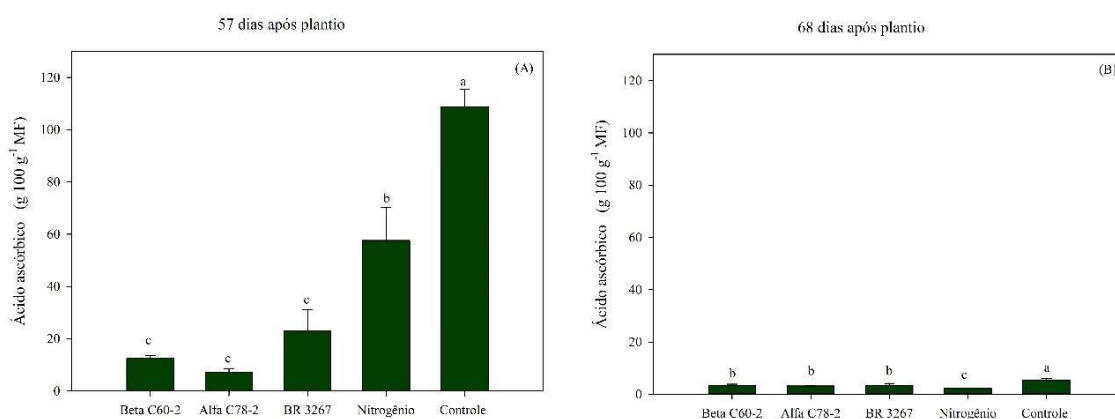


Figura 6. Conteúdo de Ascorbato reduzido (ASA) em planta de feijão-caupi (IPA 206), submetidas a cinco tratamentos com inoculação e sem inoculação com rizóbios (Beta-rizóbio (C60-2), Alfa-rizóbio(C78-2), BR 3267, Nitrogênio e Controle (sem nitrogênio e sem inoculante) coletadas aos 57 dias após a semeadura (A) e 68 dias após a semeadura (B). Letras diferentes significam diferenças estatísticas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

O teor de proteínas solúveis totais apresentou valor superior de 39,33% nas plantas inoculadas pela rizobactéria Beta C60-2, em relação aos demais tratamentos que não se diferiram entre os tratamentos na primeira colheita de 57 dias após o plantio (Fig. 7A). Na segunda colheita (Fig. 7B) não teve diferença significativa entre os tratamentos.

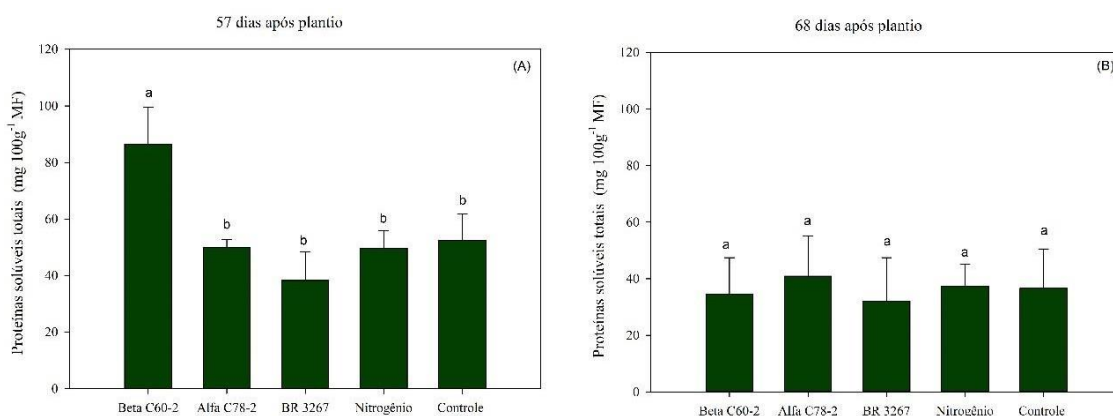


Figura 7. Proteínas solúveis totais em planta de feijão-caupi (IPA 206), submetidas a cinco tratamentos com inoculação e sem inoculação com rizóbios (Beta-rizóbio (C60-2), Alfa-rizóbio(C78-2), BR 3267, Nitrogênio e Controle (sem nitrogênio e sem inoculante) coletadas aos 57 dias após a semeadura (A) e 68 dias após a semeadura (B). Letras diferentes significam diferenças estatísticas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

De acordo com os resultados obtidos o tratamento com a rizobactéria comercial a BR 3267 apresentou maior teor significativo de fenóis em relação aos demais tratamentos, seguido pelo tratamento com Nitrogênio, para a colheita com 57 dias (Fig. 8A). Na segunda colheita com 68 dias (Fig. 8B) o tratamento com Nitrogênio sem inoculação e a estirpe Beta C60-2 apresentaram valores significativamente mais altos em relação aos demais.

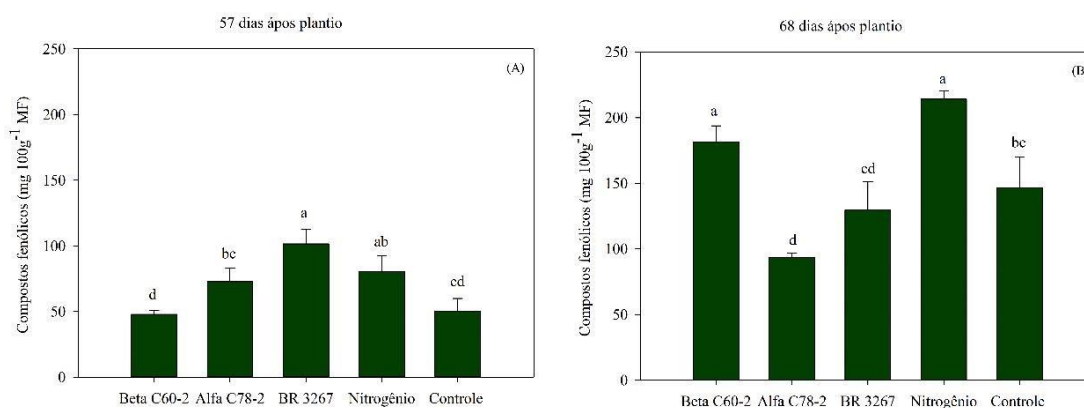


Figura 8. Compostos fenólicos em planta de feijão-caupi (IPA 206), submetidas a cinco tratamentos com inoculação e sem inoculação com rizóbios (Beta-rizóbio (C60-2), Alfa-

rizóbio(C78-2), BR 3267, Nitrogênio e Controle (sem nitrogênio e sem inoculante) coletadas aos 57 dias após a semeadura (A) e 68 dias após a semeadura (B). Letras diferentes significam diferenças estatísticas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

5.3 Produtividade em plantas de feijão-caupi inoculadas com rizobactérias nativas do semiárido.

A produtividade dos grãos de feijão-caupi, mostram que o tratamento com a inoculação com rizobactéria Alfa C78-2 foi superior com relação as demais, mostrando um aumento na produtividade de 25,29% quando comparado com a rizobactéria Beta C60-2 que obteve a menor produtividade com relação ao demais tratamentos, os tratamentos controle e o nitrogênio tiveram valores de produtividade maior do que o da estirpe Beta C60-2.

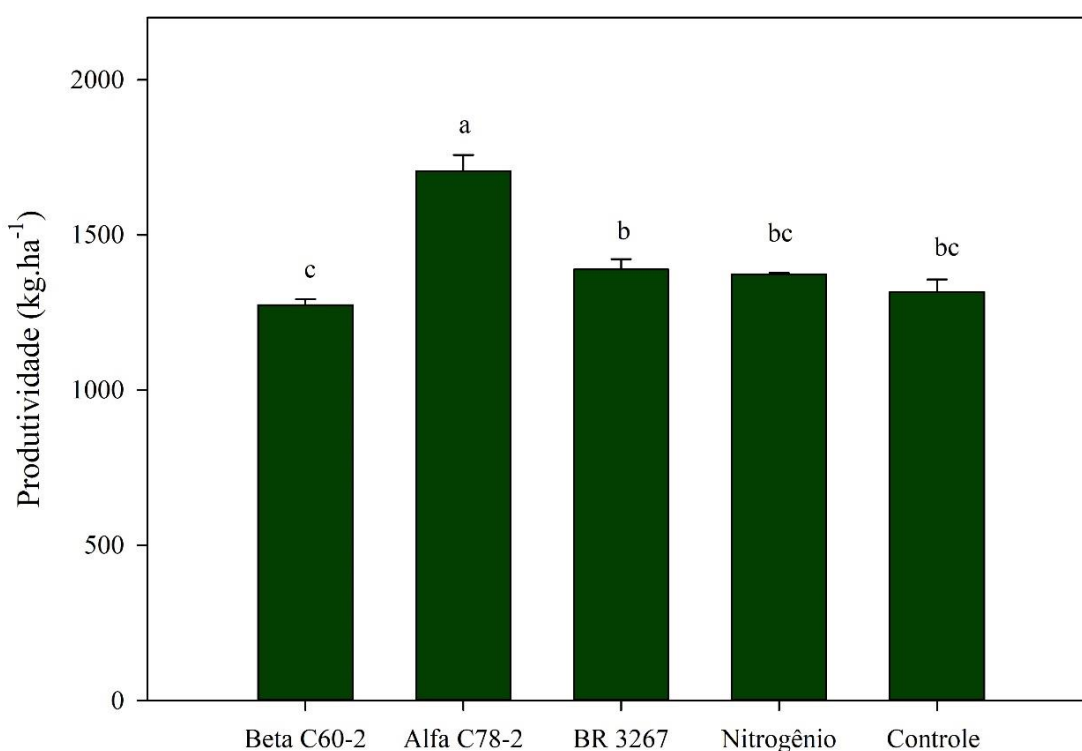


Figura 9. Produtividade da planta de feijão-caupi (IPA 206), submetidas a cinco tratamentos com inoculação e sem inoculação com rizóbios (Beta-rizóbio (C60-2), Alfa-rizóbio(C78-2), BR 3267, Nitrogênio e Controle (sem nitrogênio e sem inoculante) coletadas aos 57 dias após a semeadura (A) e 68 dias após a semeadura (B). Letras

diferentes significam diferenças estatísticas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

6 DISCUSSÃO

O cultivo de espécies agrícolas em regiões de climas áridos e semiárido é um desafio, visto que, as plantas são submetidas a múltiplos estresses abióticos simultaneamente (seca, salinidade e calor), impactando diretamente na produtividade e aumentando o estresse oxidativo (MINHAS et al., 2017). Diante disso, o presente trabalho, avaliou a inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio e promotoras de crescimento como alternativa para minimizar o dano oxidativo em plantas de feijão-caupi cultivadas no semiárido brasileiro. Este trabalho visa o estudo de novas tecnologias com o uso de inoculantes para melhorar a produtividade dos grãos em plantas de feijão-caupi através da inoculação com rizóbios eficientes em fixar nitrogênio. Os resultados mostraram que a produtividade (Fig. 9) da rizobactéria Alfa C78-2 obteve o maior rendimento dos grãos com relação aos demais tratamentos, com uma produtividade média de 1704 kg.ha⁻¹, apresentando resultados promissores com utilização de bactérias fixadoras de nitrogênio e promotoras de crescimento, que melhora o rendimento da planta e promove um maior rendimento dos grãos submetidos a condições climáticas do semiárido (GERICÓ et al., 2019; GALINDO et al., 2021).

O estresse abiótico nas plantas resulta em inúmeras mudanças fisiológicas. Nessas condições, espécies reativas de oxigênio (EROS) são produzidas em grandes taxas, em especial o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), impactando diretamente no funcionamento normal das plantas e resultando no aumento do dano aos componentes celulares (SILVEIRA et al, 2011; RODRIGUES et al., 2013; SANTOS et al., 2018). No presente estudo, as plantas de feijão-caupi inoculadas com rizóbio na colheita de 57 dias após o plantio (Fig. 3A) obtiveram os menores níveis de H₂O₂, indicando que a simbiose com as bactérias tenha promovido uma maior ação do sistema de defesa da cultura, diminuindo os danos causados pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (MOLLER et al., 2007; LOCATO et al., 2010; SANTOS et al., 2018). Além disso, a colheita aos 68 (DAP) (Fig. 3B) resultou em maiores taxas de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) no tratamento controle, que pode ser explicado devido à baixa ação dos componentes de defesa celulares devido ao início do período de senescência das plantas (SILVEIRA et al,

2011; RODRIGUES et al., 2013; SANTOS et al., 2018). O aumento nos níveis de H_2O_2 , pode causar diversos danos a membrana das plantas devido a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados, resultando no aumento da peroxidação lipídica (PUPPO et al., 2014; PANDEY et al., 2017). A peroxidação lipídica é uma consequência direta da ação das EROS, resultando no agravamento do estresse oxidativo através da produção de radicais de lipídicos que causam danos a membrana celular (SCHMIDT; KUNERT, 1986). Os resultados obtidos nesse trabalho para peroxidação lipídica foram satisfatórios mostrando eficiência na redução do estresse oxidativo para todos os tratamentos na primeira colheita de 57 dias após plantio (Fig. 2A). A maior peroxidação lipídica no feijão-caupi foi obtida com a rizobactéria Alfa C78-2 e no tratamento controle, e rizobactéria Beta C60-2 promoveu menor peroxidação na colheita aos 68 dias após o plantio (Fig. 2B). Os demais tratamentos BR 3267 e nitrogênio aumentaram taxas de peroxidação com retardo da colheita (Fig. 2B). Esse aumento pode ter ocorrido devido à redução na concentração de legemoglobina que ocorre no período de senescência (BEN SALAH et al., 2021; EGAMBERDIEVA et al., 2013; RODRIGUES et al., 2013).

O ácido ascorbato reduzido (ASA) é um composto antioxidante de grande abundância encontrado nas plantas, apresentando um papel fundamental no combate ao estresse oxidativo. Além de ter capacidade para doação de elétrons no processo enzimático e não enzimático, mostrando-se assim um poderoso antioxidante para manter baixo os níveis das EROS (SHAO et al., 2008; PANDEY et al. 2017). Neste estudo, o controle (sem nitrogênio e sem inoculante) apresentou uma maior quantidade na produção de ASA na colheita aos 57 dias após o plantio (Fig. 6A), mostrando que o nível de ascorbato reduzido foi de 93,31% com relação ao tratamento Alfa C78-2, exibindo uma capacidade de proteção oxidativa para as plantas de feijão-caupi mesmo sem tratamento. Esse resultado corrobora com os valores obtidos nas análises de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a peroxidação lipídica (TBARS), os quais não diferiram dos demais tratamentos com inoculação de rizóbios e adubação nitrogenada na primeira colheita com 57 dias após o plantio (Fig 2A e Fig. 3A). Os demais tratamentos apresentaram níveis mais baixos com relação ao controle nos dois períodos de colheita avaliados, sendo que na segunda colheita após 68 dias (Fig. 6B) os níveis de ASA foram menores quando comparado com a primeira colheita, mas o controle se manteve com o nível de ASA maior, seguido dos tratamentos inoculados e com

tratamento com nitrogênio tendo menor valor para a análise de ASA. O ascorbato reduzido mesmo em baixas concentrações fornece a proteção da membrana (CONKLIN e BARTH, 2004; MAIA et al., 2010).

As EROS podem alterar de diversos modos as proteínas, essas modificações podem ocorrer de maneiras diretas e indiretas. No modo direto, a modulação decorre através da carbonilação, formação de ligações dissulfeto, nitrosilação e glutathionilação. Já na maneira indireta ocorre a quebra da peroxidação dos ácidos graxos (YAMAUCHI et al., 2008). As plantas de feijão-caupi inoculadas com Beta C60-2 na primeira colheita de 57 dias após o plantio (Fig. 7A), apresentaram valores superiores aos demais tratamentos, os quais não mostraram diferenças significativas, indicando que a rizobactéria Beta C60-2 resultou maior resistência, visto que em condições de estresse o conteúdo proteico tende a diminuir em decorrência dos eventos de senescência e aumento da peroxidação lipídica (TAUSEEF et al., 2021).

Os compostos fenólicos apresentam papel importante como recurso antioxidante, pois possui metabolismo secundários e são capazes de reduzir espécies reativas de oxigênio através da transferência de elétrons. No entanto, para que isso ocorra dependerá da quantidade e da posição dos grupos de hidroxila ter a eficiência nos sistemas antioxidantes (GRACE e LOGAN, 2000; PODSEDEK, 2007). Os dados obtidos mostram que aos 57 (DPA) (Fig. 8A), o tratamento com o inoculante comercial BR 3267 mostrou eficiente com relação a produção de compostos fenólicos, sendo mais eficiente no metabolismo antioxidante da planta de feijão-caupi. Com relação a plantano período de senescência, que ocorreu após 68 dias do plantio (Fig. 8B), os tratamentos com o inoculante Beta C60-2 e o tratamento com nitrogênio produziram mais composto fenólicos em relação ao demais tratamentos. Tanto a primeira colheita como a segunda colheita (Fig. 8A e B) mostraram que quando as plantas são submetidas a tratamentos com fertilizantes químicos ou naturais (inoculação), o metabolismo tende a produzir um sistema mais eficaz antioxidante (ISLAM et al., 2015; GUPTA e PANDEY, 2020).

Os rizóbios são muito eficientes na proteção oxidativa pois possuem diversas moléculas e enzimas antioxidantes, que são capazes de diminuir as atividades das EROS, mantendo seus níveis baixos e estáveis (SCHELER et al., 2013; MORAES et al., 2016). O sistema de proteção antioxidante é formado por diversas enzimas como a Catalase (CAT), superóxido de dismutase (SOD) e Peroxidase (POD), sendo muito importante na redução dos danos causados pelas EROS (MARINO et al., 2013; PUPPO

et al., 2014). A SOD é uma metaloenzima que busca a redução dos danos provocados pelas EROS. Esse sistema atua na conversão de dois ânions ($O_2^{\bullet-}$) para oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A SOD estão presentes nas mitocôndrias promovendo a defesa contra as EROS (JIANG et al., 2021). Os resultados desse trabalho mostram que os tratamentos Alfa C78-2, BR 3267, Nitrogênio e controle obtiveram uma maior produção da atividade da SOD para a primeira colheita de 57 dias após o plantio (Fig. 4A), para a segunda colheita, aos 68 dias após o plantio (Fig. 4B), não obtiveram diferenças significativas.

A CAT e POD agem com diversos mecanismos para degradar o H_2O_2 , com intuito de proteger a planta do estresse oxidativo (ANDREWS e LEA, 2013; PUPPO et al., 2014). A POD atua através da oxidação do co-substrato com antioxidante para degradar o H_2O_2 , apresentando maior atividade que a CAT (RODRIGUES et al., 2013; PUPPO et al., 2014). Dentre os tratamentos no feijão-caupi, o tratamento com as rizobactérias BR 3267 na atividade da POD foi maior na primeira colheita 57 dias após o plantio (Fig. 5A). O aumento dessa atividade enzimática está correlacionado com a diminuição do conteúdo de H_2O_2 , indicando que a POD pode criar barreira contra a entrada de metais pesados devido a indução da lignina biossíntese (BHADURI e FULEKAR, 2012; MORAES et al., 2016). Nesse contexto, o presente estudo mostra que a ação dos rizóbios e dos demais tratamentos obtiveram resultados efetivos na redução do estresse oxidativo promovido pelas EROS, na fase de maturação da plantana colheita de 57 dias após o plantio. Nas condições de senescência o tratamento controle teve os maiores níveis de estresse oxidativo no período 68 dias após o plantio. O inoculante comercial BR 3267 se mostrou mais promissora no sistema de defesa antioxidante das plantas de feijão-caupi no período de maturação. Esses resultados indicam que a inoculação com rizóbios é bastante importante para redução do uso de fertilizantes, entretanto, são necessários mais estudos para explorar o potencial da inoculação (SANTOS et al., 2018).

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho mostram que todos os tratamentos foram eficientes na redução do estresse oxidativo promovido pelas EROS, na primeira colheita aos 57 dias após o plantio. Todas as estirpes apresentaram resultados satisfatório com relação ao sistema de defesa para planta do feijão-caupi, com destaque para a estirpe comercial Br 3267 que apresentou maiores resultados para as análises do sistema de defesa antioxidante. No período de senescência onde ocorre a perda das características fisiológicas da planta, o tratamento controle teve um aumento no estresse oxidativo, devido a planta está mais suscetível os estresses abióticos, esses dados mostram que estágio de desenvolvimento parece ser um ponto importante na tolerância ao estresse oxidativo. A produtividade mostrou-se superior para a estirpe Alfa C78-2, com relação aos demais tratamentos, porém os demais tratamentos mostraram uma produtividade com valores acima da média nacional para plantio irrigado, mostrando que todos os tratamentos foram eficientes na produtividade. Vale destacar que são necessários mais estudos para comprovar a eficiência da regulação do sistema antioxidante para as plantas inoculadas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABHILASH, P. C. C.; DUBEY, R. K.; TRIPATHI, V.; GUPTA, V. K.; SINGH, H. B. Plant Growth-Promoting Microorganisms for Environmental Sustainability. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n.11, p. 847-850, 2016. DOI: 10.1016/j.tibtech.2016.05.005.

ANDREWS, M.; LEA, P. J. Our nitrogen ‘footprint’: the need for increased crop nitrogen use efficiency. **Ann. Appl. Biol.**, v. 163, p. 165-169, 2013.

ALMEIDA, A. L. G.; ALCÂNTARA ROSA, M. C. M.; NOBREGA, R. S. 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**, v. 5, n. 3, p. 364-369, 2010. DOI: 10.5039/agraria.v5i3a795.

ARAÚJO, E. O. *Bradyrhizobium sp.*, *Azospirillum brasilense* e adubação fosfatada na cultura do Feijão-caupi cultivado em ambiente Amazônico. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, v. 16, n. 29, p. 577, 2019. DOI: 10.18677/EnciBio_2019^a43.

ARAÚJO, L. B. R.; PINHEIRO, M. S.; FIEGE, L. B. C.; BERTINI, C. H. C. M.; DOVALE, J. C. Agronomic potential and genetic diversity of land- races of cowpea of the state of Ceará. **Revista Caatinga**, v. 32, n. 3, p. 698-708, 2019. DOI: 10.1590/1983-21252019V32N314RC.

ASADA, K. THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, USA, v. 50, n. 1, p. 601–639, 1999. DOI: 10.1146/annurev.arplant.50.1.601.

AZEVEDO NETO, A. D.; GOMES-FILHO, E.; PRISCO, J. T. Salinity and Oxidative Stress. (A. N. Khan, S. Singh, Eds.) Abiotic stress and plant responses. **New Delhi: I. K. International Publishing House**, p. 58-82, 2008.

BARAÚNA, A. C. Ecologia e taxonomia de rizóbios de mimosas do Brasil: Diversidade e interação com seus hospedeiros de diferentes biomas. **Tese (Doutorado em Ciência Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**. Seropédica, RJ. 2017.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006. DOI: 10.1590/S0100-40422006000100021.

Barros, M. A.; Rocha, M. M.; Gomes, R. L. F.; Silva, K. J. D, Neves, A. C. Adaptabilidade e estabilidade produtiva de 41iliar-caupi de porte semiprostrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 4, p. 403-410, 2013. DOI:10.1590/S0100-204X2013000400008.

BASTOS, V. J.; MELO, D. A.; ALVES, J. M. A.; UCHÔA, S. C. P.; SILVA, P. M. C.; TEXEIRA JUNIOR, D. L. Avaliação da fixação biológica de nitrogênio em feijão-caupi submetido a diferentes manejos da vegetação natural na savana de Roraima. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 6, n. 2, p. 133-139, 2012. DOI: 10.18227/1982-8470RAGRO.V6I2.851.

BEAUCHAMP, C. & FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase – improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971. DOI: 10.1016/0003-2697(71)90370-8.

BEM SALAH, I.; SLATNI, T.; GRUBER, M.; MESSEDI, D.; GANDOUR, M.; BENZARTI, M.; HAOUALA, R.; ZRIBI, K.; BEM HAMED, K.; PEREZ-ALFOCEA, F.; ABDELLY, C. Relationship between symbiotic nitrogen fixation sucrose synthesis and anti-oxidant activities in source leaves of two Medicago 41iliares lines cultivated under salt stress. **Environ. Exp. Bot**, v. 70, p. 166–173, 2011.

BEZERRA, A. K. P.; LACERDA, C. F.; HERNANDEZ, F. F. F.; SILVA, F. B.; GHEYSI, H. G. Rotação cultural feijão-caupi/milho utilizando-se águas de salinidades

diferentes. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1075-1082, 2010. DOI: 10.1590/s0103-84782010000500012.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista Nutrição**, v. 12, n. 12, p. 123-130, 1999. DOI: 10.1590/S1415-52731999000200001.

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**, v. 72, p. 248-254, 1976. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3

BHADURI, A.M.; FULEKAR, M. H.; Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress. **Rev. Environ. Sci. Biotechnol**, v. 11, p. 55-69, 2012.

BHAT, M. A.; RASOOL, R.; RAMZAN, S. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for sustainable and eco-friendly agriculture. **Acta Scientific Agriculture**, v. 3, p. 23–25, 2019.

BHATTACHARYYA, P. N. e JHA, D. K. Crescimento das plantas rizobactérias (PGPR): emergência na agricultura. **World J Microbiol Biotechnol**, n. 28, p. 1327– 1350, 2012. DOI: 10.1007/s11274-011-0979-9.

CARVALHO, T.; CHAGAS, I. *Brasil, campeão mundial em consumo de agrotóxicos*. Politize, 2019. Disponível em: <https://www.politize.com.br/brasil-campeao-mundial-emconsumo-de-agrotoxicos/>

CAVERZAN, A.; PIASECKI, C.; CHAVARRIA, G.; STEWART, C. N.; JR. & VARGA, L. Defenses Against ROS in Crops and Weeds: The Effects of Interference and Herbicides. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 1086, 2019. DOI: 10.3390/IJMS20051086

COELHO JÚNIOR, L. F; FERREIRA-SILVA, S. L; VIEIRA, M. R. S; CARNELOSSI, M. A. G.; SIMÕES, A. N. Darkening, damage and oxidative protection are stimulated

in tissues closer to the yam cut, attenuated or not by the environment. **J. Sci. Food Agric.** 2019; 99: 334–342. DOI: 10.1002/jsfa.9192.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos- Safra 2018/19 – Nono levantamento, v. 6, p.1-113, 2021.

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

DANTAS, A. P. J.; HOLANDA, G. C.; ROLIM, R. R.; FERREIRA, L. T.; NASCIMENTO, N. F. F.; ARAÚJO, H. F. P. Evaluation of two cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) genotypes under rainfed farming with low rainfall. **Revista Brasileira Meio Ambiente**, v. 7, n. 3, p. 58-69, 2019. DOI: 10.5281/zenodo.3575407

DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**, v. 109, p. 212–228, 2015. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2014.06.021.

DEVI, C. B.; KUSHWAHA, A.; KUMAR, A. Sprouting characteristics and associated changes in nutritional composition of Cow-pea (*Vigna unguiculata*). **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 6821-6827, 2015. DOI: 10.1007/s13197-015-1832-1.

EGAMBERDIEVA, D.; BERG, G.; LINDSTROM, K.; RASANEN, L. A. Alleviation of salt stress of symbiotic *Galega officinalis* L (Goat's Rue) by co-inoculation of rhizobium with rootcolonizing *Pseudomonas*. *Plant Soil*, v. 369, n. 1–2, p. 453–465, 2013.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas. **Editora Planta**, Londrina, PR, p. 1-22, 2006.

FIORI, M. S. Estresse oxidativo em clones de seringueira sob ataque de antracnose-das-folhas. **Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP**. Botucatu, SP. 2011.

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 73, n. 2, p. 627-650, 1927. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)84277-6

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. **Embrapa Meio-Norte**, Teresina, PI, p. 1-84, 2011.

FREIRE FILHO, F. R. Origem, evolução e domesticação do caupi. **EMBRAPA/UEPAE**, Brasília, DF, p. 26-46. 1988.

JIANG, L.; PAN, B.; LIANG, J.; WANG, B.; YANG, Y.; LIN, Y. Earthworm casts restrained the accumulation and phytotoxicity of soil glyphosate to cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) plants. **Chemosphere**, v. 279, p. 130571, 2021. DOI:10.1016/j.chemosphere.2021.130571.

GALINDO, F. S.; SILVA, E. C.; PAGLIARI, P. H.; FERNANDES, G. C.; RODRIGUES, W. L.; BIAGINI, A. L. C.; BARATELLA, E. B.; SILVA JÚNIOR, C. A.; MORETTI NETO, M. J.; SILVA, V. M.; MURAOKA, T.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M. Nitrogen recovery from fertilizer and use efficiency response to *Bradyrhizobium sp.* and *Azospirillum brasilense* combined with N rates in cowpea-wheat crop sequence. **Applied Soil Ecology**, v. 157, p. 103764, 2021. DOI:10.1016/j.apsoil.2020.103764.

GERICÓ, T. G.; TAVANTI, R. F. R.; OLIVEIRA, S. C.; LOURENZANI, A. E. B. S.; LIMA, J. P.; RIBEIRO, R. P.; SANTOS, L. C. C.; REIS, A. R. *Bradyrhizobium sp.* enhance ureide metabolism increasing peanuts yield. **Archives of Microbiology**, 2019. DOI:10.1007/s00203-019-01778-x.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309–314, 1977.

GONÇALVES, Z. S.; LIMA, L. K. S. Desempenho agronômico e diversidade genética de linhagens de feijão-caupi nas condições do Recôncavo da Bahia. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 9, n. 3, p. 285-294, 2021. DOI: 10.20873/JBB.UFT.CEMAF.V9N3.GONCALVES.

GRACE, S. G.; LOGAN, B. A. “Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway,” *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, v. 355, n. 1402, p. 1499–1510, 2000.

GRATÃO, P. L.; POLLE, A.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v. 32, p. 481-494, 2005. DOI:10.1071/fp05016.

GUALTER, R. M. R.; LEITE, L. F. C.; ALCANTARA, R. M. C. M.; COSTA, D. B.; LIMA, S. S. Avaliação dos efeitos da inoculação de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp) com *Bradyrhizobium elkanii*. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 2, p. 637-640, 2007.

GUPTA, S.; PANDEY, S. Enhanced salinity tolerance in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) plants using twin ACC deaminase producing rhizobacterial inoculation. **Rhizosphere**, 100241, 2020. doi:10.1016/j.rhisph.2020.100241

HEMEDA, H. M.; KELIN, B. P. Effects of Naturally Occurring Antioxidants on Peroxidase Activity of Vegetable Extracts. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 1, p. 184-185, 1990. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1990.tb06048.x

ISLAMs, F.; YASMEEN, T.; ARIF, M. S.; ALI, S.; Ali, B., HAMEED, S.; ZHOU, W. (2015). Plant growth promoting bacteria confer salt tolerance in *Vigna radiata* by up-regulating antioxidant defense and biological soil fertility. **Plant Growth Regulation**, v. 80, n. 1, p. 23–36, 2015. DOI:10.1007/s10725-015-0142-y

JARAMILLO-FLORES, M. E.; GONZÁLEZ-CRUZ, L.; CORNEIJO-MAZÓN, M.; DORANTES-ALVARES, L.; GUTIÉRREZ-LÓPEZ, G. F.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ H. Effect of Thermal Treatment on the Antioxidant Activity and Content of Carotenoids and Phenolic Compounds of Cactus Pear Cladodes (*Opuntia ficus-indica*). **Food Science and Technology International**, v. 9, n. 4, p. 271–278, 2003. DOI:10.1177/108201303036093

KAMPFENKEL, K.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. **Analytical biochemistry**, v. 225, n. 1, p. 165–7, 1995.

KRESLAVSKI, V. D.; ZORINA, A. A.; LOS, D. A.; FOMINA, I. R.; ALLAKHVERDIEV, S. I. Molecular Mechanisms of Stress Resistance of Photosynthetic Machinery. **Molecular Stress Physiology of Plants**, p. 21-51 2013. DOI: 10.1007/978-81-322-0807-5_2.

LANGARO, A. C.; AGOSTINETTO, D.; OLIVEIRA, C.; SILVA, J. D. G; BRUNO, M. S. Biochemical and physiological changes in rice plants due to application of herbicides. **Planta Daninha** v. 34, n. 2, p. 277-289, 2016. DOI: 10.1590/S0100-83582016340200009.

LOCATO, V.; PINTO, M.C.; PARADISO, A.; GARA, L. Reactive oxygenspecies and ascorbate glutathione interplay in signaling and stress responses. In: Gupta SD, ed. *Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants*. Enfield: **Science Publishers**, p. 45–64, 2010.

LOPES, M. J. S.; DIAS-FILHO, M. B.; GURGEL, E. S. C. Successful plant growth-promoting microbes: inoculation methods and abiotic factors. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, p. 1-13, 2021. DOI: 10.3389/fsufs.2021.606454.

LOPES, R.; TSUI, S.; GONÇALVES, P. J. R. O.; QUEIROZ, M. A look into a multifunctional toolbox: endophytic *Bacillus* species provide broad and underexploited

benefits for plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 3, p. 94-102, 2018. DOI: 10.1007/s11274-018-2479-7.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. S. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MAIA, J. M.; SILVA, S. L. F.; VOIGT, E. L.; MACÊDO, 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 Botanica Brasilica**, v. 26, n.2, p. 342-349, 2012. DOI: 10.1590/S0102-33062012000200010.

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. **Braz J Plant Physiol**, v. 22, n. 2, p. 113–122, 2010.

MARINO, D.; DAMIANI, I.; GUCCIARDO, S.; MIJANGOS, I.; PAULY, N.; PUPPO, A. Inhibition of nitrogen fixation in symbiotic *Medicago truncatula* upon Cd exposure is a local process involving leghemoglobin. **J. Exp. Bot.** v. 64, p. 5651-5660, 2013.

MENEGAZZO, R. F.; RICKLI, M. E.; SCANAVACCA, J.; LIMA, J. D.; SILVEIRA, A. C.; MENEGAZZO, A. W.; SOUZA, S. G. H.; LOPES, A. D. Differential response to different classes of herbicides: *Tradescantia pallida* (Rose) D. R. Hunt var. *purpurea* Boom as a model plant. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, p. e6910111452, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i1.11452.

MILLER, G.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. **Plant, Cell & Environment**, v. 33, p. 453–467, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x

MINHAS, P. S.; RANE, J.; PASALA, R. K. Abiotic Stresses in Agriculture: An Overview. **Abiotic Stress Management for Resilient Agriculture**, p. 3–8, 6 out. 2017.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405–410, 2002. DOI: 10.1016/S1360-1385(02)02312-9.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 10, p. 490–498, 2004. DOI: 10.1016/j.tplants.2004.08.009

MOLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annu. Rev. Plant Biol.** v. 58, p. 459–481, 2007.

MONTEIRO, C. C. Análise bioquímica do mutante hormonal de tomateiro *Never ripe* (*Nr*) submetido aos estresses por cádmio e salinidade. **Dissertação (Mestrado em Ciência) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**. Piracicaba, SP, 2010.

MORAES, N. de J.; COSTA NETO, V. P.; ARAÚJO, A. S. F.; FIGUEIREDO, M. V. B.; BONIFACIO, A.; RODRIGES, A. C. Bradyrhizobium sp. inoculation ameliorates oxidative protection in cowpea subjected to long-term composted tannery sludge amendment. **European Journal of Soil Biology**, v. 76, p. 35–45, 2016. DOI:10.1016/j.ejsobi.2016.07.006

MOREIRA, F.M.S. Avaliação da eficiência de inoculantes microbianos de leguminosas em regiões inexploradas e de métodos para seu controle de qualidade e inspeção visando à expansão de seu uso na agricultura brasileira. **Projeto de Pesquisa**, UFV, Viçosa, 2008.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74-99, 2010. DOI: 10.14295/cs.v1i2.45

OLIVEIRA, G. M. Efeito do pré-tratamento foliar com H₂O₂ sobre o proteoma e enzimas antioxidante em planta de Feijão-de-corda submetidas ao estresse salino. **Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal de Fortaleza**. Fortaleza, CE, 2016.

PANDEY, S.; FARTYAL, D.; AGARWAL, A.; SHUKLA, T.; JAMES, D.; KAUL, T.; NEGI, Y. K.; ARORA, S.; REDDY, M. K. Abiotic stress tolerance in plants: myriad roles of ascorbate peroxidase. **Front PlantSci**, v. 8, p. 581, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2017.00581>

PANDHAIR, V.; SEKHON, B. S. Reactive oxygen species and antioxidants in plants: an overview. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 15, p. 71-78, 2006. DOI:10.1007/bf03321907.

PEREIRA, P. C.; SILVA, T. G. F.; ZOLNIER, S.; MORAIS, J. E.F.; SANTOS, D. C. Morfogênese da palma forrageira irrigada por gotejamento. **Rev. Caatinga**, v. 28, n. 3, p. 184–195, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/1983-21252015v28n321rc>

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 30, n. 1, p. 11–26, 2015. DOI: 10.1007/s12291-014-0446-0.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: a review. **LWT - Food Sci. Technol.** v. 40, p. 1–11, 2007. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.07.023>.

POLIDOEROS, A. N.; MYLONA, P. V; PASENTSIS, K.; SCANDALIOS, J. G.; TSAFTARIS, A. S. The maize alternative oxidase 1A (AOX1A) gene is regulated by signals related to oxidative stress. **Redox report: communications in free radical research**, v. 10, n. 2, p. 71–8, 2005. DOI: 10.1179/135100005X21688.

POSADA, A.; MEJÍA, D.; POLANCO-ECHEVERRY, D.; CARDONA, J. Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR): Una revisión sistemática 1990-2019. **Revista de Investigación Agraria y ambiental**, v. 12, n.2, p. 161 – 178, 2021. DOI:10.22490/21456453.4040.

PUPPO, A.; PAULY, N.; BOSCARI, A.; MANDON, K.; BROUQUISSE, R. Hydrogen peroxide and nitric oxide: key regulators of the legume-rhizobium and mycorrhizal symbioses, **Antioxid. Redox Signal.** v. 18, p. 2202-2219, 2014.

RAI, P. K.; SINGH, M.; ANAND, K.; SAURABH, S.; KAUR, T.; KOUR, D.; YADAY, A. N.; KUMAR, M. Role and potential applications of plant growthpromoting rhizobacteria for sustainable agriculture. **Trends of Microbial Biotechnology for Sustainable Agriculture and Biomedicine Systems: Diversity and Functional Perspectives**, p. 49-60, 2020. DOI: 10.1016/B978-0-12-820526-6.00004-X.

RAMOS, G. Y. R.; SILVA, Y. M.; JUNIOR, J. S. A.; SANTOS, A. S.; SILVA, G. N. Resposta da fixação biológica de nitrogênio (FBN) em cultivares de feijão-caupi, no município de Codó-MA. **SOCIEDADE 5.0: EDUCAÇÃO, CIÊNCIA, TECNOLOGIA E AMOR. V COINTER PDVAgro.** Recife, PE, 2020. DOI: 10.31692/2526-7701.VCOINTERPDVAgro.0155

RAO, D. L. N. Recent advances in biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Proceedings of the Indian National Science Academy**, v. 80, n. 2, p. 359-378, 2014. DOI: 10.16943/ptinsa/2014/v80i2/55114

REZENDE, C. C.; SILVA, M. A.; FRASCA, L. L. M.; FARIA, D. R.; FILIPPI, M. C. C.; LANNA, A. C.; NASCENTE, A. S. Microrganismos multifuncionais: utilização na agricultura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e50810212725, 2021. DOI: 10.33448/RSD-V10I2.12725.

ROCHA, M. M.; SILVA, K. J. D.; JÚNIOR, J. A. N. M.; HASHIMOTO, J. M.; NEVES, A. C.; SOUSA, F. M. Folheto informativo: Feijão-caupi melhoramento genético para o avanço da cultura. **Embrapa Meio-Norte**, Teresina, PI, 2016.

RODRIGUES, A. C.; BONIFACIO A.; ANTUNES, J. E. L.; SILVEIRA, J. A. G.; FIGUEIREDO, M. do V. B. Minimization of oxidative stress in cowpea nodules by the

interrelationship between *Bradyrhizobium* sp. and plant growth-promoting bacteria. **Applied Soil Ecology**, v. 64, p. 245–251, 2013. DOI:10.1016/j.apsoil.2012.12.018.

SANTOS, A. A.; SILVEIRA, J. A. G.; BONIFACIO, A.; RODRIGUES, A. C.; FIGUEIREDO, M. V. B. Antioxidant response of cowpea co-inoculated with plant growth-promoting bacteria under salt stress. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 513–521, 2018. DOI:10.1016/j.bjm.2017.12.003.

SCHELER, C.; DURNE, J.; ASTIER, J. Nitric oxide and reactive oxygen species in plant biotic interactions, *Curr. Opin. Plant Biol*, v.16, p. 534-539, 2013.

SCHMIDT, A.; KUNERT, K. J. Lipid Peroxidation in Higher Plants. **Plant Physiology**, v. 82, n. 3, p. 700–702, 1986.

SELLSCHOP, J. P. F. Cowpeas: *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Field Crop Abstracts**, v. 15, n. 4, p. 259-266, 1962.

SHAO, H. B.; CHU, L. Y.; LU, Z. H.; KANG C. M. “Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells,” **International Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 1, p. 8–14, 2008. DOI: 10.7150/ijbs.4.8.

SHINOZAKI, K.; UEMURA, M.; BAILEY-SERRES, J.; BRAY, E. A.; WERETILNYK, E. Responses to Abiotic Stress. **Biochemistry & molecular biology of plants**. Chichester, West Sussex ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, p. 1051-1100, 2015.

SILVA, A. C.; VASCONCELOS, P. L. R.; MELO, L. D. F. A.; SILVA, V. S. G.; JÚNIOR, J. L. M. A.; SANTANA, M. B. Diagnóstico da produção de feijão-caupi no Nordeste Brasileiro. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 16, n. 2, p. 1-5, 2018. DOI: 10.5892/ruvrd.v16i2.4380.

SILVA, A. F. Populações de alfa e beta-rizóbios de feijão-caupi naturalmente estabelecidas em solos do semiárido tropical. **Tese (Doutorado em Ciência Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco**. Recife, PE. 2019.

SILVA, F. H. A. D.; TORRES, S. B.; CARVALHO, S. M. C.; BAI, M.; LOPES, W. D. A. R. Physical and physiological attributes of saved cowpea seeds used in the brazilian semiarid region. **Revista Caatinga**, v. 32, n. 1, p. 113-120, 2019. DOI: 10.1590/1983-21252019V32N112RC

SILVA, T. G. F.; ARAÚJO PRIMO, J. T.; MOURA, M. S. B.; SILVA, S. M. S.; MORAIS, J. E. F.; PEREIRA, P. C.; SOUZA, C. A. A. Soil water dynamics and evapotranspiration of forage cactus clones under rainfed conditions. **Pesqui. Agropecu. Bras**, v. 50, p. 515–525, 2015. DOI:<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2015000700001>

SILVA, V. N.; SILVA, L. E. S. F.; FIGUEIREDO, M. V. B. Atuação de rizóbios com rizobactéria promotora de crescimento em plantas na cultura do caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). **Acta Scienciarum Agronomy**, v. 28, n. 3, p. 407-412, 2006.

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.; eds. **Microbial Ecology of Tropical Soils**. Nova Science Publishers Inc, 2011.

SIMÕES, W. L.; OLIVEIRA, A. R.; REIS, V. M.; PEREIRA, W.; LIMA, J. A. Aplicação de bactérias diazotróficas via sistema de irrigação para fixação biológica de nitrogênio na cana-de-açúcar. **Revista Energia na Agricultura**, v. 33, n. 1, p. 45-51 2018. DOI: 10.17224/EnergAgric.2018v33n1p45-51.

SINGH, S.; SINGH, V.; PAL, K. Importance of microorganisms in agriculture. **Climate and Environmental changes: Impact, Challenges and Solutions**, v. 1, p. 93-117, 2017.

SOUZA, J. S.; MARTINS, A. F.; PEDROSA, L. M. Importância de bactérias fixadoras de nitrogênio no cultivo do feijão-caupi *Vigna unguiculata* L. (walp). **Scientific Electronic Archives**, v. 14, n. 9, 2021. DOI:10.36560/14920211456.

SUDHAKAR, C.; LAKSHMI, A.; GIRIDARAKUMAR, S. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. **Plant Science**, v. 161, p. 613-619, 2001. DOI: 10.1016/S0168- 9452(01)00450-2

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3ed. Porto Alegre, RS: Artmed, p. 719, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. OLIVEIRA, P. L. Porto Alegre, RS: Artmed, 2017.

TAUSEEF, A.; HISAMUDDIN, GUPTA, J.; REHMAN, A.; USSIN, I. Differential response of cowpea towards the CuO nanoparticles under *Meloidogyne incognita* stress. **South African Journal of Botany**, v. 139, p. 175–182, 2021. DOI:10.1016/j.sajb.2021.02.017.

VARMA, A.; TRIPATHI, S.; PRASAD, R. *Plant Biotic Interactions*. **Springer**, 2019. DOI: 10.1007/978-3-030-26657-8

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323- 1338, 2007. DOI: 10.1590/S0100-40422007000500046.

YAMAUCHI, Y.; FURUTERA, A.; SEKI, K.; TOYODA, Y.; TANAKA, K.; SUGIMOTO, Y. Malondialdehyde generated from peroxidized linolenic acid causes protein modification in heat-stressed plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 8-9, p. 786–793, 2008.

ZILLI, J. É.; MARSON, L. C.; MARSON, B. F.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de

feijão-caupi em Roraima. **Revista ACTA Amazônica**, v. 39, n. 4, p. 749-757, 2009. DOI: 10.1590/S0044-59672009000400003

ZHENG, H; LIU, W; LIU, S; LIU, C; ZHENG, L. Effects of melatonin treatment on the enzymatic browning and nutritional quality of fresh-cut pear fruit. **Food Chemistry**, v. 299, p.125-116, 2019. DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2019.125116.

ZIMMERMANN, P.; HEINLEIN, C.; ORENDI, G.; ZENTGRAF, U. Senescencespecific regulation of catalases in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. **Plant, Cell and Environment**, v. 29, n. 6, p. 1049–1060, 2006.